

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7318931号
(P7318931)

(45)発行日 令和5年8月1日(2023.8.1)

(24)登録日 令和5年7月24日(2023.7.24)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A	
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85	Z	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68		

請求項の数 5 (全38頁)

(21)出願番号	特願2019-529788(P2019-529788)	(73)特許権者	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1
(86)(22)出願日	平成30年7月12日(2018.7.12)	(74)代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(86)国際出願番号	PCT/JP2018/026362	(74)代理人	100125380 弁理士 中村 綾子
(87)国際公開番号	WO2019/013294	(74)代理人	100142996 弁理士 森本 聡二
(87)国際公開日	平成31年1月17日(2019.1.17)	(72)発明者	齊藤 博英 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1 国立大学法人京都大学 内
審査請求日	令和3年4月30日(2021.4.30)	(72)発明者	イ クアン 京都府京都市左京区吉田本町3 6 番地 1 国立大学法人京都大学 内
(31)優先権主張番号	特願2017-136469(P2017-136469)		
(32)優先日	平成29年7月12日(2017.7.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高発現性mRNAスイッチ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) miRNAもしくはタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、(ii) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNAであって、当該mRNAに含まれるヌクレオチドがN¹-メチルシュードウリジンを含み、当該mRNAに含まれるウリジンと、N¹-メチルシュードウリジンの総数に対するN¹-メチルシュードウリジンの数が95%以上であり、当該mRNAが、

(a) 前記(i)の核酸配列がmiRNAによって特異的に認識される核酸配列であり、前記(i)および(ii)の核酸配列が5'から3'の方向に連結されているmRNA、

(b) 前記(i)の核酸配列がmiRNAによって特異的に認識される核酸配列であり、前記(ii)の核酸配列が、前記(i)の核酸配列の3'側に連結され、さらに前記(ii)の核酸配列の3'側に翻訳抑制配列を含むmRNA、または

(c) 前記(i)の核酸配列がL7AeまたはMS2CPタンパク質によって特異的に認識される核酸配列であり、前記(i)および(ii)の核酸配列が5'から3'の方向に連結されているmRNA

から選択される、mRNA。

【請求項 2】

前記マーカータンパク質が、膜タンパク質または分泌タンパク質である、請求項1に記載のmRNA。

【請求項 3】

10

20

前記マーカートンパク質が、蛍光タンパク質、発光タンパク質、薬剤耐性タンパク質、細胞死誘導性タンパク質、または細胞死抑制性タンパク質である、請求項 1 に記載の mRNA。

【請求項 4】

(1) 請求項 1 に記載の mRNA を、細胞に導入する工程と、

(2) 当該マーカートンパク質の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程とを含む、細胞の判別方法。

【請求項 5】

前記マーカートンパク質が、膜タンパク質または分泌タンパク質である、請求項 4 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞内での発現量が高い高発現性 mRNA スイッチに関する。

【背景技術】

【0002】

多細胞生物の組織や器官は、多種類の細胞で構成されている。ヒトは、60兆(6×10¹³)個もの細胞から構成され、その種類は、成熟細胞だけでも400種以上にも及ぶ。これらの細胞については、個々の細胞の機能を解析するだけでなく、医療応用のための細胞調製において、細胞種を判別したり、同定したりする技術が重要になってきている。

20

【0003】

本発明者らは、細胞内在性のマイクロRNA(miRNA)に反応してタンパク質を発現するmiRNA応答性mRNAを開発し、これにより、miRNAの発現を指標として所望の細胞種を判別する方法を開発してきた(例えば、特許文献1)。また、これに先立って、特定のタンパク質の発現に反応して、他のタンパク質を発現するタンパク質応答性mRNAを開発してきた(例えば、特許文献2)。

【0004】

miRNA応答性mRNAや、タンパク質応答性mRNAなどのmRNAスイッチの細胞内への導入にあたっては、天然のmRNAに含まれる通常のウリジン、シチジンに替えて、シュードウリジン()、5-メチルシチジン(m5C)などの修飾塩基を有するヌクレオチドを含むことが好ましいことが開示されている(特許文献1)。他にも、修飾塩基を有するヌクレオチドを用いたmRNAにより、レポーター遺伝子の発現の促進を可能にしたことが報告されている(例えば、非特許文献1)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開WO2015/105172

特開2009-142259号公報

【非特許文献】

【0006】

【文献】Journal of Controlled Release 217 (2015) 337-344

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

mRNAスイッチを用いた技術は、特定の細胞の識別、同定、あるいは特定細胞の運命制御に応用が可能であり、さらなる発展が望まれる。中でも、mRNAスイッチは細胞に導入されて、コードするタンパク質の発現もしくは発現抑制により機能するため、その発現量を増加させることは重要な課題となる。mRNAスイッチの発現量は、コードするタンパク質や導入する細胞種によって異なる場合があり、特に、膜タンパクや分泌タンパクをコードするmRNAを細胞に導入しても、その発現量が低く、スイッチとして十分に機能しない

50

場合があった。

【0008】

本発明者らは、鋭意検討の結果、所定の修飾塩基を用いてmiRNA応答性mRNAやタンパク質応答性mRNAなどのmRNAスイッチを調製することにより、発現の増加および免疫反応の低減を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は次に記載の事項を提供するものである。

[1] (i) miRNAもしくはタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、(ii) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNAであって、当該mRNAに含まれるヌクレオチドがN¹-メチルシュードウリジンを含むmRNA。

10

[2] 前記(i)の核酸配列がmiRNAによって特異的に認識される核酸配列であり、前記(i)および(ii)の核酸配列が5'から3'の方向に連結されている、[1]に記載のmRNA。

[3] 前記mRNAが、前記(ii)の核酸配列が、前記(i)の核酸配列の3'側に連結され、さらに前記(ii)の核酸配列の3'側に翻訳抑制配列を含む、[1]に記載のmRNA。

[4] 前記(i)の核酸配列がタンパク質によって特異的に認識される核酸配列であり、前記(i)および(ii)の核酸配列が5'から3'の方向に連結されている、[1]に記載のmRNA。

[5] 前記マーカータンパク質が、膜タンパク質または分泌タンパク質である、[1]~[4]のいずれか1項に記載のmRNA。

20

[6] 前記マーカータンパク質が、蛍光タンパク質、発光タンパク質、薬剤耐性タンパク質、細胞死誘導性タンパク質、細胞死抑制性タンパク質である、[1]~[4]のいずれか1項に記載のmRNA。

[7] (1)(i) miRNAもしくはタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、(ii) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNAであって、当該mRNAに含まれるヌクレオチドがN¹-メチルシュードウリジンを含むmRNAを、細胞に導入する工程と、

(2) 当該マーカータンパク質の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程とを含む、細胞の判別方法。

[8] 前記マーカータンパク質が、膜タンパク質または分泌タンパク質である、[7]に記載の方法。

30

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、細胞に導入した際に、コードするタンパク質の発現量が多く、また免疫の問題を回避した、機能性の高いmRNA、及びこれを用いた細胞の判別方法を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1(a)】図1(a)及び(b)は、Native及び様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAを、293FT細胞で発現させた結果を示すグラフである。

40

【図1(b)】図1(b)は、Native及び様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAを、201B7、201B7D20、A2780、Hela、SH-5YSY、及びNHDF細胞で発現させた結果を示すグラフである。

【図2】図2は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなる3種のアルカリフォスファターゼmRNAを、細胞で発現させた結果を示すグラフである。

【図3】図3は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAの、Rabbit Reticulocyte Lysateにおけるin vitro翻訳を行った場合の、時間と蛍光強度との関係を示すグラフである。

【図4】図4は、293FT細胞におけるEGFP mRNAの経時的な発現を示すグラフである。

【図5】図5は、EGFPを発現するHeLa細胞(HeLa EGFP)におけるiRFP670 mRNAの

50

経時的な発現を示すグラフである。

【図6】図6は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAの細胞内における量の経時的な変化を示す。

【図7】図7は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNA、PALP mRNAを293FTにトランスフェクトした6時間後の、活性な免疫応答マーカーの量を示す。

【図8(a)】図8(a)は、修飾塩基を有するあるいは有さないヌクレオチドから構成されたタンパク質応答性EGFP mRNAのダイナミックレンジを示すグラフである。

【図8(b)】図8(b)は、RNA-タンパク質結合モチーフの二次構造の模式図と、これに特異的に結合するトリガータンパク質の組み合わせを示す図であり、トリガータンパク質としては、L7Ae、MS2CP、Lin28を用いた。

10

【図9(a)】図9(a)は、miR-302aスイッチ(miR-302a応答性Off Switch mRNA)は、m1 修飾塩基を用いることで、m5C/ 修飾塩基を用いたときと比較して、より大きなダイナミックレンジが得られることを示す。

【図9(b)】図9(b)は、m5C/ 修飾塩基を有するヌクレオチドからなる4x miR-302aスイッチを用いて、201B7 iPSCをトランスフェクトした結果を示す図である。

【図9(c)】図9(c)は、m1 修飾塩基を有するヌクレオチドからなる4x miR-302aスイッチを用いて、201B7 iPSCをトランスフェクトした結果を示す図である。

【図10】図10は、HeLa細胞中で、m1 修飾塩基を有するヌクレオチドからなる複数種のmiRスイッチが、ダイナミックレンジを向上させたことを示す。

20

【図11(a)】図11(a)は、HeLa細胞及び293FT細胞を、左図はm5C/ 修飾塩基を有するヌクレオチドからなるmiR-21-5p応答性mRNAにより、右図はm1 修飾塩基を有するヌクレオチドからなるmiR-21-5p応答性mRNAにより、トランスフェクトした結果を示す図である。

【図11(b)】図11(b)の左図はm5C/ 修飾塩基を有するヌクレオチドからなるmiR-21-5p応答性mRNAを用いたHeLa細胞と293FT細胞の分離のヒストグラムであり、右図はm1 修飾塩基を有するヌクレオチドからなるmiR-21-5p応答性mRNAを用いたHeLa細胞と293FT細胞の分離のヒストグラムであり、m1 修飾塩基を有するヌクレオチドからなるmRNAを用いた場合に、HeLa細胞と293FT細胞の空間分離能が向上することを示す。

30

【図12】図12はアルカリフォスファターゼ(ALP)により染色したiPSCの写真である。

【図13】図13はアルカリフォスファターゼ(ALP)により染色した、部分的に分化したiPSCの写真である。

【図14】図14は、Native及び様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmiR-21-5p応答性EGFPスイッチの293FT細胞におけるFold Changeを示すグラフである。

【図15】図15は修飾塩基を持つオリゴヌクレオチドの融解温度 T_m (melting temperature)を調べた結果であり、図15(A)は、天然型オリゴヌクレオチド、図15(B)はオリゴヌクレオチド、図15(C)はm1 オリゴヌクレオチドの典型的なfirst derivative report及びSecond derivative reportを示す。

【図16】図16は天然型、m1、またはm5C/ 修飾塩基を有するmiR-661応答性EGFPスイッチ、miR-210応答性EGFPスイッチ、またはmiR-335応答性EGFPスイッチにおいて、天然型オリゴヌクレオチドからなるスイッチのダイナミックレンジを1としたときの相対ダイナミックレンジを示すグラフである。

40

【図17】図17は天然型、m1、またはm5C/ 修飾塩基を有する4xmiR-302a-h mAG mRNAスイッチの293FT細胞における発現を50%抑制するために必要なmiR-302a模倣体の量を示すグラフである。

【図18】図18は天然型、m1、またはm1 修飾塩基を有するmiR-335-EGFP mRNAスイッチの293FT細胞におけるSlicer efficiencyを示すグラフである。

【図19】図19は天然型、m1、m5C/、m5C/m1 修飾塩基を有するU1A応答性EGFP mRNAスイッチの293FT細胞におけるFold Changeを示すグラフである。

50

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下に本発明を、実施態様を示して詳細に説明する。しかしながら、本発明は以下の実施態様に限定されるものではない。

【0013】

本発明は、一実施形態によれば、mRNAに関する。特に、(i) miRNAもしくはタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、(ii) マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNAであって、当該mRNAに含まれるヌクレオチドがN¹-メチルシュードウリジンを含むmRNAに関する。

【0014】

本実施形態によるmRNAは、細胞内に導入されると、細胞内在性のmiRNAもしくはタンパク質に特異的に応答して、マーカートンパク質の発現が制御されるmRNAである。本明細書において、このような、細胞内在性物質に応答してマーカートンパク質の発現が制御されるmRNAを、miRNA応答性mRNA、タンパク質応答性mRNA、あるいは、これらを総称してmRNAスイッチと指称する。miRNA応答性mRNAには、miRNAに応答してマーカートンパク質の発現量が増加するmiRNA応答性On-Switch mRNAと、miRNAに応答してマーカートンパク質の発現量が抑制されるmiRNA応答性Off-Switch mRNAとが含まれる。また、細胞内に導入されると、細胞内在性の物質に関係なくマーカートンパク質を発現するmRNAを、コントロールRNAと指称する。

【0015】

本発明において、mRNAスイッチが導入される細胞とは、特に限定されるものではなく任意の細胞であってよい。例えば、多細胞生物種から採取した細胞であってもよく、単離された細胞を培養することによって得られる細胞であってもよい。当該細胞は、特に、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）採取した細胞、若しくは哺乳動物より単離された細胞又は哺乳動物細胞株を培養することによって得られる細胞である。体細胞としては、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における細胞として用いることができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

【0016】

本発明における細胞は、前期体細胞を採取後に人為的な操作を加えた細胞であってよく、例えば、前記体細胞から調製したiPS細胞を含んでなる細胞群であり、あるいはES細胞やiPS細胞などによって例示される多能性幹細胞を分化させた後に得られる細胞群であって、所望する細胞以外に分化された細胞を含み得る細胞群であってもよい。本発明における細胞は、特に生存状態にあることが好ましい。本発明において、細胞が生存状態にあるとは、代謝能を維持した状態の細胞を意味する。本発明においては、細胞にmiRNA応答性mRNAを導入した後にも、その生来の特性を失うことなく、生存状態のまま、特に分裂能を維持したまま、続く用途に用いることができる細胞である。

【0017】

(1) mRNAスイッチ

10

20

30

40

50

(a) miRNA-応答性Off Switch mRNA

本発明において、miRNA-応答性Off Switch mRNAは、以下の (i a) および (i i a) の核酸配列を含むmRNAを意味する：

(i a) miRNAによって特異的に認識される核酸配列、および

(i i a) マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列。

当該 (i a) miRNAによって特異的に認識される核酸配列と (i i a) マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、機能的に連結されている。miRNA-応答性Off Switch mRNAは、miRNA Off Switch、あるいはmiRNA Switchと指称することもある。

【 0 0 1 8 】

本発明における「miRNA」とは、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与する、細胞内に存在する短鎖（20-25塩基）のノンコーディングRNAである。このmiRNAは、miRNAとその相補鎖を含むヘアピンループ構造を取ることが可能な一本差のpri-miRNAとして転写され、核内にあるDroshaと呼ばれる酵素により一部が切断されpre-miRNAとなって核外に輸送された後、さらにDicerによって切断されて機能する。

【 0 0 1 9 】

(i a) のmiRNAとしては、ある特定の細胞においてマーカートンパク質の発現を制御、特にマーカートンパク質の発現を抑制または活性化することを目的として、その細胞で特異的に発現している、あるいは特異的に発現していないmiRNAを適宜選択することができる。特異的に発現しているmiRNAとは、他の細胞と比較してある特定の細胞において、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上あるいはそれ以上の割合で高く発現しているmiRNAが例示される。このようなmiRNAは、データベースの情報（例えば、<http://www.mirbase.org/>又は<http://www.microrna.org/>）に登録されたmiRNA、及び/または当該データベースに記載されている文献情報に記載されたmiRNAより適宜選択することができる

【 0 0 2 0 】

本発明において、miRNAによって特異的に認識される核酸配列は、例えば、当該miRNAに完全に相補的な配列であることが好ましい。あるいは、当該miRNAにおいて認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該miRNAに完全に相補的な配列からの不一致は、所望の細胞において、通常にmiRNAが認識し得る不一致であれば良く、生体内における細胞内の本来の機能では、40～50%程度の不一致があっても良い。このような不一致は、特に限定されないが、1塩基、2塩基、3塩基、4塩基、5塩基、6塩基、7塩基、8塩基、9塩基、若しくは10塩基又は全認識配列の1%、5%、10%、20%、30%、若しくは40%の不一致が例示される。また、特に、細胞が備えているmRNA上のmiRNA標的配列のように、特に、シード領域以外の部分に、すなわちmiRNAの3'側16塩基程度に対応する、標的配列内の5'側の領域に、多数の不一致を含んでもよく、シード領域の部分は、不一致を含まないか、1塩基、2塩基、若しくは3塩基の不一致を含んでもよい。このような配列は、RISCが特異的に結合する塩基数を含む塩基長であればよく、長さは別段限定されないが、好ましくは、18塩基以上、24塩基未満の配列、より好ましくは、20塩基以上、22塩基未満の配列である。本発明において、miRNAによって特異的に認識される核酸配列は、所望の細胞および他の細胞へ当該配列を有するmiRNA-応答性Off Switch mRNAを導入し、所望の細胞においてのみ対応するマーカートンパク質の発現が抑制されることを確認することによって、適宜決定して用いることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明において使用される前記 (i i a) の「マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列」とは、細胞内で翻訳されて、マーカートンとして機能しうる、以下に詳述するマーカートンパク質を発現し得る核酸配列をいうものとする。なお、マーカートンパク質を、レポータータンパク質と指称することもある。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうるタンパク質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、若しくは蛍光、発光又は呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質であってよい。蛍光タンパク質としては、Sirius、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green (例えば、hmAG1)、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、などの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange (例えば、hmKO2)、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、などの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed (例えば、hdKeimaRed)、mRaspberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらには限定されない。

10

【0023】

発光タンパク質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、beta-ガラクトシダーゼ、ラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発明において、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質をマーカー遺伝子として使用する場合、所望の細胞の判別において、対応する前駆物質と細胞を接触させること、又は細胞内に対応する前駆物質を導入することによって行われ得る。

20

【0024】

また、細胞内でマーカーとして機能しうるタンパク質の別の例としては、細胞の機能に直接影響を与えるタンパク質類が挙げられる。細胞増殖タンパク質、細胞死滅タンパク質、細胞シグナル因子、薬剤耐性遺伝子、転写制御因子、翻訳制御因子、分化制御因子、リプログラミング誘導因子、RNA結合タンパク質因子、クロマチン制御因子、膜タンパク質、分泌タンパク質を例示することができるが、これらには限定されない。例えば、細胞増殖タンパク質は、それを発現した細胞のみを増殖させ、増殖した細胞を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅タンパク質は、それを発現した細胞の細胞死を引き起こすことで、特定のmiRNAを含有、もしくは含有しない細胞自体を死滅させ、細胞の生死を示すマーカーとして機能する。細胞シグナル因子は、それを発現した細胞が、特定の生物学的信号を発し、この信号を特定することでマーカーとして機能する。細胞死滅タンパク質として、例えば、BaxまたはBimが例示される。翻訳制御因子は、一例としては、特定のRNAの3次構造を認識して結合することで他のmRNAからのタンパク質への翻訳を制御することでマーカーとして機能する。翻訳制御因子として、5R1、5R2 (Nat Struct Biol. 1998 Jul; 5(7):543-6)、B2 (Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov;12(11):952-7)、Fox-1 (EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.)、GLD-1 (J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.)、Hfq (EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405)、HuD (Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5.)、SRP19 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50)、L1 (Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8.)、L11 (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.)、L18 (Biochem J. 2002 Mar 15;362(Pt 3):553-60)、L20 (J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.)、L23 (J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7)、L25 (EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):6508-21.)、L30 (Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.)、LicT (EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97.)、MS2 coat (FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75.)、Nova-2 (Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32)、Nucleocapsid (J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511.)、Nucleolin (EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81.)、p19 (Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811)、L7Ae (RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.)、PAZ (PiWi Argonaut and Zwillig) (Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.)、RnaselIII (Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66)、RR1-38 (Nat Struct Biol. 1998 J

30

40

50

ul;5(7):543-6.)、S15 (EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908.)、S4 (J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7.)、S8 (J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24.)、SacY (EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29.)、SmpB (J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39.)、snRNP U1A (Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7.)、SRP54 (RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50.)、Tat (Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81.)、ThrRS (Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7.)、TIS11d (Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.)、Virp1 (Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43.)、Vts1P (Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.)、および N (Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99.) が例示される。より好ましい翻訳制御因子は、MS2 coat、L7Aeである。

10

【0025】

膜タンパク質としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、表面抗原、膜輸送体（イオン輸送体）が挙げられる。分泌タンパク質としては、例えば、ホルモン類、消化酵素類が挙げられる。従来のmRNAスイッチにおいて、膜タンパク質や分泌タンパク質をマーカータンパク質として設計しても発現量が低く、スイッチとしての機能が十分に発揮されない問題があった。しかし、本発明のmRNAスイッチにより、十分な発現量を確保することができるようになった。

【0026】

本発明において、(ia) miRNAによって特異的に認識される核酸配列と、(iia) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNA機能的に連結される。これらが機能的に連結されるとは、マーカータンパク質のコード領域に対応するオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の5'UTR内、3'UTR内、及び/または当該オープンリーディングフレーム内に、少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備えることを意味する。miRNA-responsive Off Switch mRNAは、好ましくは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造（7メチルグアノシン5'リン酸）、マーカータンパク質のコード領域に対応するオープンリーディングフレーム並びに、ポリAテイルを備え、5'UTR内、3'UTR内、及び/またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも1つのmiRNAの標的配列を備える。mRNAにおけるmiRNAの標的配列の位置は、5'UTRであっても、3'UTRであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの3'側）であってもよく、これらのすべてにmiRNAの標的配列を備えていてもよい。したがって、miRNA標的配列の数は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つあるいはそれ以上であっても良い。

20

30

【0027】

好ましくは、miRNA-responsive Off Switch mRNAは、(ia) および (iia) の核酸配列が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。このとき、cap構造とmiRNAの標的配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、cap構造とmiRNA標的配列との間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるように設計することができる。また、miRNA標的配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、miRNA標的配列と開始コドンと間の塩基数は、0～50塩基、好ましくは、10～30塩基となるような配置にて設計することができる。

40

【0028】

本発明において、miRNA-responsive mRNA中のmiRNA標的配列内には、開始コドンとなるAUGが存在しないことが好ましい。例えば、miRNAの標的配列が5'UTRに存在し、かつ、当該標的配列内にAUGを含む場合には、3'側に連結されるマーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、標的配列内にAUGを含む場合、標的配列内のAUGをGUGに変換して使用することも可能である。また、標的配列内のAUGの影響を最小限に留めるために、5'UTR内における標的配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、cap構造と標的配列内のAUG配列との間の塩基数が、0～60塩基、例えば、0～15塩基、10～2

50

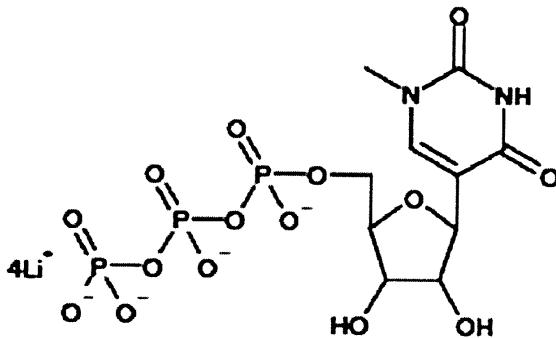
0塩基、20～30塩基、30～40塩基、40～50塩基、50～60塩基となるような配置にて設計され得る。

【0029】

所望のmiRNA及びマーカータンパク質の既知の核酸配列に基づき、上記の(i a)及び(ii a)の核酸配列を備えるmRNA設計する場合、天然の核酸を利用する場合、通常、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、ウラシル(U)の4種の塩基をもつヌクレオチドで構成されるmRNAを設計することができる。本発明のmRNAは、上記のようにして設計されたmRNAにおいて、ウラシルを塩基としてもつウリジンに代えて、N¹-メチルシュードウリジンを含むように調製する。N¹-メチルシュードウリジンは、「m1」あるいは1NUと表記することもある。以下に、N¹-メチルシュードウリジン-5'-三リン酸のリチウム塩の構造式を示す。

10

【化1】



20

【0030】

miRNA-responsive Off Switch mRNAでは、上記の設計されたmRNAに含まれるすべてのウリジンに代えてN¹-メチルシュードウリジンを含んでもよく、一部にN¹-メチルシュードウリジンを含み他はウリジンが存在していてもよい。一部にN¹-メチルシュードウリジンを含む場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができるが、例えば、ウリジンと、N¹-メチルシュードウリジンとの総数に対するN¹-メチルシュードウリジンの数が、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、あるいは、95%以上であることが好ましい。もっとも好ましくは、すべてのウリジンに代えてN¹-メチルシュードウリジンを含む。このような修飾塩基を含むmRNAは、化学合成により、あるいは、遺伝子工学的な手法により合成することができ、重合させる核酸として、ウリジン三リン酸に代えてN¹-メチルシュードウリジン-5'-三リン酸を使用することで得ることができる。なお、本発明のmRNAスイッチは、N¹-メチルシュードウリジン以外の修飾塩基、例えば、シュードウリジン()、5-メチルシチジン(m5C)、N6-メチルアデノシン(m6A)のいずれか、あるいはそれらの任意の組み合わせを含んでもよいが、好ましくは、N¹-メチルシュードウリジン以外の修飾塩基をもつヌクレオチドは含まない。

30

【0031】

(b) miRNA-応答性On Switch mRNA

本発明において、miRNA-応答性On Switch mRNAは、以下の(i b)、(ii b)および(iii b)の核酸配列を含むmRNAを意味する：

(i b) polyA配列の3'側に連結したmiRNAによって特異的に認識される核酸配列、

(ii b) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列、及び

(iii b) 前記miRNAによって特異的に認識される核酸配列の3'側に連結した翻訳抑制配列

。

miRNA-応答性On Switch mRNAは、miRNA On Switch、あるいはmiRNA Switchと指称することもある。

【0032】

40

50

miRNA-応答性On Switch mRNAにおいても、(ib)中のmiRNAによって特異的に認識される核酸配列、(iib)マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、先の(a)Off Switch mRNAにおいて定義した配列であってよい。

【0033】

miRNA-応答性On Switch mRNAは、好ましくは、5'末端から、5'から3'の向きに、Cap構造

(7メチルグアノシン5'リン酸)、所望のタンパク質遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム並びに、PolyA配列を備え、PolyA配列の3'側に連結するmiRNA標的配列、及びmiRNA標的配列の3'側に連結する翻訳抑制配列を備えている。

【0034】

5'UTRの構造は、5'末端にCap構造を備え、miRNA標的配列を備えていないものであれば、塩基数についても、塩基配列についても特に限定されるものではない。一例として、5'UTRの構造は20塩基以上であって、例えば、40~150塩基、好ましくは40~100塩基程度で構成され、Stem-loopなどのRNAの構造をとりにくく、開始コドンを含まない配列とすることができるが、特定の配列には限定されない。PolyA配列は、特に長さの上限はないが、例えば50~300塩基、好ましくは、100~150塩基のAからなる配列であってよい。

【0035】

PolyA配列の3'側に連結するmiRNA標的配列の数は、1つであることが好ましい。これは、miRNAによる標的配列の切断後にPolyAの3'側に配列が残ると、PolyAとして認識されにくくなり、遺伝子の発現が開始しない(発現抑制を解除できない)場合があるためである。しかしながら、miRNAによる標的配列の切断後に、発現抑制を解除することができる場合には、複数のmiRNA標的配列を備えていてもよい。「PolyA配列の3'側に連結するmiRNA標的配列」とは、PolyA配列とmiRNA標的配列とが直接連結されていてもよく、これらの間に機能に影響を及ぼさない程度の配列、例えば1~5塩基程度の配列を備えてもよいことをいう。

【0036】

miRNA標的配列の3'側には、翻訳抑制配列を連結する。(iib)中、「miRNAの標的配列の3'側に連結した翻訳抑制配列」とは、miRNA標的配列と翻訳抑制配列とが直接連結される場合のみならず、これらの間に、他の配列が存在していてもよいことをいうものとする。例えば、miRNA標的配列と翻訳抑制配列との間には、20~100塩基のアダプター配列を含んでもよい。また、2つ以上のmiRNA標的配列を備える場合、miRNA標的配列の3'側とは、最も3'側に位置するmiRNA標的配列の3'末端側をいうものとする。

【0037】

翻訳抑制配列は、PolyA配列の翻訳に関与する作用を妨げることが可能な配列であってよく、好ましくは、()PolyA配列を特異的に認識する20以上の塩基配列、()5'UTRを特異的に認識する配列、及び()100塩基以上の配列から選択される塩基配列を含む。

【0038】

()PolyA配列を特異的に認識する20以上の塩基配列としては、PolyA配列に完全に相補的なPolyU配列が挙げられ、例えば、20以上、40以上、60以上、または80以上のウリジンからなるPolyU配列が挙げられるが、これらには限定されない。また、PolyA配列を特異的に認識することができれば、ミスマッチが存在してもよい。また、PolyA配列を特異的に認識する20以上の塩基配列を含んでいれば、その3'側及び/または5'側に、任意の配列をさらに含んでいてもよい。なお、PolyA配列を特異的に認識し、翻訳抑制することができれば、必ずしも20以上でなくとも、5以上、10以上、あるいは15以上の塩基からなる配列であってよい。

【0039】

()5'UTRを特異的に認識する配列としては、5'UTRに完全に相補的な配列であることが好ましい。しかしながら、5'UTRを特異的に認識することができれば、完全に相補的

10

20

30

40

50

な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。また、5'UTRを特異的に認識する配列を含んでいれば、その3'側及び/または5'側に、任意の配列をさらに含んでいてもよい。

【0040】

() 100塩基以上の配列としては、塩基の種類及びおよび塩基の配列は問わず、翻訳抑制が可能な程度の長い配列であればよい。100塩基以上、好ましくは300塩基以上、500塩基以上、1000塩基以上、1500塩基以上であってもよい。

【0041】

このような構造的特徴を備えるmiRNA応答性On Switch mRNAは、細胞内の翻訳システムからpolyA配列を隠し、翻訳を阻害することができる。mRNAは細胞の中で、5'末端に存在するCAP構造と3'末端に存在するpolyA配列により認識、翻訳の活性化が起こるとされているところ、上記のように設計された人工的なmiRNA応答性On Switch mRNAは、一時的に不活性化されているといえる。そして、標的配列に特異的に結合するmiRNAの存在下においては、翻訳抑制配列による翻訳の抑制が解除され、マーカートンパク質の翻訳がなされる。

【0042】

上記に従って、(ib)、(iib)及び(iii b)の核酸配列を含むmiRNA-応答性On Switch mRNAを設計する場合、天然の核酸を用いる場合には、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、ウラシル(U)の4種の塩基をもつ核酸で構成されるmRNAを設計することができる。しかし、本発明のmRNAは、上記のようにして設計されたmRNAにおいて、ウラシルを塩基としてもつウリジンに代えて、N¹-メチルシュドウリジンを含むように調製する。N¹-メチルシュドウリジンの含有割合や、他の修飾塩基を備えるヌクレオチドの含有については、先の(a) Off Switch mRNAにおいて説明した態様と同様の態様であってよい。

【0043】

(c) タンパク質応答性Off Switch mRNA

本発明において、タンパク質応答性mRNAは、以下の(ic)、及び(iic)の核酸配列を含むmRNAを意味する：

(ic) トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列、及び

(iic) マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列。

当該(ic)トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列と(iic)マーカートンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、機能的に連結されている。タンパク質応答性Off Switch mRNAは、タンパク質応答性mRNAあるいはタンパク質応答性Switchと指称することもある。

【0044】

本態様において、(ic)トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列とは、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAである。RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、天然または既知のRNA-タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフに含まれるRNA側、または試験管内進化法(in vitro selection法)により得られた人工的なRNA-タンパク質結合モチーフに含まれるRNA側である。したがって、トリガータンパク質は、天然または既知のRNA-タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフに含まれるタンパク質側を含む。

【0045】

天然のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列は、通常、約5~30塩基で構成されており、特定のアミノ酸配列を保有するタンパク質と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成することが知られている。このような天然のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列は、以下の表1及び表2、及びウェブサイト上で利用できるデータベース：<http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/dna-protein/RNA/RNA.html>から、所望の構造変化を生ずるモチーフを適宜選択して入手することができる。本実施形態において好ましく用いられるRNA-タンパク質結合モチーフは、X

10

20

30

40

50

線結晶構造解析またはNMRによる構造解析が既に行われているモチーフ、あるいは構造解析がなされている相同タンパク質の立体構造から立体構造を推定可能なモチーフである。さらに、タンパク質がRNAの二次構造及び塩基配列を特異的に認識するモチーフであることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

【表 1】

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> oocyte)	5R2	0.35 ± 0.03 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
dsRNA	B2	1.4 ± 0.13 nM	Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov;12(11):952-7
RNA splicing motif with UGCAUGU element	Fox-1	0.49 nM at 150 mM salt	EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.
TGE	GLD-1	9.2 ± 2 nM	J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.
sodB mRNA	Hfq	1.8 nM	EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405.
RyhB (siRNA)	Hfq	1500 nM	Ann Rev Microbiol. 2004;58:303-28
mRNA	HuD	0.7 ± 0.02 nM	Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5
S domain of 7S RNA	human SRP19		RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50. Epub 2005 May 31
Large subunit of SRP RNA	human SRP19	2 nM	Nat Struct Biol. 2001 Jun;8(6):515-20
23S rRNA	L1		Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8
23S rRNA	L11		Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
5S rRNA	L18		Biochem J. 2002 May 1;363(Pt 3):553-61
23S rRNA	L20	13 ± 2 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site1	L20	88 ± 23 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site2	L20	63 ± 23 nM	Mol Microbiol. 2005 Jun;56(6):1441-56
23S rRNA	L23		J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7
5S rRNA	L25		EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):6508-21
Own mRNA	L30		Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.
mRNA	LicT		EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97
Own mRNA	M52 coat	39 ± 5 nM	FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75
Stem-loop RNA motif	Nova-2		Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32
SL2	Nucleocapsid	110 ± 50 nM	J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511
Pre-rRNA	Nucleolin		EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81
	p19	0.17 ± 0.02 nM	Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811
Box C/D	L7Ae	0.9 ± 0.2 nM	RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 2】

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
siRNA with the characteristic two-base 3' overhangs	PAZ(PWI Argonhant and Zwiile)		Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.
dsRNA	Rnase III		Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66
HIV-1 RRE (IIB)	RR1-38	3-8 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
Own mRNA	S15	5 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S15	6 nM	Nat Struct Biol. 2000 Apr;7(4):273-277.
Own mRNA	S15	43 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S4	6.5 μM in 4°C, 1.7 nM in 42°C	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S4	18 μM	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S8	26 ± 7 nM	J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24
mRNA	S8	200 nM	RNA. 2004 Jun;10(6):954-64
mRNA	SacY	1400 nM	EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29
SnRNA	Sm		Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:313-20.
tmRNA	SmpB	21 ± 7 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
TD3 of tmRNA	SmpB	650 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
U1 snRNA	snRNP U1A	0.032 ± 0.007 nM (salt dependence)	Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
S domain of 7S RNA	SRP54	500 nM	RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50.
TAR	Tat	200-800 nM	Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81
BIV TAR	Tat	1.3 nM or 8 nM or 60 nM (Changed depending on difference in Mg)	Mol Cell. 2000 Nov;6(5):1067-76
tRNA ^{Thr}	ThrRS	500 nM	Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7
thrS mRNA operator	ThrRS	10 nM	Trends Genet. 2003 Mar;19(3):155-61
Single stranded mRNA	TIS11d		Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.
PSTVd	Virp1	500 nM	Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43
RNA hairpin; Smaug recognition element (SRE)	Vts1p	30 nM	Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.
λ-BoxB	λ-N	90 nM	Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99

【 0 0 4 8 】

人工のRNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、人工的に設計したRNA - タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフ中のRNA側である。このようなRNAの塩基配列は、通常、約10～80塩基で構成されており、特定のタンパク質の特定のアミノ酸配列と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成するよう設計する。このような人工的なRNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとしては、特定のタンパク質に特異的に結合するRNAアダプターが例示される。標的となる所望のタンパク質に対し特異的に結合するRNAアダプターは、例えば、in vitro selection法またはSELEX法として知られている進化工学的手法より得るこ

10

20

30

40

50

とができる。このときのトリガータンパク質は、当該RNAアプタマーが結合するタンパク質となる。例えば、以下の表3に挙げるRNA配列が知られており、これらもまた本発明のRNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列として用いることができる。

【0049】

【表3】

Name of RNA	Name of protein	Kd	Publication
Rev aptamer 5	Rev	190 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
Aptamer	p50	5.4 ± 2.2 nM	Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9268-73.
BMV Gag aptamer	BMV Gag	20 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
BMV Gag aptamer	CCMV Gag	260 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	CCMV Gag	280 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	BMV Gag	480 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57

【0050】

本実施形態において、RNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列は、対応するトリガータンパク質との解離定数Kdが、約0.1 nM ~ 約1 μM程度であるものが好ましい。

【0051】

また、これらのRNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列自体に加え、このような

10

20

30

40

50

配列の変異体も本発明による当該配列に含まれる。ここでいう変異体とは、RNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間の解離定数 K_d が 10%、20%、30%、40% または 50% 以上高い変異体もしくは 10%、20%、30%、40% または 50% 以下の変異体である。このような変異体は、RNA - タンパク質複合体が形成できる限り、適宜選択して用いることができる。また、このような変異体の塩基配列は、当該 RNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列（正鎖）に対する相補的な配列を有する核酸（相補鎖）とストリンジントな条件でハイブリダイズすることができる程度の塩基配列でもよい。ここでストリンジントな条件は、Bergerand Kimmel (1987, Guideto Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、結合する核酸の融解温度 (T_m) に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度の条件を挙げることができる。相補鎖は、かかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度の洗浄条件、さらに厳しくは「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度の洗浄条件で洗浄しても正鎖と相補鎖とがハイブリダイズ状態を維持する条件を挙げることができる。具体的には、上述の RNA - タンパク質結合モチーフに含まれる RNA の配列と少なくとも 90%、好ましくは少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有する塩基配列からなる。かかる変異体は、RNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間で、一定の結合を保持し、RNA - タンパク質複合体の形成に寄与することができる。

10

20

【0052】

本実施形態による RNA - タンパク質結合モチーフを形成する配列の具体的な例としては、下記表 4 に示す、L7Ae (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) が結合する配列である、boxC motif (5' - GGCGUGAUGAGC - 3') (配列番号 1)、kink-loop (配列番号 2)、kink-loop2 (配列番号 3) が挙げられる。

【0053】

【表 4】

RNA name	Sequence(5' -> 3')	Sequence ID No.
boxC motif	GGCGUGAUGA GC	1
kink-loop	AGAUCCGGGU GUGAACGGUG AUCACCCGAG AUCC	2
kink-loop2	AGAUCCGGAC GUACGUGUGA ACGGUGAUCA CGUACGCCGA GAUCC	3

30

【0054】

別の具体例としては、MS2 コートタンパク質が特異的に結合する配列である MS2 ステムループモチーフ (22: Keryer-Bibens C, Barreau C, Osborne HB (2008) Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. Biol Cell 100: 125-138)、パチルスのリボソームタンパク質 S15 が結合する配列である Fr15 (24: Batey RT, Williamson JR (1996) Interaction of the Bacillus Stearothermophilus ribosomal protein S15 with 16SrRNA: I. Defining the minimal RNA site. J Mol Biol 261: 536-549) が挙げられる。

40

【0055】

さらなる具体例には、アミノアシル化を行う酵素であって、自身の mRNA に結合し、翻訳を阻害するフィードバック阻害を持つことが知られている Threonyl-tRNA synthetase (Cell (Cambridge, Mass.) v97, pp. 371-381 (1999)) が結合する配列である、5' - GGCGUAUGUGAUCUUUCGUGUGGGUCACCCACUGCGCC - 3' (配列番号 4)、およびその

50

変異体がある。また、癌細胞特異的な内在性タンパク質である Bcl-2 ファミリー CED-9 由来の RNA-タンパク質結合モチーフを形成する塩基配列である、R9-2; 5'-GGGUGCUUCGAGCGUAGGAAGAAAGCCGGGGGCGUGCAGAUAAUGUAUAGC-3' (配列番号 5)、およびその変異体、NF-kappaB に結合する RNA 配列のアプタマー由来の塩基配列およびその変異体が挙げられる。

【0056】

(iic) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列は、先の (a) miRNA-応答性 Off Switch mRNA について説明したとおりであり、(a) miRNA-応答性 Off Switch mRNA の (iia) と同様の構成とすることができる。

【0057】

好ましくは、タンパク質応答性 mRNA は、(ic) および (iic) の核酸配列が、5' から 3' の方向にこの順序で連結されている。このとき、cap 構造とトリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、cap 構造とトリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列との間の塩基数は、0 ~ 50 塩基、好ましくは、10 ~ 30 塩基となるように設計することができる。また、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列と開始コドンと間の塩基数は、0 ~ 50 塩基、好ましくは、10 ~ 30 塩基となるような配置にて設計することができる。

【0058】

本発明において、タンパク質応答性 mRNA 中のトリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列内には、開始コドンとなる AUG が存在しないことが好ましい。例えば、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列が 5' UTR に存在し、かつ、当該核酸配列内に AUG を含む場合には、3' 側に連結されるマーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列内に AUG を含む場合、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列内の AUG を GUG に変換して使用することも可能である。また、トリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列内の AUG の影響を最小限に留めるために、5' UTR 内におけるトリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、cap 構造とトリガータンパク質によって特異的に認識される核酸配列内の AUG 配列との間の塩基数が、0 ~ 60 塩基、例えば、0 ~ 15 塩基、10 ~ 20 塩基、20 ~ 30 塩基、30 ~ 40 塩基、40 ~ 50 塩基、50 ~ 60 塩基となるような配置にて設計され得る。

【0059】

上記に従って、(ic)、及び (iic) の核酸配列を含むタンパク質応答性 Off Switch mRNA を設計する場合、天然の核酸を用いる場合には、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、ウラシル (U) の 4 種の塩基をもつ核酸で構成される mRNA を設計することができる。しかし、本発明の mRNA は、上記のようにして設計された mRNA において、ウラシルを塩基としてもつウリジンに代えて、N¹-メチルシュードウリジンを含むように調製する。N¹-メチルシュードウリジンの含有割合や、他の修飾塩基を備えるヌクレオチドの含有については、先の (a) Off Switch mRNA において説明した態様と同様の態様であってよい。

【0060】

タンパク質応答性 Off Switch mRNA において、トリガータンパク質が細胞内在性のタンパク質ではない場合、タンパク質応答性 Off Switch mRNA を制御するための、トリガータンパク質をコードする mRNA を同時に用いることができる。トリガータンパク質をコードする mRNA は、トリガータンパク質の発現を制御可能な mRNA であってもよく、トリガータンパク質の発現は制御されない mRNA であってもよい。前者の mRNA は、例えば、miRNA によって特異的に認識される核酸配列と前記トリガータンパク質のコード領域に対

10

20

30

40

50

応する核酸配列とを機能的に連結して含むmRNAであってよい。この場合、5'UTRは、先の(a) Off Switch mRNAの5'UTRと同様に設計することができる。後者の場合、miRNAによって特異的に認識される核酸配列を有さず、トリガータンパク質のコード領域に対応する核酸配列を含むmRNAであってよい。いずれの場合であっても、タンパク質応答性 Off Switch mRNAの(ic)の核酸配列を特異的に認識し得るタンパク質を、トリガータンパク質として設計することができる。そして、この場合も、天然の核酸を用いる場合には、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、ウラシル(U)の4種の塩基をもつ核酸で構成されるmRNAを設計することができる。ウラシルを塩基としてもつウリジンに代えて、N¹-メチルシュードウリジンを含むmRNAとすることが好ましい。N¹-メチルシュードウリジンの含有割合や、他の修飾塩基を備えるヌクレオチドの含有については、先の(a) Off Switch mRNAにおいて説明した態様と同様の態様であってよい。

【0061】

(2) 細胞の判別方法

本発明は一実施形態によれば、細胞の判別方法であって、

(1) (i) miRNAもしくはタンパク質によって特異的に認識される核酸配列と、(ii) マーカータンパク質のコード領域に対応する核酸配列とを含むmRNAであって、当該mRNAに含まれるヌクレオチドがN¹-メチルシュードウリジンを含むmRNAを、細胞に導入する工程と、

(2) 当該マーカータンパク質の翻訳量を指標として、細胞種を判別する工程とを含む。

【0062】

本実施形態に係る方法において、細胞を「判別する」とは、2種以上の細胞を含む細胞群の中から、所望の、特定の1以上の細胞種について、他の細胞種と異なる検出可能な信号情報を提示することをいい、特に、視覚的に認識可能な情報を提示することをいうものとする。なお、視覚的に認識可能な情報とは、細胞が直接的に視認しうる信号を発することに限定されるものではなく、細胞が発した信号を、数値、図表又は画像等によって視覚的に認識可能な情報に変換された情報であり、当業者が視覚的に認識可能な情報をいう。本明細書において、判別するという文言には、当該判別の後に、所望の細胞種を認識し、所望の細胞種を識別し、所望の細胞種を同定し、所望の細胞種を分類し、所望の細胞種を単離し、所望しない細胞種を除去し、所望の細胞種の生死を判定し、所望の細胞種の特定の生物学的な信号を検出あるいは定量し、所望の細胞種の特定の物理的あるいは化学的な信号に基づいて分画することを含んでもよい。

【0063】

本発明の方法において、細胞に導入するmRNAスイッチは、典型的には、(a) miRNA-応答性 Off Switch mRNA、(b) miRNA-応答性 On Switch mRNA、または(c) タンパク質応答性 Off Switch mRNAであってよい。(a)、(b)、または(c)のいずれか1種類であってもよく、2種、または3種であってもよい。また、(a)、(b)、または(c)のいずれかの構成を持つ、mRNAスイッチを1種、2種、3種、4種、5種、6種、7種、あるいは8種類以上用いてもよい。いずれの場合も、例えば、miRNA標的部位もしくはトリガータンパク質標的部位の配列が異なり、異なるmiRNAもしくはトリガータンパク質に反応して、異なるマーカータンパク質を発現する複数種のmRNAを用いることができる。

【0064】

mRNAスイッチの導入

本発明において、mRNAスイッチを細胞に導入する方法としてはmRNAの形態で導入することができる。例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

【0065】

異なる2種以上のmRNAスイッチを導入する場合、あるいはmRNAスイッチと、コントロールとなるmRNA(以下、コントロールmRNAとも指称する)とを用いる場合には、複

10

20

30

40

50

数のmRNAを細胞群に共導入することが好ましい。共導入した2種以上のmRNAの細胞内での割合は個々の細胞で維持されるため、これらのmRNAから発現するタンパク質の活性比は、細胞集団内において一定となるためである。この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量のマーカーを得るために当業者は適宜これらを選択することができる。本発明において、コントロールmRNAとは、miRNAもしくはトリガータンパク質の標的部位を有さないmRNAをいう。すなわち、コントロールmRNAは、細胞内在性のmiRNAもしくはトリガータンパク質の発現量の影響を受けることなく、細胞に導入されて翻訳されるmRNAである。コントロールmRNAは、好ましい態様においては、mRNAスイッチとともに細胞群に導入されて、mRNAスイッチが導入された細胞を確認し、識別するためのコントロールとして機能し得る。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

10

【0066】

mRNAスイッチが細胞に導入されると、(a) miRNA-応答性Off Switch mRNA、(b) miRNA-応答性On Switch mRNA、または(c) タンパク質応答性Off Switch mRNAのそれぞれの構造的特徴に応じて、細胞内に存在するmiRNAもしくはタンパク質に反応して、マーカータンパク質の翻訳が制御される。一方、コントロールmRNAは、細胞内に存在する物質の存否に関わらず翻訳される。

【0067】

次いで、マーカータンパク質の翻訳量を指標として、細胞を判別する工程(以下、判別工程とも指称する)を実施する。判別工程では、上記のようなマーカータンパク質の翻訳量から、細胞を判別する。例えば、指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞、あるいは多い細胞は、2種以上の細胞を含む細胞群に属する細胞間で、マーカータンパク質の翻訳量の比率を得ることにより決定することができる。マーカータンパク質として細胞死滅タンパクを用いた場合、指標となるmiRNAの発現量に応じて、特異的に細胞死を誘導され、取り除くことができる。

20

【0068】

判別工程は、所定の検出装置を用いて、マーカータンパクからの信号を検出することにより実施することができる。検出装置としては、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、CCDカメラ等が挙げられるが、これらには限定されない。このような検出装置は、マーカータンパク及び判別の態様により、当業者が適したものを用いることができる。例えば、マーカータンパクが、蛍光タンパク又は発光タンパクの場合には、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、CCDカメラといった検出装置を用いてマーカータンパクの定量が可能であり、マーカータンパクが、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパクの場合には、発光顕微鏡、CCDカメラ、ルミノメーターといった検出装置を用いたマーカータンパクの定量方法が可能であり、マーカータンパクが、膜局在タンパクの場合には、抗体などの細胞表面タンパク特異的な検出試薬と、上記の検出装置を用いたマーカータンパクの定量方法が可能である他、磁気細胞分離装置(MACS)といった、マーカータンパクの定量過程を経ない細胞の単離方法が可能であり、マーカータンパクが薬剤耐性遺伝子の場合、薬剤投与によりマーカータンパク質の発現を検出して、生細胞を単離する方法が可能である。

30

40

【0069】

マーカータンパクが蛍光タンパクの場合の好ましい検出方法の一例として、フローサイトメーターが挙げられる。フローサイトメーターは、個々の細胞において翻訳されたマーカータンパクである、蛍光タンパク、発光酵素が発する光の強度を、判別の情報として提供することができる。

【0070】

本発明によれば、従来技術と比較して、マーカータンパク質の発現量を増大させることができ、例えば、3~25倍とすることができる。特に、N¹-メチルシュドウリジンを含まないmRNAスイッチを用いてもほとんど発現させることができなかつた膜タンパ

50

ク質や、分泌タンパク質を、細胞の判別が十分に可能な程度に発現することができる。これにより、例えば、本発明のスイッチを用いて、特定の細胞の細胞膜にアルカリフォスファターゼを発現させてホスホDペプチドの一種であるD-3ペプチド(WO2016/114341)で当該細胞を除去したり、目的の細胞でのみ特定の膜タンパク質を発現させて、抗体やビースで選別したりすることが可能になる。

【実施例】

【0071】

以下、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。しかしながら、下記の実施例は、本発明を限定するものではない。実施例で用いたmRNAスイッチは、miRNA応答性off switch mRNAまたはタンパク質応答性off switch mRNAであって、特定のmiRNAあるいはタンパク質に反応して、マーカータンパク質の翻訳が抑制されるmRNAである。以下の表記においては、「off switch」を省略している。また、miRNA XXX応答性YYY mRNAと表記する場合、miRNA XXXの標的配列を備え、マーカータンパク質としてYYYをコードするmRNAをいうものとする。

【0072】

DNAテンプレートの構築

本実施例にて、全てのmRNAを生成するために用いたプライマーを表5に示す。EGFPオープンリーディングフレームは、plasmid pFr15-EGFP、pCTp-EGFPあるいはpAptamerCassette-EGFPから、TAP_IVTrev及びTAP EGFP_IVT fwdあるいはKWC00405_EGFP mRNA1 ORF_Fw及びKWC00427_EGFP ORF_Rvのプライマーセットを用いて増幅した。BFPオープンリーディングフレームは、plasmid pcDNA3.1-tagBFPから、TAP_IVTrev及びTAP tagBFP_IVT fwdのプライマーセットを用いて増幅した。iRFP670オープンリーディングフレームは、plasmid pC9-NirFPから、TAP_IVTrev及びiRFP670 off fwdのプライマーセットを用いて増幅した。hmAGオープンリーディングフレームは、plasmid pCTp-hmAG1-M9あるいはpFucci-S/G2/M Greenから、hmAG1_IVT fwd及びhmAG1_IVTrevのプライマーセットを用いて増幅した。MS2CPオープンリーディングフレームは、plasmid pTAP-MS2CPから、TAP MS2CP_IVTfwd及びTAP_IVTrevのプライマーセットを用いて増幅した。Lin28オープンリーディングフレームは、plasmid pLIN28Amyc-T2A -tagRFPから、Lin28_Tfwd及びLin28_Trevのプライマーセットを用いて増幅した。L7Aeオープンリーディングフレームは、plasmid pTAP-L7Aeから、L7Ae_IVTfwd及びL7AeRevのプライマーセットを用いて増幅した。U1Aオープンリーディングフレームは、plasmid pU1Afullmyc-T2A -tagRFPから、KWC00430_U1Afull ORF_Fw及びKWC00431_U1Afull ORF_Rvのプライマーセットを用いて増幅した。アルカリフォスファターゼ(PALP)のオープンリーディングフレームは、plasmid OHU18818から、5'AL Porf及び3'AL Porf newのプライマーセットを用いて増幅した。ここで、アルカリフォスファターゼとは、GPIフラグメントを含有するヒト胎盤アルカリフォスファターゼである。SEAPのオープンリーディングフレームは、plasmid OHU18818から、5'AL Porf及びALPP_rev_2のプライマーセットを用いて増幅した。pDisplay-ALPの生成には、まずALPの触媒ドメインを、plasmid 18818から、ALPP_ORF_fwd及びALPP_ORF_revのプライマーセットを用いて増幅した。pDisplayALPは、GPIフラグメントが除去され、pDisplayフラグメントが追加されたヒト胎盤アルカリフォスファターゼである。5' Igkシグナルペプチド配列は予め、pDisplay plasmid (Invitrogen)から、Signal Peptide_IVT_fwd及びSignal Peptide_IVT_revのプライマーセットを用いて増幅した。3' PDGFR膜貫通ドメインは、同じpDisplay plasmidから、PDGFR_IVT_fwd及びPDGFR_IVT_revのプライマーセットを用いて増幅した。トランケートされたALPPペプチド、特に触媒性の残基の二次構造は、Phyre² オンラインソフトウェア(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)により判定された野生型ALPPの既知の構造と厳密に一致すると予測された。全長pDisplay-ALPorfは、fusion PCRにより、3つのフラグメントと、Signal Peptide_IVT_fwd及びPDGFR_IVT_revのプライマーセットを用いて生成した。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

【表 5】

Primer	Sequence 5'to 3'	配列番号
TAP_IVTrev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATcactcgagatgcatatgagatc	6
TAPEGFP_IV Tfwd	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCGTGAGCAAGGGC	7
TAPtagBFP_ IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCAGCGAG	8
TAPiRFP_IV T fwd	CACCGGTCGCCACCATGGCGCGTAAGGTGATCTC	9
TAPiRFP_IV T rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATCACTCGAGATGCatatgagatc	1 0
hmAG1_IVT fwd	CACCGGTCGCCACCATGGTGGAGCGTGATCAAGCCCCG	1 1
hmAG1_IVT rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTCACCTGGCCTGGCTGGGC	1 2
TAPMS2CP_ IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCGCTTC	1 3
Lin28_Tfwd	GCCACCATGGGATCCGGCTCCGTGTCCAAC	1 4
Lin28_Trev	TATGAGATCTATTCTGTGCCTCCGGGAG	1 5
L7Ae_IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATGTACGTGAGATTTGAGGTTCTG	1 6
L7Ae Rev pr imer	GGGGGgaattCTCACTTCTGAAGGCCTTTAATCTTCTCC	1 7
5'ALP orf	caccggtcgccaccatgCTGGGGCCCTGCATGCTGCTg	1 8
3' ALP orf n ew	gccccgcagaaggtctagactaGGGAGCAGTGGCCGTCTCCAGCA	1 9
ALPP_rev_2	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTAgtcgggtggtgccggcgg	2 0
ALP_ORF_f wd	GCCCAGCCGGCCAGATCTatcatcccagttgaggaggagaaccc	2 1
ALP_ORF_re v	agaaccaccaccagaaccaccaccgtcggtggtgccggcgg	2 2
SignalPepti de_IVT_fwd	CACCGGTCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGG	2 3
SignalPepti de_IVT_rev	AGATCTGGCCGGCTGGGC	2 4
PDGFR_IVT _fwd	ggtggtggttctggtggtggttctGAACAAAACATCTCAGAAGAG GATCTGAATGC	2 5
PDGFR_IVT _rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTACTAACGTGGCTTCTTCTGCCA AAGCATG	2 6
ORF_puroR_ fwd	CACCGGTCGCCACCATGACCGAGTACAAGCCCACG	5 1
ORF_puroR_ rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATCAGGCACCGGGCTTGC	5 2
KWC00430_ U1Afull ORF _Fw	CACCGGTCGCCACCATGGcgGCAGTTCCCGAGACCCG	5 7
KWC00431_ U1Afull ORF _Rv	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTACTTCTGGCAAAGGAGATCTT CATG	5 8
KWC00405_ EGFP mRNA 1 ORF_Fw	CACCGGTCGCCACCATGGTGGAGCAAGGGCGAG	5 9
KWC00427_ EGFP ORF_ Rv	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC GAGAG	6 0

10

20

30

40

【 0 0 7 4 】

3'UTRフラグメントは、テンプレートIVT_3prime_UTRから、Fwd3UTR及びRev3UTR2T20のプライマーセットを用いてPCR増幅した。miRNA標的部位をもたないコントロールmRNAについては、5'UTRフラグメントは、テンプレートIVT_5prime_UTRから、TAP_T73GC及びRev5UTRのプライマーセットを用いてPCR増幅した。miRNA標的部位をもつスイッチmRNAの5UTRは、以下の表 6 に挙げる各配列を用いた。

【 0 0 7 5 】

50

【表 6】

miRNA		5UTR sequence for miR switch		配列 番号
Name	ID	Name	Sequence 5'to 3'	
hsa-miR-661	MI0003669	5UTRte mp_T661	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCACGCGCAGGCCAGAGACCCAGGCAAGATCACCGGTGCGCCACCATG	27
hsa-miR-335	MIMAT0000765	5UTRte mp_T335-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCACATTTTCGTTATTGCTCTTGAAGATCCACCGGTGCGCCACCATG	28
hsa-miR-210	MIMAT0000267	5UTRte mp_T210	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTCAGCCGCTGTCACACGCACAGAGATCACACCGGTGCGCCACCATG	29
hsa-miR-21-5p	MI0000077	5UTRte mp_T21-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTAAGATCACACCGGTGCGCCACCATG	30
hsa-miR-21-5p	MI0000077	5UTRte mp_T4x21-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCtcaacatc agtctgataagctatcaacatcagtctgataagctatcaacatcagt ctgataagctatcaacatcagtctgataagctatAGATCACACCG GTCGCCACCATG	31
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	5UTRte mp_T302a-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCAGCAAG TACATCCACGTTTAAAGTAGATCCACCGGTGCGCCACCATG	32
hsa-miR-302a	MIMAT0000684	5UTRte mp_4x302a-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCagcaagt acatccacggttaagtagcaagtagcatccacggttaagtagcaagta catccacggttaagtagcaagtagcatccacggttaagtagAGATCACA CCGGTGCGCCACCATG	33
hsa-miR-17-5p		5UTR_17-5p	ggucagauccgcuaggaucccuaccugcacuguaagcacuuug agaucuaccggugcgcaccaug	34
hsa-miR-206		5UTR_206	gguuccuuuaucgcggaucucccacacacuuccuuacauuccaag aucacaccggugcgcaccaug	35
hsa-miR-92a		5UTR-92a	cgacucacuaauaggucagauccgcuaggauccacaggccggggac aagugcauaaagaucuaaccggugcgcaccaug	36

10

20

【0076】

タンパク質応答性スイッチmRNAの5UTRは、以下の表7に挙げる各配列を用いた。Lin28応答性mRNAについては、stbC Fwd primer及びstbC spacerの2つのプライマーをフュージョンPCRにおける5'UTR配列として用いた。TAP_T73GCは、この反応では用いなかった。MS2CP応答性mRNAについては、5'UTRはテンプレートplasmid pscMS2(WTx2)-EGFPからGCT7CMV_G及びRev 5UTRのプライマーセットを用いて得た。L7Ae応答性mRNAについては、KWC0131_T7-kt-EGFP_Fw及びSpacer 5UTR Fwdの2つのプライマーを、フュージョンPCRにおける5UTR配列として用いた。TAP_T73GCは、この反応では用いなかった。U1A応答スイッチは3つのプライマーKWC00433_T7-U1utr-EGFP_v2_fw、KWC00434_T7+g_Fw、KWC0137_Spacer5UTR_ver2及び、蛍光レポーターのオープンリーディングフレーム、3'UTRフラグメント、3UTR120Aを用いてフュージョンPCRにて作製した。

30

【0077】

40

50

全てのmRNAは、Mega Script T7kit (Ambion)を用いてプロトコルに従って調製した。この反応において、 α -mRNAの合成についてはウリジン三リン酸に代えて、シュードウリジン-5'-三リン酸を用い、 β -mRNAの合成についてはウリジン三リン酸に代えて、 N^1 -メチルシュードウリジン-5'-三リン酸 (N^1 -methyl-pseudouridine-5'-triphosphate)を用いた。 γ -mRNAの合成についてはシチジン三リン酸に代えて、5-メチルシチジン-5'-三リン酸を用いた。 δ -mRNAの合成についてはウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に代えて、シュードウリジン-5'-三リン酸及び5-メチルシチジン-5'-三リン酸を用いた。 ϵ -mRNAの合成についてはウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に代えて、 N^1 -メチルシュードウリジン-5'-三リン酸及び5-メチルシチジン-5'-三リン酸を用いた。 ζ -mRNAの合成についてはアデノシン三リン酸に代えて、 N^6 -メチルアデノシン-5'-三リン酸を用いた。 η -mRNAの合成についてはウリジン三リン酸及びアデノシン三リン酸に代えて、 N^1 -メチルシュードウリジン-5'-三リン酸及び N^6 -メチルアデノシン-5'-三リン酸を用いた。すべての修飾核酸は、Tri Link Bio Technologiesから入手した。なお、本実施例で「修飾塩基で構成された」mRNAと表記した核酸は、全ての該当する塩基が、修飾塩基からなるものを用いた。

【0081】

IVT反応 (mRNA合成) の前に、グアノシン三リン酸を、Anti Reverse Cap Analog (New England Biolabs)を用いて5倍希釈した。反応混合物は37℃で、4時間インキュベーションし、これに、TURBO DNase (Ambion)を添加した。得られた混合物を、37℃でさらに30分インキュベーションした。得られたmRNAは、RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (Qiagen)を用いて精製し、これをAntarctic Phosphatase (New England Biolabs)を用いて、37℃で30分インキュベーションし、RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (Qiagen)を用いてさらに精製した。調製したmRNAはA260reading on Nanodrop (Thermo Fisher)により決定した。mRNAの純度は、100ngのmRNAと、RNA kit (Shimadzu)またはRNA6000 Nano kit (Agilent)を用いて、Bio Analyzer (Agilent)により決定した。品質確認を経たmRNAは100ng/ μ lまで希釈し、使用まで-30℃で保存した。

【0082】

細胞培養

全ての細胞は、37℃、5%CO₂の条件で培養した。HeLa細胞(ATCC)は、10%の胎児ウシ血清(FBS)、1mMのピルビン酸ナトリウム(Invitrogen)、0.1mMの非必須アミノ酸(NEAA) (Invitrogen)を添加した高グルコースダルベッコ改変イーグル培地DMEM(Nacalai-Tesque)で培養した。安定的にEGFPを過剰発現するHeLa細胞は、上記同様の培地で培養した。293FT細胞 (Invitrogen)は、10%FBS、0.1 mMのNEAA、1 mMのピルビン酸ナトリウムを含む高グルコースDMEMで培養した。正常ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF; Lonza)は、complete fibroblast basal medium中で培養した。ヒト卵巣癌細胞A2780(Sigma)は、10%FBS及び2mM L-glutamineを添加した1640RPMI培地中で培養した。SH-5YSY細胞(Sigma)は、10%FBS、2mM L-glutamine、及び0.1mMのNEAAを添加したDMEM-F12 (1:1)で培養した。ヒトフィーダーフリーhiPSC株201B7 (Ff-201B7)は、京都大学の中川誠人博士及び京都大学iPS細胞研究所の細胞調製施設から提供を受け、complete Stem Fit(AK03)培地(Ajinomoto)中の、iMatrix-511 (Nippi)で維持した。自然分化細胞は、上記Ff-201B7に基づきStem Fit培地から基本成長因子を除去して2週間培養することにより得た。

【0083】

トランスフェクション

培養細胞は、 0.5×10^5 cells/wellで24ウェルプレートに播種した。翌日、mRNAを細胞に導入した。導入には1 μ LのLipofectamine MessengerMax (Thermo Fisher Scientific)を用い、製造者の指示にしたがって導入を実施した。mRNAの発現の測定については、異なる修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNA(200ng)を各細胞に導入した。細胞質の蛍光タンパク質の発現については、導入の24時間後に細胞をAccuriC6 (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーにより測定した。生細胞(7-AAD陰性細胞)のE

GFPの平均発現量を測定し、修飾塩基を用いないNative mRNAによりトランスフェクトされた細胞の発現量と比較した。生細胞のパーセンテージ（7-AAD陰性細胞の全ての細胞に対する割合）及びトランスフェクションのパーセンテージ（EGFP陽性細胞の全ての生細胞に対する割合）もまた、AccuriC6により測定した。膜タンパク質の発現については、導入の24時間後に各サンプルの溶解物をCell Lytic-M (Sigma)を用いて採取した。各サンプルの総タンパク質量は、BCA Protein Assay Kit (Pierce)により測定し、各サンプルのアルカリフォスファターゼ活性は、同量の総タンパク質を用いて、アルカリフォスファターゼ検出キット、Fluorescence (Sigma)により測定した。タンパク質の相対発現量は、Native mRNAでトランスフェクトされた細胞の発現と比較した。分泌タンパク質SEAPについては、各サンプルの培養培地におけるアルカリフォスファターゼ活性を、同量の培地を用いて、アルカリフォスファターゼ検出キット、Fluorescence (Sigma)により測定した。タンパク質の相対発現量は、Native mRNAでトランスフェクトされた細胞の発現と比較した。

10

【0084】

miRNA応答性mRNAを用いた実験においては、100ngのmiRNA応答性mRNAを、90ngのコントロールmRNAと共導入した。コントロールmRNAはm5C/ 修飾塩基で構成されたものを用いた。導入の24時間後に細胞をAccuri C6 (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーにより測定した。各細胞におけるmiRNA応答性mRNAがコードするマーカータンパク質の平均蛍光強度は、コントロールmRNAの平均強度により規格化した。ダイナミックレンジは、miRNAを含まないサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の強度を、対応するmiRNAを含むサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の強度で割ることにより識別した。なお、ダイナミックレンジと、後述するFold Changeは同じ意味で使用される。

20

【0085】

miRNA模倣体アッセイにおいては、3~0.0003nMのmiRNA模倣体を、90ngのmiRNA応答性mRNA、90ngのコントロールmRNAとともに、293FT細胞に共導入した。導入の24時間後に、細胞をAccuriC6またはAria (BD Biosciences)を用いたフローサイトメトリーにより測定した。各細胞におけるmiRNA応答性mRNAがコードするマーカータンパク質の平均蛍光強度は、コントロールmRNAの平均強度により規格化した。miRNA模倣体による抑制のパーセンテージは、各サンプルの規格化されたマーカータンパク質の平均蛍光強度を、miRNA模倣体を含まないサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の平均蛍光強度と比較することにより計算した。

30

【0086】

タンパク質応答性mRNAを用いた実験においては、200ngのタンパク質応答性mRNAと、90ngのコントロールmRNAを、トリガータンパクをコードするmRNAとともに、あるいはトリガータンパクをコードするmRNAを含まずに細胞に共導入した。トリガータンパクをコードするmRNAは、タンパク質応答性mRNAに特異的に結合するトリガータンパク質をコードするmRNAである。トリガータンパク質がL7Aeの場合には、30ngのL7Ae mRNA (L7AeをコードするmRNA)、トリガータンパク質がMS2またはLin28の場合には、100ngのMS2 mRNA (MS2をコードするmRNA) またはLin28mRNA (Lin28をコードするmRNA) を共導入した。導入の24時間後、細胞をAccuri C6を用いたフローサイトメトリーにより測定した。各細胞におけるタンパク質応答性mRNAがコードするマーカータンパク質の平均蛍光強度は、コントロールmRNAの平均強度により規格化した。ダイナミックレンジは、トリガータンパクをコードするmRNAを含まないサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の強度を、対応するトリガータンパクをコードするmRNAを含むサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の強度で割ることにより識別した。

40

【0087】

フローサイトメトリー

トランスフェクションの24時間後に細胞を培養皿から分離し、メッシュを通過させてフローサイトメトリーにより分析した。hmAG1及びEGFPは、90% cut FITC filter (530/

50

30nm)を備えた波長が488nmの青色レーザーで検出した。tagBFPは、Pacific Blue filter(450/40nm)を備えた波長が405nmの紫色レーザーで検出した。iRFP670は、それぞれBP filter(675/25nm)を備えた波長が633nmの赤色レーザー及び紫色レーザーで検出した。死細胞及びデブリは、前方及び後方光散乱シグナルにより除去し、さらに、7-AAD染色により識別した。

【0088】

タイムラプスイメージング

トランスフェクション直後に、EGFPを安定的に発現するHela細胞をCell aview (KELLERMSR)に載置し、37°C、5%CO₂で、暗所で培養した。各セルの異なる4つのエリアの蛍光強度は、1時間ごとに記録した。各サンプルの蛍光強度は、iRFP670の蛍光強度で平均化し(averaging)、次いで、平均化された内在性EGFPの強度により規格化することにより得た。

10

【0089】

Pathscan(登録商標)アッセイ

トランスフェクションの6時間後、pathscanアッセイ(Cell signaling)のプロトコルにしたがって細胞溶解物を採取した。同じプロトコルにしたがって、Lipofectamine MessengerMaxを用いて、ポジティブコントロールとしての10µg/mLのpoly ICを細胞に導入した。ネガティブコントロールとしては、これらの細胞をトランスフェクション試薬であるLipofectamine MessengerMaxのみで処理した。

【0090】

20

Invitrotranslation

平底の黒のハーフエリア96ウェルソリッドプレート中のRabbit reticulocytelysate (Ambion) 中で、プロトコルにしたがってin vitro translationを実施した。Rabbit reticulocytelysateアッセイについては、25µlの反応物を300ngのEGFP mRNAに添加した。EGFPの蛍光は上部から10分おきに、12時間、37°Cで、TECAN plate-readerにより測定した。

【0091】

図1(a)及び(b)は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAを、異なる複数の細胞で発現させた結果を示すグラフである。EGFP mRNAは、miRNA標的部位も、トリガータンパク質の標的部位も持たないコントロールmRNAである。細胞は、24ウェルプレートの0.5mLの培地に0.5x10⁵cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50µLのOpti MEMに200ngのmRNAと、1µLのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。EGFPの発現は、トランスフェクションの24時間後に、90%cutFL-1filterを用いて、Accuri flowcytometer (BDバイオサイエンス社製)により測定した。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さないヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAを表し、m1、m5C/、m5C/m1、m5C、m6A、m6A/m1は、それぞれ、NativeのmRNAに対し「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。

30

【0092】

図2は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなる3種のアルカリフォスファターゼmRNAを、細胞で発現させた結果を示すグラフである。これらのmRNAは、miRNA標的部位も、トリガータンパク質の標的部位も持たないコントロールmRNAである。細胞は、24ウェルプレートの0.5mLの培地に0.5x10⁵cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50µLのOpti MEMに200ngのmRNAと、1µLのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。アルカリフォスファターゼの発現は、Alkaline Phosphatase Detection Kitを用い、トランスフェクションの24時間後の蛍光を測定した。また、発現は、総タンパク質量に対して調整した。グラフ中、PALPは、GPIフラグメントを含有するヒト胎盤アルカリフォスファターゼをコードするmRNAに基づき発現したタンパク質、pDisplay-ALPは、GPIフラグメントが除去され、pDisplayフラグメントが追加されたヒト胎盤アルカリフォスファターゼをコードするmRNAに基づき発

40

50

現したタンパク質、SEAPは、GPIフラグメントを有さないヒト胎盤アルカリフォスファターゼをコードするmRNAに基づき発現したタンパク質をそれぞれ意味する。PALPとpDisplay-ALPは細胞溶解物中で測定し、SEAPの発現は培養液中で測定した。Lipofectamin MessengerMaxのみでトランスフェクトした細胞溶解物または培養液中の細胞からの発現をこの実験のブランクとして用いた。また、グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さないヌクレオチド配列からなるアルカリフォスファターゼmRNAを表し、m1、m5C/、m5C/m1は、それぞれ、NativeのmRNAに対し「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。

【0093】

図3は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAの、Rabbit Reticulocyte Lysateにおけるin vitro翻訳を行った場合の、時間と蛍光強度との関係を示すグラフである。300ngの各mRNAは、in vitro translation assayにおいて、Invitrogen Rabbit Reticulocyte Lysateに添加した。蛍光強度は、TECAN plate-readerを用いて、10分ごとに測定した。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、m5C/、m1、m5C/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。Backgroundは、Rabbit Reticulocyte Lysateのみからなるサンプルを意味する。

10

【0094】

図4は、239FT細胞におけるEGFP mRNAの経時的な発現を示すグラフである。239FT細胞は、24ウェルプレートの0.5mLの培地に 0.5×10^5 cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50 μ LのOpti MEMに200ngのmRNAと、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。EGFPの発現の記録は、トランスフェクションの直後から開始し、細胞イメージ解析システムCELAVIEW（オリンパス社製）により測定した。EGFPチャンネルの平均強度を積算したものを、時間（hr）に対してプロットした。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、m5C/、m1、m5C/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。Mockは、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxのみでトランスフェクトした細胞を示す。

20

【0095】

図5は、EGFPを安定的に発現するHeLa細胞（HeLa@EGFP）におけるiRFP670 mRNAの経時的な発現を示すグラフである。HeLa EGFPは、24ウェルプレートの0.5mLの培地に 0.5×10^5 cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50 μ LのOpti MEMに200ngのiRFP670 mRNAと、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。発現の記録は、トランスフェクションの4時間後から開始し、細胞イメージ解析システムCELAVIEW（オリンパス社製）により測定した。iRFP670の発現は内部発現EGFPに対して調節した。2回の試行の結果を平均して示す。エラーバーは、標準誤差を示す。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、m5C/、m1、m5C/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。Mockは、図4に示す結果と同様に定義される。

30

【0096】

図6は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNAの細胞内における量の経時的な変化を示す。293FT細胞を、24ウェルプレートの0.5mLの培地に 0.5×10^5 cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50 μ LのOpti MEMに200ngのEGFP mRNAと、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。トランスフェクションから、所定の時間経過の時点で、細胞溶解物を採取し、total RNAを抽出した。EGFPの量は、qPCRにより定量した。グラフにおいて、EGFPの量は、それぞれのEGFP mRNAにおいて、トランスフェクションから1時間の時点における量を1として相対量で示した。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌ

40

50

クレオチド配列からなるmRNAであり、m5C/、m1、m5C/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。

【0097】

図7は、様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるEGFP mRNA、PALP mRNAを293FTにトランスフェクトした6時間後の、活性な免疫応答マーカの量を示す。293FT細胞は、24ウェルプレートの0.5mLの培地に 0.5×10^5 cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50 μ LのOptiMEMに200ngの各mRNAおよび10 μ g/mLのpolyICと、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。Pathscan (登録商標) Immune Cell Signaling Antibody Array Kit (Fluorescent Readout)のプロトコルにしたがって、トランスフェクションの6時間後に各サンプルのcell lysateを回収した。活性な免疫応答マーカの量は、Pathscan Immune Cell Signaling Antibody Array Kitを用いて測定した。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、m1、m5C/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAであり、Mockは、1 μ LのLipofectamine MessengerMaxのみでトランスフェクトされた細胞を示す。

【0098】

図8(a)は、修飾塩基を有するあるいは有さないヌクレオチドから構成されたタンパク質応答性EGFPあるいはhmAG1 mRNAのダイナミックレンジを示すグラフである。図8(b)は、RNA-タンパク質結合モチーフの二次構造の模式図と、これに特異的に結合するトリガータンパク質の組み合わせを示しており、配列に沿って示す実線はタンパク質結合配列(Protein binding sequence)を意味する。トリガータンパク質としては、L7Ae、MS2CP、Lin28を用い、トリガータンパク質により特異的に認識される配列は、これらに対応するRNA-タンパク質結合モチーフの核酸配列を用いた。293細胞を、24ウェルプレートの0.5mLの培地に 0.5×10^5 cellsとなるように播種した。播種の24時間後に、50 μ LのOptiMEMに200ngのタンパク質応答性EGFPあるいはhmAG1 mRNA、100ngコントロールiRFP670 mRNAを、トリガータンパク質をコードするmRNAの存在下または非存在下で1 μ LのLipofectamine MessengerMaxを溶解させてトランスフェクションを実施した。iRFP670 mRNA、及びトリガータンパク質をコードするmRNAはm5C/、m1、m5C/m1修飾塩基で構成されたものを用いた。EGFPあるいはhmAG1の発現は、iRFP670の発現により調節した。ダイナミックレンジは、トリガータンパク質の存在下でのEGFPあるいはhmAG1発現量に対する、トリガータンパク質の非存在下でのEGFPあるいはhmAG1発現量で定義される。タンパク質の結合能は、RNAの一次構造及び二次構造の両者によるため、ヌクレオチドの修飾は各システムに異なる影響を与えた。kink-turn及びstbCのタンパク質結合配列にはウリジンが含まれないため、ウリジンの修飾はこれらの二つのシステムに対する影響は限られていた。これらの二つのシステムでは、m5C/m1修飾が、最も高いダイナミックレンジをもたらした。これは、m5Cとm1とが共同してRNAモチーフのステム構造を安定化したためであると考えられる。最も大きなダイナミックレンジを示したサンプルはすべて、m1修飾を有するものであった。

【0099】

図9(a)、9(b)及び9(c)は、m1修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmiR-302a応答性Off Switch mRNAが、m5C/、m1、m5C/m1修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmiR-302a応答性Off Switch mRNAと比較して、より大きなダイナミックレンジを有することを示す。90ngのmiR-302ahmAG mRNA及び180ngのコントロールtagBFP mRNAを、Lipofectamine MessengerMAXを用いて201B7 iPSCsにトランスフェクトした。miR-302ahmAG mRNAは、単一のmiR-302a標的配列をもつものと、4リピートのmiR-302a標的配列をもつものを用いた。Off Switch mRNAは、m5C/、m1、m5C/m1修飾塩基、あるいはm1修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されるものを用いた。コントロールtagBFPは、m5C/、m1、m5C/m1修飾塩基で構成されたものを用いた。ダイナミックレンジは、ス

スイッチオンの状態における、すなわち、miRNA標的配列を持たないhmAG mRNAを用いた場合の翻訳効率（hmAGの発現強度 / tagBFPの発現強度）を、スイッチオフの状態における、すなわち上記miR-302a応答性mRNAを用いた場合の翻訳効率で割ることによって計算した。この結果から、m1 修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAスイッチが、上記に定義されるスイッチオン、オフのダイナミックレンジを大きく向上させることがわかった。

【0100】

図10は、HeLa細胞中で、修飾塩基を有するヌクレオチドから構成された複数種のmiRNA応答性Off Switch mRNAが、ダイナミックレンジを向上させたことを示す。90ngのmiR-17-5p応答性hmAG mRNA、miR-92a応答性hmAG mRNA、miR-21-5p応答性hmAG mRNA(miR-21-5p標的配列1x,及び4x)、miR-206応答性hmAG mRNA、またはmiR-302a応答性hmAG mRNA(miR-302a標的配列1x,及び4x)と、180ngのコントロールtagBFP mRNAを、Lipofectamine Messenger MAXを用いてHeLa細胞にトランスフェクトした。miR-206応答性hmAG mRNA及びmiR-302a応答性hmAG mRNAについては、4pmolの対応するmiRNA模倣体をコトランスフェクトした。Off Switch mRNAは、m5C/修飾塩基、あるいはm1 修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmRNAを用いた。

【0101】

図11は、m1 修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmiR-21-5p応答性mRNAを用いることにより、HeLa細胞と293FT細胞の空間分離能が向上することを示す。HeLa細胞と293FT細胞の1:1共培養培地を、90ngのmiR-21-5p応答性hmAG mRNA及び180ngのコントロールtagBFP mRNAでトランスフェクトした。RNAは、m5C/修飾塩基、あるいはm1 修飾塩基を用いた。標準化した翻訳効率(hmAG/tagBFP)は、HeLa細胞におけるmiR-21-5p活性を示す集団(高活性)と、293FT細胞におけるmiR-21-5p活性を示す集団(低活性)の二つに分離された(図11(a))。翻訳効率を示すヒストグラムからは、m1 修飾塩基を用いたmiRスイッチを用いた場合に、2つのピーク間により広い隔たりがあることが確認された(図11(b))。HeLa細胞中で、修飾塩基を有するヌクレオチドから構成された複数種のmiRNA応答性Off Switch mRNAが、ダイナミックレンジを向上させたことを示す。90ngのmiR-21-5p応答性hmAG mRNA(miR-21-5p標的配列1x,及び4x)180ngのm5C/修飾コントロールtagBFP mRNAを、Lipofectamine Messenger MAXを用いてHeLa細胞にトランスフェクトした。この結果から、m1 修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAスイッチが、上記に定義されるスイッチオン、オフのダイナミックレンジを大きく向上させることがわかった。

【0102】

図12は、アルカリフォスファターゼ(ALP)により染色したiPSCの写真である。201B7細胞を、24ウェルプレートに、 0.7×10^5 cells/wellで播種した。24時間後、30ngのm5C/修飾塩基、あるいはm1 修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmiR-4x302a-応答性puroR mRNAと、4pmolのコントロール阻害剤またはmiR-302a-5p阻害剤を細胞にトランスフェクトした。puroRは、ピューロマイシン耐性遺伝子を意味する。miR-4x302a-応答性puroR mRNAは、5'UTRに4リピートのmiR-302a-5p標的配列をもち、ピューロマイシンをコードするmRNAスイッチであって、miR-302a-5pの発現に反応して、puroRの発現が抑制されるスイッチである。コントロール阻害剤(ctrl inhibitor)は、mirVana(商標) miRNA Inhibitor, Negative Control #1を用いた。6時間後に、2µg/mlのピューロマイシンを添加した培地に交換した。翌日、培地を通常のiPSC培地に交換し、さらに6日間培養して、固定、ALP染色を実施した。その結果、201B7細胞にてmiR-302a-5pの発現に反応して、puroRの発現の抑制が確認された。次いで、ピューロマイシン処理によって、puroRを発現していない201B7細胞の細胞死が生じた。図12に、ALP染色を行った、6日後の201B7の生細胞の写真を示す。この結果から、m1 修飾塩基を有する応答性mRNAでトランスフェクトした201B7細胞の生細胞数が明らかに少ないことがわかった(左下)。miR-302a-5p阻害剤は内在性miR-302a-5pの活性を阻害す

10

20

30

40

50

るため、細胞死が発生しない。このため、細胞死は302a-5pの発現に依存することが確認された。

【0103】

図13は、アルカリフォスファターゼ(ALP)により染色した、部分的に分化したiPSCの写真である。201B7細胞から部分的に分化したiPSC (Day7)を、24ウェルプレート中のiPSC培地に、 0.7×10^5 cells/wellで播種した。24時間後、30ngのm5C/ 修飾塩基、あるいはm1 修飾塩基を有するヌクレオチドから構成されたmiR-4x302a-puroR mRNAと、4pmolのコントロール阻害剤またはmiR-302a-5p阻害剤を細胞にトランスフェクトした。6時間後に、2 μ g/mlのピューロマイシンを添加した培地に交換した。翌日、培地を通常のiPSC培地に交換し、さらに6日間培養して、固定、ALP染色を実施した。ALP染色によって、m1 修飾塩基を有する応答性mRNAをトランスフェクトした細胞の中で、201B7細胞の生細胞数が明らかに少ないことがわかった。m1 修飾塩基を有する応答性mRNAは、内在性miRに依存して特異的に細胞を除去する能力を大きく向上させることがわかった。

10

【0104】

さらに、実施例の表6に示すテンプレートを用いて調製した、m1 修飾塩基で構成されたmiR-661、miR-335、及びmiR-210に特異的に応答するmRNAスイッチも、通常のウリジンを備えるmRNAスイッチと比較して、生細胞中で高い発現性を示し、かつダイナミックレンジの向上もみられた。

【0105】

天然型及び異なる7種の修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmiR-21-5p応答性EGFPスイッチを作製し、先の「トランスフェクション」において記載したのと同様の方法で、293FT細胞にトランスフェクトした。図14は様々な修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmiR-21-5p応答性EGFPスイッチを、293FT細胞で発現させた結果を示すグラフである。スイッチオフ状態は、miR-21-5p 模倣体をmiR-21-5p応答性EGFPスイッチと共導入することにより実現した。Fold Changeは、スイッチオン状態におけるmiR-21-5p応答性EGFPスイッチの翻訳効率を、スイッチオフ状態における翻訳効率で割ることによって計算した。なお、Fold Changeは先に述べたダイナミックレンジと同じ意味で使用される。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、m1、m5C/、m5C/m1、m5C、m6A、m6A/m1は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。測定は3回実施し、データは平均 \pm 標準誤差で表した。

20

30

【0106】

天然型オリゴヌクレオチド並びに、m1 修飾塩基を持つオリゴヌクレオチドの融解温度 T_m (melting temperature)を調べた。 T_m オリゴヌクレオチドは、以下の表9に示すプライマーセットT7_fwd TAATACGACTCACTATAGとT7_rev CGCAAACGCGCTATAGTAGTGCAGTCGTATTAを用いて、IVTにより合成した。得られたRNA産物は、PAGE及びゲル抽出により精製した。逆相補ヌクレオチドは、Gene Design Inc (Osaka, Japan)より購入した。UV融解実験は、温度調節装置と8つのマイクロセルホルダー(JASCO PAC-743R)を備えた分光光度計(JASCO V-650 UV/VIS)を用いて実施した。まず、モル濃度を等しくした各オリゴヌクレオチド(最終濃度4 μ M)とRNA相補鎖を、20mMのリン酸ナトリウム、50mMのNaClを含むpH 7.0のバッファー中で、ProFlex(商標)PCRシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いて85 から室温まで徐冷した。融解プロファイルは、260 nmの波長にて、15 から85 の温度範囲で、0.5 /minでスキャンした。 T_m は、二本鎖が半分解離した温度で計算し、各 T_m は融解曲線のderivativesから決定した。下記表10は、それぞれ天然型の相補オリゴCGCAAACGCCとアニーリングした、天然型オリゴヌクレオチド、m1 オリゴヌクレオチド、 オリゴヌクレオチドの T_m 値を示す。測定は3回実施し、データは平均 \pm 標準誤差で表した。可能性のある不安定な形態の T_m も測定した。図15(A)は、天然型、図15(B)は、図15(C)はm1 オリゴヌクレオチドの典型的なfirst derivative report及び Second derivative rep

40

50

ortを示す。矢印は、核酸塩基上の可能性のある水素結合部位を示す。では、可能性のある水素結合部位が多く存在するために、不安定な形態を形成しやすいと考えられる。

【0107】

【表9】

Primer	Sequence 5' to 3'	配列番号
YK_T7_fwd short	TAATACGACTCACTATAG	5 5
YK_T7_rev	cgcaaaacgcCTATAGTGAGTCGTATTA	5 6

10

【0108】

【表10】

Type	Sequence	T_m (°C)
Native	GGCGUUUUGCG	54.8 ± 1.2
m1Ψ	GGCGm1Ψm1Ψm1Ψm1ΨGCG	63.5 ± 0.1
Ψ	GGCGΨΨΨΨGCG	63.3 ± 0.5 *38.5 ± 4.8

20

【0109】

miRNA応答性mRNAスイッチの標的配列におけるm1の量と翻訳効率の関係を調べた。天然型並びに、 、m1、m5C/Ψ修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmiR-661応答性EGFPスイッチ、miR-210応答性EGFPスイッチ、miR-335応答性EGFPスイッチを作製し、293FT細胞にトランスフェクトした。下記表11は、miR-661、miR-210、miR-335の各配列、並びに、miR-661の相補配列、miR-210の相補配列、miR-335の相補配列を示す。表中、相補配列におけるUは、ボールド体で示す。シード配列及びその相補配列は下線で示す。3' compensatory sites及びその相補配列は点線からなる下線で示す。図16は天然型、 、m1、またはm5C/Ψ修飾塩基を有するmiR-661応答性EGFPスイッチ、miR-210応答性EGFPスイッチ、またはmiR-335応答性EGFPスイッチにおいて、天然型オリゴヌクレオチドからなるスイッチのダイナミックレンジを1としたときの相対ダイナミックレンジを示すグラフである。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、 、m1、m5C/Ψは、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。測定は3回実施し、データは平均 ± 標準誤差で表した。このデータから、m1が、 や天然型のUと比較してmiRNAスイッチを促進する効果は、miRNA標的配列に含まれるUの量に依存することがわかった。

30

【0110】

40

50

【表 1 1】

microRNA	microRNA ID (miRBase v21)	Sequence	Complementary Sequence
hsa-miR-661	MMAT0003324	ugccugggucucuggccugcgcu	acgcgagggcagagaccaggca
hsa-miR-210-3p	MMAT0000267	cugugcgugugacagcggcuga	ucagccgcugucacacgcacag
hsa-miR-335-5p	MMAT0000765	ucaagagcaauaacgaaaaangu	acauuuuucguuauugcucuuca

10

【0 1 1 1】

天然型並びに、 $m1$ 、 $m5C/$ 修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなる4xmiR-302a-hmAG mRNAを作製した。3~0.0003nMのmiRNA模倣体を、90ngの4xmiR-302a-hmAG mRNA、90ngのコントロールmRNAとともに、293FT細胞に共導入した。導入の24時間後に、細胞をAccuriC6またはAria (BD Biosciences)を用いたフローサイトメトリーにより測定した。各細胞における4xmiR-302a-hmAG mRNAがコードするマーカータンパク質の平均蛍光強度は、コントロールmRNAの平均強度により規格化した。miRNA模倣体による抑制のパーセンテージは、各サンプルの規格化されたマーカータンパク質の平均蛍光強度を、miRNA模倣体を含まないサンプルにおける規格化されたマーカータンパク質の平均蛍光強度と比較することにより計算した。図17は、天然型、 $m1$ 、または $m5C/$ 修飾塩基を有する4xmiR-302a-hmAG mRNAスイッチの293FT細胞における発現を50%抑制するために必要なmiR-302a模倣体の量を示すグラフである。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、 $m1$ 、 $m5C/$ は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。測定は3回実施し、データは平均±標準誤差で表した。このデータから、 $m1$ 修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるスイッチは、miR模倣体との結合親和力がより高いことが示された。

20

30

【0 1 1 2】

293FT細胞は、トランスフェクションの前日に 1×10^5 cell/wellの濃度で12ウェルプレートに播種した。天然型、 $m1$ のmiR-335-EGFPスイッチ mRNA (200 ng)と、コントロールRenilla RNA (30 ng)、control またはmiR-335 模倣体 (3 nM)をLipofectamine MessengerMaxを用いて293FT細胞に導入した。導入の4時間後に培地をフレッシュ培地に取り換えた。導入の8時間後に細胞を1 mLのRT PBS バッファーで洗浄し、TRIzol (商標) に添加した。duplicate setの細胞はトリプシン処理し、Accuriにより測定した。細胞のtotal RNAはmiRNeasy protocolにより生成した。100 ngのtotal RNAを用いてcDNAを製造した (ReverTra Ace (登録商標); 0.2ngのfirefly mRNAをRT controlとして各サンプルに添加した)。残ったスイッチの量は、standard SYBR Green RT-qPCRにより測定した。図18は、miR-loaded RISCが、天然型や $m1$ スwitchと比較して、より効率的に $m1$ スwitchを分解することを示す。各種のmiR-335-EGFP mRNAスイッチの293FT細胞におけるSlicer efficiencyは、トランスフェクションの8時間後に測定した。Slicer efficiencyは、miR模倣体とmiRNAスイッチが共導入されて誘導された細胞における、切断されたスイッチのパーセンテージで表される指標である。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、 $m1$ 、 $m5C/$ は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。測定は3回実施し、データは平均±標準誤差で表した。

40

【0 1 1 3】

異なる修飾塩基を含むU1A応答性EGFP mRNAスイッチを調製した。200 ng のU1A応

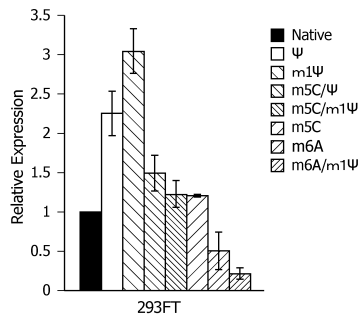
50

答性EGFP mRNAスイッチと90 ng のコントロールiRFP670 mRNAを100 ng のU1A mRNAと一緒に、あるいはU1A mRNAを用いずに293FT細胞に共導入した。トランスフェクションの8時間後または24時間後に細胞をAccuri C6 (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーにより測定した。異なる修飾塩基を含むU1A応答性EGFP mRNAスイッチの293FT細胞におけるFold changeを図19に示す。U1A mRNAを導入した場合の翻訳効率をスイッチオフ状態とし、導入しなかった場合の翻訳効率をスイッチオン状態とし、Fold Changeは、スイッチオンの状態における翻訳効率を、スイッチオフの状態における翻訳効率で割ることによって計算した。グラフ中、Nativeは修飾塩基を有さない天然型のヌクレオチド配列からなるmRNAであり、 Ψ 、m1 Ψ 、m5C/ Ψ 、m5C/m1 Ψ 、m6A、m6A/m1 Ψ は、それぞれ「In vitro transcription」において説明した修飾塩基を有するヌクレオチド配列からなるmRNAである。測定は3回実施し、データは平均 \pm 標準誤差で表した。

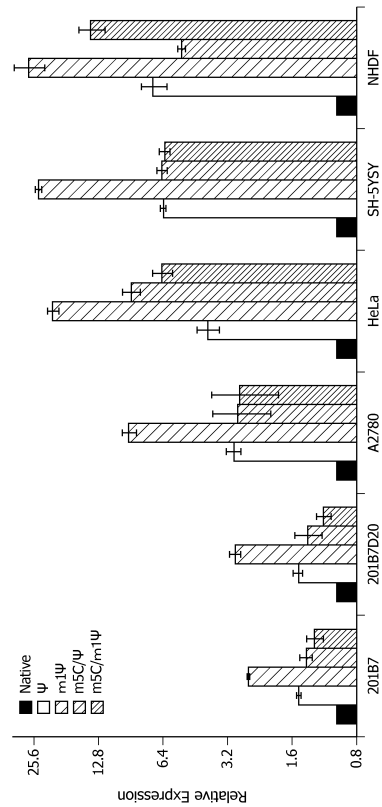
10

【図面】

【図1(a)】



【図1(b)】



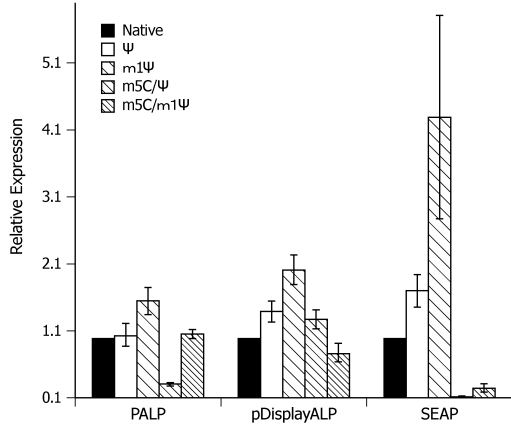
20

30

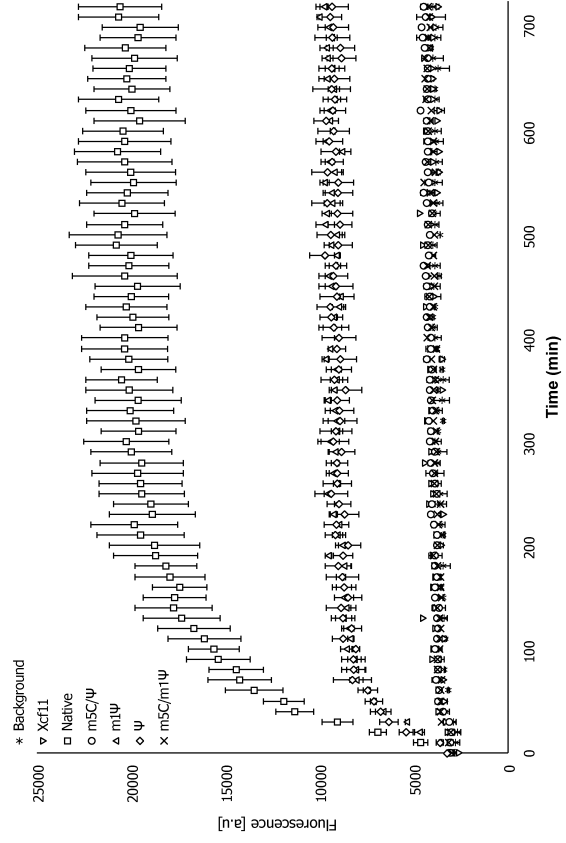
40

50

【 2 】



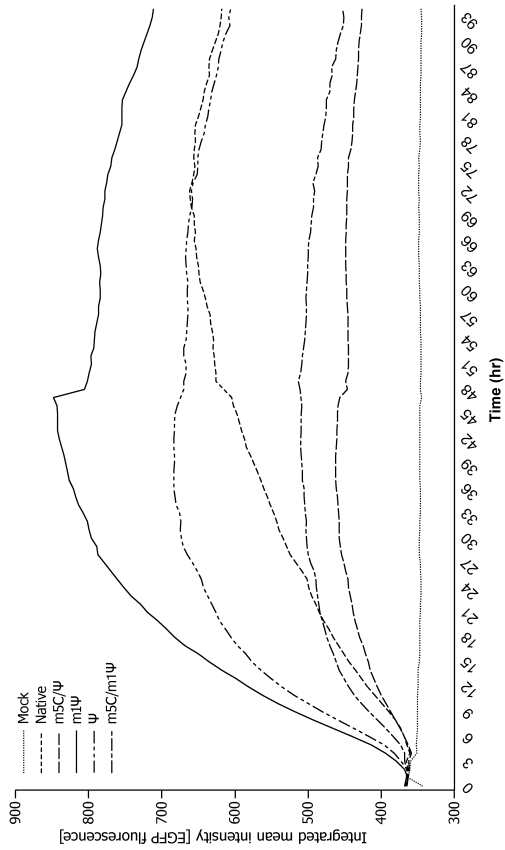
【 3 】



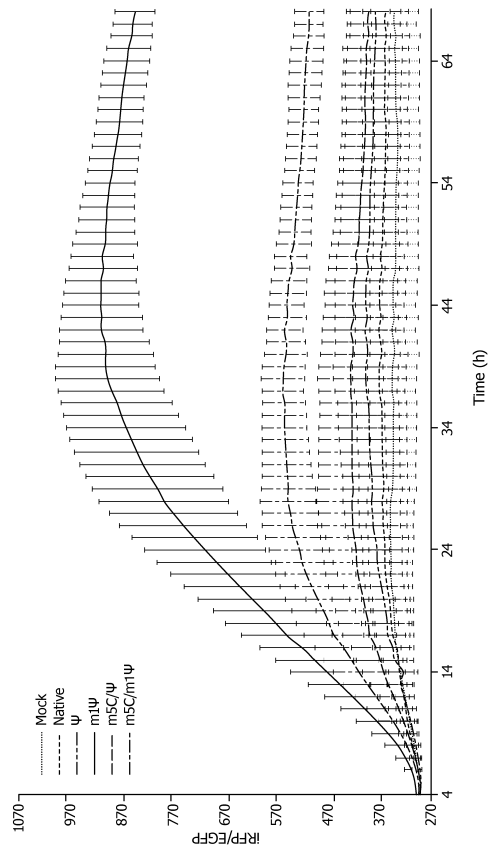
10

20

【 4 】



【 5 】

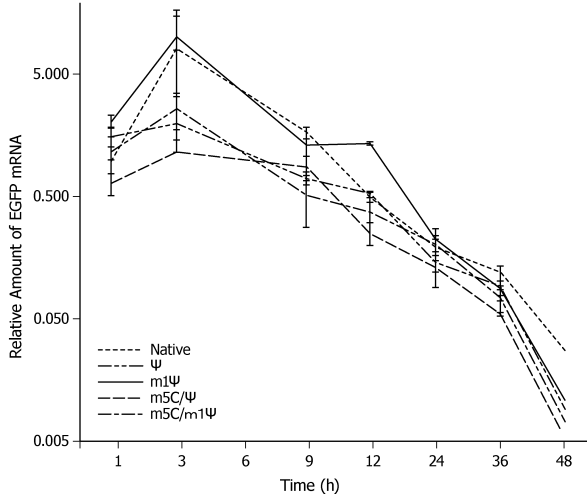


30

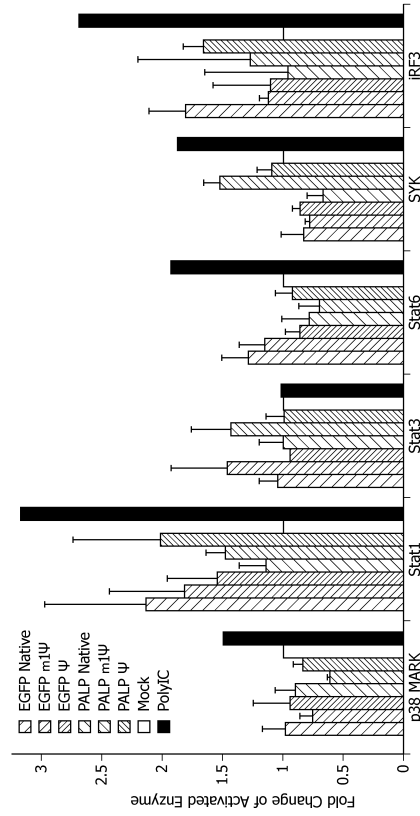
40

50

【 6 】



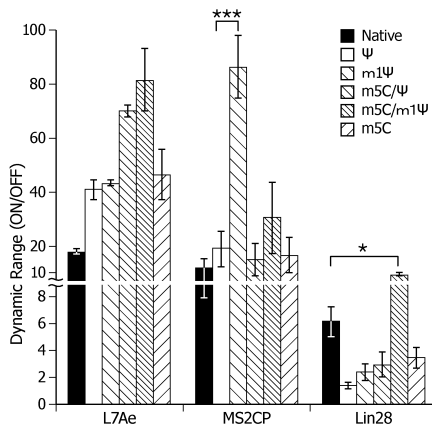
【 7 】



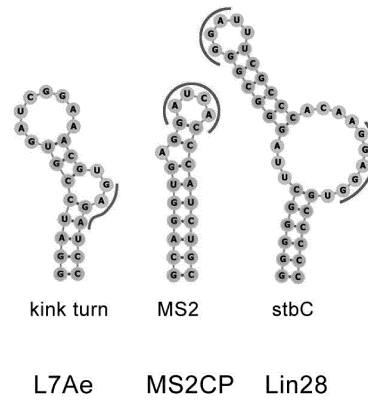
10

20

【 8 (a) 】



【 8 (b) 】

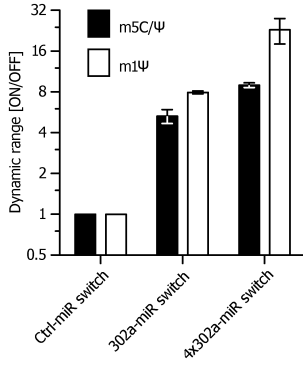


30

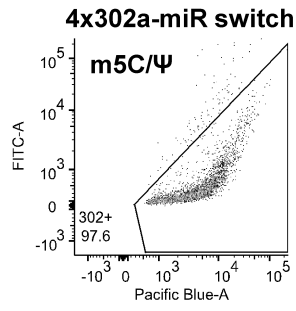
40

50

【 9 (a) 】

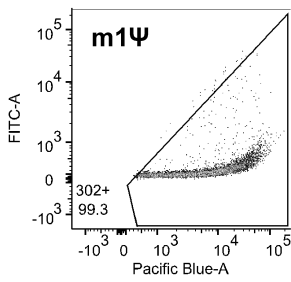


【 9 (b) 】

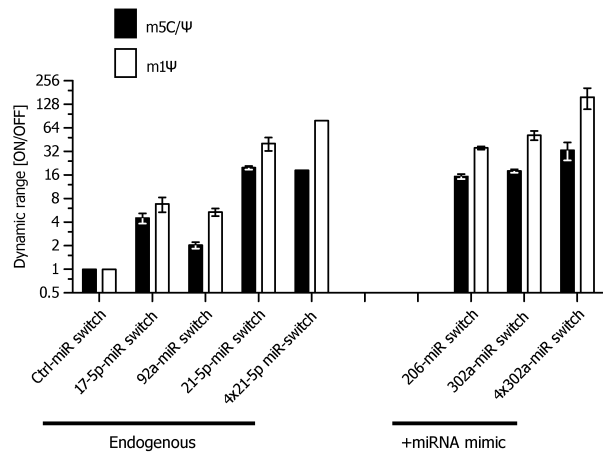


10

【 9 (c) 】

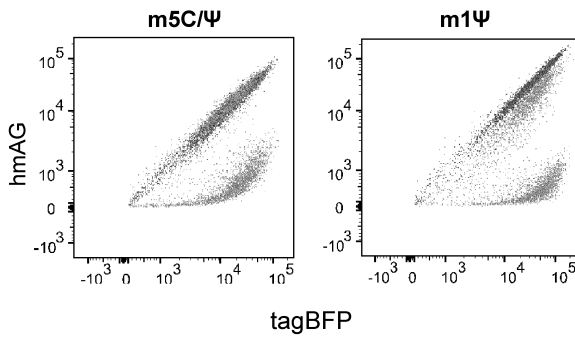


【 1 0 】

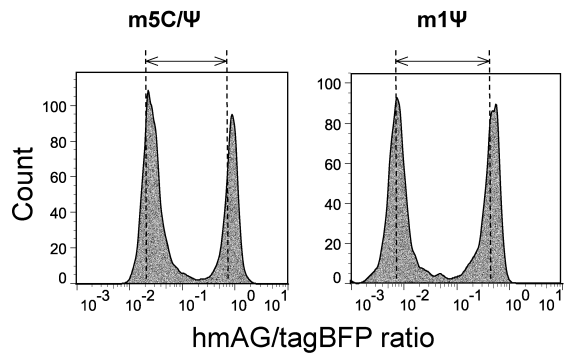


20

【 1 1 (a) 】



【 1 1 (b) 】

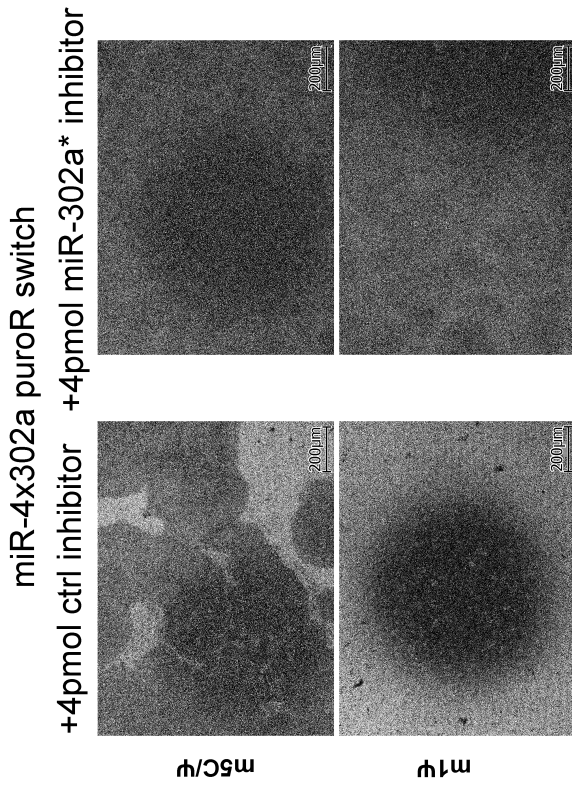


30

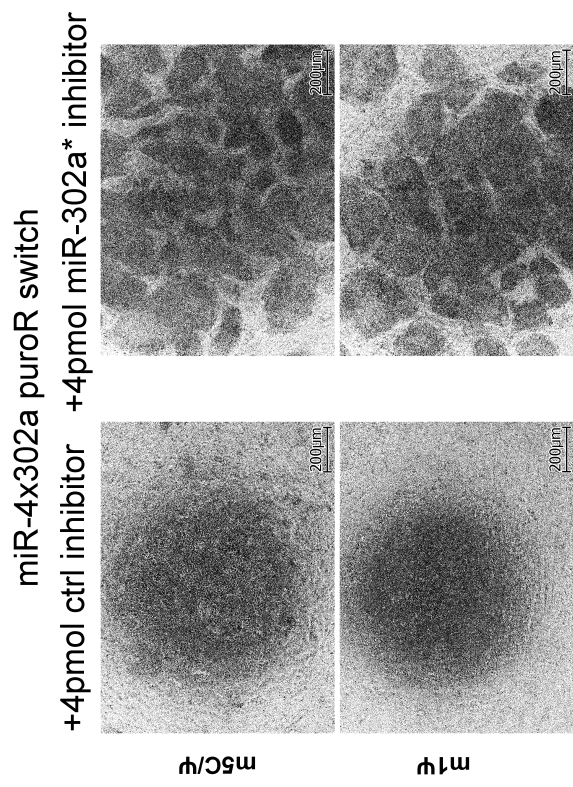
40

50

【 図 1 2 】



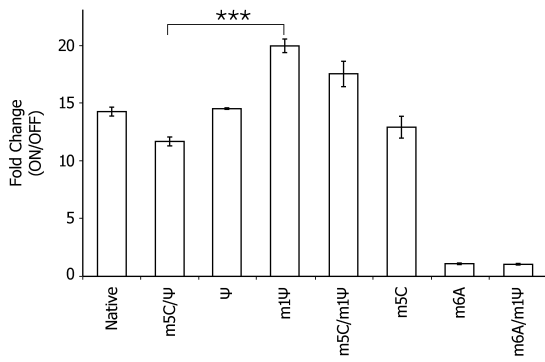
【 図 1 3 】



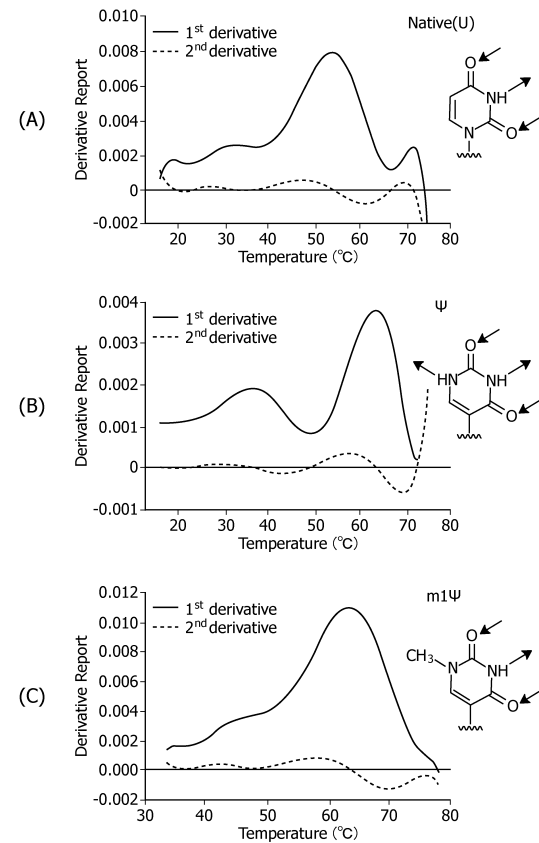
10

20

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

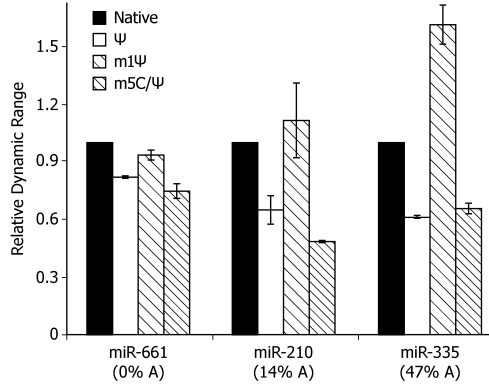


30

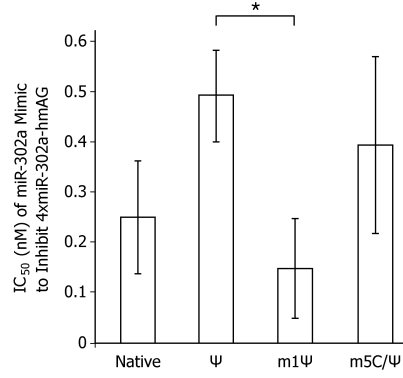
40

50

【 図 1 6 】

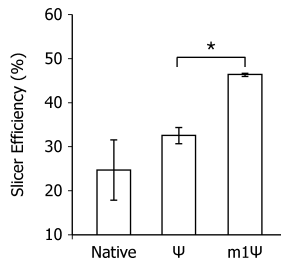


【 図 1 7 】

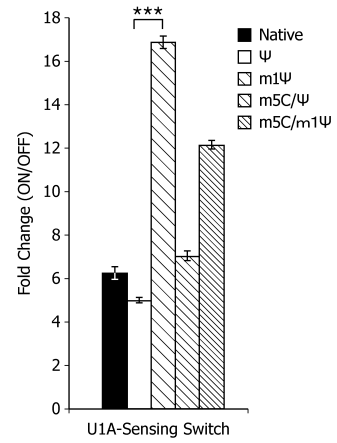


10

【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



20

【 配列表 】

0007318931000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 パー カラム

京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学 内

審査官 小倉 梢

(56)参考文献

国際公開第2016/114354(WO,A1)

国際公開第2016/171235(WO,A1)

国際公開第2015/141827(WO,A1)

国際公開第2017/062513(WO,A1)

特表2015-535430(JP,A)

特表2016-504050(JP,A)

国際公開第2017/094878(WO,A1)

J. Control. Release., 2015年, Vol. 217, p. 337-344

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)