

明 細 書

発明の名称：

標的RNAを編集するための機能性領域を付加したアンチセンス型ガイドRNA

技術分野

[0001] 本発明は、ADARを誘導して標的RNA編集を行うためのガイドRNA、特に、機能性領域を付加したアンチセンス型ガイドRNAに関する。

背景技術

[0002] 生体内では一塩基変異によるRNA編集機構が存在する。特に、アデノシンの脱アミノ化によってイノシンへ変換するAからIへのRNA編集は最も多く認められ、標的となるRNAの数は400万にもものぼる。二本鎖RNAを基質としてアデノシンからイノシンへの変換を行う酵素として、ADAR (Adenosine deaminases acting on RNA) が知られている。ADARには遺伝子の異なる3つのサブタイプ (ADAR1、ADAR2、ADAR3) が存在しており、ADARは、そのN末端には二本鎖RNA結合ドメインを、C末端にはデアミナーゼドメインを有する。ADAR2は、特に中枢神経系において、3-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 型グルタミン酸受容体を構成するサブユニットのGluR2を高い効率で編集する (Nature、1996、Vol. 379、p. 460-464)。アデノシンから変換されたイノシンは、グアノシンと類似の構造であることから、翻訳の段階ではグアノシンと認識されるため、結果としてコード領域にアミノ酸の変異を導入する場合がある。非コード領域のADARの基質としては、レトロトランスポゾン (FEBS Letters、2006、Vol. 580、p. 2301-2305) やマイクロRNA (miRNA) 前駆体も報告されており、ADARが生体内で多様な機能を担っている可能性が示唆されている (Annu. Rev. Biochem.、2010、Vol.

79、p. 321-349)。

[0003] 人工的に変異を導入したADARの改変体も報告されている。例えば、ADARに変異を入れることにより、アデノシンだけでなくシチジンも認識でき、シチジンの脱アミノ化によってウリジンへ変化するCからUへのRNA編集も行うことができる、ADARの改変体が報告されている (Science、2019、Vol. 365、p. 382-386)。

[0004] 近年、野生型ADARと人工ガイドRNAを用いたRNA編集として、Glur2由来のADARリクルート塩基配列を含む標的RNAを編集するためのガイドRNAがいくつか報告されている (国際公開第2016/097212号、国際公開第2017/050306号、国際公開第2017/010556号、国際公開第2019/111957号、Nucleic Acids Research、2017、Vol. 45、p. 2797-2808、Nature Methods、2019、Vol. 16、p. 239-242)。

[0005] また、人工合成核酸であるアンチセンスオリゴヌクレオチドをガイドRNAとして用いたRNA編集技術として、編集標的のアデノシンを含むmRNAに相補的な35塩基以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用い、mRNAと不完全ヘリックス構造の二本鎖を形成してADARをリクルートすることで、標的RNAを編集する技術も報告されている (特許文献1~3)。さらに100塩基以上の人工RNAを用いてADARによる標的RNAの編集を誘導できることも報告されている (非特許文献1)。加えて、ADAR1デアミナーゼドメイン-MS2コートタンパク質 (MCP) の融合タンパク質と、アンチセンス-MS2 RNAのコンジュゲートシステムによる標的RNAの編集も報告されている (非特許文献2)。

[0006] このように、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたRNA編集についてはいくつかの報告がある。しかし、標的RNA編集ガイドRNAを医薬品として使用するためには、細胞で一定の編集効率を示すことが必要であるが、編集効率の高いRNA編集技術については十分に検討されていない。

[0007] 一方、核内低分子RNA (snRNA: small nuclear RNA)、リボソームRNA (rRNA: ribosomal RNA)、グアニン四重鎖構造やステムループ構造等の高次構造を有するRNA等の各種の機能を有するRNA配列が知られており、そのいくつかについては、ガイドRNA等のRNA又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに付加することも報告されている。

[0008] 真核生物において、snRNAは、リボ核タンパク質(RNP)を介して前駆体メッセンジャーRNA(pre-mRNA)のスプライシングやプロセシングに作用する。特に5種類のsnRNP(U1、U2、U4、U5、U6)はスプライシングに関わるスプライソソームを構成しており、snRNAは真核生物のほぼすべての細胞で大量かつ安定に発現している(Biological Chemistry、2018、Vol. 399、p. 1265-1276)。

[0009] U6 snRNAは、すべてのヒト細胞において安定かつ大量に発現し、核内でリボ核タンパク質U6 snRNPを形成する。U6 snRNPはスプライソソームを構成して、RNA前駆体におけるスプライシングを制御する。U6 snRNA遺伝子上流の転写開始エレメントは、任意のRNA(リボザイム、アンチセンスリボ核酸、RNAアプタマーなど)を発現させる強力なポリメラーゼIII(poly III)型プロモーターとして知られている(非特許文献3)。非特許文献3～5では、U6をコードする配列で作られる低分子RNA(small RNA)発現カセット(以下、非特許文献3～5に記載のU6をコードする配列を含む発現カセットを「U6カセット」と称する)は、U6配列の高次構造が機能して、挿入したRNAを核内に局在させることが報告されている。U6カセットはsmall RNAを安定かつ強力に発現させる工夫として、poly(U)ターミネーター配列の直前に人工ステムループ配列を含む。RNA配列UNCGで形成するテトラループを含む人工ステムループ配列は、熱力学的に最も安定したステムループ構造をとる(Nucleic Acids Research、19

91、Vol. 19、p. 5901-5905)。安定したステムループ構造は3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対する耐性を示して、U6カセットの転写産物を安定化させることが示唆されている（非特許文献3～5）。

[0010] U1 snRNAはスプライシングドナー配列（エクソンの3'とイントロンの5'のジャンクション）と相補的な配列とクローバー様構造をとる配列から成る。U1 snRNAのスプライシングドナー配列を標的遺伝子のアンチセンス配列に置き換えたキメラU1 snRNAは、エキソンスキッピングを誘導できることが知られている（Mol. Ther.、2010、Vol. 18、p. 1675-1682、Proc. Nat. Acad. Sci.、2002、Vol. 99、p. 9456-9461）。U1 snRNA遺伝子上流400塩基の配列はpol III型プロモーターを含み、キメラU1 snRNAの転写にも用いられる（Mol. Ther.、2004、Vol. 10、p. 191-199）。

[0011] U7 snRNAはヒストンpre-mRNAのプロセッシングを担う。U7 snRNAはヒストン3のpre-mRNAの相補配列、Smタンパク質結合サイト、及びステムループ配列から成る。Smタンパク質結合サイトは変異を加えることで、本来のLsmタンパク質ではなくスプライソソームを形成するD1、D2タンパク質との結合能を有するようになる（Cell Mol. Life Sci.、2004、Vol. 61、p. 2560-2570）。標的遺伝子のアンチセンス配列、変異Smタンパク質結合サイト、及びステムループ配列で構成される変異キメラU7 snRNAは、エキソンスキッピングを誘導できることが報告されている（Nat. Med.、2014、Vol. 20、p. 992-1000）。U7 snRNA遺伝子上流270塩基の配列はポリメラーゼII（pol II）型プロモーターを含み、変異キメラU7 snRNAの転写にも用いられる（Science、2004、Vol. 306、p. 1796-1799）。

[0012] リボソームは細胞内でタンパク質を合成する細胞小器官であり、2つのサブユニットで構成される。真核生物の大サブユニットは28S、5.8S、

及び5SのrRNAと種々のタンパク質から成り、核小体で集合した後細胞質へ輸送される。5S rRNAは、5つのヘリックスと5つのループから成る二次構造をとる。非特許文献5では、5S rRNA配列を含むアンチセンス配列の発現カセットを使用して、5S遺伝子上流のp o l l l l型プロモーターから5S rRNAと連結したアンチセンス配列を転写すると、細胞質に局在することが報告されている（以下、非特許文献5に記載の5S rRNAを含む発現カセットを「5Sカセット」と称する）。5SカセットはU6カセットと同様に、ターミネーター配列の直前に人工ステムループ配列を持つ。

[0013] グアニン四重鎖（Gq : G-quadruplex）構造は、生体内の環境において、熱力学的に安定であるDNA又はRNA高次構造として知られている、グアニンを含む繰り返し配列である。高次構造の形成には一価陽イオンを必要とする。Gqは、もともとテロメアにみられる配列として報告された（Cell、1989、Vol. 59、p. 871-880）。Gqの機能としては、転写翻訳やエピゲノム制御などが知られている（EMBO Reports、2015、Vol. 16、p. 910-922）。Cas9のガイドRNAに対しては、その3'末端にGqを付加することで、ゲノム編集効率が向上することが報告されている（非特許文献6）。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドにGqを付加することで、RNA分解酵素による遺伝子発現抑制の効率を上昇させることが報告されている（特許文献4）。

[0014] small RNAに認められる核酸の高次構造であるステムループ構造は、翻訳調節機能に寄与することが知られている（Cell. Mol. Life Sci.、2006、Vol. 63、p. 901-908）。λファージ由来のBox B配列はステムループ構造をとり、λNタンパク質と強力なアフィニティを示す（Biol. Cell.、2008、Vol. 100、p. 125-138、J. Am. Chem. Soc.、2002、Vol. 124、p. 10966-10967）。この性質を利用して、ガイドR

NAにADARをリクルートさせるために、ガイドRNAにB_o×B配列を付加し、ADARにλNタンパク質を融合させることが報告されている（非特許文献7）。また、特許文献5には、GluR2の配列に基づき設計されたガイドRNAを安定化させるために、ガイドRNAの3'末端にB_o×B配列を付加できることが記載されているが、非特許文献8には、ガイドRNAへのB_o×B配列の付加による安定化の効果は微小であったことが記載されている。

[0015] このように、各種の機能を有するRNA配列が報告されているが、標的RNAを編集するガイドRNAの編集活性に寄与するために機能を有するRNA配列を付加することは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0016] 特許文献1：国際公開第2017/220751号
特許文献2：国際公開第2018/041973号
特許文献3：国際公開第2018/134301号
特許文献4：国際公開第2017/188898号
特許文献5：国際公開第2017/050306号

非特許文献

- [0017] 非特許文献1：Nat. Biotechnol.、2019、Vol. 37、p. 1059-1069
非特許文献2：Protein Eng. Des. Sel.、2018、Vol. 1、p. 471-478
非特許文献3：Gene Ther.、1997、Vol. 4、p. 45-54
非特許文献4：Nat. Biotechnol.、2002、Vol. 20、p. 505-508
非特許文献5：Mol. Ther.、2003、Vol. 7、p. 237-247

非特許文献6: Chem. Commun.、2018、Vol. 54、p. 2377-2380

非特許文献7: Nucleic Acids Research、2016、Vol. 44、p. e157

非特許文献8: Nucleic Acids Research、2017、Vol. 45、p. 2797-2808

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0018] 標的RNAをADARにより編集するためのアンチセンス型ガイドRNA及びそれをコードする核酸を提供する。

課題を解決するための手段

[0019] 本発明者らは、ADARを誘導して標的RNA編集を行うためのガイドRNAについて鋭意検討した結果、少なくとも1つの機能性領域が連結されたアンチセンス領域を含み、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAが細胞で高い編集効率を示すことを知見して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下の[1]～[23]に関する。

[1] 標的RNAをADARにより編集するためのガイドRNAであって、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNA。

[2] 少なくとも1つの機能性領域がアンチセンス領域に直接結合されている又はリンカーを介して連結されている、[1]に記載のガイドRNA。

[3] アンチセンス領域が、標的RNAとミスマッチ塩基対を形成する塩基を有する、[1]又は[2]に記載のガイドRNA。

[4] 機能性領域が、ガイドRNAの安定化、ガイドRNAの核への局在、ガイドRNAの細胞質への局在、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形

成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、及び標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化からなる機能のいずれか1以上の機能を有する塩基配列からなる領域である、[1]～[3]のいずれか1つに記載のガイドRNA。

[5] 機能性領域が、snRNA配列からなる領域、rRNA配列からなる領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである、[1]～[4]のいずれか1つに記載のガイドRNA。

[6] 機能性領域が、snRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、[5]に記載のガイドRNA。

[7] snRNA配列からなる領域が、U6 snRNA配列からなる領域、U1 snRNA配列からなる領域、又はU7 snRNA配列からなる領域である、[6]に記載のガイドRNA。

[8] 機能性領域が、rRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、[5]に記載のガイドRNA。

[9] rRNA配列からなる領域が5S rRNA配列からなる領域である、[8]に記載のガイドRNA。

[10] 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらの組み合わせである、[5]に記載のガイドRNA。

[11] アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるさらなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、[1]～[5]のいずれか1つに記載のガイドRNA。

[12] ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域及びアンチセンス領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、[1]～[5]のいずれか1つに記載のガイドRNA。

[13] [1]～[12]のいずれか1つに記載のガイドRNA及びADARを含む、標的RNAを編集するシステム。

[14] [1]～[12]のいずれか1つに記載のガイドRNAをコードする核酸。

[15] [1]～[12]のいずれか1つに記載のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター。

[16] さらにADARをコードする核酸を含む、[15]に記載の発現ベクター。

[17] ADARが、ADAR1又はADAR2である、[16]に記載の発現ベクター。

[18] [15]～[17]のいずれか1つに記載の発現ベクターが導入された宿主細胞。

[19] [18]に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、発現ベクターを製造する方法。

[20] [15]～[17]のいずれか1つに記載の発現ベクター及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[21] [15]に記載の発現ベクター、ADARをコードする核酸を含む発現ベクター、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

[22] [1]～[12]のいずれか1つに記載のガイドRNAをコードする核酸を細胞又はウイルス等に導入する工程を含む、標的RNAを編集する方法。

[23] 標的RNAをADARにより編集するためのポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的

RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチド。

発明の効果

[0020] 機能性領域を付加したアンチセンス型ガイドRNAは、標的RNAを編集するためのガイドRNAとして使用できる。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明について以下に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。本明細書中で使用される用語が具体的に定義されていない場合、当該用語は、当業者に一般的に受け入れられている意味で使用される。

[0022] <本発明のガイドRNA>

本発明は、標的RNAをADARにより編集するためのガイドRNAであって、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNA（以下、「本発明のガイドRNA」とも称する）を提供する。本発明において、「標的RNAをADARにより編集するためのガイドRNA」とは、該標的RNAの一部に相補的で該標的RNAと二本鎖を形成する領域を有し、ADARを標的RNAに誘導するRNA分子をいう。

[0023] 1. 標的RNA

本発明において、「標的RNA」とは、本発明のガイドRNAによる編集の標的となるRNAをいう。該標的RNAの一部には、イノシンに変換されるアデノシン又はウリジンに変換されるシチジンが含まれる。ある態様では、標的RNAは、アデノシンを含み、該アデノシンがイノシンに変換されることで細胞機能及び／又は遺伝子発現が制御されうる、任意のRNA配列である。別の態様では、標的RNAは、シチジンを含み、該シチジンがウリジンに変換されることで細胞機能及び／又は遺伝子発現が制御されうる、任意

のRNA配列である。ここで、細胞機能が制御されうるとは、標的RNAを有する細胞におけるRNAの機能、翻訳、タンパク質の機能が変化することにより該細胞の機能が制御されうることという。遺伝子発現が制御されうるとは、標的RNAを有する遺伝子の発現が制御されうることという。標的RNAは、エクソン(exon)、イントロン(intron)、エクソン中のコーディング領域又は各種非翻訳領域(例えば、レトロトランスポゾン、マイクロRNA(miRNA: microRNA)、転移RNA(tRNA: transfer RNA)、リボソームRNA(rRNA: ribosomal RNA)等)を含むRNA内に存在しうる。標的RNAは、真核細胞、哺乳動物細胞、ウイルス、原核細胞、バクテリア、ファージ等に含まれるRNA内に存在しうる。

[0024] 2. アンチセンス領域

本発明のガイドRNAは、アンチセンス領域を含む。本発明において、「アンチセンス領域」とは、標的RNAの一部に相補的な塩基配列を有し、標的RNAと二本鎖を形成する配列からなる領域をいう。アンチセンス領域を構成する塩基配列の長さは、ある態様では、10塩基～100塩基、10塩基～80塩基、10塩基～60塩基、10塩基～40塩基であり、ある態様では、15塩基～40塩基であり、ある態様では、10塩基～38塩基、ある態様では、15～38塩基、ある態様では、18～38塩基である。ある態様では、アンチセンス領域は、標的RNAとミスマッチ塩基対を形成する塩基又はゆらぎ塩基対を形成する塩基を含んでいてもよい。ある態様では、アンチセンス領域は、標的RNAとミスマッチ塩基対を形成する塩基を含んでいてもよい。

[0025] 本明細書において「ミスマッチ塩基対」とは、G-A、C-A、U-C、A-A、G-G、C-C、U-U塩基対である。本明細書において「ゆらぎ塩基対」とは、G-U、I-U、I-A、I-C塩基対である。アンチセンス領域は、ある態様では、該標的RNAの一部に含まれるアデノシン又はシチジンとミスマッチ塩基対を形成する塩基を有し、標的RNAと二本鎖を形

成する塩基配列からなる領域である。ある態様では、アンチセンス領域は、該標的RNAの一部に含まれるアデノシンとミスマッチ塩基対を形成する塩基を有し、標的RNAと二本鎖を形成する塩基配列からなる領域である。ある態様では、アンチセンス領域は、該標的RNAの一部に含まれるアデノシンとミスマッチ塩基対を形成する塩基であるシチジンを有し、標的RNAと二本鎖を形成する塩基配列からなる領域である。

[0026] アンチセンス領域を構成する塩基配列は、標的RNAの配列、塩基長、標的RNAと形成するミスマッチ塩基の位置、オフターゲット効果等を考慮して、当業者が適宜設計することが可能である。アンチセンス領域を構成する塩基配列は、ADARによる標的RNAのアデノシン又はシチジンへ編集効率を向上させるために、該アデノシン又はシチジンとミスマッチ塩基対又はゆらぎ塩基対を形成するように設計することもできる（RNA、2001、Vol. 7、p. 846-858、Nat. Biotechnol.、2019、Vol. 37、p. 1059-1069）。

[0027] 本明細書において「ASR」とは、アンチセンス領域（Antisense Region）を意味する。

[0028] 3. 機能性領域

本発明のガイドRNAは、少なくとも1つの機能性領域を含む。本発明において、「機能性領域」とは、ガイドRNAの安定化、ガイドRNAの核への局在、ガイドRNAの細胞質への局在、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化などの機能のいずれか1以上の機能を有する塩基配列からなる領域をいう。ある態様では、機能性領域は、ガイドRNAの安定化、ガイドRNAの核への局在、ガイドRNAの細胞質への局在、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、及び標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化からなる機能のいずれか1以上の機能を有する塩基配列からなる領域である。

[0029] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、(a)ガイドRNAの安定化を促進する塩基配列からなる領域、(b)ガイドRNAの核への局在を促進する塩基配列からなる領域、(c)ガイドRNAの細胞質への局在を促進する塩基配列からなる領域、(d)標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成を促進する塩基配列からなる領域、(e)アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成を阻害する塩基配列からなる領域、又は(f)標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化を促進する塩基配列からなる領域、或いは前記(a)～(f)に記載された機能のいずれか2以上の機能を有する塩基配列からなる領域を含む。機能性領域がこれらの1以上の機能を有することを、まとめて「機能を有する」と称することがある。また、(a)、(b)、及び(d)に記載された機能を有することをまとめて「snRNA配列の機能を有する」と称することがある。(a)及び(c)に記載された機能を有することをまとめて「rRNA配列の機能を有する」と称することがある。

[0030] 本明細書において、「ガイドRNAの安定化を促進する」とは、RNA分解酵素への耐性を付与することをいう。該機能は、公知の方法により、RNA分解酵素存在下でのガイドRNAの残存量、細胞へのガイドRNAをコードする核酸の導入後の転写阻害下での細胞内のガイドRNAの残存量等を測定することにより評価することができる。例えば、実施例10に記載の方法で評価することができる。「ガイドRNAの核への局在を促進する」とは、細胞へ導入されたガイドRNAの核への移行及び局在を促進することをいう。該機能は、公知の方法により、ガイドRNAの細胞内での分布や量を検出することにより評価することができる。例えば、インサイチュハイブリダイゼーション(in situ hybridization) (Mol. Ther., 2003, Vol. 7, p. 237-247)により確認することができる。「ガイドRNAの細胞質への局在を促進する」とは、細胞へ導入されたガイドRNAが細胞質にとどまることを促進することをいう。該機能は、公知の方法により、ガイドRNAの細胞内での分布や量を検出するこ

とにより評価することができる。例えば、インサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization) (Mol. Ther., 2003, Vol. 7, p. 237-247) により確認することができる。「標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成を促進する」とは、標的RNAとアンチセンス領域の親和性を向上させることをいう。該機能は、公知の方法により、アフィニティアッセイにより評価できる (BMC Biotech., 2008, Vol. 8, article number 48)。「アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成を阻害する」とは、非特異的な二本鎖形成 (以下、「オフターゲット効果」とも称する) を軽減することをいう。該機能は、RNAシーケンス等の公知の方法により評価することができる (Nat. Biotechnol., 2019, Vol. 37, p. 657-666)。「標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化を促進する」とは、標的RNAとアンチセンス領域で形成される二本鎖を含む複合体の状態が維持されることをいう。該機能は、公知の方法により、DNA/RNAハイブリッド鎖のRNAを分解するRNA分解酵素存在下で、標的RNAとアンチセンス領域で形成される二本鎖の残存量を測定することにより評価することができる。例えば、RNase Hの存在下での標的RNAとDNA配列からなるガイドRNAで形成される二本鎖の残存量を測定することにより評価することができる (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol. 7, p. 86-93)。

[0031] ある態様では、ガイドRNAの安定化を促進する塩基配列からなる領域は、熱力学的に安定化する高次構造を形成する塩基配列からなる領域である。熱力学的に安定化する高次構造は、ヌクレアーゼ活性に耐性を示す構造であれば特に限定されない。ある態様では、ガイドRNAの安定化を促進する塩基配列からなる領域は、核内低分子RNA (snRNA: small nuclear RNA) 配列からなる領域、リボソームRNA (rRNA: ribosomal RNA) 配列からなる領域、二重鎖構造を形成する塩基

配列からなる領域、三重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域等である。ある態様では、ガイドRNAの安定化を促進する塩基配列からなる領域は、snRNA配列からなる領域、グアニン四重鎖（Gq : G-quadruplex）構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0032] ある態様では、ガイドRNAの核への局在を促進する塩基配列からなる領域は、低分子RNA（small RNA）由来の塩基配列からなる領域である。ある態様では、ガイドRNAの核への局在を促進する塩基配列からなる領域は、snRNA配列からなる領域である。

[0033] ある態様では、ガイドRNAの細胞質への局在を促進する塩基配列からなる領域は、small RNA由来の塩基配列からなる領域である。ある態様では、ガイドRNAの細胞質への局在を促進する塩基配列からなる領域は、ガイドRNAのリボソームへの局在を促進する塩基配列からなる領域であり、ある態様では、rRNA配列からなる領域である。ある態様では、ガイドRNAの細胞質への局在を促進する塩基配列からなる領域は、転移RNA（tRNA : transfer RNA）配列からなる領域である。ある態様では、ガイドRNAの細胞質への局在を促進する塩基配列なる領域は、シグナル認識粒子（Signal Recognition Particle : SRP）由来RNA配列である7SL RNA配列からなる領域である。

[0034] ある態様では、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成を促進する塩基配列からなる領域は、熱力学的及び立体構造的に二本鎖及び二本鎖を含む複合体の形成を促進する塩基配列からなる領域である（Nat. Biotechnol.、2019、Vol. 37、p. 657-666）。ある態様では、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成を促進する塩基配列からなる領域は、snRNA配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである。あ

る態様では、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成を促進する塩基配列からなる領域は、U6 snRNA配列からなる領域、U1 snRNA配列からなる領域、U7 snRNA配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである。

[0035] ある態様では、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成を阻害する塩基配列からなる領域は、熱力学的及び立体構造的にオフターゲット効果を軽減する塩基配列からなる領域である。ある態様では、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成を阻害する塩基配列からなる領域は、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である (Chem. Commun., 2018, Vol. 54, p. 2377-2380)。

[0036] ある態様では、標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化を促進する塩基配列からなる領域は、熱力学的及び立体構造的に二本鎖及び二本鎖を含む複合体が安定化して、ヌクレアーゼ活性に耐性を示す塩基配列からなる領域である (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol. 7, p. 86-93)。ある態様では、標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化を促進する塩基配列からなる領域は、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0037] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、snRNA配列からなる領域、rRNA配列からなる領域、グアニン四重鎖 (Gq: G-quadruplex) 構造を形成する塩基配列からなる領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、SRP由来RNA配列からなる領域、長鎖非コードRNA (lncRNA: long non-coding RNA) 配列からなる領域、tRNA配列からなる領域、核小体低分子RNA (snRNA: small nucleolar RNA) 配列からなる領域、又はmiRNA配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせを含む。本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域と

して、s n R N A配列からなる領域、r R N A配列からなる領域、G q構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせを含む。

[0038] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、s n R N A配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、s n R N A配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。s n R N A配列からなる領域と組み合わせて用いることができるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域は、ある態様としては、人工ステムループ配列からなる領域である。人工ステムループ配列とは、人工的に作製されたステムループ構造を形成する配列であり、例えば、U6カセット又は5Sカセットに含まれる人工ステムループ配列（本明細書中、「STL配列」と称する）（Gene Ther., 1997, Vol. 4, p. 45-54, Nat. Biotechnol., 2002, Vol. 20, p. 505-508, Mol. Ther., 2003, Vol. 7, p. 237-247）が挙げられる。s n R N A配列からなる領域と組み合わせて用いることができるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域は、ある態様としては、STL配列からなる領域である。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、s n R N A配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、s n R N A配列からなる領域及びSTL配列からなる領域を含む。

[0039] 本発明で使用されるs n R N A配列からなる領域は、当業者に周知のs n R N Aの塩基配列から構成される領域であり、s n R N A配列の機能を有する限り、天然のs n R N Aの塩基配列において部分的に改変を含んでもよく、及び/又はs n R N A配列の機能を有する限り、天然のs n R N Aの塩基配列の部分配列であってもよい。例えば、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U1 s n R N A配列、U2 s n R N A配列、U4 s n R N A配列、U5 s n R N A配列、U6 s n R N A配列、U7 s n R N A

配列、U11 snRNA配列、U12 snRNA配列、U4atac snRNA配列、又はU6atac snRNA配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせを含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U1 snRNA配列、U2 snRNA配列、U4 snRNA配列、U5 snRNA配列、U6 snRNA配列、又はU7 snRNA配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせを含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U6 snRNA配列からなる領域、U1 snRNA配列からなる領域、又はU7 snRNA配列からなる領域を含む。

[0040] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、U6 snRNA配列からなる領域、U1 snRNA配列からなる領域、又はU7 snRNA配列からなる領域、及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U6 snRNA配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U6 snRNA配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U6 snRNA配列からなる領域及びSTL配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U1 snRNA配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U1 snRNA配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U1 snRNA配列からなる領域及びSTL配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U7 snRNA配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U7 snRNA配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域を含む。

含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、U7 snRNA配列からなる領域及びSTL配列からなる領域を含む。

[0041] 本発明で使用するU6 snRNA配列からなる領域は、U6 snRNAの塩基配列から構成される領域であり、snRNA配列の機能を有する限り、天然のU6 snRNAの塩基配列において部分的に改変を含んでもよく、及び/又はsnRNA配列の機能を有する限り、天然のU6 snRNAの部分配列であってもよい。ある態様では、本発明で使用するU6 snRNA配列からなる領域は、U6 snRNAの塩基配列の部分配列からなる領域であり、ある態様では、U6 snRNAの塩基配列の転写開始点から27塩基目までの塩基配列からなる領域である。本発明のガイドRNAにおいて、U6 snRNA配列からなる領域は、snRNA配列の機能を有する限り、人工ステムループ配列からなる領域と合わせて使用してもよい。U6 snRNA配列からなる領域と人工ステムループ配列からなる領域を使用する場合、U6 snRNA配列からなる領域と人工ステムループ配列からなる領域の間にアンチセンス領域を挿入する。本発明で使用するU6 snRNA配列からなる領域は、ある態様では、配列番号1に示される塩基配列、又は、配列番号1に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び/若しくは付加された塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である。本発明で使用する人工ステムループ配列からなる領域は、ある態様では、STL配列からなる領域であり、ある態様では、配列番号2に示される塩基配列、又は、配列番号2に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び/若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0042] 本発明で使用するU1 snRNA配列からなる領域は、U1 snRNAの塩基配列から構成される領域であり、snRNA配列の機能を有する限り、天然のU1 snRNAの塩基配列において部分的に改変を含んでもよく、及び/又はsnRNA配列の機能を有する限り、天然のU1 snRNA

Aの部分配列であってもよい。本発明のガイドRNAにおいて、U1 snRNA配列からなる領域は、snRNA配列の機能を有する限り、アンチセンス領域をU1 snRNA配列に連結して使用してもよく、又はアンチセンス領域をU1 snRNA配列に挿入して使用してもよい。アンチセンス領域をU1 snRNA配列に挿入する場合は、U1 snRNA配列を任意の2つの領域に分けて、その間にアンチセンス領域を挿入する。U1 snRNA配列へのアンチセンス領域の挿入は、U1 snRNA配列の一部をアンチセンス領域で置換して行ってもよい。ある態様では、U1 snRNA配列の塩基配列の転写開始点から3塩基目から10塩基目まで塩基配列をアンチセンス領域に置換することができる。U1 snRNA配列へのアンチセンス領域の挿入は、ある態様では、U1 snRNA配列の塩基配列の転写開始点から3塩基目から10塩基目の8塩基が欠失した塩基配列からなるU1 snRNA配列の転写開始点から3塩基目にアンチセンス領域を挿入することができる。本発明で使用されるU1 snRNA配列からなる領域は、ある態様では、配列番号3に示される塩基配列、又は、配列番号3に示される塩基配列において1～20塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である。ある態様では、配列番号3に示される塩基配列において転写開始点から3塩基目から10塩基目の8塩基が欠失した塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である。

[0043] 本発明で使用されるU7 snRNA配列からなる領域は、U7 snRNAの塩基配列から構成される領域であり、snRNA配列の機能を有する限り、天然のsnRNAの塩基配列において部分的に改変を含んでもよく、及び/又はsnRNA配列の機能を有する限り、天然のU7 snRNAの部分配列であってもよい。ある態様では、本発明で使用されるU7 snRNA配列からなる領域は、U7 snRNAの塩基配列の部分配列からなる領域である。ある態様では、本発明で使用されるU7 snRNA配列からなる領域は、U7 snRNAの塩基配列の部分配列からなる領域であり、あ

る態様では、S mタンパク質結合サイト（S m OPT配列）及びU 7 s n RNAのステムループ配列を含むU 7 s n RNA配列からなる領域である。本発明のガイドRNAにおいて、U 7 s n RNA配列からなる領域は、s n RNA配列の機能を有する限り、アンチセンス領域をU 7 s n RNA配列に連結して使用してもよく、又はアンチセンス領域をU 7 s n RNA配列に挿入して使用してもよい。本発明で使用されるU 7 s n RNA配列からなる領域は、配列番号4に示される塩基配列、又は、配列番号4に示される塩基配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、s n RNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である。

[0044] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、r RNA配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、r RNA配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。

[0045] 本発明で使用されるr RNA配列からなる領域は、当業者に周知のr RNAの塩基配列から構成される領域であり、r RNA配列の機能を有する限り、天然のr RNAの塩基配列において部分的に改変を含んでもよい。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、真核生物のr RNA配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、28S r RNA配列、18S r RNA配列、5.8S r RNA配列、5S r RNA配列、ミトコンドリア12S r RNA配列、又はミトコンドリア16S r RNA配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせを含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、5S r RNA配列からなる領域を含む。

[0046] 本発明で使用される5S r RNA配列からなる領域は、5S r RNAの塩基配列から構成される領域であり、r RNA配列の機能を有する限り、天然の5S r RNAの塩基配列において部分的に改変を含んでもよい。本発明のガイドRNAにおいて、5S r RNA配列からなる領域は、r RN

A配列の機能を有する限り、人工ステムループ配列からなる領域と合わせて使用してもよい。5 S r R N A配列からなる領域と人工ステムループ配列からなる領域を使用する場合、5 S r R N A配列からなる領域と人工ステムループ配列からなる領域の間にアンチセンス領域を挿入する。本発明で使用される5 S r R N A配列からなる領域は、ある態様では、配列番号5に示される塩基配列、又は、配列番号5に示される塩基配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、r R N A配列の機能を有する塩基配列からなる領域である。本発明で使用される人工ステムループ配列からなる領域は、ある態様では、配列番号2に示される塩基配列、又は、配列番号2に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0047] ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらの組み合わせを含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む。

[0048] 本発明で使用されるグアニン四重鎖構造（Gq構造）を形成する塩基配列からなる領域はGq配列を含む。Gq配列とは、連続するグアニンからなる繰り返し単位を4個含む配列であり、4つのグアニンが平面上の四重鎖（Gq）構造を形成する配列である。グアニンからなる繰り返し単位同士の間には、Gq構造を維持する限りグアニン以外の塩基を含んでいてよい。ある態様では、Gq配列は、1、2、3、又は4個の連続するグアニンからなる繰り返し単位を含み、それぞれ、1、2、3、又は4層のGqを形成する。ある態様では、Gq配列は、3個の連続するグアニンからなる繰り返し単位を含み、3層のGqを形成する。これを「3層のグアニン四重鎖構造」（以下

、「3 G q」とも称する）と称する。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、3 G qを形成する塩基配列からなる領域を含み、ある態様では、3 G qを形成する塩基配列からなる領域は、配列番号6に示される塩基配列、又は、配列番号6に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、G q構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0049] ステムループ構造は、ヘアピン構造とも称し、当該技術分野において周知である。ステムループ構造を形成する塩基配列としては、アプタマー配列（*Int. J. Biochem. Mol. Biol.*、2013、Vol. 4、p. 27-40、国際公開第2016/143700号）、Box B配列由来の配列、MS2配列由来の配列、PP7配列由来の配列（*Integr. Biol.*、2009、Vol. 1、p. 499-505、*Nucleic Acids Research*、2016、Vol. 44、p. 9555-9564）、人工ステムループ配列（例えば、U6カセット又は5Sカセットに含まれる人工ステムループ配列（STL配列）（*Gene Ther.*、1997、Vol. 4、p. 45-54、*Nat. Biotechnol.*、2002、Vol. 20、p. 505-508、*Mol. Ther.*、2003、Vol. 7、p. 237-247））等が挙げられる。

[0050] ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含み、該ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域は、Box B配列由来の配列、アプタマー配列、MS2配列由来の配列、PP7配列由来の配列、又は人工ステムループ配列（例えば、STL配列）からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、Box B配列由来の配列からなる領域を含む。ある態様では、本発明のガイドRNAは、機能性領域として、STL配列からなる領域を含む。

[0051] 本発明で使用されるBox B配列由来の配列からなる領域は、ある態様では、配列番号7に示される塩基配列、又は、配列番号7に示される塩基配列

において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる。

[0052] 本発明で使用される人工ステムループ配列からなる領域は、ある態様では、U6カセット又は5Sカセットに含まれる人工ステムループ配列（STL配列）からなる領域であり、ある態様では、配列番号2に示される塩基配列、又は、配列番号2に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である。

[0053] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、機能性領域として、SRP由来RNA配列からなる領域を含み、ある態様では、該SRP由来RNA配列からなる領域が7SL RNA配列、6S RNA配列、又は4.5S RNA配列からなる領域である。

[0054] 本発明のガイドRNAは、ある態様では、同一の機能性領域を少なくとも2つ含んでいてもよく、別の態様では、異なる2以上の機能性領域を少なくとも1つずつ含んでいてもよい。

[0055] 4. 機能性領域の連結

本発明のガイドRNAにおいて、機能性領域はアンチセンス領域に連結されている。本明細書において「連結」とは、直接結合すること及びリンカーを介して結合することを含む。ある態様では、本発明のガイドRNAにおいては、少なくとも1つの機能性領域がアンチセンス領域に直接結合されている。別の態様では、本発明のガイドRNAは、少なくとも1つの機能性領域がアンチセンス領域にリンカーを介して連結されている。本発明のガイドRNAにおいて、複数の機能性領域を連結して用いる場合、機能性領域間の連結は、直接結合又はリンカーを介した連結のいずれであってもよい。

[0056] リンカーを使用する場合、ある態様では、リンカーの長さは1～10塩基であり、ある態様では1～6塩基、ある態様では1～3塩基、ある態様では3～6塩基、ある態様では3塩基、ある態様では6塩基である。リンカーの塩基配列は、ガイドRNAを構成する配列に基づき当業者に適宜設計可能で

ある。例えば、本発明において使用されるリンカーの塩基配列は、標的RNAと相補鎖を形成しないように設計してもよい。ある態様では、リンカーは、塩基配列「UCU」、制限酵素Sallサイト配列である「GUCGAC」、又は制限酵素XbaIサイト配列である「UCUAGA」からなる。

[0057] ある態様として、本発明のガイドRNAが機能性領域としてBoxB配列由来の配列からなる領域を含む場合には、BoxB配列由来の配列からなる領域とアンチセンス領域の間、及びBoxB配列由来の配列からなる領域と他の機能性領域の間にリンカーを介した連結を用いることができ、ある態様では、該リンカーは塩基配列「UCU」である。ある態様として、本発明のガイドRNAが機能性領域としてU6 snRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む場合、又は本発明のガイドRNAが機能性領域として5S rRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域を含む場合には、リンカーを介して機能性領域にアンチセンス領域を連結することができ、ある態様では、該リンカーは塩基配列「GUCGAC」又は「UCUAGA」である。

[0058] 5. 標的RNAを編集するためのガイドRNA

本発明のガイドRNAは、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まないガイドRNAである。「ADARリクルート塩基配列」とは、同一分子内でステムループ構造を形成し、該ステムループ構造にADARが結合して、該ADARが標的RNAにリクルートされることができ塩基配列である。ADARリクルート塩基配列の例としては、GluR2のmRNA前駆体等のADARの基質由来のステムループ構造に基づき設計された塩基配列（国際公開第2016/097212号、国際公開第2017/050306号、ドイツ特許第102015012522号、国際公開第2017/010556号、国際公開第2019/111957号、Nucleic Acids Research、2017、Vol. 45、p. 2797-2808、Nature Methods、2019、Vol. 16、p. 239

ー 2 4 2) が挙げられる。本発明において、A D A R リクルート塩基配列を「実質的に含まない」とは、ガイド R N A の同一分子内に A D A R リクルート塩基配列を含まないことをいう。

[0059] 本発明のガイド R N A は、ある態様では、以下のいずれかのガイド R N A である：

少なくとも 1 つの機能性領域及び該標的 R N A の一部に相補的で該標的 R N A と二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも 1 つの該機能性領域が該アンチセンス領域に直接結合されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイド R N A、或いは、

少なくとも 1 つの機能性領域及び該標的 R N A の一部に相補的で該標的 R N A と二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも 1 つの該機能性領域が該アンチセンス領域にリンカーを介して連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイド R N A。

[0060] 本発明のガイド R N A は、ある態様では、以下のガイド R N A である：

少なくとも 1 つの機能性領域及び該標的 R N A の一部に相補的で該標的 R N A と二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも 1 つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイド R N A であって、該アンチセンス領域は、該標的 R N A とミスマッチ塩基対を形成する塩基を有する、ガイド R N A。

[0061] ある態様では、本発明のガイド R N A は、少なくとも 1 つの機能性領域及び該標的 R N A の一部に相補的で該標的 R N A と二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも 1 つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイド R N A であって、以下の特徴を有する：

(1) 機能性領域が、ガイド R N A の安定化、ガイド R N A の核への局在、ガイド R N A の細胞質への局在、標的 R N A とアンチセンス領域の二本鎖形成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、及び標的 R N A とアンチセンス領域で形成される複合体の安定化からなる機能のいずれ

か1以上の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(2) 機能性領域が、s n R N A配列からなる領域、r R N A配列からなる領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである、

(3) 機能性領域が、s n R N A配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(4) 機能性領域が、U 6 s n R N A配列からなる領域、U 1 s n R N A配列からなる領域、及びU 7 s n R N A配列からなる領域から選択されるs n R N A配列からなる領域、並びに任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(5) 機能性領域が、U 6 s n R N A配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域である、

(6) 機能性領域が、U 6 s n R N A配列の塩基配列の部分配列であってs n R N A配列の機能を有する塩基配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域である、

(7) 機能性領域が、U 6 s n R N A配列の塩基配列の転写開始点から27塩基目までの部分配列であってs n R N A配列の機能を有する塩基配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域である、

(8) 機能性領域が、配列番号1に示される塩基配列、又は、配列番号1に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、s n R N A配列の機能を有する塩基配列からなる領域、並びに、配列番号2に示される塩基配列、又は、配列番号2に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(9) 機能性領域が、U 1 s n R N A配列からなる領域である、

(10) 機能性領域が、配列番号3に示される塩基配列、又は、配列番号

3に示される塩基配列において1～20塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(11) 機能性領域が、配列番号3に示される塩基配列において転写開始点から3塩基目から10塩基目の8塩基が欠失した塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(12) 機能性領域が、U7 snRNA配列からなる領域である、

(13) 機能性領域が、Smタンパク質結合サイト(Sm OPT配列)及びU7 snRNAのステムループ配列を含むU7 snRNAの塩基配列の部分配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(14) 機能性領域が、配列番号4に示される塩基配列、又は、配列番号4に示される塩基配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、snRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(15) 機能性領域が、rRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(16) 機能性領域が、5S rRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(17) 機能性領域が、配列番号5に示される塩基配列、又は、配列番号5に示される塩基配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、rRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域、並びに、任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(18) 機能性領域が、5S rRNA配列からなる領域及び人工ステムループ配列からなる領域である、

(19) 機能性領域が、配列番号5に示される塩基配列、又は、配列番号5に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しく

は付加された塩基配列であって、rRNA配列の機能を有する塩基配列からなる領域、並びに、配列番号2に示される塩基配列、又は、配列番号2に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列を含まない領域である、

(20) 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらの組み合わせである、

(21) 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(22) 機能性領域が、3層のグアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(23) 機能性領域が、配列番号6に示される塩基配列、又は、配列番号6に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(24) 機能性領域が、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(25) 機能性領域が、B×B配列由来の配列からなる領域である、

(26) 機能性領域が、配列番号7に示される塩基配列、又は、配列番号7に示される塩基配列において1～3塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列であって、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(27) 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域の組み合わせである、

(28) 機能性領域が、3層のグアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域及びB×B配列由来の配列からなる領域の組み合わせである。

[0062] 上記(1)～(28)のいずれかの特徴を有する本発明のガイドRNAにおいて、少なくとも1つの該機能性領域は該アンチセンス領域に直接結合されていてリンカーを介して連結されていてもよい。

[0063] ある態様では、本発明のガイドRNAは、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で該標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAであって、以下の特徴を有する：

(a-1) ガイドRNAが、U6 snRNA配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるリンカー、及び人工ステムループ配列からなる領域からなり、U6 snRNA配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び人工ステムループ配列からなる領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-2) ガイドRNAが、U6 snRNA配列の塩基配列の転写開始点から27塩基目までの部分配列であってsnRNA配列の機能を有する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるリンカー、及び人工ステムループ配列からなる領域からなり、U6 snRNA配列の塩基配列の転写開始点から27塩基目までの部分配列であってsnRNA配列の機能を有する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び人工ステムループ配列からなる領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-3) ガイドRNAが、U1 snRNA配列からなる機能性領域、及びアンチセンス領域からなり、アンチセンス領域がU1 snRNA配列の塩基配列に挿入されている、

(a-4) ガイドRNAが、U1 snRNA配列の塩基配列の転写開始点から3塩基目から10塩基目の8塩基が欠失した塩基配列であってsnRNA配列の機能を有する塩基配列からなる機能性領域、及びアンチセンス領域からなり、アンチセンス領域がU1 snRNA配列の塩基配列の転写開始

点から3塩基目に挿入されている、

(a-5) ガイドRNAが、U7 snRNA配列からなる機能性領域、及びアンチセンス領域からなり、アンチセンス領域及びU7 snRNA配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-6) ガイドRNAが、Smタンパク質結合サイト(Sm OPT配列)及びU7 snRNAのステムループ配列を含むU7 snRNA配列の塩基配列の部分配列であってsnRNA配列の機能を有する塩基配列からなる機能性領域、並びにアンチセンス領域からなり、アンチセンス領域及びU7 snRNA配列の塩基配列の部分配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-7) ガイドRNAが、5S rRNA配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるリンカー、及び人工ステムループ配列からなる領域からなり、5S rRNA配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び人工ステムループ配列からなる領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-8) ガイドRNAが、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域及びグアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-9) ガイドRNAが、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域及びアンチセンス領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-10) ガイドRNAが、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、さらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及びさらなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-11) ガイドRNAが、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、さらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、さらなる機能性領域、アンチセンス領域、及びグアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-12) ガイドRNAが、アンチセンス領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-13) ガイドRNAが、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域及びアンチセンス領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-14) ガイドRNAが、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、さらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及びさらなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-15) ガイドRNAが、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-16) ガイドRNAが、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及びグア

ニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、

(a-17) ガイドRNAが、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及びステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域がこの順に5'側から3'側に連結されている、又は

(a-18) ガイドRNAが、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及びアンチセンス領域がこの順に5'側から3'側に連結されている。

[0064] <本発明で使用されるADAR>

本発明で使用されるADARには、天然に存在するADAR、及びデアミナーゼ活性を有する限り、その改変体も含まれる。デアミナーゼ活性は、当業者に公知の方法により、基質の脱アミノ化を検出することで測定できる。例えば、デアミナーゼ活性は、アデノシンのイノシンへの変換又はシチジンのウリジンへの変換を検出することで測定できる。具体的には、デアミナーゼ活性は、実施例7又は8に記載の方法で測定することができる。本発明で使用されるADARは、ある態様では、真核生物由来ADARであり、ある態様では、哺乳動物由来のADARであり、またある態様では、ヒトADARである。本発明で使用されるADARは、ある態様では、ADAR1又はADAR2であり、ある態様では、ADAR2である。ADAR1には、2種のスプライシングバリエーションADAR1 p110及びADAR1 p150が含まれ、本発明で使用されるADARは、ある態様では、ADAR1 p110又はADAR1 p150である。本発明で使用されるADAR

は、ある態様では、ヒトADAR1又はヒトADAR2であり、ある態様では、ヒトADAR2である。本発明で使用されるADARは、ある態様では、二本鎖RNA結合領域（dsRBD: double-stranded-RNA binding domain）を含みデアミナーゼ酵素活性を有するポリペプチドである（Trends in Biochemical Sciences、2001、Vol. 26、p. 376-384、RNA、2001、Vol. 7、p. 846-858）。本発明で使用されるADARは、ある態様では、デアミナーゼドメインを含み、標的RNAのアデノシンをイノシンに変換することができるポリペプチドである。本発明で使用されるADARは、別の態様では、デアミナーゼドメインを含み、標的RNAのシチジンをウリジンに変換することができるポリペプチドである。本発明で使用されるADARは、また別の態様では、デアミナーゼドメインを含み、標的RNAのアデノシンをイノシンに変換すること及びシチジンをウリジンに変換することができるポリペプチドである。本発明で使用されるADARは、他因子との融合タンパクであってもよい。本発明で使用されるADARの改変体には、アデノシンデアミナーゼ活性を有する改変体、シチジンデアミナーゼ活性を有する改変体、アデノシン及びシチジンの両方を認識し、それぞれをイノシン及びウリジンへ変換するデアミナーゼ活性を有する改変体が含まれる（Science、2019、Vol. 365、p. 382-386）。本発明で使用されるADAR及びADARの改変体は、他因子との融合タンパクであってもよい。

[0065] 本発明で使用されるADARは、ある態様では、アクセッション番号 [NP_001103.1]、アクセッション番号 [NP_056648.1]、又はアクセッション番号 [NP_001102.3] に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、或いは、これらのアミノ酸配列と同一性が90%以上であるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列において1~10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドである。本発明で

使用されるADARは、ある態様では、配列番号9に示されるアミノ酸配列（ヒトADAR2）からなるポリペプチド、或いは、該配列と同一性が90%以上であるアミノ酸配列又は該配列において1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドである。本発明で使用されるADARは、ある態様では、真核細胞において内在的に存在するADARであり、ある態様では、真核細胞に外来的に導入されたADARであってもよい。真核細胞へのADARの導入は、ADARポリペプチドを直接導入しても、ADARをコードする核酸を含む発現ベクターを導入してもよい。

[0066] 本明細書において、「同一性」とは、EMBOSS NEEDLE program (J. Mol. Biol., 1970, Vol. 48, p. 443-453) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値Identityを意味する。前記のパラメータは以下の通りである。

Gap Open penalty=10

Gap Extend penalty=0.5

Matrix=EBLOSUM62

[0067] <本発明の標的RNAを編集するシステム>

本発明はまた、本発明のガイドRNA及びADARを含む標的RNAを編集するシステムを提供する。本発明のガイドRNA及びADARを含む標的RNA配列を編集するシステムとは、本発明のガイドRNA及びADARを含む標的RNA配列を編集するためのキット、又は本発明のガイドRNA及びADARを用いて標的RNA配列を編集する方法を含む。本発明の標的RNAを編集するシステムは、ある態様では、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まないガイドRNA、並びにADARを含む、システムであり、ある態様では、少なくとも1つ

の機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まないガイドRNA、並びにADAR1又はADAR2を含む、システムである。

本発明の標的RNAを編集するシステムは、細胞内でも細胞外でも用いることができる。ある態様では、該システムを真核細胞内で用いることができる。ある態様では、該システムを原核細胞内、バクテリア内、ファージ内、ウイルス内等で用いることができる。

[0068] <本発明のガイドRNAをコードする核酸>

本発明はまた、本発明のガイドRNAをコードする核酸（本項において「本発明の核酸」とも称する）を提供する。本発明の核酸は、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAをコードする核酸である。ある態様では、本発明の核酸は、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAをコードする核酸であり、該機能性領域をコードする核酸として、以下に示す核酸を含む；

（1） 以下の「機能性領域をコードする核酸」に示す配列番号から選択される1つの配列番号に示される塩基配列からなる核酸、

（2） 以下の「機能性領域をコードする核酸」に示す配列番号12に示される塩基配列において1～20塩基が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された塩基配列であって、該機能性領域としての機能を有する塩基配列からなる核酸、

（3） 以下の「機能性領域をコードする核酸」に示す配列番号13又は配

列番号 14 に示される塩基配列において 1 ～ 10 塩基が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された塩基配列であって、該機能性領域としての機能を有する塩基配列からなる核酸、

(4) 以下の「機能性領域をコードする核酸」に示す配列番号 10、配列番号 11、配列番号 15、又は配列番号 16 に示される塩基配列において 1 ～ 3 塩基が欠失、置換、挿入、及び／若しくは付加された塩基配列であって、該機能性領域としての機能を有する領域をコードする塩基配列からなる核酸、或いは、

(5) (1) ～ (3) に含まれる核酸のいくつかの組み合わせ：

機能性領域をコードする核酸

U6 snRNA をコードする核酸：配列番号 10

STL をコードする核酸：配列番号 11

U1 snRNA をコードする核酸：配列番号 12

U7 snRNA をコードする核酸：配列番号 13

5S rRNA をコードする核酸：配列番号 14

3Gq をコードする核酸：配列番号 15

Box B をコードする核酸：配列番号 16

[0069] 本発明の核酸は、デオキシリボ核酸が連結した構造を有し、例えば、DNA であり、ある態様では、DNA である。ある態様では、本発明の核酸は、発現ベクターに組み込まれた核酸である。ある態様では、本発明の核酸は、プラスミドベクターに組み込まれた核酸である。ある態様では、本発明の核酸は、ウイルスベクターに組み込まれた核酸である。

[0070] 本発明の核酸にコードされるガイド RNA の具体的態様は、前記＜本発明のガイド RNA＞の項において記載される本発明のガイド RNA の態様と同様である。具体的な例を以下に示す。本発明の核酸は、ある態様では、以下のいずれかのガイド RNA をコードする核酸である：

少なくとも 1 つの機能性領域及び該標的 RNA の一部に相補的で該標的 RNA と二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも 1 つの該機能

性領域が該アンチセンス領域に直接結合されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNA、

少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で該標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域にリンカーを介して連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNA、又は

少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で該標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAであって、該アンチセンス領域は、標的RNAとミスマッチ塩基対を形成する塩基を有する、ガイドRNA。

[0071] ある態様では、本発明の核酸は、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A R リクルート塩基配列を実質的に含まない、ガイドRNAをコードする核酸であって、該ガイドRNAが、以下の特徴を有する：

(1) 機能性領域が、ガイドRNAの安定化、ガイドRNAの核への局在、ガイドRNAの細胞質への局在、標的RNAとアンチセンス領域の二本鎖形成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、及び標的RNAとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化からなる機能のいずれか1以上の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(2) 機能性領域が、snRNA配列からなる領域、rRNA配列からなる領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである、

(3) 機能性領域が、snRNA配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(4) 機能性領域が、U6 snRNA配列からなる領域、U1 snR

N A 配列からなる領域、及び U 7 s n R N A 配列からなる領域から選択される s n R N A 配列からなる領域、並びに任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(5) 機能性領域が、r R N A 配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(6) 機能性領域が、5 S r R N A 配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(7) 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらの組み合わせである、

(8) ガイド R N A が、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるさらなる機能性領域がこの順に 5' 側から 3' 側に連結されている、

(9) ガイド R N A が、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域及びアンチセンス領域がこの順に 5' 側から 3' 側に連結されている。

[0072] <本発明で使用する A D A R をコードする核酸>

本発明で使用する A D A R をコードする核酸は、上記<本発明で使用する A D A R >に記載された A D A R をコードする核酸である。ある態様では、本発明で使用する A D A R をコードする核酸は、アクセッション番号 [NP__001103.1]、アクセッション番号 [NP__056648.1]、又はアクセッション番号 [NP__001102.3] に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸、或いは、これらの少なくとも 1 つの配列と同一性が 90%以上である塩基配列又はこれらの少なくとも 1

つの配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸である。本発明で使用されるADARをコードする核酸は、ある態様では、配列番号8に示される塩基配列からなる核酸、或いは、該配列と同一性が90%以上である塩基配列、又は該配列において1～10塩基が欠失、置換、挿入及び／若しくは付加された塩基配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸である。

[0073] <本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター>

本発明はまた、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター（「本発明の発現ベクター」とも称する）を提供する。本発明はまた、本発明のガイドRNAをコードする核酸とADARをコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。本発明のガイドRNAをコードする核酸及びADARをコードする核酸は、同一の発現ベクターに搭載されていても、別々の発現ベクターに搭載されていてもよい。ある態様では、本発明の発現ベクターは、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター及びADARをコードする核酸を含む発現ベクターの組み合わせである。ある態様では、本発明の発現ベクターは、本発明のガイドRNAをコードする核酸及びADARをコードする核酸を含む発現ベクターである。

[0074] 1. 本発明で使用される発現ベクター

本発明で使用される発現ベクターとしては、本発明のガイドRNAをコードする核酸から本発明のガイドRNAを発現できる発現ベクター、及び／又はADARを発現できる発現ベクターであれば、特に制限されない。ある態様において、本発明で使用される発現ベクターはヒト細胞において本発明のガイドRNAを発現させるために、及び／又はADARを発現させるために用いることのできる発現ベクターである。ある態様では、本発明で使用される発現ベクターの例としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター）等が挙げられる。

[0075] 2. プロモーター

本発明の発現ベクターは、本発明のガイドRNAをコードする核酸及び／又はADARをコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含んでいてもよい。本明細書において、「作動可能に連結された」とは、核酸にコードされたポリペプチド又はRNAが宿主細胞において発現可能なように、少なくとも1つのプロモーターが核酸に連結されていることを意味する。本発明の発現ベクターに含まれるプロモーターとしては特に限定されないが、本発明のガイドRNA又はADARをコードする核酸を発現させるのに適したRNAポリメラーゼ（例えば、RNAポリメラーゼII（pol II）、RNAポリメラーゼIII（pol III））に対応したプロモーターを使用できる。本発明のガイドRNAを発現させるためには、ある態様としては、pol II又はpol IIIに対応したプロモーターを用いることができ、別の態様としては、pol IIIに対応したプロモーターを用いることができる。ADARを発現させるためには、ある態様としては、pol IIに対応したプロモーターを用いることができる。

[0076] pol IIに対応したプロモーターとしては、例えば、CMV（cytomegalovirus）由来プロモーター、SV40（simian virus 40）プロモーター、RSV（respiratory syncytial virus）プロモーター、EF1 α （Elongation factor 1 α ）プロモーター、CAGプロモーター、U1 snRNAプロモーター、U7 snRNAプロモーター等が挙げられる。pol IIIに対応したプロモーターとしては、例えば、ヒトU6 snRNAプロモーター（U6）（Nat. Biotechnol.、2002、vol. 20、p. 497-500）、高感度U6プロモーター（Nucleic Acids Research、2003、vol. 31、p. e100）、ヒトH1プロモーター、5S rRNAプロモーターその他、当業者に公知の他のウイルス及び真核細胞プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

[0077] 本発明の発現ベクターは、使用するプロモーターや宿主細胞等に応じて、さらに、翻訳開始コドン、翻訳終止コドン、p o l i l l の転写開始点に好ましいプリン塩基（G又はA）、p o l y Aシグナル、p o l i l l のための連続Tのターミネーター配列、エンハンサー、非翻訳領域、スプライシング接合部等を含んでいてもよい。

[0078] <本発明の宿主細胞>

本発明はまた、本発明のガイドRNAをコードする核酸を導入することにより形質転換された宿主細胞（「本発明の宿主細胞」とも称する）を提供する。ある態様において、本発明の宿主細胞は、本発明の発現ベクターが導入された宿主細胞である。ある態様において、本発明の宿主細胞は、プラスミドベクターである本発明の発現ベクターが導入された宿主細胞である。ある態様において、本発明の宿主細胞は、ウイルスベクターである本発明の発現ベクターを製造するためのプラスミドベクターを導入された宿主細胞である。ある態様において、本発明の宿主細胞は、ウイルスベクターである本発明の発現ベクターが導入された宿主細胞である。

[0079] 本発明の発現ベクターが導入される宿主細胞としては、特に限定されないが、本発明のガイドRNAをコードする核酸又は本発明の発現ベクターの産生に使用し得る細胞である限り、当該分野で公知の細胞を選択することができる。ベクターの複製に使用し得る宿主細胞としては、例えば、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞又は人工的に樹立された細胞等種々の細胞が挙げられる。ベクターの複製に使用し得る宿主細胞としては、例えば、動物細胞（例えば、CHO細胞、HEK293細胞等）、昆虫細胞（例えば、Sf9等）、細菌（大腸菌等）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属等）等が挙げられる。ある態様として、大腸菌を宿主細胞として使用することができる。形質転換は、当業者に公知の方法で実施することができる（Green、M. R. and Sambrook、J.、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、4th Edition、Cold Spring Harbor Labor

atory Press、2012)。

[0080] <本発明のガイドRNAをコードする核酸及び本発明の発現ベクターを製造する方法>

本発明のガイドRNAをコードする核酸（本項において「本発明の核酸」とも称する）は、本明細書に記載された配列又は公的に利用可能な配列情報に基づき、当該分野で公知の標準的なポリヌクレオチド合成法を使用して合成することができる。また、ある本発明の核酸を取得すれば、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edition、1987、John Wiley & Sons Section）等の当業者に公知の方法を使用して、所定の部位に変異を導入することによって、別の本発明の核酸を作製することも可能である。

[0081] 本発明の核酸及び本発明の発現ベクターを製造する方法には、本発明の核酸又は本発明の核酸を含む発現ベクターが導入された宿主細胞を培養する工程を含む、核酸を製造する方法が含まれる。ある態様では、本発明の核酸を製造する方法は、本発明の核酸が導入された宿主細胞を培養し、本発明の核酸を複製する工程を含む。ある態様では、本発明の核酸を製造する方法は、本発明の核酸を含む発現ベクターが導入された宿主細胞を培養し、本発明の発現ベクターを複製する工程を含む。本発明の発現ベクターがウイルスベクターである場合には、本発明の発現ベクターを製造する方法は、本発明の核酸を含むウイルスベクタープラスミドが導入された宿主細胞を培養し、宿主細胞内で作製されたウイルスベクターを精製する工程を含む。ウイルスベクターは当業者に公知の方法により作製することができる。

[0082] 本発明の核酸及び本発明の発現ベクターを製造する方法は、宿主細胞の培養液を回収してライセート（溶菌液）を得る工程を含んでもよい。ライセートは、例えば、回収した培養液をアルカリ溶解法又はボーリング法で処理することで得ることができる。本発明の核酸を製造する方法は、さらに、ライセートから核酸又は発現ベクターを精製する工程を含んでもよい。ライセー

トからの核酸又は発現ベクターの精製には、イオン交換クロマトグラフィー及び／又は疎水相互作用クロマトグラフィーを用いることができる。本発明の発現ベクターがウイルスベクターである場合には、ライセートからのウイルスベクターの精製には、塩化セシウム密度勾配遠心分離法、ショ糖勾配遠心分離法、イオジキサノール（Iodixanol）密度勾配遠心分離法、限外ろ過法、ダイアフィルトレーション法、アフィニティークロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ポリエチレングリコール沈殿法や硫酸アンモニウム沈殿法などを用いることもできる。

[0083] <本発明のガイドRNAを製造する方法>

本発明のガイドRNAは、配列情報に基づき、当該分野で公知の標準的なポリヌクレオチド合成法を使用して合成することができる。また、本発明のあるガイドRNAを取得すれば、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edition、1987、John Wiley & Sons Section）等の当業者に公知の方法を使用して、所定の部位に変異を導入することによって、標的RNAへの誘導機能及び標的RNAを編集する機能を維持した本発明のガイドRNAの改変体を作製することも可能である。本発明のガイドRNAは、修飾をされた核酸を用いて製造することもできる。本発明のガイドRNAは、本発明のガイドRNAをコードする核酸を用いて作製することもできる。例えば、本発明のガイドRNAは、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクターから本発明のガイドRNAを転写させることにより作製することができる。

[0084] <本発明のポリヌクレオチド>

本発明はまた、標的RNAをADARにより編集するためのポリヌクレオチドであって、少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で標的RNAと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、ADARリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチド（以下、「本発明のポ

リヌクレオチド」とも称する)を提供する。

[0085] 本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」には、修飾されていないヌクレオチド(DNA又はRNA)及び修飾されたヌクレオチドが含まれる。本発明で使用する修飾されたヌクレオチドの例としては、リボースの2'-OH基が修飾されたヌクレオチド、ヌクレオシド間のホスホジエステル結合が修飾されたヌクレオチド、リボースが変換されたヌクレオチド、プリン残基又はピリミジン残基が修飾されたヌクレオチド、分子内架橋されたリボースを含むヌクレオチド等が含まれる。リボースの2'-OH基が修飾されたヌクレオチドには、2'-O-メチルリボース、2'-フルオロリボース等を含むヌクレオチドが挙げられる。ヌクレオシド間のホスホジエステル結合が修飾されたヌクレオチドには、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、等を含むヌクレオチド、又はペプチド結合核酸(PNA: Peptide nucleic acid)が挙げられる。リボースが変換されたヌクレオチドには、モルフォリノ核酸(PMO: Morpholino nucleic acid)等が含まれる。プリン残基又はピリミジン残基が修飾されたヌクレオチドには、5-メチルデオキシシチジナーリン酸(5-Me-dCMP)、2-アミノデオキシアデノシン-リン酸(2-amino-dAMP)、C5-修飾ピリミジンを含むヌクレオチドが含まれる。分子内架橋されたリボースを含むヌクレオチドには、ロックド核酸(LNA: Locked nucleic acid)等が含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、使用する塩基配列及び修飾の種類に基づき当該分野で公知の方法により作製可能である。

[0086] 本発明のポリヌクレオチドの具体的態様は、前記<本発明のガイドRNA>及び<本発明のガイドRNAをコードする核酸>の項において記載される本発明のガイドRNAの態様と同様である。具体的な例を以下に示す。

[0087] 本発明のポリヌクレオチドは、ある態様では、以下のいずれかのポリヌクレオチドである：

少なくとも1つの機能性領域及び該標的RNAの一部に相補的で該標的R

N Aと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に直接結合されていて、A D A Rリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチド、

少なくとも1つの機能性領域及び該標的R N Aの一部に相補的で該標的R N Aと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域にリンカーを介して連結されていて、A D A Rリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチド、又は

少なくとも1つの機能性領域及び該標的R N Aの一部に相補的で該標的R N Aと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A Rリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチドであって、該アンチセンス領域は、標的R N Aとミスマッチ塩基対を形成する塩基を有する、ポリヌクレオチド。

[0088] ある態様では、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの機能性領域及び該標的R N Aの一部に相補的で該標的R N Aと二本鎖を形成するアンチセンス領域を含み、少なくとも1つの該機能性領域が該アンチセンス領域に連結されていて、A D A Rリクルート塩基配列を実質的に含まない、ポリヌクレオチドであって、以下の特徴を有する：

(1) 機能性領域が、ガイドR N Aの安定化、ガイドR N Aの核への局在、ガイドR N Aの細胞質への局在、標的R N Aとアンチセンス領域の二本鎖形成促進、アンチセンス領域による非特異的な二本鎖形成阻害、及び標的R N Aとアンチセンス領域で形成される複合体の安定化からなる機能のいずれか1以上の機能を有する塩基配列からなる領域である、

(2) 機能性領域が、s n R N A配列からなる領域、r R N A配列からなる領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域、又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらのいずれかの組み合わせである、

(3) 機能性領域が、s n R N A配列からなる領域及び任意に含まれるス

ステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(4) 機能性領域が、U 6 s n R N A 配列からなる領域、U 1 s n R N A 配列からなる領域、及びU 7 s n R N A 配列からなる領域から選択される s n R N A 配列からなる領域、並びに任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(5) 機能性領域が、r R N A 配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(6) 機能性領域が、5 S r R N A 配列からなる領域及び任意に含まれるステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域である、

(7) 機能性領域が、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる領域又はステムループ構造を形成する塩基配列からなる領域、或いはそれらの組み合わせである、

(8) ガイド R N A が、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、アンチセンス領域、グアニン四重鎖構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、及び任意に含まれるさらなる機能性領域がこの順に 5' 側から 3' 側に連結されている、

(9) ガイド R N A が、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域、アンチセンス領域、任意に含まれるさらなる機能性領域、及び任意に含まれるリンカーからなり、ステムループ構造を形成する塩基配列からなる機能性領域及びアンチセンス領域がこの順に 5' 側から 3' 側に連結されている。

[0089] <本発明の医薬組成物>

本発明はまた、本発明のガイド R N A、本発明のガイド R N A をコードする核酸（本項において「本発明の核酸」とも称する）、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチド、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物（「本発明の医薬組成物」とも称する）を提供する。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイド R N A 及び薬学的に許容される

賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNA、ADAR、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明の核酸、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明の核酸、ADAR、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター、及び、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸及びADARをコードする核酸を含む発現ベクター、並びに薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター、ADARをコードする核酸を含む発現ベクター、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のポリヌクレオチド、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のポリヌクレオチド、ADAR、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。

[0090] ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸及びヒトADAR1又はヒトADAR2をコードする核酸を含む発現ベクター、並びに薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター、ヒトADAR1又はヒトADAR2をコードする核酸を含む発現ベクター、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸及び配列番号9に示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列、又は該アミノ酸配列と同一性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなる核酸を含む発現ベクター、並びに薬学的に許容される賦形

剤を含む医薬組成物である。ある態様では、本発明の医薬組成物は、本発明のガイドRNAをコードする核酸を含む発現ベクター、配列番号9に示されるアミノ酸配列のポリペプチドをコードする塩基配列、又は該アミノ酸配列と同一性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、アデノシンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列からなる核酸を含む発現ベクター、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物である。

[0091] 本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられる賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴用剤等の非経口剤が挙げられ、静脈内投与、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。

[0092] 本発明のガイドRNA、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、本発明のポリヌクレオチド、ADARをコードする核酸を含む発現ベクター、又はADARの投与量は、標的RNAが存在する細胞、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型等に合わせて適宜投与量を調整することができる。例えば、0.001mg/kg～100mg/kgの範囲の投与量とすることができる。

[0093] 本発明の医薬組成物で予防又は治療できる疾患は、ある態様として、遺伝性疾患であり、ある態様として、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患であり、ある態様として、標的RNA中の1個以上のアデノシンのイノシンへの変換が有益な変化をもたらす任意の疾患の疾患である。本発明の医薬組成物は、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患の予防又は治療剤として用いることができる。ある態様として、本発明の医薬組成物は、標的RNA中の1個以上のアデノシンのイノシンへの変換が有益な変化をもたらす任意の疾患の予防又は治療剤として用いることができ

る。

[0094] 本発明には、本発明のガイドRNA、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチドを含む、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患の予防又は治療用医薬組成物が含まれる。また、本発明には、本発明のガイドRNA、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチドの予防有効量又は治療有効量を投与する工程を包含する、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患を予防又は治療する方法が含まれる。また、本発明には、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患の予防又は治療に使用するための、本発明のガイドRNA、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチドが含まれる。また、本発明には、標的RNA中の1個以上のアデノシン又はシチジンの編集が有益な変化をもたらす任意の疾患の予防又は治療用医薬組成物の製造における、本発明のガイドRNA、本発明の核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチドの使用が含まれる。

[0095] <本発明の標的RNAを編集する方法>

本発明はまた、本発明のガイドRNAを用いた標的RNAを編集する方法（「本発明の編集方法」とも称する）を提供する。ある態様では、本発明の編集方法では、本発明のガイドRNAのアンチセンス領域が標的RNAと二本鎖を形成し、形成された二本鎖RNAにADARがリクルートされ、リクルートされたADARが標的RNA配列のアデノシンをイノシンに変換する方法を含む。ここで、イノシンに変換される標的RNA上のアデノシンは、アンチセンス領域とミスマッチ塩基対を形成していてもよい。ある態様では、本発明の編集方法では、本発明のガイドRNAのアンチセンス領域が標的RNAと二本鎖を形成し、形成された二本鎖RNAにADARがリクルートされ、リクルートされたADARが標的RNA配列のシチジンをウリジンに変換する方法を含む。ここで、ウリジンに変換される標的RNA上のシチジ

ンは、アンチセンス領域とミスマッチ塩基対を形成していてもよい。

- [0096] 本発明の編集方法は、(i) 本発明のガイドRNA、本発明のガイドRNAをコードする核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリヌクレオチドを、標的RNAを有する細胞又はウイルス等に導入する工程を含む。ある態様では、本発明の編集方法は、さらに、(ii) ADAR、ADARをコードする核酸、又はADARをコードする核酸を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程を含む。工程(i)及び(ii)は、同時であっても別々に行ってもよい。ある態様では、導入される細胞は、真核細胞又は原核生物等であり、ある態様では、当該細胞は、哺乳動物細胞又はバクテリア等である。ある態様では、導入されるウイルスには、ファージを含む。ある態様では、標的RNAのアデノシンがイノシンに変換され、別の態様では、標的RNAのシチジンがウリジンに変換される。さらに、標的RNAがコード領域にある場合は、翻訳時にイノシンをグアノシンと読み取る工程を含んでいてもよい。

実施例

- [0097] 特に断りがない場合は、以下の実施例に記載の工程は、公知の方法に従って実施可能である。また、市販のキット又は試薬等を用いた部分については、特に断りのない限り添付のプロトコルに従って実験を行った。

- [0098] 実施例1 機能性領域としてU6 snRNA配列を付加したガイドRNA発現プラスミドの作製

pSUPER, neoベクター (Oligoengine社、カタログ番号VEC-PBS-0004) のH1 RNA polymerase IIIプロモーター (以下、H1プロモーターと称する) を、human U6 snRNA polymerase III (hU6) プロモーター配列 (配列番号17) に置換したベクターを構築した (以下、pSUPER, neo-U6ベクターと称する)。hU6プロモーター配列を含む断片は、hU6プロモーターを有するpBAsi-hU6 Neo DNA (タカラバイオ社、カタログ番号3227) を鋳型とし、5'側にEcoRI及び3

’側にB g l I Iの各制限酵素サイトを付加するようにして、標準的なPCR法を用いて増幅した。反応には、DNAポリメラーゼG f l e x（タカラバイオ社、カタログ番号R 0 6 0 A）を使用した。得られたh U 6プロモーター断片を、制限酵素E c o R Iサイト（5’側）及びB g l I I Iサイト（3’側）を使用してp S U P E R, n e oベクターに挿入した。構築したp S U P E R, n e o-U 6ベクターでE. c o l i D H 5 α C o m p e t e n t C e l l s（タカラバイオ社、カタログ番号9 0 5 7、以下、「D H 5 α大腸菌株」と称する）を形質転換し、液体培養を行った。培養液を遠心し菌体を回収し、N u c l e o B o n d（登録商標）X t r a M i d i P l u s E F（タカラバイオ社、カタログ番号U 0 4 2 2 B）でプラスミド抽出精製を行い、増幅したp S U P E R, n e o-U 6ベクターを得た。

[0099] 機能性領域としてU6 snRNA配列（以下、「U6」と称することがある）を付加したガイドRNA発現プラスミドを以下のように構築した。pSUPER. neo-U6ベクターのhU6プロモーター下流に、ガイドRNA U6-ASR-STLをコードするDNA配列（配列番号18）を、制限酵素BglIIサイト（5'側）及びHindIIIサイト（3'側）を使用し挿入した。

挿入するDNA配列の作製に際しては、制限酵素切断末端を形成するように合成したフォワードオリゴとリバーソオリゴ（下記）をアニーリングする方法を用いた。

フォワードオリゴ： 5' - G A T C T - ガイドRNAをコードするDNA配列 - 3'

リバースオリゴ：5' - A G C T T - ガイドRNAをコードするDNA配列
の逆相補配列 - 3'

挿入したDNA配列には、5'側にp o l l l lの転写開始点に好ましいプリン塩基（G又はA）、3'側にp o l l l lのターミネーター配列が含まれる。

作製したガイドRNA発現プラスミドをpSUPERneo__U6__gRNAと称する。

[0100] ここで、ASRは、実施例4で使用される検出用レポーターmRNA（Rluc-W104X）の一部に相補的な24塩基からなるアンチセンス塩基配列を表し、配列番号18に示されるDNA配列のうち、37塩基目から60塩基目までの配列にコードされるRNA配列からなる。U6は、配列番号1に示されるRNA配列からなり、U6をコードする核酸は配列番号10に示されるDNA配列からなる。STLは、配列番号2に示されるRNA配列からなり、STLをコードする核酸は配列番号11に示されるDNA配列からなる。

ガイドRNAの概要を表1に示す。表1において、「5' -」はASRの5'側に付加した機能性領域を、「- 3'」はASRの3'側に付加した機能性領域を示す。「リンカー」はASRと各機能性領域を連結する配列を示す。

構築したpSUPERneo__U6__gRNAプラスミドを、DH5 α 大腸菌株（タカラバイオ社、カタログ番号9057）を用いて上記と同様にし増殖した。

[0101] 実施例2 機能性領域としてU1 snRNA配列又はU7 snRNA配列又は5S rRNA配列を付加したガイドRNA発現プラスミドの作製
機能性領域としてU1 snRNA配列、U7 snRNA配列、又は5S rRNA配列（以下、それぞれ「U1」、「U7」、「5S」と称することがある）を付加したガイドRNA発現プラスミドを以下のように作製した。pSUPERneoベクターのH1プロモーター上流の制限酵素EcoRIサイト（5'側）及びHindIIIサイト（3'側）を使用し、それぞれのプロモーター配列及びガイドRNAをコードするDNA配列を挿入した。human U1 snRNAプロモーター配列（配列番号19）、human U7 snRNAプロモーター配列（配列番号20）、又は5S rRNAプロモーター配列（配列番号21）の直下には、下記のガイド

RNAをコードするDNA配列がそれぞれ連結している。

＜ガイドRNAの名称及びそれをコードするDNA配列番号＞

ASR-U1：配列番号22

ASR-U7：配列番号23

5S-ASR-STL：配列番号24

ASR-U1及び5S-ASR-STLには、3'側にポリT配列が含まれる。

[0102] U1は、配列番号3に示されるRNA配列からなり、U1をコードする核酸は配列番号12に示されるDNA配列からなる。ASR-U1（配列番号22）は、配列番号12のうち3塩基目から10塩基目までをASRと置き換えた塩基配列からなる。

U7は、配列番号4に示されるRNA配列からなり、U7をコードする核酸は配列番号13に示されるDNA配列からなる。

5Sは、配列番号5に示されるRNA配列からなり、5Sをコードする核酸は配列番号14に示されるDNA配列からなる。

各ガイドRNAをコードするDNA配列の概要を表1に示す。

[0103] 挿入するDNA配列の作製に際しては、DNA合成（ファスマック社）により作製した。得られたプラスミドをpSUPERneo-U1-gRNA、pSUPERneo-U7-gRNA、pSUPERneo-5S-gRNAとそれぞれ称する。

構築したプラスミドはDH5α大腸菌株（タカラバイオ社、カタログ番号9057）を用いて実施例1と同様の方法にて増殖した。

[0104] 実施例3 機能性領域としてGq配列及び／又はBoxB配列由来の配列を付加したガイドRNA発現プラスミドの作製

機能性領域としてGq配列（実施例中では、3Gqを形成する配列をGq配列と称することもある）及び／又はBoxB配列由来の配列を付加したガイドRNAの発現プラスミドを以下のように作製した。pSUPERneoベクターのH1プロモーター下流に、8種のガイドRNAをコードするD

NA配列（後述する＜ガイドRNAの名称及びそれをコードするDNA配列番号＞を参照）を、制限酵素BglIIサイト（5'側）及びHindIIIサイト（3'側）を使用し、それぞれ挿入した。

＜ガイドRNAの名称及びそれをコードするDNA配列番号＞

ASR-Gq：配列番号25

Gq-ASR：配列番号26

ASR-BoxB：配列番号27

BoxB-ASR：配列番号28

Gq-ASR-BoxB：配列番号29

BoxB-ASR-Gq：配列番号30

ASR-Gq-BoxB：配列番号31

Gq-BoxB-ASR：配列番号32

挿入したDNA配列には、5'側にp o l i l l iの転写開始点に好ましいプリン塩基（G又はA）、3'側にp o l i l l iのターミネーター配列が含まれる。

[0105] Gqは、配列番号6に示されるRNA配列からなり、Gqをコードする核酸は配列番号15に示されるDNA配列からなる。BoxBは、配列番号7に示されるRNA配列からなり、BoxBをコードする核酸は配列番号16に示されるDNA配列からなる。各ガイドRNAの概要を表1に示す。

[0106] 挿入するDNA配列は実施例1と同様の方法を用いて作製した。得られたガイドRNA発現プラスミドをまとめてpSUPERneo_H1_gRNAと称する。

構築したプラスミドはDH5α大腸菌株（タカラバイオ社、カタログ番号9057）を用いて実施例1と同様の方法にて増殖した。

[0107] なお、比較対照となるガイドRNAとして、機能性領域を含まずASRのみをコードするDNA配列（配列番号33）を用いて、上記と同様にして作製した。挿入したDNA配列には、5'側にp o l i l l iの転写開始点に好ましいプリン塩基（G又はA）、3'側にp o l i l l iのターミネーター配

列が含まれる。

[0108] [表1]

	機能性領域		ガイドRNA名	5' -	リンカー	ASR	リンカー	-3'
比較対照	なし		ASR	-	-	ASR(24)	-	-
実施例1	snRN	U6	U6-ASR-STL	U6	GUCCGAC		UCUAGA	STL
実施例2		U1	ASR-U1	AU	-		-	U1
実施例2		U7	ASR-U7	-	-		-	U7
実施例2	rRNA	5S	5S-ASR-STL	5S	GUCCGAC		UCUAGA	STL
実施例3	Gq		ASR-Gq	-	-		-	Gq
実施例3			Gq-ASR	Gq	-		-	-
実施例3	BoxB		ASR-BoxB	-	-		UCU	BoxB
実施例3			BoxB-ASR	BoxB	UCU		-	-
実施例3	Gq/BoxB		Gq-ASR-BoxB	Gq	-		UCU	BoxB
実施例3			BoxB-ASR-Gq	BoxB	UCU		-	Gq
実施例3			ASR-Gq-BoxB	-	-		-	Gq-UCU-BoxB
実施例3			Gq-BoxB-ASR	Gq-BoxB	UCU		-	-

[0109] 実施例4 細胞内標的RNAの編集活性検出用レポーター発現プラスミドの作製

細胞内標的RNA編集活性検出するためのレポーターmRNAとして、レニラルシフェラーゼ (Renilla Luciferase: RLuc) mRNAを使用した。細胞内標的RNA編集活性検出用レポーターRLuc mRNA (RLuc-W104X) は、psiCHECK-2ベクター (プロメガ社、カタログ番号C8021) に搭載されたRLuc遺伝子にコードされるRLuc mRNA配列に基づいて設計した。具体的には、RLuc-W104Xは、RLucの104番目のアミノ酸であるTrpをコードするUGGの311番目のGがAに置換されており、Trpの代わりに翻訳終止コドン (UAG) をコードするように設計した。RLuc-W104X発現プラスミドは、psiCHECK-2ベクター (プロメガ社、カタログ

番号C8021)に、変異点G311Aを含むDNA配列(配列番号34)を、制限酵素DraIIIサイト(5'側)及びAatIIサイト(3'側)を使用し置換して、作製した。得られたプラスミドをpsiCHECK-2__Rluc-W104Xと称する。構築したpsiCHECK-2__Rluc-W104XベクターをDH5α大腸菌株(タカラバイオ社、カタログ番号9057)を用いて実施例1と同様の方法にて増殖した。

[0110] 実施例5 ADAR2発現プラスミドの作製

ADAR2発現プラスミドを、pAAV-CMVベクター(タカラバイオ社、カタログ番号6230)のCMV由来プロモーター下流の制限酵素EcoRIサイト(5'側)及びBamHIサイト(3'側)に、ADAR2(配列番号9)をコードするDNA配列(配列番号8)を、制限酵素EcoRIサイト(5'側)及びBglIIサイト(3'側)を使用し挿入して、作製した。得られたプラスミドをpAAV-CMV-ADAR2と称する。挿入したDNA配列には翻訳開始コドン上流にコザック配列(配列番号8の13塩基目から15塩基目の「ACC」)を、ADAR2遺伝子下流に終止コドン配置した。構築したpAAV-CMV-ADAR2プラスミドをDH5α大腸菌株(タカラバイオ社、カタログ番号9057)を用いて実施例1と同様の方法にて増殖した。

[0111] 実施例6 トランスフェクション

実験1(表2に結果を示すルシフェラーゼアッセイ及びサンガーシーケンスによるRNA編集効率の検討のためのトランスフェクション)

ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞を5%ウシ胎児血清(FBS)添加Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; ThermoFisher Scientific社、カタログ番号10569-010)に懸濁し、96ウェルプレートに 2.0×10^4 細胞/100μLで播種し、5%CO₂存在下37℃で一晩培養した。

[0112] 実施例4で作製した細胞内標的RNA編集活性検出用レポーター発現プラスミド(psiCHECK-2__Rluc-W104X)、実施例5で作製

したADAR2発現プラスミド (pAAV-CMV-ADAR2)、実施例1、2、又は3で作製したガイドRNA発現プラスミド (pSUPERneo_U6_gRNA、pSUPERneo_U1_gRNA、pSUPERneo_U7_gRNA、pSUPERneo_5S_gRNA、及びpSUPERneo_H1_gRNA)、及びキャリアープラスミドを、それぞれ1:40:30:9の重量比で総量100ng/ウェルとなるように混合した。キャリアープラスミドとしてpHelper Vector (タカラバイオ社、カタログ番号6230)を使用した。

[0113] 播種後一晩培養したHEK293細胞にLipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific社、カタログ番号L3000015)でトランスフェクションした。比較対照となるガイドRNA発現プラスミドも同様に、トランスフェクションした。

トランスフェクション後、同条件で培養し、培養3日の細胞を実施例7に記載のルシフェラーゼアッセイによるRNA編集活性及び実施例8に記載のサンガーシーケンスによるRNA編集効率の検討に供した。

[0114] 実験2 (表3に結果を示すルシフェラーゼアッセイ及びサンガーシーケンスによるRNA編集効率の検討のためのトランスフェクション)

細胞内標的RNA編集活性検出用レポーター発現プラスミド (psiCHECK-2_RLuc-W104X)、ADAR2発現プラスミド (pAAV-CMV-ADAR2)、実施例1及び3で作製したガイドRNA発現プラスミド (pSUPERneo_U6_gRNA及びpSUPERneo_H1_gRNA)、及びキャリアープラスミドを、それぞれ1:20:15:4の重量比で総量100ng/ウェルとなるように混合し、実験1と同様の方法を用いてHEK293細胞へのトランスフェクションを行った。キャリアープラスミドとしてpHelper Vector (タカラバイオ社、カタログ番号6230)を使用した。

[0115] 実施例7 ルシフェラーゼアッセイによるRNA編集活性の検出

実施例6でトランスフェクションした細胞の各ウェルにおいて、トランスフェクション効率を補正するためのホタルルシフェラーゼ発光強度（F l u c）と、編集活性を評価するためのレニラルシフェラーゼ発光強度（R l u c）を、Dual-Glo（登録商標）Luciferase Assay System（プロメガ社、カタログ番号E2940）とEnVision（PerkinElmer社）を用いて添付プロトコルに従って測定した。

[0116] 表2において、実施例6の実験1のトランスフェクション実験で得られた結果を示す。

表2には、サンプル間のトランスフェクション効率を補正するためR l u c / F l u c 値を算出し、比較対照となるASRのR l u c / F l u c 値を1とした場合のそれぞれのガイドRNAサンプルのR l u c / F l u c 値を相対値で表した。独立した4試行の算術平均を示した。

[0117] [表2]

機能性領域		ガイドRNA名	Rluc/Fluc値の相対値	RNA編集効率 (%)
なし(比較対照)		ASR	1	N.D.
snRNA	U6	U6-ASR-STL	3.06	28.5
	U1	ASR-U1	2.04	23.0
	U7	ASR-U7	2.60	32.9
rRNA	5S	5S-ASR-STL	6.76	52.6
Gq		ASR-Gq	2.97	29.5
		Gq-ASR	0.91	N.D.
BoxB		ASR-BoxB	0.54	N.D.
		BoxB-ASR	4.42	33.8
Gq/BoxB		Gq-ASR-BoxB	0.41	N.D.
		BoxB-ASR-Gq	0.68	N.D.
		ASR-Gq-BoxB	2.82	23.6
		Gq-BoxB-ASR	0.58	N.D.

「N.D.」は検出限界以下を表す。

[0118] 表3において、実施例6の実験2のトランスフェクション実験で得られた結果を示す。

表3には、サンプル間のトランスフェクション効率を補正するためR l u

c / F l u c 値を算出し、3 ウェルの算術平均値と標準偏差値及び比較対照となる A S R の R l u c / F l u c 値を 1 とした場合のそれぞれのガイド RNA サンプルの R l u c / F l u c 値を相対値で示した。

[0119] [表3]

機能性領域	ガイド RNA 名	Rluc/Fluc値			RNA編集 効率 (%)
		相対値	算術平均 値	標準偏差 値	
なし(比較対照)	ASR	1	0.026	0.0010	11.2
snRNA U6	U6-ASR-STL	6.96	0.181	0.0119	71.3
Gq	ASR-Gq	6.23	0.162	0.0040	58.7
	Gq-ASR	2.42	0.063	0.0017	34.2
BoxB	ASR-BoxB	1.58	0.041	0.0023	20.2
	BoxB-ASR	4.96	0.129	0.0102	47.2
Gq/BoxB	Gq-ASR-BoxB	0.65	0.017	0.0011	12.9
	BoxB-ASR-Gq	1.15	0.030	0.0029	17.0
	ASR-Gq-BoxB	6.69	0.174	0.0039	68.4

[0120] A D A R タンパク質とガイド RNA によって細胞内で標的 RNA の A から I への編集が誘導されると、変異導入した翻訳終止コドン (U I G) は m R N A から翻訳される際に T r p となり、レニラルシフェラーゼの発光は回復する。すなわち、R l u c 値が高いほど RNA 編集活性が高いことを示す。

[0121] 表 2 より、アンチセンス領域に s n R N A 又は 5 S r R N A が連結したガイド RNA、アンチセンス領域 3' 側に G q のみが連結したガイド RNA、アンチセンス領域 5' 側に B o x B のみが連結したガイド RNA、アンチセンス領域 3' 側に G q 及び B o x B が連結したガイド RNA は、R l u c / F l u c 値の相対値が比較対照となるアンチセンス領域からなるガイド RNA (A S R) に対して 2. 0 以上を示した。

[0122] 表 3 より、アンチセンス領域 5' 側に G q 及び 3' 側に B o x B が連結したガイド RNA を除く全てのガイド RNA は、比較対照となる A S R よりも高い R l u c / F l u c 値を示した。特に、アンチセンス領域に U 6 が連結したガイド RNA、アンチセンス領域 3' 側に G q のみが連結したガイド R

NA、アンチセンス領域5'側にBoxBのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGq及びBoxBが連結したガイドRNAは、 $R I u c / F I u c$ 値の相対値が比較対照となるASRに対して5.0以上を示した。

[0123] 実施例8 サンガーシーケンスによるRNA編集効率の検討

実施例6でトランスフェクションした細胞を回収し、回収した細胞からQIAshredder (QIAGEN社、カタログ番号79656)、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社、カタログ番号74106)、RNase-free DNase Set (QIAGEN社、カタログ番号79254)を用いて添付プロトコルに従って総RNAを抽出、精製した。精製したRNAについて、Recombinant DNase I (RNase-free) (タカラバイオ社、カタログ番号2270A)を用いて添付プロトコルに従って再度DNA消化処理を行った。得られたRNAについて、SuperScript (登録商標) VILLO™ cDNA Synthesis kit (ThermoFisher Scientific社、カタログ番号11754-250)を用いて添付プロトコルに従って、逆転写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型とし、編集点を含む断片を増幅する下記プライマーとPrimeSTAR (登録商標) GXL DNA Polymerase (タカラバイオ社、カタログ番号R050A)を用いて添付プロトコルに従ってPCR反応を行った。

[0124] <表2の実験で使用したプライマー>

フォワードプライマー: ATGGCTTCCAAGGTGTACGACC
(配列番号35)

リバープライマー: TTACTGCTCGTTCTTCAGCACG (配列番号36)

<表3の実験で使用したプライマー>

フォワードプライマー: CTCGCTGCAAGCAAATGAAC (配列番号37)

リバースプライマー：TCGTCCCAGGACTCGATCAC（配列番号38）

[0125] PCR増殖断片はExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagents (ThermoFisher Scientific社、カタログ番号75001, 200, UL) を用いて添付プロトコル通り精製し、PCR増殖に用いたフォワードプライマーとともに3730xl（エックスエル）DNA Analyzer（Applied Biosystems社）によるサンガーシーケンス反応に供した。

表2において、実施例6の実験1のトランスフェクション実験で得られた結果を示す。

サンガーシーケンス反応で得られた波形データファイル（拡張子：.ab1）に、QSV analyzer（Bioinformatics, 2009, Vol. 25, p3244-3250）によって解析を加え、グアニン（G）のシグナル強度の比（ $G / (G + A) \times 100$ ）をRNA編集効率（%）とした。「N.D.」は検出限界以下を表す。代表例の結果を示す。

表3において、実施例6の実験2のトランスフェクション実験で得られた結果を示す。

表3では、得られた波形データファイル（拡張子：.ab1）に、QSV analyzerによって解析を加えた。未編集Rluc-W104XのGのシグナル強度を0かつAのシグナル強度を1、野生型RlucのGのシグナル強度を1かつAのシグナル強度を0と補正した時の、Gの補正したシグナル強度の比（ $G / (G + A) \times 100$ ）をRNA編集効率（%）とした。代表例の結果を示す。

[0126] 表2より、比較対照となるASRが誘導するRNA編集効率は検出限界以下であった。同条件において、アンチセンス領域にsnRNA又は5S rRNAが連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGqのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域5'側にBox Bのみが連結したガイ

ドRNA、アンチセンス領域3'側にGq及びBoxBが連結したガイドRNAは、23%以上のRNA編集効率を示した。

表3に記載の機能性領域が連結されたアンチセンス領域を含む本発明のガイドRNAは、比較対照となるASRよりも高いRNA編集効率を示した。特に、アンチセンス領域にU6が連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGqのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域5'側にBoxBのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGq及びBoxBが連結したガイドRNAは、47%以上のRNA編集効率を示した。

[0127] 実施例9 ホタルルシフェラーゼ (Fluc) mRNAを標的としたRNA編集効率の検討

本発明のガイドRNAが異なる標的RNAに対しても高いRNA編集効率を示すかを確認した。

psiCHECK-2ベクター (プロメガ社、カタログ番号C8021) に搭載されているホタルルシフェラーゼ (Fluc) のコーディング領域内167番目のAを編集標的としたガイドRNA発現プラスミドを、実施例1及び3と同様にして作製した。作製に使用したガイドRNAをコードするDNA配列は下記の通りである。

<ガイドRNAの名称及びそれをコードするDNA配列番号>

U6-ASRf-STL : 配列番号39

ASRf-Gq : 配列番号40

Gq-ASRf : 配列番号41

ASRf-BoxB : 配列番号42

BoxB-ASRf : 配列番号43

Gq-ASRf-BoxB : 配列番号44

BoxB-ASRf-Gq : 配列番号45

ASRf-Gq-BoxB : 配列番号46

Gq-BoxB-ASRf : 配列番号47

DNA配列には、5'側にp o l l l lの転写開始点に好ましいプリン塩

基（G又はA）、3'側にp o l l l lのターミネーター配列が含まれる。

得られたプラスミドを、まとめてp S U P E R n e o _ _ g R N A fと称する。

A S R fは、編集標的のAを含むF l u cレポーターmRNAに相補的な24塩基からなるアンチセンス塩基配列を表し、配列番号40に示されるDNA配列の3塩基目から26塩基目までの配列にコードされるRNA塩基配列からなる。

なお、比較対照となるガイドRNA発現プラスミドも同様にして、機能性領域を含まずA S R fのみをコードするDNA配列（配列番号48）を用いて作製した。

[0128] 実施例6の実験1と同様にして、F l u cレポーター発現プラスミド（p s i C H E C K - 2（プロメガ社、C8021）、実施例5で作製したA D A R 2発現プラスミド（p A A V - C M V - A D A R 2）、上記のガイドRNA発現プラスミド（p S U P E R n e o _ _ g R N A f）、及びキャリアープラスミドを、それぞれ1 : 80 : 100 : 19の重量比で総量100ng／ウェルとなるように混合しHEK293細胞にL i p o f e c t a m i n e TM 3000 T r a n s f e c t i o n R e a g e n t（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c社、カタログ番号L3000015）を用いてトランスフェクションした。比較対照となるガイドRNA発現プラスミドも同様にして、トランスフェクションした。キャリアープラスミドとしてp H e l p e r V e c t o r（タカラバイオ社、カタログ番号6230）を使用した。

実施例8（表2の場合）と同様にしてPCR反応を行い、シーケンスプライマーを用いてサンガーシーケンス反応を行った。F l u cレポーターmRNAを標的としたRNA編集効率を、サンガーシーケンス反応の波形データファイルより表2と同様に算出した。本試験のPCR反応及びサンガーシーケンス反応に用いたプライマーを下記に示した。

フォワードプライマーF l u c : A C C C G C T T A A A A G C T T G G

C（配列番号49）

リバースプライマーF l u c : C C A C G G T A G G C T G A G A A A T

G（配列番号50）

シークエンスプライマー：C A T G C T G T T C A G C A G C T C G C（

配列番号51）

独立した3試行の算術平均を表4に示す。

[0129] [表4]

機能性領域		ガイドRNA名	RNA編集効率 (%)
なし(比較対照)		ASRf	5.7
snRNA	U6	U6-ASRf-STL	17.5
Gq		ASRf-Gq	19.5
		Gq-ASRf	7.3
BoxB		ASRf-BoxB	8.9
		BoxB-ASRf	5.1
Gq/BoxB		Gq-ASRf-BoxB	4.2
		BoxB-ASRf-Gq	18.2
		ASRf-Gq-BoxB	9.2
		Gq-BoxB-ASRf	2.5

[0130] アンチセンス領域にU6が連結したガイドRNA、アンチセンス領域5'側又は3'側にGqのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にBoxBのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域5'側にBoxB及び3'側にGqが連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGq及びBoxBが連結したガイドRNAで、比較対照となるASRfよりも高いRNA編集効率を示した。特に、アンチセンス領域にU6が連結したガイドRNA、アンチセンス領域3'側にGqのみが連結したガイドRNA、アンチセンス領域5'側にBoxB及び3'側にGqが連結したガイドRNAは17%以上のRNA編集効率を示した。

[0131] 実施例10 ガイドRNAの細胞内での安定性の検討

ガイドRNAの細胞内での安定性は、転写阻害後のガイドRNAの残存量の比較によって評価できる。ガイドRNAの細胞導入後に目的とするガイド

RNAの残存量が多いほど安定性が高いことを意味する。

- [0132] HEK293細胞を5%FBS添加DMEMにて培養し、24ウェルプレートに 1×10^5 細胞/0.5mLで播種し、5%CO₂存在下37℃で一晩培養した。翌日、実施例4で作製した細胞内標的RNA編集活性検出用レポーター発現プラスミド(psiCHECK-2__Rluc-W104X)、実施例5で作製したADAR2発現プラスミド(pAAV-CMV-ADAR2)、並びに実施例1及び3で作製したガイドRNA発現プラスミド(pSUPERneo__H1__gRNA及びpSUPERneo__U6__gRNA)、及びキャリアープラスミドを、それぞれ、1:40:30:9の重量比で総量400ng/ウェルとなるように混合した。キャリアープラスミドとしてpHelper Vector(タカラバイオ社、カタログ番号6230)を使用した。Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific社、カタログ番号L3000015)を用いてHEK293細胞にトランスフェクションした。
- [0133] トランスフェクション24時間後に一部のウェルの細胞を回収し、アクチノマイシンD添加前の状態を0時間とした。同時に、回収しなかったウェルはアクチノマイシンD(和光純薬社、カタログ番号010-21263)を5μg/mLで添加したDMEMに置き換えた。アクチノマイシンDは二本鎖DNAに結合してRNAポリメラーゼによる転写を阻害することが知られている。アクチノマイシンD添加後4時間及び6時間において細胞を回収し、回収した細胞からmiRNeasy Mini Kit(QIAGEN社、カタログ番号217004)及びRNase-free DNase Set(QIAGEN社、カタログ番号79254)を用いて添付プロトコルに従ってガイドRNAを含む総RNAを抽出、精製した。得られたRNAについて、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit(タカラバイオ社、カタログ番号638315)を用いて添付プロトコルに従ってsmall RNAへポリA付加を行った後、逆転

写反応を行いcDNAを得た。cDNAを鋳型とし、PrimeSTAR（登録商標）GXL DNA Polymerase（タカラバイオ社、カタログ番号R050A）を用いて2種類のタッチダウンPCR反応を行った。細胞に内在性に発現するU6 snRNAのPCR反応には、Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green（登録商標）Kit（タカラバイオ社、カタログ番号638314）に添付のU6 Forward Primer及びU6 Reverse Primerを用いた。細胞内在性U6 snRNA量はサンプル間のガイドRNA量の補正に用いた。ガイドRNAのPCR反応にはASRと相同な配列（配列番号52）のプライマー及び上記キットに添付のmRQ 3' Primerを用いた。タッチダウンPCRの反応条件は、94℃、1分のサイクル前熱変性ステージ、98℃、10秒の熱変性、65℃、15秒のアニーリング、68℃、30秒の伸長反応からなる増幅ステージ、72℃、3分の伸長反応ステージで構成される。この内、増幅ステージの1サイクル目から5サイクル目は、サイクルの経過ごとにアニーリング温度が1℃ずつ低下するタッチダウン方式であり、6サイクル目以降のアニーリング温度は60℃で維持される。細胞内在性U6 snRNAのPCRの増殖ステージは全23サイクル、ガイドRNAのPCRの増殖ステージは全20サイクルで実施した。

[0134] それぞれのPCR産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、泳動結果をChemiDoc™ Touch イメージングシステム（BIO RAD社）にて撮影した。PCRバンドはImage Lab 6.1 Software for Windows（BIO RAD社）で定量した。

表5では、ガイドRNAを鋳型としたPCRバンドのシグナル強度を細胞内在性U6 snRNAを鋳型としたPCRバンドのシグナル強度で補正した値（ガイドRNA/U6値）を算出した。ガイドRNAの残存量を、アクチノマイシンD添加前の値を1とし、アクチノマイシンD添加後4時間及び6時間におけるガイドRNA/U6値の相対値を表した。独立した3試行の算術平均を示した。

[0135] [表5]

機能性領域		ガイドRNA名	ガイドRNAの残存量	
			4時間	6時間
なし(比較対照)		ASR	0.36	0.40
snRNA	U6	U6-ASR-STL	0.46	0.52
Gq		ASR-Gq	0.48	0.59
BoxB		BoxB-ASR	0.57	0.68

[0136] アクチノマイシンD添加後のガイドRNAの残存量が多いほど、細胞内における当該ガイドRNAの安定性が高いことを意味している。

表5に示した本発明のガイドRNAは、比較対照となるASRに比べて、アクチノマイシンD添加後4時間及び6時間において高いガイドRNAの残存量を示し、安定性が高いことが認められた。

産業上の利用可能性

[0137] 本発明のガイドRNAは、標的RNA編集に有用であり、本発明のガイドRNA、本発明のガイドRNAをコードする核酸、本発明の発現ベクター、又は本発明のポリペプチドを含む医薬組成物は、遺伝性疾患をはじめ標的RNAを編集することにより予防又は治療する種々の疾患に使用することができる点で有用である。

配列表フリーテキスト

[0138] 配列番号1～7：合成RNA
配列番号10～52：合成DNA