(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2007 年2 月15 日 (15.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/018169 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C07H 21/02* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/315581

(22) 国際出願日: 2006 年8 月7 日 (07.08.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-229335 2005 年8 月8 日 (08.08.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 勉 (SUZUKI, Tsutomu) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 櫻井 雅之 (SAKURAI, Masayuki) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

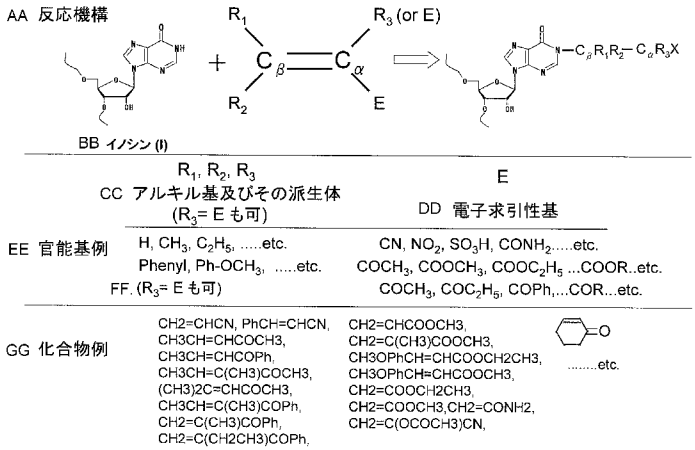
(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目８番７号 京橋日殖ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,

[続葉有]

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTION OF INOSINE-CONTAINING SITE IN RNA

(54) 発明の名称: ＲＮＡ中のイノシン化部位の検出方法



(57) **Abstract:** Disclosed is a method for detection of an inosine-containing site in RNA, which can distinguish the inosine-containing site from a noise or SNP readily, can be performed only using RNA as a sample to be analyzed, can analyze even on a small quantity of a sample, can reduce the detection background at a low level, and can detect the presence of inosine at a high sensitivity. The method comprises the step of treating RNA with a compound having an α,β-unsaturated bond and an electron-attracting group to chemically modify an inosine-containing site in the RNA.

(57) 要約: 本発明の目的は、ノイズやSNPとの判別が容易であり、解析サンプルとしてRNAのみで解析を行うことが可能であり、少量のサンプルでも解析可能であり、さらにバックグラウンドを低く抑えることが可能であり、イノシンの存在を高感度に検出することが可能である、ＲＮＡ中のイノシン化部位を検出する方法を提供することである。本発明によれば、ＲＮＡをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシ

[続葉有]

WO 2007/018169 A1

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

ン化部位を化学修飾する工程を含む、イノシン化部位の検出方法が提供される。

明 細 書

RNA中のイノシン化部位の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、RNA中のイノシン化部位の検出方法に関する。より詳細には、本発明は、RNA中のイノシン化部位を化学修飾することによって、該イノシン化部位を検出する方法に関する。

背景技術

[0002] 脱アミノ化(デアミネーション)による修飾は、RNAエディティングと呼ばれている。RNAエディティングにより、A からIへの変化が生じ、mRNA上のコドンが変化することでアミノ酸配列の変化を引き起こす。二本鎖RNAアデノシンデアミネース(ADAR;adenosine deaminase acting on RNA)はRNAの二本鎖部分を特異的に認識してアデノシン残基をイノシンに変換する酵素である。哺乳動物には、ADAR1、ADAR2、ADAR3の3種類のファミリーが存在する。グルタミン酸受容体のサブユニットGluR-BのmRNAは、ADAR2の基質であり、エキソン11番中のアデノシンがイノシンへとエディティングされ、アミノ酸配列がグルタミンからアルギニンへと変化する。ADAR2のノックアウトマウスはこのエディティングが生じないため、グルタミン酸受容体のカルシウム透過性をコントロールできず、てんかん症状を起こし、早期に死に至ることが知られている。ADARは二本鎖RNAに対し幅広い基質認識能を示すことが知られ、GluR-B以外にも、セロトニンレセプター(5-HT2c)、カリウムチャンネル(Kv1.1)などでAからIへのエディティングが見つかっている。また、興味深いことにADAR2は自身のmRNAのイントロン部位をAからIにエディティングすることで、可変的スプライシングを誘導し、ADAR2の発現量をフィードバック制御していることが知られている。

[0003] ADARが高発現している脳mRNAには17000塩基に一度の頻度でイノシンが含まれているとの見積もりがあり、ヒトmRNAには未知のエディティング部位が多量に存在することが予測されていた。最近、バイオインフォマティクス的手法を用いた解析により、ヒトmRNAのUTRにおけるAlu因子の反復配列にAからIへのエディティング候補部位が大量に報告された。実験的に実証された例はこのうちのまだわずかであるが、1

600遺伝子の12000箇所以上の部位にイノシンが存在するという見積もりは、AからIへのエディティングが遺伝子のグローバルな発現制御に大きな役割を果たしていることを示唆している。Alu因子を持っているのは霊長類だけであり、ADARは脳で高発現していることを考え合わせると、AからIへのエディティングによるトランスクリプトームの複雑性増加は、高度に進化した脳の神経回路の複雑性の獲得と関連している可能性がある。また、RNAエディティング異常に起因する疾患も報告されている。悪性グリオーマ(Malignant glioma)や筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis)ではグルタミン酸受容体のサブユニットタンパク質(GluR2)のAからIへのエディティングが顕著に減少している。このように、mRNA中のイノシンはRNAに質的な変化を与えるものであり、高次生命現象と深く関わっている可能性が高い。

[0004] AからIへの RNA エディティング部位(=Iの存在部位)の検出法としてこれまで最も一般的である手法がmatched-tissue 法である(図1)。この方法は同一個体の同一組織由来のRNA(cDNAとして増幅)とゲノムで相当する領域の配列を比較する方法である。IはCと塩基対を形成するため、mRNAから逆転写・PCR増幅後のcDNA中のI相当部位にはGが取り込まれる。よってエディティング部位ではゲノム上の塩基がAであるにも関わらず、cDNA上ではGもしくはA/Gの混在となっている。しかしこの方法ではPCRの非特異増幅・ゲノム混入・シークエンスエラー・ノイズ・対立遺伝子間のSNP (Allele SNP)・偽遺伝子・遺伝子コピー・スプライスバリアント等を原因とする偽シグナルによるGの混在と、目的とするイノシン由来のGの混在を判別することが難しい。また、エキソン境界領域や偽遺伝子の存在する領域の場合、RNAに対応するゲノム領域を判別することが困難であるためこの方法自体用いることができない。さらにこの方法で特定されたイノシン化部位は配列上Gとして検出されるため、厳密にはイノシンの存在を証明してはいない。また、同一個体由来のゲノムとRNAの両方を準備する必要があるため、解析可能なサンプルも制限されてしまうという難点も持つ。

[0005] また、これまでに分子生物学分野におけるイノシンの化学修飾法としては2例の報告がある。1つは生体内RNA中のイノシン化部位同定を目的としたイノシン特異的切断法である(Morse, D. P. (2004). Identification of substrates for adenosine deaminases that act on RNA. Methods Mol Biol 265, 199-218;Morse, D. P., and Bass, B. L.

(1997). Detection of inosine in messenger RNA by inosine-specific cleavage. Biochemistry 36, 8429-8434;及びMorse, D. P., and Bass, B. L. (1999). Long RNA hairpins that contain inosine are present in Caenorhabditis elegans poly(A)+ RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6048-6053)(図2)。この手法は以下の3ステップからなる。

[0006] (1)化学修飾試薬としてグリオキサールを用いて、RNA鎖中のグアノシン(G)とイノシン(I)の塩基修飾を行う。Gの場合、グリオキサールは1位及びN'2位に付加してcis-ジオールとなり、さらにホウ酸と化合物(図中G*)される。一方イノシンの場合、2位のアミノ基が存在しないためグリオキサールは1位にのみ付加する。さらに付加した構造は不安定であるため、容易に逆反応を起こして元のイノシンに戻る。

(2)グリオキサール/ホウ酸処理後のRNAをGとイノシンに特異的なRNase T1により切断する。このときGがG*へと修飾されているためにG部位では切断は起らない。一方イノシンは修飾を受けていない(元に戻っている)ためイノシン化部位での切断が起る。結果としてイノシン化部位特異的な切断が可能となる。

(3)切断後のRNA中のG*から付加物を取り除き、イノシンを含む側のRNAフラグメントにアンカー配列を取り付けてこの部位から逆転写・PCRを行い、その配列を解析する。

[0007] この方法でMorseらは数例のmRNA中のイノシン化部位を同定しているが(Morse, D. P., and Bass, B. L. (1999). Long RNA hairpins that contain inosine are present in Caenorhabditis elegans poly(A)+ RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6048-6053)、その後の報告はない。この解析法の成功の鍵はグリオキサール/ホウ酸処理によるGのRNase T1非感受性修飾処理である。RNAを構成する塩基の1/4を占めるGを全て修飾するのは困難であり、未修飾のGが残存することは避けられない。さらに数千～数万塩基からなる一本のmRNA中にイノシンは0～30塩基程度しか存在しないほど微量であり、未修飾のG部位の切断によるバックグラウンドが目的のイノシン化部位における切断の検出を非常に困難なものにしている。そのため仮に候補部位が得られた場合でも、matched tissue 法による確認が必要である。

[0008] また、イノシン特異的化学修飾はYoshidaらにより報告されている(Yoshida, M., Furuichi, Y., Ukita, T., and Kaziro, Y. (1967). The effect of cyanoethylation on codon r

ecognition of yeast tRNA containing inosine. Biochim Biophys Acta 149, 308-310)。この解析法では酵母の転位RNA(transfer RNA; tRNA)のアンチコドン部位(遺伝暗号を規定するmRNA上のコドンと対号する)に存在するイノシンの機能解明を目的とし、イノシンの1位をアクリロニトリルを用いてシアノエチル化してコドン－アンチコドン対形成を阻害してその効果を解析している。また反応効率は低いものの、シュードウリジン(□)もシアノエチル化され(Yoshida, M., and Ukita, T. (1968). Modification of nucleosides and nucleotides. 8. The reaction rates of pseudouridine residues with acrylonitrile and its relation to the secondary structure of transfer ribonucleic acid. Biochim Biophys Acta 157, 466-475)、Mengel-Jorgensenらはシアノエチル化によるシュードウリジンの分子量の変化を質量分析法により解析し、tRNA上の位置を特定する手法を報告している(Mengel-Jorgensen, J., and Kirpekar, F. (2002). Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry. Nucleic Acids Res 30, e135)。これらの手法は比較的豊富に存在するtRNAを解析対象とし、アンチコドンの不活性化の与える影響もしくはシアノエチル化による質量の変化を解析するものである。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、ノイズやSNPとの判別が容易であり、解析サンプルとしてRNAのみで解析を行うことが可能であり、少量のサンプルでも解析可能であり、さらにバックグラウンドを低く抑えることが可能であり、イノシンの存在を高感度に検出することが可能である、RNA中のイノシン化部位を検出する方法を提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾することによって、RNA中のイノシン化部位を検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 即ち、本発明によれば、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化

合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾する工程を含む、イノシン化部位の検出方法が提供される。

[0012] 好ましくは、本発明の方法は、さらに、化学修飾されたRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成する工程、及び合成されたcDNAに基づいてイノシン化部位を検出する工程を含む。

好ましくは、イノシン化部位の検出は、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域又はイノシン化部位の同定である。

[0013] 好ましくは、α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物は、

式：$C(R^1)R^2=C(R^3)E$

（式中、R^1及びR^2はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、又は炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基を示し、またR^1及びR^2の何れか一方はEと結合して環を形成してもよい。R^3は、水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基、又は電子吸引性基を示す。Eは電子吸引性基を示す。）

で表される化合物である。

好ましくは、電子吸引性基は、CN、NO_2、SO_3H、$CONH_2$、$COCH_3$、$COOCH_3$、$COOC_2H_5$、$COCH_3$、COC_2H_5、又はCOC_6H_5である。

[0014] 好ましくは、化学修飾されたRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成した後に、cDNAの増幅反応を行う。

好ましくは、対照として化学修飾されていないRNAを逆転写反応に供して合成されたcDNAと化学修飾されたRNAから合成されたcDNAとを比較することにより、イノシン化部位を検出する。

好ましくは、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾した後に、化学修飾されたRNAを質量分析に供することによって化学修飾されたイノシンを検出する。

好ましくは、化学修飾されたRNAに由来するcDNAの長さを検出することによって、化学修飾されたイノシンを検出する。

[0015] 好ましくは、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理

することによってイノシン化部位を化学修飾した後に、化学修飾されたRNA又はそれに由来するcDNAの塩基配列を決定することによって、化学修飾されたイノシンを検出する。

好ましくは、化学修飾されたRNAに由来するcDNAを、RNAのイノシン化部位の上流のみの配列を含むプローブを用いて検出することによって、化学修飾されたイノシンを検出する。

好ましくは、化学修飾されたRNAに由来するcDNAを、イノシン化部位で停止したcDNAを選択的に抽出してその配列を解析することによって、化学修飾されたイノシンを検出する。

[0016] 本発明の別の側面によれば、α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物を含む、RNA中のイノシン化部位修飾剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の修飾剤を含む、上記した本発明の方法を行うための試薬キットが提供される。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明の実施の形態についてさらに詳細に説明する。

本発明によるイノシン化部位の検出方法は、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾する工程を含むことを特徴とする。本発明においてRNAの種類は特に限定されず、mRNA、rRNA、tRNA又はノンコーディング(nc)RNAの何れでもよい。

[0018] 本発明の方法では、イノシン特異的な修飾・逆転写伸長阻害を検出することにより、cDNA中のイノシンの存在を証明することが可能であり、ノイズやSNPとの判別も容易である。さらに解析サンプルとしてゲノムは必要なくRNAのみで解析が行えるため、少量の貴重なサンプルでも解析可能である。この理由によりスプライス部位などの遺伝子構造や、ゲノム上のコード領域が不明な場合でもイノシン化部位を特定することが可能である。これらの点において、本発明の方法は、従来のmatched-tissu法より優れている。また、本発明の方法ではイノシン特異的な修飾を施すため、バックグラウンドを非常に低く抑えることが可能であり、イノシンの存在を高感度に検出・証明することができる利点を持つ。さらに本発明の方法における検出をマイクロアレイで行う

ことにより、生体内RNA中のイノシン化部位を網羅的に特定することができる。さらに、本発明の方法は、全RNA種を対象とし、イノシン特異的な化学修飾による逆転写鎖の伸長阻害を利用するという点において、従来報告されているイノシン特異的化学修飾(Yoshida, M., Furuichi, Y., Ukita, T., and Kaziro, Y. (1967). The effect of cyanoethylation on codon recognition of yeast tRNA containing inosine. Biochim Biophys Acta 149, 308-310)とは区別されるものである。

[0019] 以下、本発明の方法を具体的に説明する。

[0020] (1)イノシン特異的化学修飾

本発明による方法では先ず、イノシン特異的な化学修飾をRNAに施す。試薬としてはα, β－不飽和－電子求引性基化合物を用いることができる。

[0021] 反応機構は基本的にはMichael付加と呼ばれる機構(図3A)で進む。まず、修飾試薬の電子求引性基の影響でβ位の炭素原子が正電荷を帯びる。この炭素原子が、イノシンの活性アミンである1位の窒素原子に求電子付加することにより、イノシンへの付加修飾が進む。修飾試薬の選択によっては、付加官能基特異的にイノシンを含むRNA分子を単離することも可能である。修飾試薬により適切な溶媒を選択して、反応を行うことができる。以下に記載の実施例ではアクリロニトリル(CH_2=CHCN)を使用している。アクリロニトリルの場合、同様にシュードウリジンも反応することが知られているが、これは反応時間を短縮することでほぼイノシン特異的な反応条件とすることが可能である。

[0022] α, β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物としては、例えば、

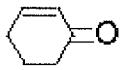
式:C(R^1)R^2=C(R^3)E

(式中、R^1及びR^2はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、又は炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基を示し、またR^1及びR^2の何れか一方はEと結合して環を形成してもよい。R^3は、水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基、又は電子吸引性基を示す。Eは電子吸引性基を示す。)

で表される化合物を挙げることができる。上記化合物中の官能基の例、並びに上記化合物の具体例は、図3B及び図3Cにそれぞれ示す。

[0023] 上記化合物の具体例としては、CH_2＝CHCN、C_6H_5CH＝CHCN、CH_3CH＝CHCOCH$_3$、CH_3CH＝CHCOC$_6H_5$、CH_3CH＝C(CH_3)COCH$_3$、(CH3)$_2$C＝CHCOCH$_3$、CH_3CH＝C(CH_3)COC$_6H_5$、CH_2＝C(CH_3)COC$_6H_5$、CH_2＝C(CH_2CH_3)COC$_6H_5$、CH_2＝CHCOOCH$_3$、CH_2＝C(CH_3)COOCH$_3$、$CH_3OC_6H_5$CH＝CHCOOCH$_2$CH$_3$、$CH_3OC_6H_5$CH＝CHCOOCH$_3$、CH_2＝COOCH$_2$CH$_3$、CH_2＝COOCH$_3$、CH_2＝CONH$_2$、CH_2＝C(OCOCH$_3$)CN、及び

[0024] [化1]



[0025] などを挙げることができる。

[0026] (2)逆転写反応(必要に応じて増幅)

本発明の方法では、イノシン特異的に化学修飾を施したRNAに対して逆転写反応を行うことができる。化学修飾をしていない場合、逆転写酵素によりイノシン化部位に対してシチジン(C)が取り込まれる。一方、化学修飾をほどこした場合、この化学修飾によりCの取り込みが阻害されて逆転写鎖の伸長はその手前で停止する。

[0027] 逆転写反応は、プライマー、化学修飾を施したRNA(鋳型)、4種のdNTP、逆転写酵素などを用いて常法により行うことができる。即ち、逆転写反応は、上記の試薬を適当な反応液(例えば、適当な塩を含む緩衝液)中で混合して、所定の温度で一定時間インキュベートすることにより行うことができる。

[0028] 本発明においては、化学修飾されたRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成した後に、cDNAの増幅反応を行うことが好ましい。この場合、逆転写反応と増幅反応は、RT－PCR法により一連の操作により行うことができる。あるいは逆転写後のcDNAを鋳型とした転写増幅により行うことも可能である。

[0029] また、逆転写反応では、化学修飾されていないRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成し、これを以下の検出工程において対照用として用いることもできる。

[0030] (3)検出

検出においては、質量分析によりイノシンによる化学修飾の有無を検出してもよいし、あるいは、伸長阻害された逆転写鎖を検出し、イノシン化学修飾の有無で比較す

ることによりRNA中のイノシン化部位を検出してもよい。この際、検出対象情報としては、その長さ、塩基配列、又は量などが挙げられる。

[0031] 検出の第一の態様としては、RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾した後に、化学修飾されたRNAを質量分析に供することによって化学修飾されたイノシン化部位を検出することができる。質量分析を行う場合、イノシンの有無及び総量を解析するには、化学修飾後のRNAをサンプルとしてもよいが、好ましくは化学修飾されたRNAをRNaseとフォスファターゼでヌクレオシドまで分解した後に行う。ここで用いるRNaseはヌクレオシドまで分解可能ならば特に限定はなく、例えば、NucleaseP1などを用いることができる。フォスファターゼも特に限定はなく、バクテリアなどの由来する生物種も限定はない。例えば、大腸菌由来のBacterial Alkaline Phospataseなどを用いることができる。

[0032] 例えば、アクリロニトリルをイノシン化部位の修飾剤として用いてRNAを処理し、その後ヌクレオシドまで分解する。このサンプルを非化学修飾RNA由来のヌクレオチドサンプルと比較して、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC／MS）におけるイノシンのピーク（m／z 269）の減少またはシアノエチル化イノシンのピーク（m／z 322）の出現またはその増加によりイノシン化部位の検出を行うことができる。

[0033] また、イノシンを含む領域の同定には、化学修飾後のRNAをサンプルとしても良いが、好ましくは化学修飾されたRNAを適当なRNaseにより断片化した後に行う。ここで用いるRNaseはRNAを数塩基から100塩基程度の長さに断片化可能ならば特に限定はなく、例えばG特異的RNase T1などを用いることができる。

[0034] 例えば、アクリロニトリルをイノシン化部位の修飾剤として用いてRNAを処理し、その後RNA断片に分解する。このサンプルを非化学修飾RNA由来のRNA断片化サンプルと比較して、液体クロマトグラフィー／質量分析法(LC／MS)におけるイノシンを含む断片のピークの減少またはシアノエチル化イノシンを含む断片のピーク（イノシン一箇所当たり53の分子量増加）の出現またはその増加によりイノシンを含む領域の同定を行うことができる。

[0035] この方法によれば、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域の同定が可能である。

[0036] 検出の第二の態様としては、化学修飾されたRNAの逆転写産物であるcDNAあるいはその増幅産物の長さを検出することによってα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物によって化学修飾されたイノシンを検出することができる。cDNAの長さは電気泳動など当業者に公知の常法により検出することができる。上述したように化学修飾（例えば、シアノエチル化など）により逆転写鎖の伸長をイノシン化部位特異的に停止させ、逆転写に用いたプライマーの3'末端から伸長した長さを電気泳動の移動度等からイノシン化部位を検出することが可能である。この方法によれば、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域又はイノシン化部位の同定が可能である。

[0037] また、検出の第三の態様としては、化学修飾されたRNA又はそれに由来するcDNAの塩基配列を決定することによってα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物によって化学修飾されたイノシンを検出することができる。上述のように化学修飾されたイノシンが存在すると、逆転写反応はイノシン化部位の手前で停止し、短いcDNAが生成される。このcDNAの塩基配列を決定することにより、cDNAの伸長が停止したイノシン化部位を検出することができる。すなわち、この方法によれば、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域又はイノシン化部位の同定が可能である。

[0038] さらに、検出の第四の態様としては、化学修飾されたRNAに由来するcDNAを、RNAのイノシン化部位の上流のみの配列を含むプローブを用いてハイブリダイゼーションにより検出することによって、α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物によって化学修飾されたイノシンを検出することができる。例えば、mRNAを化学修飾した後にポリTのプライマーを用いて3'末端から伸長させると、逆転写産物には伸長反応がイノシン化部位で停止し、mRNAの上流配列に相補する配列を欠いた短いcDNAが生成される。対照として、非化学修飾RNAに由来するcDNAを用いると、イノシンを含む化学修飾RNAに由来するcDNAでは、RNAのイノシン化部位の上流のみの配列を含むプローブと反応しないが、非化学修飾RNAに由来するcDNAでは該プローブと反応したシグナルを検出することができる。このようにシグナルの有無もしくは減少により、イノシン化部位を検出することができる。また、プローブのデザインによ

っては、イノシン化部位を含む領域さらには位置を同定することも可能である。この方法は、マイクロアレイと組み合わせて行ってもよい。もう一つの例として、mRNAを化学修飾した後にランダムプライマーを用いてmRNAの全領域から伸長させる。この逆転写産物では伸長反応がイノシン化部位で停止し、mRNAの上流配列に相補する配列を欠いた短いcDNAが生成される。対照として、非化学修飾RNAに由来するcDNAを用いると、イノシンを含む化学修飾RNAに由来するcDNAでは、RNAのイノシン化部位の上流のみの配列を含むプローブと反応しないが、非化学修飾RNAに由来するcDNAでは該プローブと反応したシグナルを検出することができる。このようにシグナルの有無もしくは減少により、イノシン化部位を検出することができる。このcDNAを場合によっては増幅してもよい。また該プローブとしては、全ゲノム、もしくは転写産物に対する相補配列を網羅したタイリングアレイや、定量PCR用のプライマーセットを用いることが可能である。

上記のように、この方法によれば、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域の同定が可能である。

[0039] 検出の第五の態様としては、化学修飾されたRNAを鋳型とし、イノシン化部位で伸長が停止したcDNAのみを検出することによって、α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物によって化学修飾されたイノシンを検出することができる。 例えば、mRNAを化学修飾した後にランダムプライマーを用いてmRNAの全領域から伸長させる。この伸長反応初期にはdNTPを含む反応溶液を用いる。逆転写産物では伸長反応がイノシン化部位で停止し、mRNAの上流配列に相補する配列を欠いた短いcDNAが生成される。一方、イノシン化部位以外では逆転写産物の伸長反応は滞りなく進み、長いcDNAが生成される。続いて伸長反応の途中でdNTPをダイデオキシ(dd)NTPに置換、もしくはdNTPに対して過剰量のddNTPを添加する。この操作により、イノシン化部位以外で伸長した逆転写産物の3'末端にはddNTPが取り込まれるため、その伸長が停止する。その結果生成されるcDNAにおいて、イノシン化部位で停止したcDNAの3'末端は3'-OH基を持つが、イノシン化部位以外で伸長したcDNAの3'末端は3'-H基となる。

[0040] こうして得られたcDNAの集団から、イノシン化部位で停止した3'末端に3'-OH基を

もつcDNAのみを選別する。

[0041] その方法の例としては、第一に、伸長反応の途中でddNTP派生体を用いる。この結果、3'末端に3'-H基をもつcDNAのみにこの派生体が存在する。続いてこの派生体に特異的に結合する担体を用いることで、cDNAの集団から、イノシン化部位以外で伸長したcDNAを除去することができる。次いで系に残ったイノシン化部位で停止したcDNAを、二本鎖DNA化する。第二に、cDNAの3'末端に、アダプターDNAもしくはRNAをリガーゼにより連結する。この際に3'末端に3'-H基を持つイノシン化部位以外で伸長したcDNAにはアダプターが連結されないために、結果として3'末端に3'-OH基をもつイノシン化部位で停止したcDNAにのみアダプターが連結される。続いてこのアダプター配列に相補的なプライマーを用いて、このcDNAを二本鎖化する。第三に、cDNAの3'末端に、Terminal deocynucleotidyl transferase活性をもつ酵素を用いることで、ポリdA, dT, dC又はdG配列(ポリdN)のいずれかを付加する。この際に3'末端に3'-H基を持つイノシン化部位以外で伸長したcDNAにはポリdN配列が付加されないために、結果として3'末端に3'-OH基をもつイノシン化部位で停止したcDNAにのみポリdN配列が付加される。続いてこのポリdN配列に相補的なプライマーを用いて、このcDNAを二本鎖化する。

[0042] このようにして二本鎖化されたcDNAを、場合によっては増幅し、その配列を解析する。例えば、逆転写時のランダムプライマーの5'末端側と、二本鎖DNA合成時のプライマーの5'末端側に制限酵素認識配列を付加しておくことで、この二本鎖cDNAを制限酵素により分解して突出末端を作成することができる。もしくはPCRを用いた二本鎖DNA増幅段階で末端に突出末端を作成することができる。このようにして末端を突出末端にした二本鎖DNAをプラスミド等のクローニングベクターに組み込むことで、その配列解析を行うことができる。この際に効率化のため、突出末端を持つ二本鎖DNA同士を連結させてからクローニングベクターに組み込む方法により、複数の配列解析を一度に行うことが可能である。最終的に検出された配列に相当するRNAのすぐ上流側にイノシン化部位が存在する。

[0043] 上記のように、この方法によれば、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域の同定が可能である。

[0044] 本発明は、RNA中のイノシンを修飾する修飾剤、さらにはこれを含むイノシン化部位検出用試薬キットに関する。

[0045] RNA中のイノシンを修飾する修飾剤は、α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物を含有する。「α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物」については上記方法に使用し得る化合物と同様であることからその説明を省略する。

[0046] イノシン化部位の検出用試薬キットは、検出手法に応じて、設計することができる。たとえば、上記第一の検出手法のための試薬キットの場合には、上記イノシン修飾剤に加えて、Rnaseやフォスファターゼを組合せることできる。また、第二の検出手法のための試薬キットとしては、上記イノシン修飾剤に加えて逆転写産物を生成するための逆転写酵素や必要に応じて逆転写反応用緩衝液などを組合せることができる。第三の検出手法のための試薬キットの場合には、上記イノシン修飾剤に加えて、塩基配列決定用の試薬一式を組み合わせることができる。塩基配列決定用の試薬一式としては、例えば、ポリメラーゼ、dNTP、ddNTP、反応用緩衝液などを一例としてあげることができる。第四の検出手法のための試薬としては、上記イノシン修飾剤に加えて、検出したいRNAの上流配列に基づくプローブ（プローブセット）と、ハイブリダイゼーション用の緩衝液、洗浄液などを組み合わせるができる。プローブセットについては、マイクロアレイに固定化して提供してもよい。

[0047] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0048] 実施例1：イノシン特異的化学修飾（1−シアノエチル化）反応

解析対象とするRNA画分10μgを30μlのCEバッファー（41％エタノール，1.1M TEA−酢酸（pH8.6））に溶解させた後、15.2M のアクリロニトリル(東京化成) 4μlを加え遮光で70℃ 15分又は30分反応させた。またコントロール(CE−)としてアクリロニトリルを非添加条件でインキュベートしたサンプルも用意した。反応後のサンプルを氷上で急冷し、RNeasy MinElute Cleanup kit（QIAGEN)により精製した。さらに溶出液中のRNAをエタノール沈殿・70％エタノールでリンスした後、凍結乾燥させた。

[0049] 実施例2：

特異的にシアノエチル化されたイノシンを液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS法)により確認した。サンプルには酵母から抽出したtotal RNAを使用し、基本的に実施例1に記載した方法に従い反応した。ただし反応時間を70℃ 0分、15分、30分、又は60分とし、反応後のRNAはRNeasy MinElute Cleanup kitを使用せずそのままエタノール沈殿・70%エタノールでリンスした後、凍結乾燥させた。続いて乾燥後のRNAを、Sakurai, M., Ohtsuki, T., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2005). Unusual usage of wobble modifications in mitochondrial tRNAs of the nematode Ascaris suum. FEBS Lett 579, 2767-2772に従ってNuclease P1とbacterial alkaline phosphatase を用いてヌクレオシドまで分解後、LC/MS解析を行った。

[0050] その結果、CE-(Cyanoethyl化, 図4A)で観察されたイノシンのピーク(m/z 269)がシアノエチル化の反応時間にともない減少し、代わりにCE-では検出されなかったシアノエチル化イノシン(CE-I)(m/z 322)のピークが観察された(図4B、C、D、E)。また、シアノエチル化シュードウリジン(CE-Ψ)のピーク (m/z 298)もシアノエチル化時間に伴い増加していったがその反応速度は遅く(図4B、C、D、F)、60分反応後も6割程度の未反応シュードウリジン(m/z 245)が検出された。これ以外の塩基については変化が検出されなかったことから、このシアノエチル化反応はイノシン特異的であるといえる。

[0051] 実施例3:プライマーエクステンション法によるイノシンの検出

実施例1に記載された反応手順によりマウス脳total RNA に対してイノシン特異的化学修飾反応を行った。反応後のRNA25μgと、5'末端を^{32}P標識したDNAプライマー0.4pmolを5μl に溶解し、65℃3分インキュベート後、室温まで冷やした。ここで用いたDNAプライマーはマウスグルタミン酸レセプターB mRNA におけるQ /R A-to-I RNA エディティング部位 (Aの99%がイノシンへとエディティングを受けている)に対して下流に設計したものであり、その塩基配列は、5'-GATCTTGGCGAAATATCGCATC-3' (配列番号1)である。室温まで冷却したサンプルを150μM dGTP, dCTP, dTTPと同濃度のddATP, 0.5mM DTT, 3mM $MgCl_2$, 175mM KCl, 50mM Tris-HCl (pH8.3), 100U SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を含む10μl 溶液中で50℃60分インキュベートした。

[0052] 反応後 2xLoading solution (7M urea, 0.05%bromophenol blue, 0.05%xylene cyanol, 1x TBE) を10μl, 100%formamideを20μl 加え、95℃ 5分ボイルした後、10μlを泳動に使用した。泳動は15%polyacrylamide, 7M urea, 1xTBEのゲルで行った。

[0053] 未処理(CE-)のtotal RNAの場合、イノシン化部位に対して逆転写鎖にCがとりこまれ、滞りなく伸長が進んだ[確認のため最初のU登場部位でddATP(ダイデオキシATP)により伸長を止めている]。一方、シアノエチル化した場合(CE+)、図5に示したようにシアノエチルイノシン(CE-I)の1－シアノエチル基によりCの取り込みが阻害されるため、逆転写鎖の伸長はイノシンの一塩基手前で停止した。この結果から、シアノエチル化により逆転写鎖の伸長をイノシン化部位特異的に停止させ、その伸長した長さによりイノシン化部位を同定することが可能であるといえる。

[0054] 実施例4:ダイレクトシークエンシングによるイノシンの検出(Inosine Chemical Erasing 法; ICE法)

実施例1に記載された反応手順によりマウス脳total RNA に対してイノシン特異的化学修飾反応を行った。一方、マウス セロトニンレセプター 2c (5HT2cR) mRNAにおける5箇所のA-to-I RNA エディティング部位を中心とした領域250ntを増幅するようなフォワードプライマーとリバースプライマーを設計した。ここで用いたDNAプライマーの塩基配列は、フォワードプライマー;5'-ATGGAGAAGAAACTGCACAATG-3'(配列番号2), リバースプライマー; 5'-ATGATGGCCTTAGTCCGCGAAT-3' (配列番号3)である。両方のプライマーをそれぞれ2.5pmolと、反応後のマウス脳total RNA を混合した。ここで加えたtotal RNA量は、それぞれ、CE-(アクリロニトリル無しの条件でのコントロール)条件;10ng, CE+ 15min条件; 50ng, CE+ 30min; 50ngである。混合したサンプルを 12.5μl のスケールでSuperScript III One-Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen)によりRT-PCRを行った。反応は逆転写; 55℃30分, 熱変性; 94℃2分後、94℃15秒, 60℃30秒, 68℃30秒を38サイクル行った。反応溶液5μlをExoSAP-IT (Usb)により処理して鋳型を精製した。続いてBig Dye Terminator v1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いてシークエンス反応を行い、ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems)により解析した。また、比較のためゲノムに対するプライマーを設計し、genomic PCRを行い同様にシークエ

ンシングした。

[0055] この手法の原理は次のようである。まず未処理(CE−)のtotal RNAの場合、リバースプライマーから伸長した逆転写鎖はイノシン化部位に対してCをとりこみ、フォワードプライマー相補部位まで到達する。この1st strand cDNAのPCR増幅産物センス鎖のイノシン相当部位にはイノシンを反映したGが存在する(図6A)。しかしシアノエチル化を施すとイノシンを含むmRNAに対する逆転写鎖の伸長はイノシン化部位の手前で止まり、フォワードプライマー相補部位まで到達せず、その後のPCRで増幅されない。よってイノシンが部分的に混在している場合はPCR産物センス鎖の相当部位からイノシンを反映したGは消失する(図6B)。また、完全にイノシンへの置換が起きている場合は、PCRによる増幅全体が見られなくなる(図6C)。

[0056] 実施例において(図7)、マウス脳 セロトニンレセプター 2c mRNAのゲノム配列とcDNA CE−配列を比較すると、5箇所のA−to−I RNA エディティング部位においてIを反映したGが混在している。しかしこの混在しているGのピークはシアノエチル化反応の進行に伴い特異的に消失し、A単独のピークとなった。よってCE−とCE+の配列を比較することにより、微量RNA中のイノシンを検出することが可能である。この化学修飾によりイノシン由来のGを特異的に消失させる手法を、Inosine Chemical Erasing(ICE法)と称する。

[0057] 実施例5:マイクロアレイによるイノシンの検出(ICE−マイクロアレイ法)

実施例1で調整したHuman brain total RNA (CE−)と(CE+ 15min)を用いてマイクロアレイ解析を行った。T7プロモーター配列を付加したオリゴdTプライマー [T7$(dT)_{24}$ cDNA primer (Ambion)] を用いた逆転写反応から先は日立ソフト・DNAチップ研究所に依頼し、同社のAceGene Human Olig Chip 30K 1Chip versionを用いて行った。同社では逆転写からcDNA合成、アミノアリルラベルaRNA(amplified RNA)転写増幅についてはAmino Allyl MessageAmp aRNA kit (Ambion)を使用している。

[0058] この手法の原理は以下の通りである。設定はイノシン化部位の下流(3')側に逆転写用のプライマーが位置し、イノシン化部位の上流(5')側にアレイ上のプローブが設計されている場合である。まず未処理(CE−)のtotal RNAの場合、リバースプライマーから伸長した逆転写鎖はイノシン化部位に対してCをとりこみ伸長する。その後二本鎖c

DNA化・T7 RNA polymeraseによるaRNAの転写増幅・標識を経てアレイ上のプローブとハイブリダイズさせ、このアレイ上のaRNAの標識強度(シグナル強度)を定量する(図8A)。一方CE+の場合、イノシンを含むmRNAに対する逆転写鎖の伸長はイノシン化部位の手前で停止するため、短い逆転写鎖が合成される。合成された逆転写鎖の長さはそのまま転写増幅を経てaRNAの長さに反映される(図8B)。よってイノシン特異的に停止した逆転写鎖に起因する短いaRNAは、アレイ上のプローブとの相補領域を含まず、プローブとハイブリダイズできない。結果的にプローブ上のaRNAのシグナル強度は、イノシン化部位の手前で逆転写鎖が停止した量を反映して減少すると考えられる。すなわち、CE-のシグナル強度と比較して、CE+のシグナル強度が減少した場合、そのアレイ上のプローブと逆転写プライマーの間の領域にイノシンが存在するといえる。

[0059] 実施例においては上記アレイ上のプローブ設計位置の制約から、日立ソフトのAce Geneを用いた。プローブ設計位置と、本発明者らがICE法により確認したA-to-I RNA エディティング部位の情報から、アレイ上のプローブ位置とmRNA末端との間にイノシン化部位が存在するmRNA 68種を抽出した(図9, ×印—黒線)。この68種とアレイ上の全遺伝子(図9, □印-灰色線)について、CE+のCE－に対するシグナル強度比 [Log2(CE+/CE-), グラフ中では横軸において負の方向に進むほどCE+のシグナルが減少したことを意味する] を解析したところ、RNAエディティングを受けるmRNA 68種の分布が負の方向に偏り、その平均値は-0.42とアレイ全遺伝子の平均値-0.12に対して優位なシグナル減少が得られた。よって本手法によりmRNA中のイノシンの存在が検出可能であることが示された。

[0060] 実施例6:リアルタイムPCRによるイノシンの検出

実施例1で調整したMouse brain total RNA (CE-)と(CE+ 15min)を鋳型としてランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った。CE-ではRNA 500 ng, アダプター配列を付加したN9ランダムプライマー(5'-AGCAGAGGATTGACGACTACAGNNNNNNNNN-3') (配列番号4) 250 μg を含む反応溶液 とdNTP (20μlスケールで終濃度 2 μM)を含む反応溶液13μlを調製した。CE+ではRNA 500 ng, ランダムプライマー 250μg を含む反応溶液とdNTP (20μlスケールで終濃度500μM)を含む反応溶液13

μlを調製した。反応溶液を65℃で2分熱変性させた後、この溶液に0.1 M DTT 1μl, 40 U/μl RNaseOUT(Invitrogen) 1μl, 5x First strand buffer (Invitrogen, 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$)を4μl, 200 U/μl SuperScriptIII RT (Invitrogen) 1μlを加え25℃で5分インキュベートした後、50℃で30分伸長反応を行い、反応後70℃ 15分 インキュベートして酵素を失活させた。この反応溶液に1N NaOHを2μl加えて70℃で10分温めてRNAを分解した後、1N HCl 2μl, 1M Tris-HCl (pH 7.6)) 1μl加えて中和した。

[0061] 続いてS-300 HR column (GE Healthcare), QIA quick nucleotide removal kit (QIAGEN)をこの順に用いて、1st strand cDNAを精製した。

[0062] 次にcDNAの3'末端にポリdC鎖を付加した。得られた1st strand cDNAを11μlに調製し、95℃で2分ボイルして急冷した後、ここに5x TdT buffer (1 M potassium cacodylate, 125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/ml BSA (pH 6.6)) 4μl, 10 mM $CoCl_2$ 2μl, 400μM dCTP, 400 U/μl terminal deoxynucleotidyl transferase (Roche) 1μlを含む反応溶液20μlを調整した。反応は37℃ 15分行い、65℃ 10分インキュベートして酵素を失活させた。

[0063] 次に、得られたcDNA溶液を鋳型として、1回目の PCR増幅を行った。PCRは上記反応後のcDNA溶液2 μlを使用して5'末端にアダプター配列をもつdC-tailに相補的なプライマー(5'-AGCAGAGGATTGACGACTACAGGGGGGGGGGGGGHN-3') (配列番号5) 2.5 pmolと増幅用のプライマー(5'-AGCAGAGGATTGACGACTACAG-3') (配列番号6) 2.5pmol を、1 mM $MgSO_4$, 200μM dNTPs, 1 U KOD-Plus (Toyobo), 1x KOD-Plus reaction bufferを含む反応溶液50 μl を調製した。反応は、まず94℃ 2分15秒, 50℃ 2分, 68℃ 2分インキュベートしてdsDNAを合成後, 94℃ 15秒, 60℃ 30秒, 68℃ 90秒のサイクルを16から24サイクル行った。この増幅産物を電気泳動で確認後、増幅がプラトーに達する1,2サイクル前の段階を至適サイクルとした。このサイクルにおけるPCR産物をQIA quick PCR purification kitを用いて精製した。

[0064] さらに上記PCR産物を鋳型として2回目のPCR増幅を行った。PCRは1回目のPCR反応溶液1μlを使用して、増幅用のプライマー(5'-AGCAGAGGATTGACGACTACAG-3') (配列番号7) 3 pmol, 1 mM $MgSO_4$, 200μM dNTPs, 1U KOD-Plus (Toyobo

), 1x KOD-Plus reaction bufferを含む反応溶液50μlを調製した。反応は、まず94℃ 2分の熱変性後、94℃ 15秒, 60℃ 30秒, 68℃ 90秒のサイクルを4から12サイクル行った。この増幅産物を電気泳動で確認後、増幅がプラトーに達する1,2サイクル前の段階を至適サイクルとした。このサイクルにおけるPCR産物をQIA quick PCR purification kitを用いて精製した。

[0065] 最後に、CE-とCE+のそれぞれの場合において、1回目と2回目のPCR産物を鋳型として、リアルタイムPCRによるcDNAの定量解析を行った。解析対象には、マウスのグルタミン酸レセプターB mRNAとセロトニンレセプター 2c mRNAの全領域に対して間隔を50塩基ずつ空けて増幅長がおよそ50塩基対になるように設計されたプライマーを用いて各領域におけるcDNA量を定量した。

[0066] 反応はSYBR Premix Ex Taq (Takara)を使用し、LightCycler 480(Roche)を用いて解析した。各プライマーセットのフォワードプライマー, リバースプライマーそれぞれ4 pmolと増幅・精製したPCR産物dsDNA 5 ngを用いて20μlスケールで行った。反応条件としては、Denature;95℃ 10秒, PCR(45サイクル); 95℃ 3秒 4.8℃/秒, 57℃ 10秒 2.5℃/秒, 72℃ 6秒 4.8℃/秒 acquisition=single, Melting; 95℃ 3秒 4.8℃/秒, 65℃ 15秒 2.5℃/秒, 95℃ acquisition=20point/℃, Cooling; 37℃ 30分 2.0℃/秒のプロトコルで行った。使用した各プライマー配列は以下の通りである。

MGluRBQRr-1050 (CAGTCACACTGACATTCATTCC) (配列番号8)

MGluRBQRf-1000 (ATGCTGTCCCTTACGTGAGTC) (配列番号9)

MGluRBQRr-750 (GCATTCTTTGCCACCTTCATTC) (配列番号10)

MGluRBQRf-700 (TGTTACAAGTCAAGGGCCGAG) (配列番号11)

MGluRBQRr-550 (CAATTTGTCCAACAGGCCTTG) (配列番号12)

MGluRBQRf-500 (TAACCTCGCAGTACTAAAACTG) (配列番号13)

MGluRBQRr-450 (AATGAGGATCCTTTAGGTGTGG) (配列番号14)

MGluRBQRf-400 (AACCTGGATTCCAAAGGCTAC) (配列番号15)

MGluRBQRr-400 (ATGGTGTCGCAAGGCTTCCT) (配列番号16)

MGluRBQRf-350 (CTGGAGTCCACAATGAATGAG) (配列番号17)

MGluRBQRr-300 (CCGTAGTCCTCACAAACACAG) (配列番号18)

MGluRBQRf-250 (TGTGGACTTATATGAGGAGTGC) (配列番号19)

MGluRBQRr-200 (GAGCCAGAGTCTAATGTTCCAT) (配列番号20)

MGluRBQRf-150 (GAGGATCTGTCTAAGCAAACAG) (配列番号21)

MGluRBQRr-100 (TAGCCGTGTAGGAGGAGATG) (配列番号22)

MGluRBQRf-50 (AGGTGTGTGGTGGTTCTTTAC) (配列番号23)

MGluRBQRr-25 (GATCTTGGCGAAATATCGCATC) (配列番号24)

MGluRBQRf+25 (GTTTTCCTTGGGTGCCTTTATG) (配列番号25)

MGluRBQRr+5 (CATAAAGGCACCCAAGGAAAAC) (配列番号26)

MGluRBQRf+55 (AGTGAATCAACTAATGAATTTGGGA) (配列番号27)

MGluRBQRr+60 (TCACTACTTTGTGTTTCTCTTCC) (配列番号28)

MGluRBQRf+110 (AGTGGCACACTGAGGAATTTG) (配列番号29)

MGluRBQRr+150 (CCCAATGTAGGCAAACACAATG) (配列番号30)

MGluRBQRf+200 (TCCTTTAGCCTATGAGATCTGG) (配列番号31)

MGluRBQRr+250 (CATGATAGAGATTCCAAGGCTC) (配列番号32)

MGluRBQRf+300 (AGAGGTGATTGACTTCTCGAAG) (配列番号33)

MGluRBQRr+350 (TTCCCATATACAAGTTCTCCAAC) (配列番号34)

MGluRBQRf+400 (TGCAGACACCAAAATTTGGAATG) (配列番号35)

MGluRBQRr+450 (TGGCAATTTCTGCAGCTAAGTC) (配列番号36)

MGluRBQRf+500 (TGAAGGGAATGAGCGTTATGAG) (配列番号37)

MGluRBQRr+1000 (GGGCCGAAGTATACTTAATTGTC) (配列番号38)

MGluRBQRf+1050 (GAAAAGAATACCCTGGAGCAC) (配列番号39)

MGluRBQRr+1500 (CATAGACGCCTCTTGAAAACTG) (配列番号40)

MGluRBQRf+1550 (TTTCGCAGTCACCAATGCTTTC) (配列番号41)

M5HT2cRr-1550 (TACCACTATGTTTGGGGACAGA) (配列番号42)

M5HT2cRf-1500 (TGTTGTGTCGGTATTTTGCTGC) (配列番号43)

M5HT2cRr-1050 (CTGACCACATTAGAGGGATTGA) (配列番号44)

M5HT2cRf-1000 (GCAGGTAGAGAATTTAGAGCTG) (配列番号45)

M5HT2cRr-500 (GCACCACATGATCAGAAACACA) (配列番号46)

M5HT2cRf-450 (CTTCCAAAGTCCTTGGCATTG) (配列番号47)

M5HT2cRr-400 (TTTCTTCTTTCGACGTGGCTTC) (配列番号48)

M5HT2cRf-350 (AGAACGCTCCCAACCCCAAT) (配列番号49)

M5HT2cRr-300 (TGATATTACGCAGTTCCTCCTC) (配列番号50)

M5HT2cRf-250 (CGTCAAACCCTGATGTTACTTC) (配列番号51)

M5HT2cRr-200 (CAACGGGATGAAGAATGCCAC) (配列番号52)

M5HT2cRf-150 (GACCCGAACTTCGTTCTCATC) (配列番号53)

M5HT2cRr-100 (CTCCTATTGATATTGCCCAAACG) (配列番号54)

M5HT2cRf-50 (GGACTAAGGCCATCATGAAGAT) (配列番号55)

M5HT2cRr-25 (GAATTGAACCGGCTATGCTCAA) (配列番号56)

M5HT2cRf+25 (TATCGCTGGACCGGTATGTAG) (配列番号57)

M5HT2cRr+1 (CATACCGGTCCAGCGATATG) (配列番号58)

M5HT2cRf+50 (TTTTCAACTGCGTCCATCATGC) (配列番号59)

M5HT2cRr+50 (TGGACGCAGTTGAAAATAGCAC) (配列番号60)

M5HT2cRf+100 (TTTGTGCCCCGTCTGGATTTC) (配列番号61)

M5HT2cRr+150 (TGACAAGTAGTCCCACCAGC) (配列番号62)

M5HT2cRf+200 (TCTTAATGTCCCTAGCCATTGC) (配列番号63)

M5HT2cRr+250 (AGAATGTTGCCCCCTATTGTC) (配列番号64)

M5HT2cRf+300 (CCAGCACTTTCAATAGTCGTG) (配列番号65)

M5HT2cRr+350 (CCACCATCGGAGGAATTAAAAG) (配列番号66)

M5HT2cRf+400 (GTCCAGTAGCAGCTATAGTAAC) (配列番号67)

M5HT2cRr+450 (CCAGGTTCACCATTATTGCTTC) (配列番号68)

M5HT2cRf+500 (CCCAATTCTCAGTTTGAAACTGG) (配列番号69)

M5HT2cRr+1000 (TTCTTCTTTGAAGGCCCCTAAC) (配列番号70)

M5HT2cRf+1050 (TCTTCGTCCGCTTAGAATAGTG) (配列番号71)

[0067] フォワードプライマーには"f", リバースプライマーには"r"をプライマー名の遺伝子名の後に示した。Iの存在する、GluR-BのQ to R部位、5HT2cRの最も上流のエディティング部位をそれぞれ+1位として、mRNA上の増幅領域を設定し、プライマー名の

末尾に示した。負の方向に向かうほどmRNAの3'末端に近い。プライマーの長さを含めた増幅領域はおよそ50bpとした。

[0068] この手法の原理は以下の通りである。

まずRNAを鋳型として、5'末端にアダプター配列を付加したランダムプライマーを用いて逆転写反応を行う。この際、未処理(CE-)のRNAの場合、1st strand cDNAはRNAの全領域に対して均等に生成される。一方、化学修飾処理を施した(CE+)場合、イノシン化部位の手前でcDNAの伸長が停止するため、イノシン化部位のすぐ上流側に相補的なcDNA量は、停止したcDNA量と同じだけ低下する。続いてTerminal deoxynucleotidyl transferase (Roche)を用いてcDNAの末端にポリdC鎖を付加し、このcDNAを、アダプター配列に相補的なプライマーと、アダプター配列を付加したオリゴdGプライマーにより二本鎖化とPCRによる増幅を行う。最終的に得られた産物について、タイリングアレイプローブもしくはタイリングアレイを模倣したリアルタイムPCR用のプライマーセットにより、RNAの各領域におけるcDNA量をCE-とCE+で比較する。その結果、CE+のRNAにおける1st strand cDNAが停止した量を反映して、イノシン化部位を含む領域もしくはすぐ上流(5'側)の領域でCE+/CE-のシグナル強度比が減少すると考えられる。すなわち、CE-のシグナル強度と比較して、CE+のシグナル強度が減少した場合、その定量した領域の近傍にイノシンが存在するといえる。

[0069] 実施例において、マウスのグルタミン酸レセプターB mRNA及び各領域におけるcDNA量をCE-とCE+で比較定量した(図10、図11)。

[0070] リアルタイムPCRで得られたシグナル強度において、CE+/CE-の強度比をとり、その2を底とするログを算出した。さらに同一mRNA上におけるログ値の平均を、各領域におけるログ値から引いて補正を行った。このログ値を縦軸に、横軸に各領域の位置を示した。また、グラフには1回目のPCR産物を鋳型とした場合と、2回目のPCR産物を鋳型とした場合の値を示した。

[0071] グルタミン酸レセプターBにおいては、-400-450と、-500#-550領域の間にR to G部位として知られる40%程のイノシン化部位と、+1位にQ to R部位として知られるほぼ100%のイノシン化部位が存在する。グラフでは、R to G部位の最も近い上流領域の-400#450領域及び、+1位を含む+25#-25領域において、シグナル強度比の減少のピ

ークが得られた。また、この減少度合いは、5'上流に行くにしたがって小さくなっていった。また、その減少の大きさは、それぞれのイノシン化部位の効率に比例して、R to G部位(40%)では-1程度、Q to R部位(100%)では-2.8程度まで低下した。

[0072] 一方、セロトニンレセプター2Cにおいては、+1, +3, +7, +8, +13位に、10から80%のイノシン化部位が存在する。グラフでは、これらの部位を含む+25#-25領域においてシグナル強度比の減少のピークが得られた。これらの結果から、この手法により、シグナル強度比が著しく減少する領域内もしくはその3'末端近傍にイノシン化部位の存在を検出可能であることが示された。本技術はタイリングアレイに応用可能である。

産業上の利用可能性

[0073] 12000箇所以上とも言われるイノシン化部位は、現状では、その大部分が同定されていない。イノシンは脳のmRNAに大量に存在することを考えると、精神疾患(統合失調症、パニック症候群、双極性障害、自閉症など)の異常と関連があると考えられる。これらの疾患と明確に関連するイノシン化部位を本発明の方法によって同定することができれば、疾患の発症機構の解明や治療法を考える上で非常に重要な知見を得ることができる。また、個体ごとにイノシン化部位の変動解析を行うことで、SNPのように生活習慣病や様々な疾患の発症リスクを見積もることが可能になる。

図面の簡単な説明

[0074] [図1]図1は、matched-tissue法によるイノシンの検出を示す。

[図2]図2は、イノシン特異的切断法によるイノシン化部位の同定を示す(Morse, D. P., and Bass, B. L. (1997). Detection of inosine in messenger RNA by inosine-specific cleavage. Biochemistry 36, 8429-8434より引用)。

[図3]図3は、イノシン特異的化学修飾試薬を示す。

[図4]図4は、質量分析法によるシアノエチル化反応後のイノシンの検出を示す。

[図5]図5は、プライマーエクステンション法によるイノシンの検出を示す。

[図6]図6は、ICE法の原理を示す。

[図7]図7は、ICE法によるイノシンの検出を示す。

[図8]図8は、マイクロアレイによるイノシンの検出を示す。

[図9]図9は、マイクロアレイによるイノシンを含むmRNAの検出結果を示す。

[図10]図10は、ランダムプライマーによる逆転写反応とタイリングアレイによるイノシンの検出を示す。灰色の領域はタイリングアレイ上のプローブ相補領域を示し、この領域を含むcDNAの量が各プローブにより測定される。斜線の三角形はイノシンの化学修飾により消失するプローブ量を示している。

[図11]図11は、ランダムプライマーによる逆転写反応後のcDNAのリアルタイムPCRによる定量結果を示す。ランダムプライマーを用いて逆転写後、cDNAにポリdC鎖を付加、cDNAを二本鎖化後、1回目のPCRと2回目のPCRによる産物中のマウスグルタミン酸レセプターBとセロトニンレセプタ−2Cを比較した。

請求の範囲

[1] RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾する工程を含む、イノシン化部位の検出方法。

[2] さらに、化学修飾されたRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成する工程、及び合成されたcDNAに基づいてイノシン化部位を検出する工程を含む、請求項1に記載の方法。

[3] イノシン化部位の検出が、イノシン化部位の有無の検出、イノシンの量の定量、及び／又はイノシンを含む領域又はイノシン化部位の同定である、請求項1又は2に記載の方法。

[4] α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物が、

式:$C(R^1)R^2=C(R^3)E$

（式中、R^1及びR^2はそれぞれ独立に水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、又は炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基を示し、またR^1及びR^2の何れか一方はEと結合して環を形成してもよい。R^3は、水素原子、炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、炭素数1から6のアルコキシル基を有するフェニル基、又は電子吸引性基を示す。Eは電子吸引性基を示す。）

で表される化合物である、請求項1から3の何れかに記載の方法。

[5] 電子吸引性基が、CN、NO_2、SO_3H、$CONH_2$、$COCH_3$、$COOCH_3$、$COOC_2H_5$、$COCH_3$、COC_2H_5、又はCOC_6H_5である、請求項4に記載の方法。

[6] 化学修飾されたRNAを逆転写反応に供してcDNAを合成した後に、cDNAの増幅反応を行う、請求項1から5の何れかに記載の方法。

[7] 対照として化学修飾されていないRNAを逆転写反応に供して合成されたcDNAと化学修飾されたRNAから合成されたcDNAとを比較することにより、イノシン化部位を検出する、請求項2から6の何れかに記載の方法。

[8] RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾した後に、化学修飾されたRNAを質量分析に供することによって化学修飾されたイノシンを検出する、請求項1、3、4または5の何れかに記載の方法。

[9] 化学修飾されたRNAに由来するcDNAの長さを検出することによって、化学修飾されたイノシンを検出する、請求項2から7の何れかに記載の方法。

[10] RNAをα，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物で処理することによってイノシン化部位を化学修飾した後に、化学修飾されたRNA又はそれに由来するcDNAの塩基配列を決定することによって、化学修飾されたイノシンを検出する、請求項1から7の何れかに記載の方法。

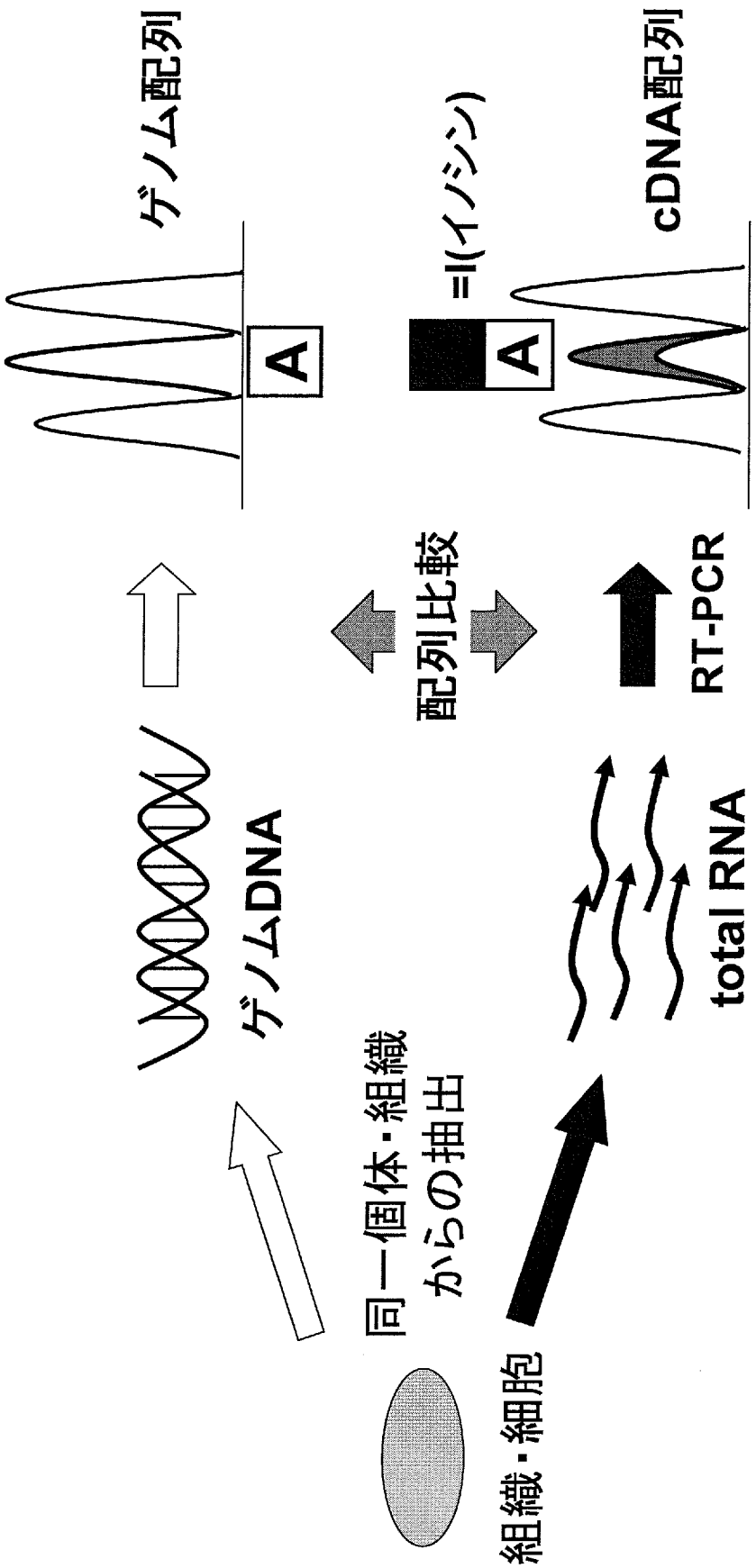
[11] 化学修飾されたRNAに由来するcDNAを、RNAのイノシン化部位の上流のみの配列を含むプローブを用いて検出することによって、化学修飾されたイノシンを検出する、請求項2から7の何れかに記載の方法。

[12] 化学修飾されたRNAに由来するcDNAを、イノシン化部位で停止したcDNAを選択的に抽出してその配列を解析することによって、化学修飾されたイノシンを検出する、請求項2から6の何れかに記載の方法。

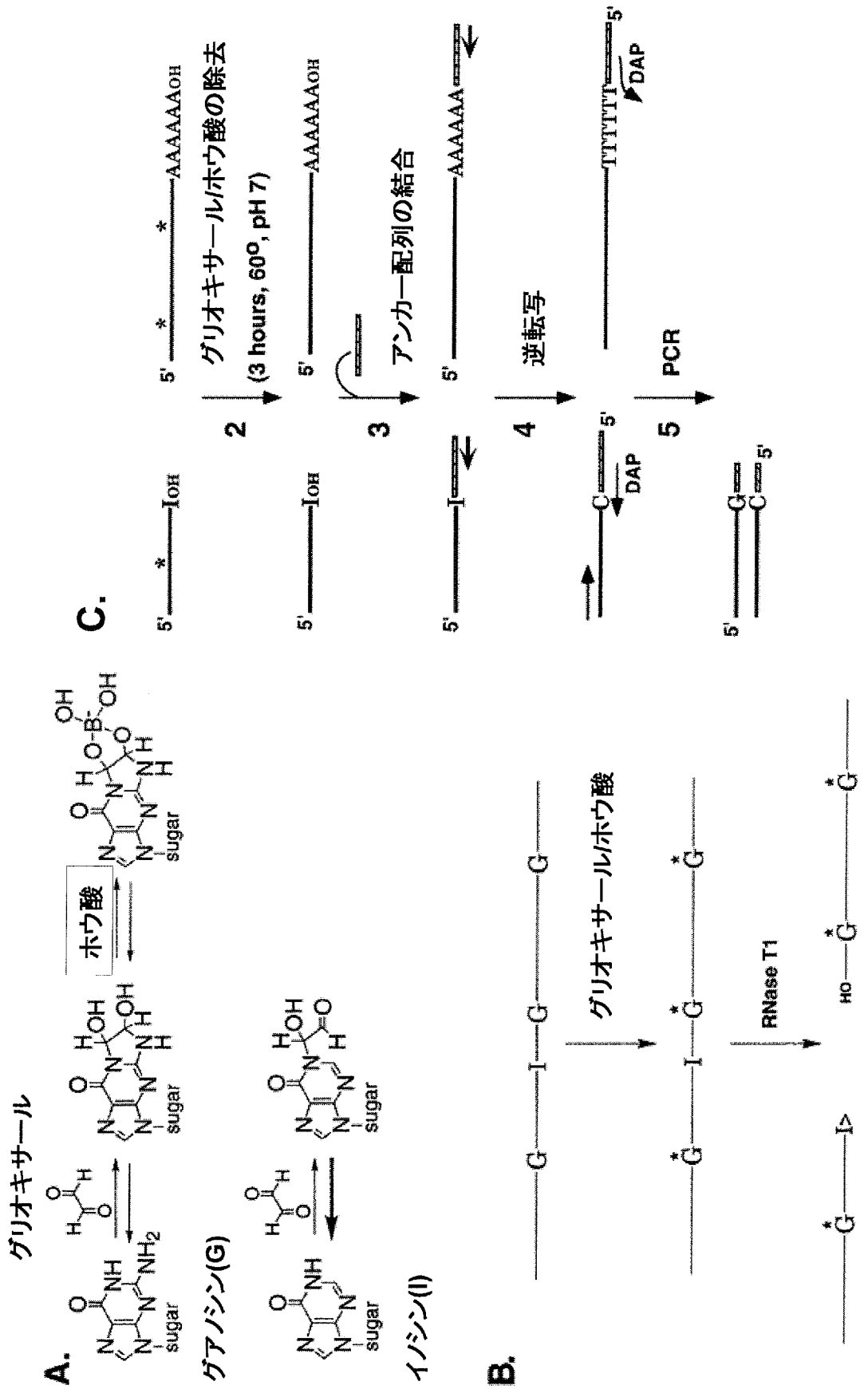
[13] α，β－不飽和結合と電子吸引性基とを有する化合物を含む、RNA中のイノシン化部位修飾剤。

[14] 請求項13記載の修飾剤を含む、請求項1から12の何れかに記載の方法を行うための試薬キット。

[図1]

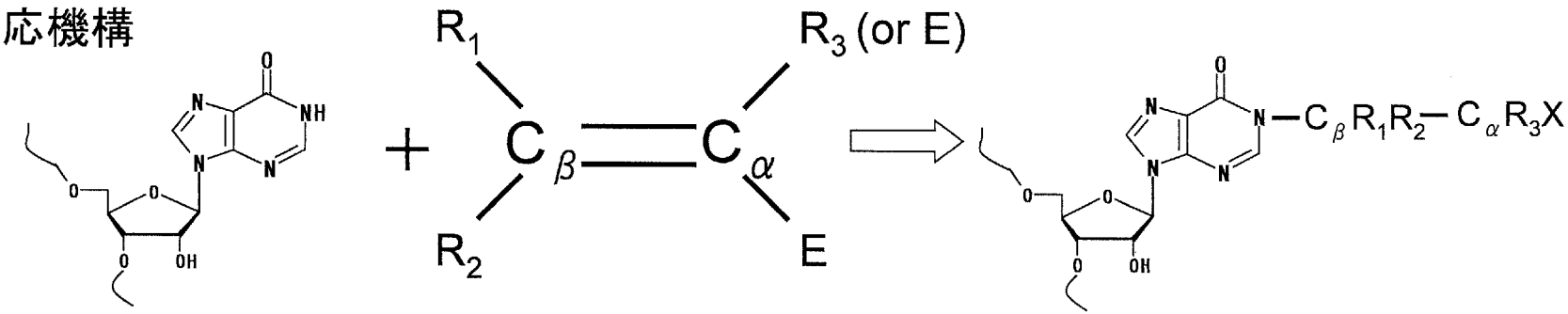

ゲノム配列
A
=I(イノシン)
A
cDNA配列
配列比較
RT-PCR
ゲノムDNA
同一個体・組織
からの抽出
total RNA
組織・細胞

[図2]

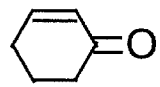

A.
グリオキサール
ホウ酸
sugar
グアノシン(G)
イノシン(I)
B.
グリオキサール/ホウ酸
RNase T1
C.
グリオキサール/ホウ酸の除去
(3 hours, 60°, pH 7)
アンカー配列の結合
逆転写
PCR
DAP

[図3]

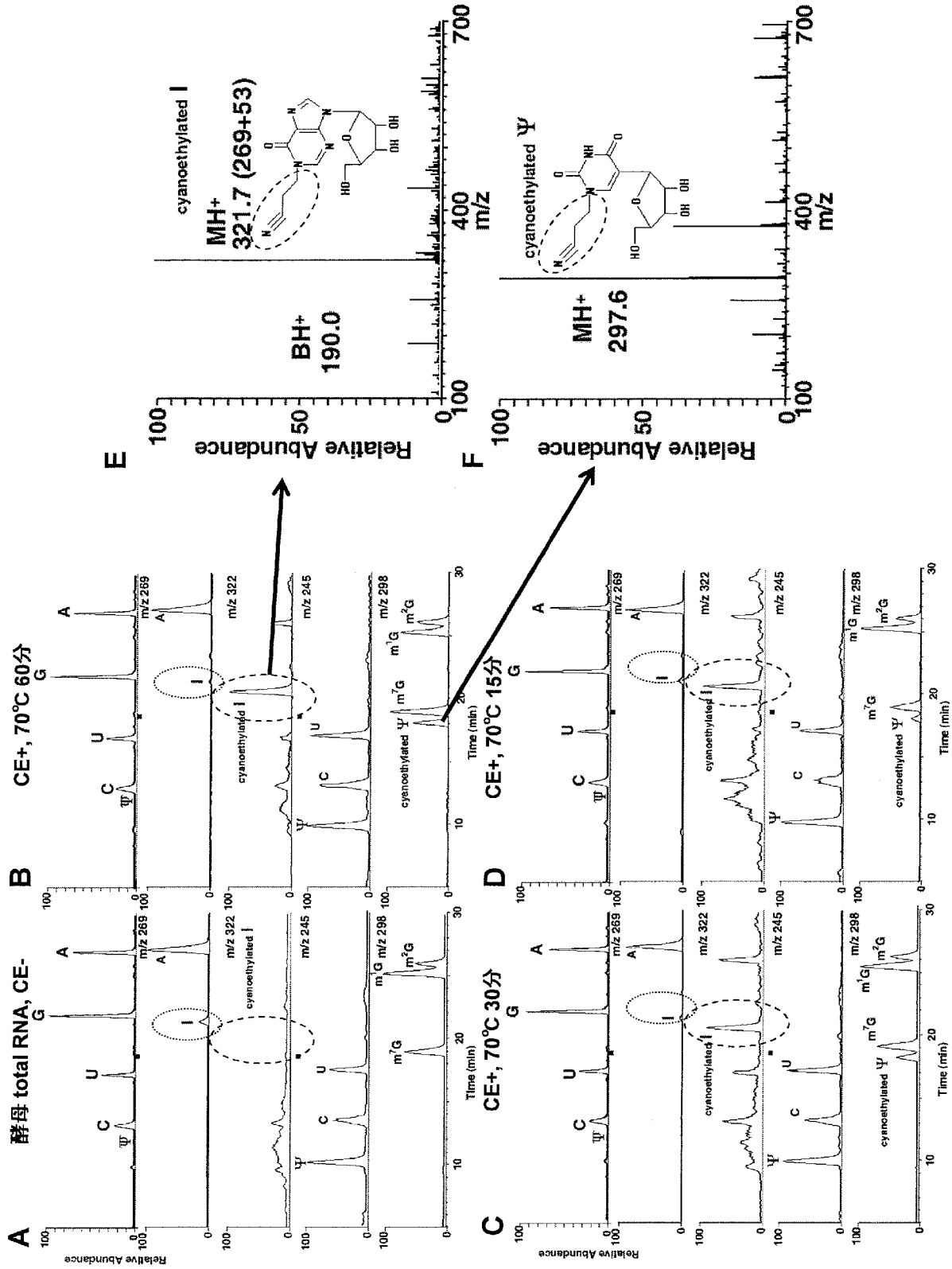
反応機構



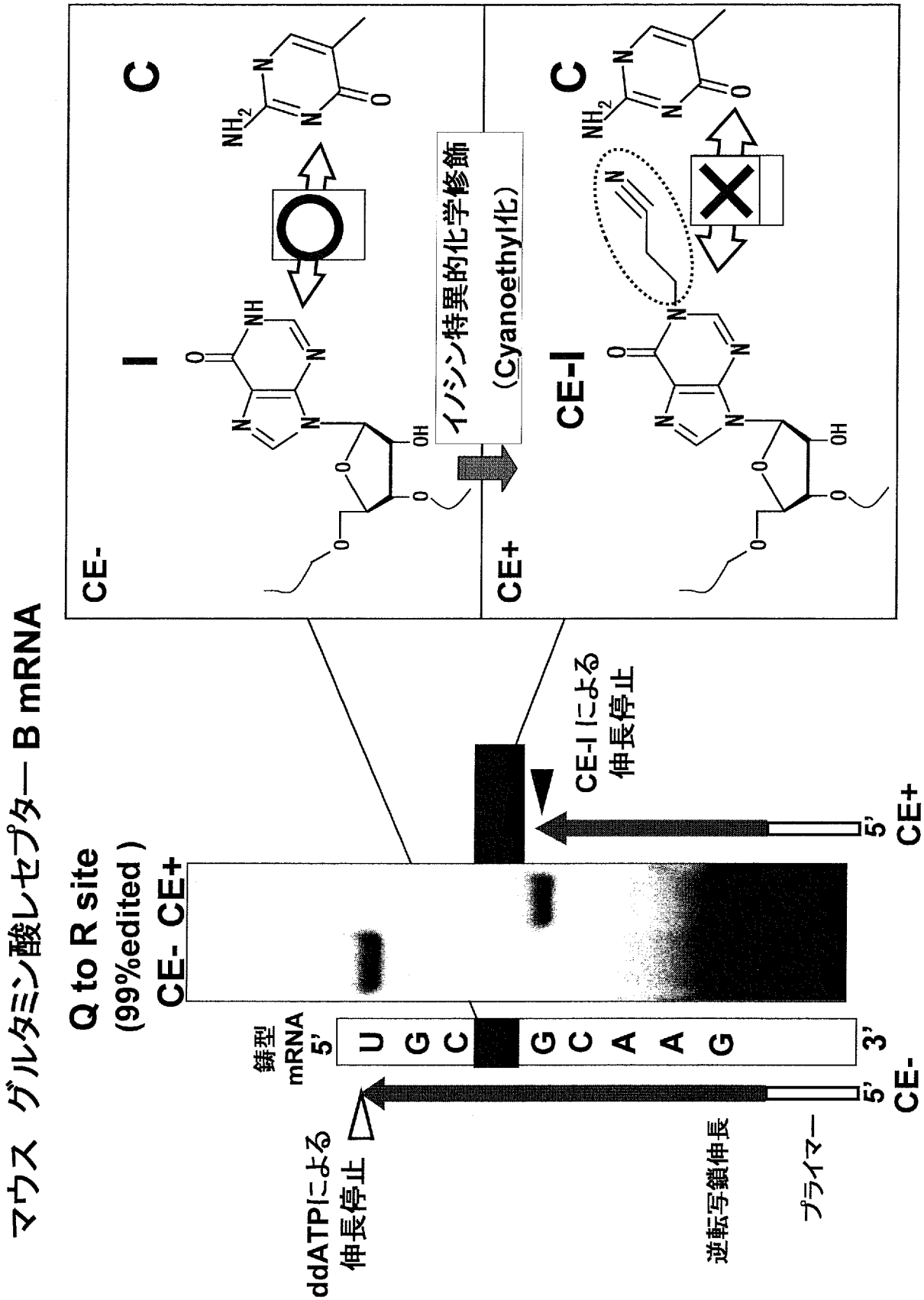
イノシン (I)

	R_1, R_2, R_3 アルキル基及びその派生体 (R_3= E も可)	E 電子求引性基
官能基例	H, CH_3, C_2H_5, ...etc. Phenyl, Ph-OCH_3, ...etc. (R_3= E も可)	CN, NO_2, SO_3H, $CONH_2$.....etc. $COCH_3$, $COOCH_3$, $COOC_2H_5$ ...COOR..etc. $COCH_3$, COC_2H_5, COPh,...COR...etc.
化合物例	CH2=CHCN, PhCH=CHCN, CH3CH=CHCOCH3, CH3CH=CHCOPh, CH3CH=C(CH3)COCH3, (CH3)2C=CHCOCH3, CH3CH=C(CH3)COPh, CH2=C(CH3)COPh, CH2=C(CH2CH3)COPh,	CH2=CHCOOCH3, CH2=C(CH3)COOCH3, CH3OPhCH=CHCOOCH2CH3, CH3OPhCH=CHCOOCH3, CH2=COOCH2CH3, CH2=COOCH3,CH2=CONH2, CH2=C(OCOCH3)CN,  .....etc.

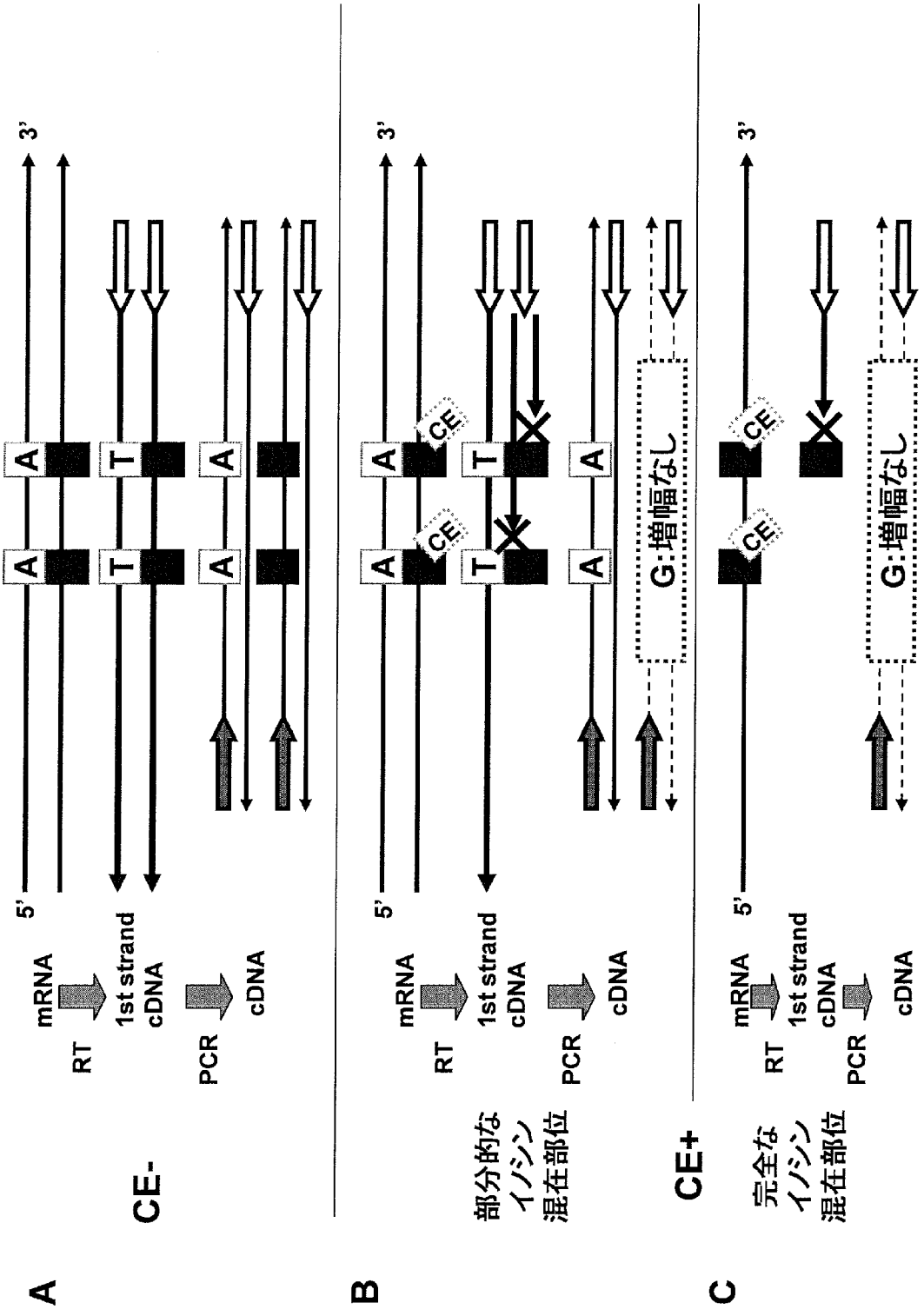
[図4]


A
酵母 total RNA, CE-
B
CE+, 70°C 60分
C
CE+, 70°C 30分
D
CE+, 70°C 15分
E
cyanoethylated I
MH+
321.7 (269+53)
BH+
190.0
F
cyanoethylated Ψ
MH+
297.6
Relative Abundance
Time (min)
m/z

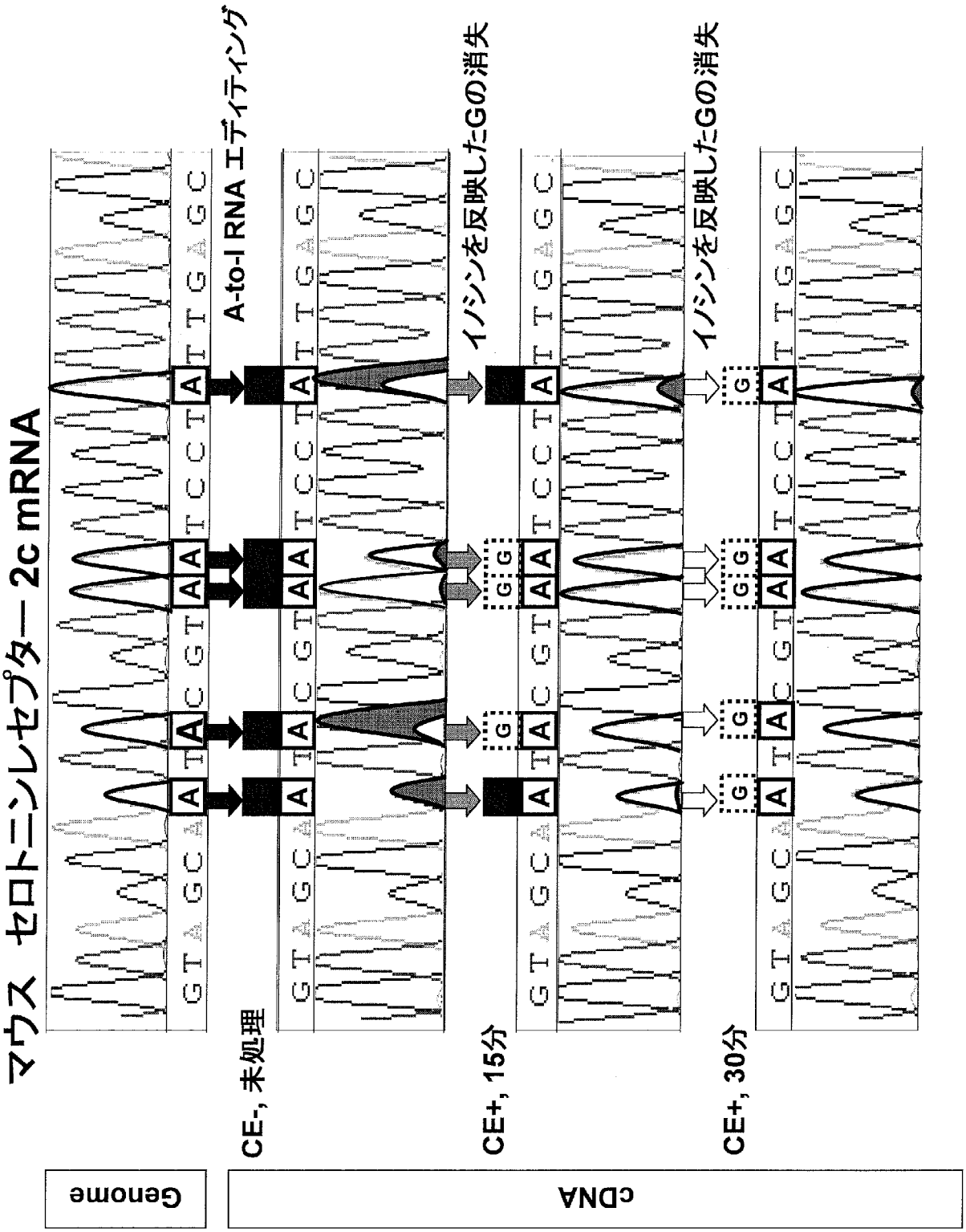
[図5]


マウス グルタミン酸レセプター B mRNA
Q to R site
(99%edited)
CE- CE+
CE-
I
C
CE+
イノシン特異的化学修飾
(Cyanoethyl化)
CE-I
C
CE-I による
伸長停止
5'
CE+
鋳型
mRNA
5'
U G C G C A A G
3'
5'
CE-
ddATPによる
伸長停止
逆転写鎖伸長
プライマー

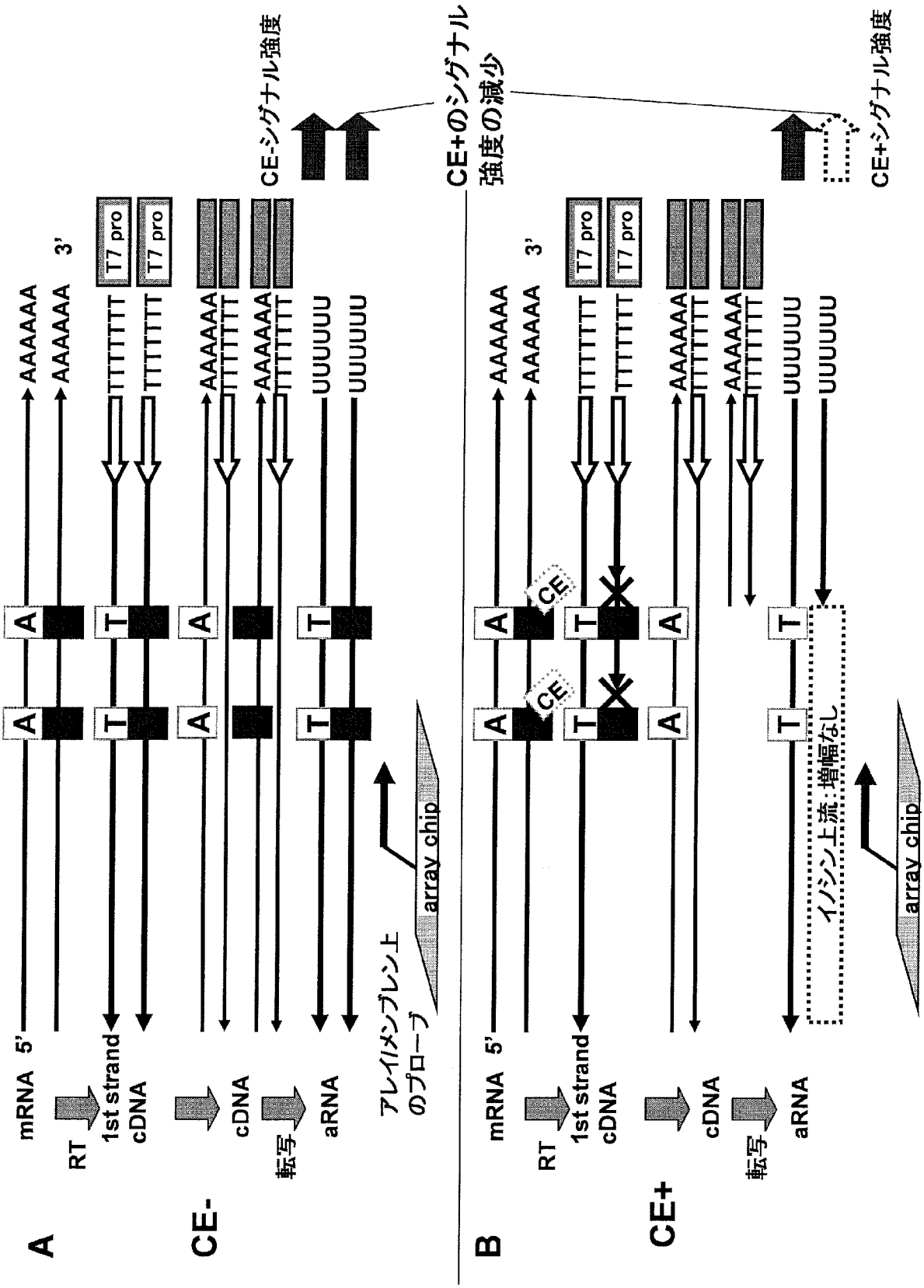
[図6]


A
CE-
B
部分的な
イノシン
混在部位
C
CE+
完全な
イノシン
混在部位
3'
5'
A
T
CE
mRNA
RT
1st strand
cDNA
PCR
cDNA
G:増幅なし

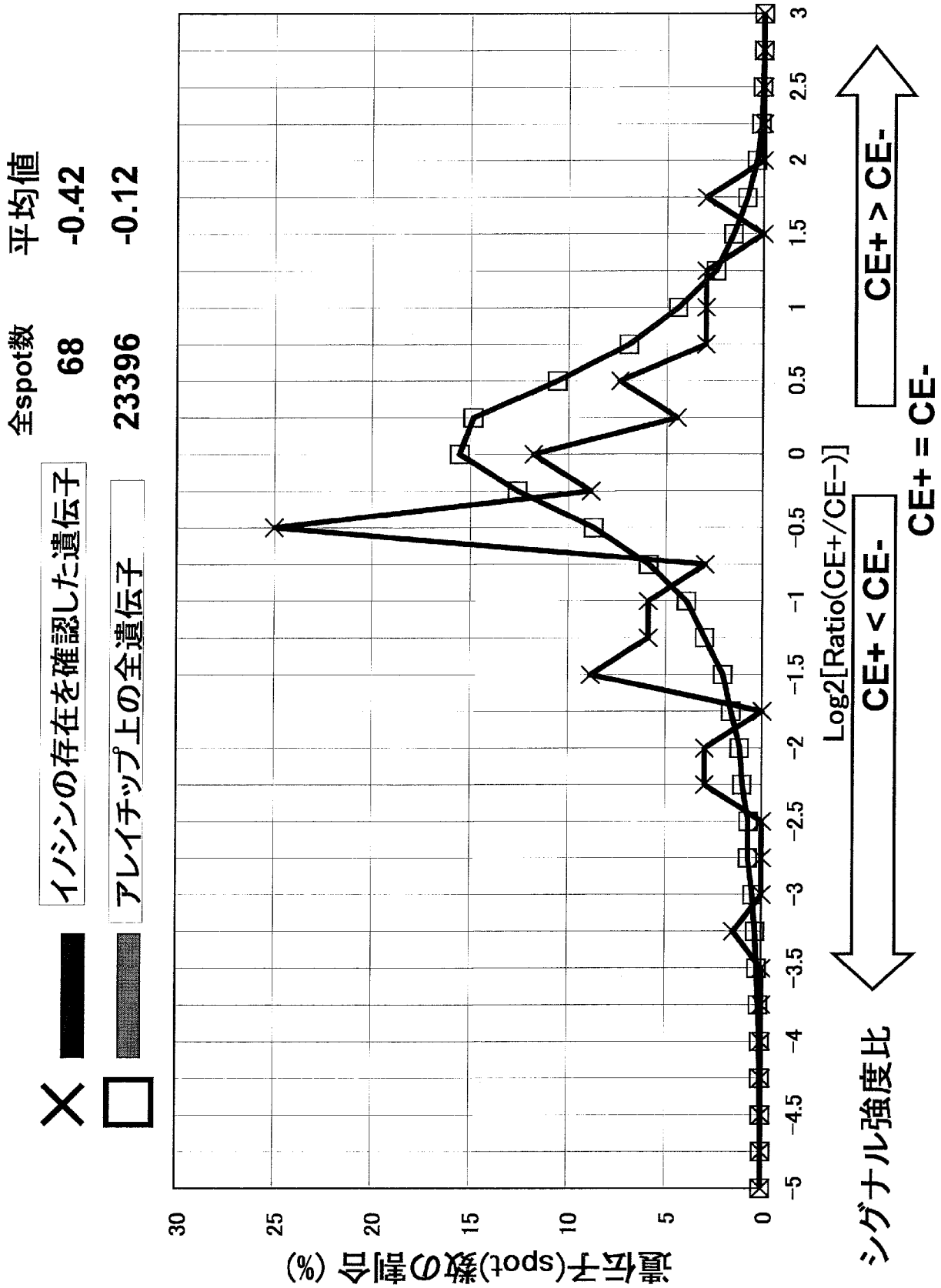
[図7]


マウス セロトニンレセプター 2c mRNA
A-to-I RNA エディティング
イノシンを反映したGの消失
イノシンを反映したGの消失
CE-, 未処理
CE+, 15分
CE+, 30分
cDNA
Genome

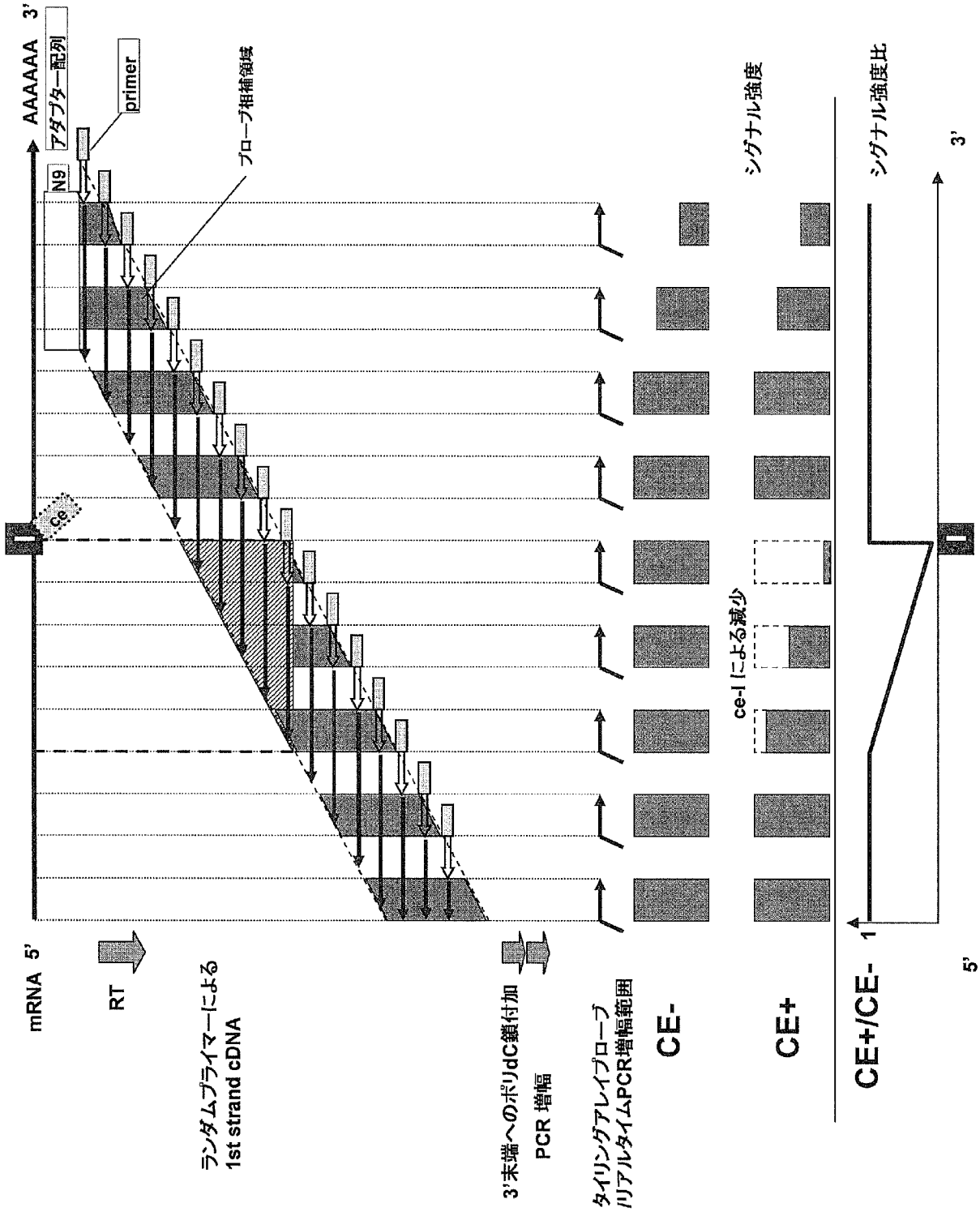
[図8]


A
CE-
B
CE+
mRNA 5'
AAAAAA 3'
RT
1st strand cDNA
T7 pro
T7 pro
TTTTTTT
cDNA
転写
aRNA
UUUUUU
アレイ/メンブレン上のプローブ
array chip
CE-シグナル強度
CE+のシグナル強度の減少
CE+シグナル強度
CE
イノシン上流：増幅なし

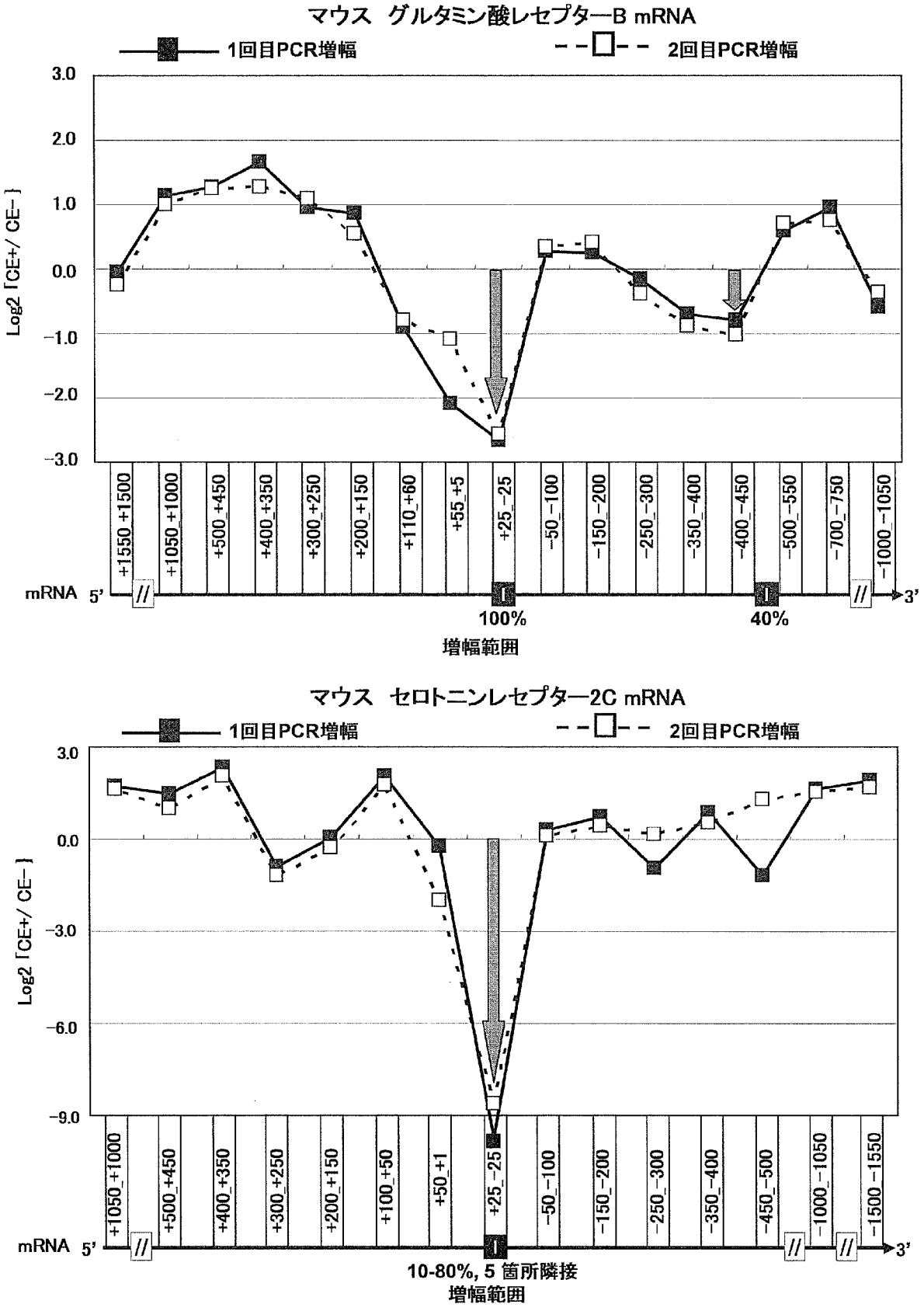
[図9]


イノシンの存在を確認した遺伝子
アレイチップ上の全遺伝子
全spot数
68
23396
平均値
-0.42
-0.12
遺伝子(spot)数の割合 (%)
シグナル強度比
Log2[Ratio(CE+/CE−)]
CE+ < CE-
CE+ = CE-
CE+ > CE-

[図10]


AAAAAA 3'
アダプター配列
N9
primer
プローブ相補領域
ce
mRNA 5'
RT
ランダムプライマーによる
1st strand cDNA
3'末端へのポリdC鎖付加
PCR 増幅
タイリングアレイプローブ
リアルタイムPCR増幅範囲
CE-
CE+
ce-I による減少
シグナル強度
シグナル強度比
CE+/CE-
1
3'
5'

[図11]


マウス グルタミン酸レセプターB mRNA
1回目PCR増幅
2回目PCR増幅
Log2 「CE+/ CE−」
3.0
2.0
1.0
0.0
−1.0
−2.0
−3.0
+1550 +1500
+1050 +1000
+500 +450
+400 +350
+300 +250
+200 +150
+110 +60
+55 +5
+25 −25
−50 −100
−150 −200
−250 −300
−350 −400
−400 −450
−500 −550
−700 −750
−1000 −1050
mRNA 5'
3'
100%
40%
増幅範囲
マウス セロトニンレセプター2C mRNA
1回目PCR増幅
2回目PCR増幅
Log2 「CE+/ CE−」
3.0
0.0
−3.0
−6.0
−9.0
+1050 +1000
+500 +450
+400 +350
+300 +250
+200 +150
+100 +50
+50 +1
+25 −25
−50 −100
−150 −200
−250 −300
−350 −400
−450 −500
−1000 −1050
−1500 −1550
mRNA 5'
3'
10-80%, 5 箇所隣接
増幅範囲

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/315581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C07H21/02*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, C12N15/09, C07H21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Daniel P. Morse et al., Long RNA hairpins that contain inosine are present in Caenorhabditis elegans poly(A)+ RNA, Proc Natl Acad Sci U S A., 1999 May 25, 96(11), pp 6048-6053.	1,3-5,7,8, 10,13,14 2,6,9,11,12
Y A	M. YOSHIDA et al., Selective Modifications of Inosine and φ-Uridine with Acrylonitrile out of the Other Ribonucleosides, J Biochem (Tokyo), 1965, 57(6), pp.818-821.	1,3-5,7,8, 10,13,14 2,6,9,11,12
Y A	Mengel-Jorgensen J. et al., Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry., Nucleic Acids Res., 2002 Dec 1, 30(23), e135.	1,3-5,7,8, 10,13,14 2,6,9,11,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 October, 2006 (30.10.06)	07 November, 2006 (07.11.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/315581

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. Yoshida et al., The effect of cyanoethylation on codon recognition of yeast tRNA containing inosine, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1967, 149(1), p.308-310	1-14
P,A	Tsutomu SUZUKI, "RNA Shushoku no Sekai-Misugosarete iru RNA no Shitsuteki na Joho", Seikagaku, 2005.12.25, Vol.77, No.12, pages 1481 to 1496	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１５５８１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/68, C12N15/09, C07H21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), JSTPlus(JDream2)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	Daniel P. Morse et al.,Long RNA hairpins that contain inosine are present in Caenorhabditis elegans poly(A)+ RNA,	1,3-5,7,8,10,13,14
A	Proc Natl Acad Sci U S A.,1999 May 25, 96(11),pp 6048-6053.	2,6,9,11,12
Y	M. YOSHIDA et al.,Selective Modifications of Inosine and φ-Uridine with Acrylonitrile out of the Other Ribonucleosides,	1,3-5,7,8,10,13,14
A	J Biochem (Tokyo) ,1965, 57(6),pp.818-821.	2,6,9,11,12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ３０．１０．２００６	国際調査報告の発送日 ０７．１１．２００６
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９７３９ 田中　晴絵 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｙ Ａ	Mengel-Jorgensen J. et al.,Detection of pseudouridine and other modifications in tRNA by cyanoethylation and MALDI mass spectrometry., Nucleic Acids Res., 2002 Dec 1, 30(23), e135.	1,3-5,7,8,10,13,14 2,6,9,11,12
Ａ	M. Yoshida et al., The effect of cyanoethylation on codon recognition of yeast tRNA containing inosine, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis ,1967,149(1), p.308-310	1-14
ＰＡ	鈴木勉，ＲＮＡ修飾の世界－見過ごされているＲＮＡの質的な情報， 生化学，2005.12.25，第７７巻，第１２号，1481-1496頁	1-14

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｂの続き）

１．この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、
以下に基づき国際調査を行った。

ａ．タイプ
- ☑ 配列表
- ☐ 配列表に関連するテーブル

ｂ．フォーマット
- ☐ 紙形式
- ☑ 電子形式

ｃ．提出時期
- ☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの
- ☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：