

(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
2017年1月19日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/010568 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/22 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01) C12N 9/64 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/071029
- (22) 国際出願日: 2016年7月15日(15.07.2016)
- (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 2015-142315 2015年7月16日(16.07.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 柴田 知範

(SHIBATA, Tomonori); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

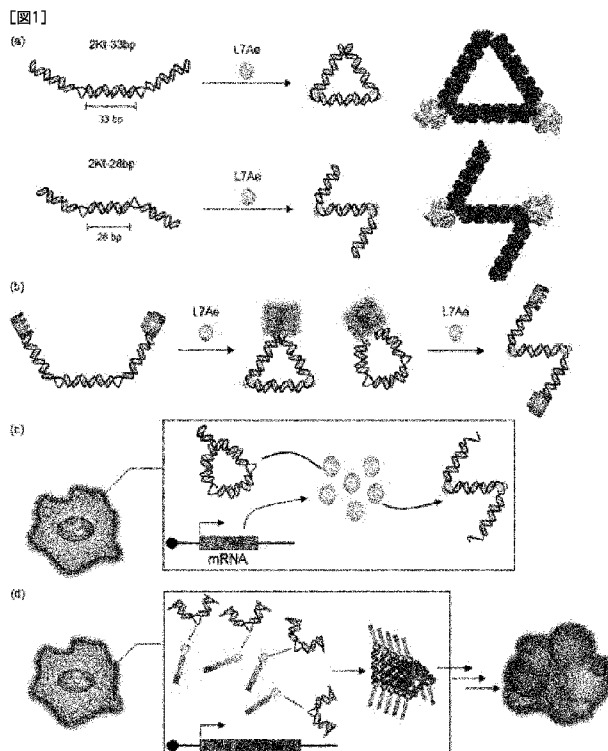
(74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).

(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: RNA-PROTEIN COMPLEX AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: RNA-タンパク質複合体とその使用



(57) Abstract: Provided is: an RNA-protein complex comprising a duplex RNA that includes two RNA-protein binding motif sequences and has functional molecules at both ends, and a protein that binds to the RNA-protein binding motif sequences; or an RNA-protein complex that includes a protein obtained by fusing a protein to be agglutinated and a protein that binds to two or more RNA-protein binding motif sequences, as well as a duplex RNA including the two or more RNA-protein binding motif sequences.

(57) 要約: RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含み、両端に機能的分子を有する2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体またはRNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合したタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を設計する。

WO 2017/010568 A1



(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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：RNA-タンパク質複合体とその使用

技術分野

[0001] 本発明は、特異的構造を有するRNA-タンパク質複合体とその使用方法に関する。

背景技術

[0002] 多様なナノ構造をデザインするために核酸の特性は有用であるため、近年、核酸は、分子ロボットのツールとして利用されている（非特許文献1）。DNAナノテクノロジーは、分子ロボット（非特許文献2）、ナノ分子デバイス（非特許文献3）およびナノマシン（非特許文献4）と言った制御可能な構造と機能性を備えた構造体のプラットフォームとして期待されている。RNAもまた同様に良く知られたナノ構造の構築に有用である（非特許文献5）。RNAナノ構造体は、アプタマー、リボザイムおよびRNA干渉（siRNA）と言った機能的なRNAナノ構造体を誘導するスキャフォールドとして既に利用されており、機能的なRNAナノ構造は、ドラッグデリバリーといった治療用に用いることが提案されている（非特許文献6）。RNAは、DNAをテンプレートとして細胞内で合成できることから、RNAナノテクノロジーは、in vivoへの応用という利点がある。RNAの機能性および表現特徴は、細胞内で機能する分子ロボットの構築のために有用なナノ構造体を取らせることができる。特に、RNA結合タンパク質と合成RNAは、細胞内RNAの構造および機能を制御することができるRNA-タンパク質複合体（RNP）として生物の機能を制御するために利用することが期待される。しかし、RNAナノ構造体の構造および機能をタンパク質との相互作用によって制御することは、難しい。

[0003] これまで、発明者は、RNA kink-turn (K-turn)モチーフおよびこれに結合するL7Aeタンパク質を用いてRNP依存型のナノ構造体のデザインと構築に成功している（特許文献1、非特許文献6および非特許文献7）。K-turnモチーフを含むRNAナノ構造体は、L7Aeの結合に応答して立体配座を変化させること

で構造的な変化を生じさせることが可能である（非特許文献8）。そのため、RNP相互作用を利用して、RNAナノ構造体の動的な性質を制御することが可能である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：W02010/010862

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Hagiya, M, et al. Accounts of chemical research 2014, 47, 1681-1690.

非特許文献2：Wickham, S. F, et al, Nat Nanotechnol. 2012, 7, 169-173.

非特許文献3：Liu M, et al, Nat Commun. 2013, 4, 2127.

非特許文献4：Modi, S, et al, Nat Nanotechnol 2009, 4, 325-330.

非特許文献5：Afonin, K, et al, Accounts of chemical research 2014, 47, 1731-1741.

非特許文献6：Osada, E, et al, ACS nano 2014, 8, 8130-8140

非特許文献7：Ohno, H, et al, Nature nanotechnology 2011, 6, 116-120.

非特許文献8：Turner, B, et al, Rna 2005, 11, 1192-1200.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] RNA構造と機能を制御することができるRNAナノマシンを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明は、一実施の形態によれば、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含み、両端に機能的分子を有する2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いることを特徴とする。

本発明は、別の実施の形態によれば、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合したタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いることを特徴とする。

[0008] すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

[1] 次の(1)および(2)を含むRNA-タンパク質複合体；

(1) RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含む2重鎖RNAであって、当該2重鎖RNAの両端に機能的分子を有するもの、および

(2) 前記(1)のRNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質。

[2] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、20塩基対から24塩基対、または31塩基対から35塩基対、または42塩基対から46塩基対である、[1]に記載のRNA-タンパク質複合体。

[3] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、15塩基対から19塩基対、または26塩基対から30塩基対、または37塩基対から41塩基対である、[1]に記載のRNA-タンパク質複合体。

[4] 前記2重鎖RNAの両端に互いに相補鎖となる6塩基対以上のオーバーハングを有する、[3]に記載のRNA-タンパク質複合体。

[5] 前記機能的分子が、アプタマーである、[1]から[4]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体。

[6] [1]から[5]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、ヒト細胞。

[7] 前記RNA-タンパク質複合体における、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、20塩基対から24塩基対、または15塩基対から19塩基対である、[6]に記載のヒト細胞。

[8] RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含み、両端に機能的分子を有する2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで、当該機能的分子の相互作用を制御する方

法。

〔 9 〕 前記 2 重鎖 RNA の RNA タンパク質結合モチーフ配列間の距離を調整することで、前記相互作用を正または負へ制御する、〔 8 〕に記載の方法。

〔 1 0 〕 前記 RNA タンパク質結合モチーフ配列間の距離を 2 0 塩基対から 2 4 塩基対、または 3 1 塩基対から 3 5 塩基対、または 4 2 塩基対から 4 6 塩基対にすることで、当該 RNA タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで前記相互作用を正へ制御する、〔 9 〕に記載の方法。

〔 1 1 〕 前記 RNA タンパク質結合モチーフ配列間の距離を 1 5 塩基対から 1 9 塩基対、または 2 6 塩基対から 3 0 塩基対、または 3 7 塩基対から 4 1 塩基対にすることで、当該 RNA タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで前記相互作用を負へ制御する、〔 9 〕に記載の方法。

〔 1 2 〕 前記 2 重鎖 RNA の両端に互いに相補鎖となる 6 塩基対以上のオーバーハングを有する、〔 1 1 〕に記載の方法。

〔 1 3 〕 前記機能的分子が、アプタマーである、〔 8 〕から〔 1 2 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 1 4 〕 前記 2 重鎖 RNA と前記融合タンパク質とをヒト細胞内で結合させる、〔 8 〕から〔 1 3 〕のいずれか 1 項に記載の方法。

〔 1 5 〕 次の (1) および (2) を含む RNA タンパク質複合体 ;

(1) RNA タンパク質結合モチーフ配列を 2 つ以上含む 2 重鎖 RNA 、および

(2) 当該 RNA タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質との融合タンパク質。

〔 1 6 〕 前記 2 重鎖 RNA における RNA タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、 2 0 塩基対から 2 4 塩基対、または 3 1 塩基対から 3 5 塩基対、または 4 2 塩基対から 4 6 塩基対である、〔 1 5 〕に記載の RNA タンパ

ク質複合体。

[17] 前記2重鎖RNAが、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を9つ以上含む、[15]または[16]に記載のRNA-タンパク質複合体。

[18] 前記被凝集タンパク質が、カスパーゼ8またはその断片である、[15]から[17]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体。

[19] [15]から[18]に記載のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、ヒト細胞。

[20] RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと、当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合した融合タンパク質とを結合させることで、被凝集タンパク質の凝集を制御する方法。

[21] 前記2重鎖RNAにおけるRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、31塩基対から35塩基対である、[20]に記載の方法。

[22] 前記2重鎖RNAが、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を9つ以上含む、[20]または[21]に記載の方法。

[23] 前記被凝集タンパク質が、カスパーゼ8またはその断片である、[20]から[22]のいずれか1項に記載の方法。

[24] 前記2重鎖RNAと前記融合タンパク質とをヒト細胞内で結合させる、[20]から[23]のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、本発明で提供されるRNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含み、両端に機能的分子を有する2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いることで、当該機能に対応するタンパク質の存在により制御することができるため、有利である。また、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合したタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いること、当該被凝集を凝集することができるた

め、有利である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1 aは、 2Kt-33bp および2Kt-28bp RNA ナノマシンのタンパク質誘因性の構造変化ならびに二つのRNA鎖（青と緑）およびL7Ae タンパク質（黄）を含むRNA-タンパク質複合体の三次元モデリング結果を示す。図1 bは、 RNAの構造および機能を制御する、タンパク質駆動性RNA ナノマシンの概要図を示す。図1 cは、細胞内で発現したセンシングL7AeによるRNAナノマシンの発動の模式図を示す。図1 dは、細胞内RNP相互作用によって誘導される細胞死の制御の模式図を示す。

[図2]図2 aは、 2Kt-33bp (lane 1-6) および2Kt-28bp (lane 7-12) RNAナノマシンならびにL7Aeとの相互作用のEMSAの結果を示す。図2 bは、L7Ae結合に対応するCy3およびCy5でラベルした2Kt-33bp RNAナノマシンのFRETの模式図および蛍光測定結果を示す。L7Aeの存在（赤）および非存在（黒）における、Cy3およびCy5でラベルした2Kt-33bp（下左図）および2mKt-33bp（下中央図）の蛍光スペクトルを示し、L7Aeの存在（黒色）および非存在（白抜き）における蛍光強度比（ F_{665}/F_{565} ）を示す。図2 cは、L7Aeの非存在下での2Kt-33bp（左図）およびL7Aeの存在下での2Kt-33bp（右図）RNA ナノ構造体のAFM像を示す。図2 dは、L7Aeの非存在下での2Kt-28bp（左図）およびL7Aeの存在下での2Kt-28bp（右図） RNA ナノ構造体のAFM像を示す。図2 eは、L7Aeの存在（赤）および非存在（黒）における2Kt-33bp RNA ナノ構造体に対する両RNA端の距離の測定結果を示す。図2 fは、L7Aeの存在（赤）および非存在（黒）における2Kt-28bp RNA ナノ構造体に対する両RNA端の距離の測定結果を示す。

[図3]図3 aは、L7Aeの存在（赤）および非存在（黒）におけるbiMGA-2Kt-33bp（左図）およびbiMGA-2Kt-33bp（右図）の蛍光スペクトルを示す。図3 bは、L7Aeの存在（左図）および非存在（右図）における biMGA-2Kt-33bpRNA ナノ構造体のAFM像を示す。図3 cは、L7Aeの存在（左図）および非存在（右図）における biMGA-2Kt-28bp RNA ナノ構造体のAFM像を示す。図3 dは、biMGA-2

Kt-33bpまたはbiMGA-2Kt-28bpの開放型（黒）および閉鎖型（赤）のナノ構造体数の測定結果を示す。

[図4]図4 aは、細胞内FRET シグナルを検出するためのタンパク質駆動性RNA ナノマシンの模式図を示す。図4 bは、フローサイトメトリーに基づいたFRET アッセイの略図を示す。図4 cは、L7Aeの存在下（赤）および非存在下（黒）における2Kt-17bp-Xbp (X = 4, 5, 6, 7, 8)の蛍光スペクトルの測定結果を示す。右下図は、RNA二本鎖長に対するFRET シグナル、 $[F_{565}/F_{665}(+L7Ae)]/[F_{565}/F_{665}(-L7Ae)]$ をプロットした結果を示す。図4 dは、L7Ae-K-tur相互作用によるRNAナノマシンの発動におけるフローサイトメトリー解析結果を示す。MS2CP（左）またはL7Ae（右）の存在下における2Kt-10bp-7bp（赤）または2mKt-10bp-7bp（青）RNA ナノマシンをHeLa細胞にコトランスフェクトした結果を示す。図4 eは、MS2CPまたはL7Aeの存在下における2Kt-10bp-7bpまたは2mKt-10bp-7bp RNA ナノマシンをHeLa細胞にコトランスフェクトした際のFRET シグナルの測定結果を示す。すべてのCy3/Cy5平均強度は、MS2CP mRNA および2mKt-10bp-7bpでコトランスフェクトした細胞のCy3/Cy5平均強度で標準化した。

[図5]図5 aは、細胞内のカスパーゼ8の凝集を検出するためのタンパク質駆動性RNAナノマシンの模式図を示す。図5 bは、各ナノ構造体（1Kt-33bp、3Kt-33bp、6Kt-33bp、9Kt-33bpおよび14Kt-33bp）のL7Ae-caspase-8 mRNA存在下でのAFM像を示す。図5 cは、各ナノ構造体（1Kt-33bp、3Kt-33bp、6Kt-33bp、9Kt-33bpおよび14Kt-33bp）およびL7Ae-caspase-8 mRNAをトランスフェクションした細胞の顕微鏡像を示す。図5 dは、各ナノ構造体（1Kt-33bp、3Kt-33bp、6Kt-33bp、9Kt-33bpおよび14Kt-33bp）（左図）および対応する変異Ktを有するナノ構造体（右図）を導入した細胞をPacific Blue Annexin V染色した後のフローサイトメトリーで解析結果を示す。図5 eは、図5 dの結果をK-turnモチーフ数に対する死細胞数のプロットした結果を示す。

[図6]図6 aは、14 K-turn モチーフを有するRNAナノ構造体とL7Ae-caspase-8の相互作用によって誘導される細胞死を測定した結果を示す。RNA ナノ構造

体とmRNAをHeLa細胞にコトランスフェクトし、Pacific Blue Annexin V染色および死細胞染色し、フローサイトメトリーで、Pacific Blue-陽性細胞を死細胞として計数した。図6bは、RNAナノ構造体(14Kt-33bp または14mKt-33bp)とmRNA(L7Ae-caspase-8, L7Ae, または caspase-8)のコトランスフェクション後の細胞の顕微鏡像を示す。

[図7]図7aは、2Kt-30bpの構造を示す。図7bは、2Kt-30bp (青) およびL7Aeタンパク質 (黄) を含むRNA-タンパク質複合体の三次元モデリング結果を示す。

[図8]図8は、2Kt-33bp、2mKt-33bp、2Kt-28bpおよび2mKt-28bpの二重鎖RNANの構造を示す。

[図9]図9aは、2Kt-33bp (lane 1-6) または2mKt-33bp (lane 7-12) (左図) もしくは2Kt-28bp (lane 1-6)または2mKt-28bp (lane 7-12) (右図) のL7Aeの存在下でのL7Ae-K-turn相互作用をEMSAで確認した結果を示す。

[図10]図10は、L7Aeの存在下 (右図) および非存在下 (左図) における2Kt-33bp (上図) および (下図) 2Kt-28bpのAFM像を示す。図中スケールバーは、100 nmを示す。

[図11]図11は、biMGA (original stem)-2Kt-33bp-U0、biMGA (original stem)-2Kt-33bp-U2、biMGA (original stem)-2Kt-33bp-U4およびoriginal stem部分の二重鎖RNANの構造を示す。

[図12]図12は、biMGA (original stem)-2Kt-28bp-U0、biMGA (original stem)-2Kt-28bp-U2、biMGA (original stem)-2Kt-28bp-U4およびoriginal stem部分の二重鎖RNANの構造を示す。

[図13]図13は、L7Aeの存在下 (白) および非存在下 (黒) における、biMGA-結合RNAナノ構造体の各ウリジンリンカーにおける蛍光強度(FI)を測定した結果を示す (上図)。biMGA-2Kt-33bp (四角) およびbiMGA-2Kt-28bp (丸) の各ウリジンリンカーFI (+L7Ae)/FI (-L7Ae)をプロットした結果を示す。

[図14]図14は、biMGA (stem A)-2Kt-33bp-U0、biMGA (stem B)-2Kt-33bp-U0およびbiMGA (stem C)-2Kt-33bp-U0ならびにstem A、stem Bおよびstem C部

分の二重鎖RNAの構造を示す。

[図15]図15は、biMGA (stem D)-2Kt-33bp-U0、biMGA (stem E)-2Kt-33bp-U0およびbiMGA (stem F)-2Kt-33bp-U0ならびにstem D、stem Eおよびstem F部分の二重鎖RNAの構造を示す。

[図16]図16は、7Aeの存在下（白）および非存在下（黒）における、biMGA-結合RNAナノ構造体における各biMGA stem配列のごとの蛍光強度(FI)測定結果を示す。

[図17]図17は、biMGA-結合RNAナノ構造体における各biMGA stem配列および各ウリジンリンカーのL7Aeの存在下でのL7Ae-K-turn相互作用をEMSAで確認した結果を示す。

[図18]図18は、L7Aeの存在下（右図）および非存在下（左図）におけるbiMGA-2Kt-33bp（上図）およびbiMGA-2Kt-28bp（下図）のAFM像を示す。図中、スケールバーは、100 nmを示す。

[図19]図19は、2Kt-17bp-4bp、2Kt-17bp-5bp、2Kt-17bp-6bp、2Kt-17bp-7bp、2mKt-17bp-7bpおよび2Kt-17bp-8bpの二重鎖RNAの構造を示す。

[図20]図20は、14 K-turn モチーフを有するRNAナノ構造体とL7Ae-caspase-8をトランスフェクトした際のCaspase-8活性を測定した結果を示す。RNAナノ構造とmRNAをトランスフェクトしたHeLa細胞のcaspase-8活性は、蛍光発生基質IETD-AMCを用いて測定した。

[図21]図21は、14 K-turnモチーフを有するRNAナノ構造体とL7Ae-caspase-8の相互作用によって誘導される細胞死を測定した結果を示す。RNA ナノ構造体（14Kt-33bpまたは14mKt-33bp）とmRNA(L7Ae, dcasp-8, L7Ae-dcasp-8 (L7Ae-caspase-8), L7Ae-dcasp-8-CS, DED-caspase-8, L7Ae-DED-caspase-8またはL7Ae-DED-caspase-8-CS)をHeLa細胞にコトランスフェクトし、Pacific Blue Annexin V染色および死細胞染色し、フローサイトメトリーで、Pacific Blue-陽性細胞を死細胞として計数した。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は

本発明を限定するものではない。

[0012] 本発明は、RNA-タンパク質複合体および当該RNA-タンパク質複合体中のRNAまたはタンパク質に付加された機能的分子の機能を発動するためのRNA-タンパク質複合体の設計方法を提供する。

[0013] 本発明のRNA-タンパク質複合体の一実施形態は、次の（１）および（２）を含む第一のRNA-タンパク質複合体である；（１）RNA-タンパク質結合モチーフ配列を２つ含む２重鎖RNAであって、当該２重鎖RNAの両端に機能的分子を有するもの、および（２）当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質。

[0014] また、本発明のRNA-タンパク質複合体の一実施形態は、次の（１）および（２）を含む第二のRNA-タンパク質複合体である；（１）RNA-タンパク質結合モチーフ配列を２つ以上含む２重鎖RNA、および（２）当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質との融合タンパク質。

[0015] 本発明の２重鎖RNAに含まれるRNA-タンパク質結合モチーフ配列とは、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配列、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配列である。

[0016] 天然のRNA-タンパク質結合モチーフ配列は、通常、約５～７０塩基で構成されており、当該配列を有するRNAは、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から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のぞましい。

[0017]

[表1]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
5S RNA (Xenopus laevis oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
5S RNA (Xenopus laevis 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 150mM 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	Annu 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	MS2 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.

[0018] [表2]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
siRNA with the characteristic two-base 3' overhangs	PAZ(Piwi Argonaut 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 μ M in 4°C, 1.7 nM in 42°C	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S4	18 μ M	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S8	26 $\pm$ 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;71:13-20.
tmRNA	SmpB	21 $\pm$ 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 $\pm$ 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 (Mg の違いで変わる)	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

[0019] 人工のRNA-タンパク質結合モチーフ配列を含むRNAとは、人工的に設計したRNA-タンパク質複合体における、2重鎖RNAとタンパク質との結合モチーフ中の2重鎖RNAのいずれか一方に含まれるRNA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に設計する。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アプタマーが例示される。標的となる所望のタンパク質に対して特異的に結合するRNAアプタマーは、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により得ることができる。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の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。

[0020] [表3]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
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

[0021] 本実施形態において、RNA-タンパク質結合モチーフ配列は、対応する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。

[0022] 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、このような配列の変異体も本発明による当該配列に包含される。本発明でいう変異体とは、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あってもよい。ここでストリンジントな条件は、Berger and Kimmel (1987, Guide to 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。

[0023] 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、L7Ae (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) が結合する配列である、K-turn (Kt) モチーフ (5' -GGCGUGAUGAGC-3' / 5' -GCUCUGACC-3') (配列番号 1 / 配列番号 2)

、*kink-loop* (配列番号3)、*kink-loop* 2 (配列番号4) が挙げられる。*L7Ae* との結合活性を保持した *K-turn* (Kt) モチーフの変異体として 5' - NNCRUGAUNNNN - 3' / 5' - NNNNUGANN - 3' (N は任意の塩基を意味し、R は A または G を意味する) の配列が例示され、例えば、5' - GGCAUGAUGAAC - 3' / 5' - GUUCUGACC - 3' (配列番号5/配列番号6)、5' - AGCGUGAUCGAU - 3' / 5' - AUCGUGACU - 3' (配列番号7/配列番号8)、5' - CGCAUGAUCAGA - 3' / 5' - UCUGUGACG - 3' (配列番号9/配列番号10)、5' - UGCAUGAUGCUU - 3' / 5' - AAGCUGACA - 3' (配列番号11/配列番号12)、5' - UGCAUGAUCUCG - 3' / 5' - CGAGUGACA - 3' (配列番号13/配列番号14)、5' - GGCGUGAUCAAC - 3' / 5' - GUUGUGACC - 3' (配列番号15/配列番号16)、5' - UGCGUGAUGACA - 3' / 5' - UGUCUGACA - 3' (配列番号17/配列番号18)、5' - CGCAUGAUGGUA - 3' / 5' - UACCUGACG - 3' (配列番号19/配列番号20)、5' - AGCAUGAUCACC - 3' / 5' - GGUGUGACU - 3' (配列番号21/配列番号22)、5' - AGCGUGAUGUUC - 3' / 5' - GAACUGACU - 3' (配列番号23/配列番号24)、5' - GGCAUGAUCCAU - 3' / 5' - AUGGUGACC - 3' (配列番号25/配列番号26)、5' - AGCAUGAUGUGC - 3' / 5' - GCACUGACU - 3' (配列番号27/配列番号28) および 5' - UGCGUGAUCUGA - 3' / 5' - UCAGUGACA - 3' (配列番号29/配列番号30) が挙げられる。

[0024] 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)、バチルス 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) Interactio

n of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with 16 S rRNA: I. Defining the minimal RNA site. *J Mol Biol* 261:536-549) が挙げられる。

- [0025] さらに具体例には、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' -GGCGUAUGUGAUCUUUCGUGUGGGUCACCACUGCGCC-3' (配列番号31)、およびその変異体がある。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' -GGGUGCUUCGAGCGUAGGAAGAAAGCCGGGGGCUGCAGAUAAUGUAUAGC-3' (配列番号32)、およびその変異体、NF- κ B 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。
- [0026] 本発明の RNA-タンパク質複合体に含まれる 2 重鎖 RNA 中の RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の RNA 配列は、任意の配列であって良いが、例えば、パリンドローム等の互いに相補的な配列な配列を含まず、RNA 配列単独で 3 次構造を取らない配列が良い。
- [0027] 本発明において、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離とは、2 重鎖 RNA に含まれる RNA-タンパク質結合モチーフ配列の間の塩基対数であり、当該 RNA-タンパク質結合モチーフ配列に含まれる 2 重鎖を形成する部分も当該距離として計数する。RNA-タンパク質結合モチーフ配列として、上述した K-turn (Kt) モチーフ (5' -NNCRUGAUNNNN-3' / 5' -NNNNUGANN-3') を用いる場合、RNA-タンパク質結合モチーフ配列の間は、5' -NNCRUGAU-(N)_n-CRUGAUNNNN-3' として表記され (n は整数)、この場合、当該距離は、n+1 となる。

[0028] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離は、第一のRNA-タンパク質複合体を三角形構造として保持するため、33塩基対であることが例示されるが、11塩基対で360°回転することから、11塩基対および22塩基対ならびに44塩基、55塩基対、およびそれ以上の11の倍数であっても良い。さらに、2塩基対の増加および減少においても、同等の効果を有する可能性が高いことから、9塩基対から13塩基対、20塩基対から24塩基対、31塩基対から35塩基対、42塩基対から46塩基対、53塩基対から57塩基対が例示される。

[0029] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離の他の態様として、第一のRNA-タンパク質複合体をZ型構造として保持するため、28塩基対であることが例示されるが、11塩基対で360°回転することから、6塩基対および17塩基対ならびに39塩基、50塩基対、およびそれ以上の11の倍数+6塩基対であっても良い。さらに、2塩基対の増加および減少においても、同等の効果を有する可能性が高いことから、4塩基対から8塩基対、15塩基対から19塩基対、26塩基対から30塩基対、37塩基対から41塩基対、48塩基対から52塩基対が例示される。

[0030] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体を哺乳細胞に導入することを考慮すると、インターフェロン活性を防ぐため、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が25塩基対以下であることが好ましい。

[0031] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体として、Z型構造と三角形構造の中間の構造を保持させるため、適宜、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間のRNA配列の距離を調整することが可能である。例えば、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間が30塩基対である第一のRNA-タンパク質複合体の構造を図7に示す。

[0032] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体として、Z型構造を保持する場合、対応するタンパク質の非存在下において、両側の末端を結合させ、後述

する機能的分子を機能的な状態にするために、ループ構造を保持するため、末端に、互いに相補鎖となる 6 塩基対以上のオーバーハングを付加しても良い。ここで、オーバーハングとは、2 重鎖構造を有する RNA において、3' 末端または 5' 末端において、突出した 1 重鎖構造を付加された状態を意味する。

[0033] 本発明の第一の RNA-タンパク質複合体の 2 重鎖 RNA の 3' 末端および 5' 末端は、機能的分子を付加されている。本発明において、機能的分子とは、呈色、蛍光、発光、他分子への特異的結合、分子間の特異的結合阻害、酵素活性、酵素活性阻害などを可能とする分子であり、当該分子は、低分子化合物であっても良く、DNA、RNA またはタンパク質と言った生体内で機能する高分子であってもよい。例えば、蛍光色素、抗体、RNA 干渉、RNA アプタマーが例示される。

[0034] 本発明の第一の RNA-タンパク質複合体の 2 重鎖 RNA の 3' 末端および 5' 末端へ付加する機能的分子は、3' 末端へ付加された分子と 5' 末端へ付加された分子が、互いに相互作用することで当該機能を発揮することが好ましい。RNA-タンパク質複合体を三角形構造として設計した場合、対応するタンパク質の存在下では、当該機能を発揮するが、対応するタンパク質の非存在下では、当該機能を発揮できないため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮を制御することが可能となる。一方、RNA-タンパク質複合体を Z 型構造として設計した場合、対応するタンパク質の存在下では、当該機能を発揮しないが、対応するタンパク質の非存在下では、当該機能を発揮するため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮を制御することが可能となる。

[0035] 一つの態様として、機能的分子として蛍光色素を用いる場合、5' 末端と 3' 末端には、蛍光共鳴エネルギー移動が起きる蛍光色素を付加することが例示される。このような蛍光色素として、Cy3 および Cy5 が例示される。この場合、RNA-タンパク質複合体を三角形構造として設計すると、対応する

タンパク質の存在下では、Cy3とCy5が相互作用し、蛍光共鳴エネルギー移動が起きるが、対応するタンパク質の非存在下では、蛍光共鳴エネルギー移動が起きないため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮（蛍光共鳴エネルギー移動）を制御することが可能となる。一方、RNA-タンパク質複合体をZ形構造として設計すると、対応するタンパク質の存在下では、Cy3とCy5が相互作用せず、蛍光共鳴エネルギー移動が起きないが、対応するタンパク質の非存在下では、Cy3とCy5が相互作用して、蛍光共鳴エネルギー移動が起きるため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮（蛍光共鳴エネルギー移動）を制御することが可能となる。

[0036] 他の態様として、機能分子としてRNAアプタマーを用いる場合、当該RNAアプタマーのセンス鎖を5'末端へ付加し、アンチセンス鎖を3'末端へ付加する態様が例示される。このようなRNAアプタマーとして、malachite green aptamerが挙げられ、5'末端へ配列番号44、46、48、50、52、54および56から成る群より選択されるいずれか一つの配列を付加し、3'末端へ配列番号45、47、49、51、53、55および57から成る群より選択されるいずれか一つの配列を付加することが例示される。この場合、RNA-タンパク質複合体を三角形構造として設計すると、対応するタンパク質の存在下では、RNAアプタマーが形成されるが、対応するタンパク質の非存在下では、RNAアプタマーが形成されないため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮（RNAアプタマーとしての結合能）を制御することが可能となる。一方、RNA-タンパク質複合体をZ構造として設計すると、対応するタンパク質の存在下では、RNAアプタマーが形成されないが、対応するタンパク質の非存在下では、RNAアプタマーが形成されるため、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって機能の発揮（RNAアプタマーとしての結合能）を制御することが可能となる。

[0037] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる二重鎖RNAの両端

に上述の通り付加された機能的分子の相互作用は、対応するタンパク質を存在させるまたは存在さないことによって制御することができる。従って、本発明は、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含み、両端に機能的分子を有する2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで、当該機能的分子の相互作用を制御する方法を提供する。当該方法に用いられるRNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAは、上述した第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる2重鎖RNAである。

[0038] 当該第一のRNA-タンパク質複合体の機能的分子の相互作用の制御において、2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を調整することで、対応するタンパク質の存在下において、相互作用を正の制御または負の制御することができる。本発明において、正の制御とは、2重鎖RNAの両端に付加された機能的分子の相互作用が起きることを意味し、同様に、負の制御とは、同機能的分子の相互作用が停止することを意味する。本発明において、機能的分子の相互作用とは、例えば、上述したとおり、機能的分子が蛍光色素の場合、蛍光共鳴エネルギー移動であり、機能的分子がRNAアプタマーの場合、相補鎖の結合によるRNAアプタマーの形成を意味する。

[0039] 第一のRNA-タンパク質複合体の2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を20塩基対から24塩基対、または31塩基対から35塩基対、または42塩基対から46塩基対にすることで、当該RNA-タンパク質複合体を形成させた場合、相互作用を正に制御することができる。

[0040] 一方、第一のRNA-タンパク質複合体の2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を15塩基対から19塩基対、または26塩基対から30塩基対、または37塩基対から41塩基対にすることで、当該RNA-タンパク質複合体を形成させた場合、相互作用を負に制御することができる。

- [0041] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体に含まれるRNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質は、被凝集タンパク質との融合タンパク質であり、融合タンパク質とは、RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質とがリンカー等を介して結合した単一のタンパク質であることを意味する。
- [0042] 本発明において、被凝集タンパク質とは、凝集することによって機能を発揮するタンパク質を意味し、例えば、アポトーシス制御タンパク質、プリオンタンパク質、カスパーゼ9、カスパーゼ8、アミロイド β 、タウ、ポリグルタミンタンパク質 (Gatchel JR, Zoghbi HY. Nat Rev Gene 6, 743-755, 2005) またはこれらのタンパク質の断片、ならびにApoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC) (Hara H, et al, Nat Immunol. 14, 1247-55, 2013) などが挙げられる。
- [0043] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体に含まれる2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間のRNA配列の距離は特に限定されないが、例えば、15塩基対から52塩基対が例示される。対応するタンパク質が結合したRNA-タンパク質複合体において三角形様の構造を基盤とする繰り返し構造を呈することが、好ましく、従って、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間のRNA配列の距離として、9塩基対から13塩基対、20塩基対から24塩基対、31塩基対から35塩基対、42塩基対から46塩基対、53塩基対から57塩基対が例示される。
- [0044] 被凝集タンパク質とRNA-タンパク質複合体に対応するタンパク質との融合タンパク質は、本発明の第二のRNA-タンパク質複合体を存在させるまたは存在さないことによって当該非凝集タンパク質の凝集を制御することができる。従って、本発明は、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合したタンパク質を結合させることで、被凝集タンパク質の凝集を制御する方法を提供する。当該方法に用いられるRNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAは、上

述した第二のRNA-タンパク質複合体に含まれる2重鎖RNAである。

[0045] 被凝集タンパク質を多く凝集させることによって、当該機能を発揮させるために、本発明の被凝集タンパク質の凝集を制御する方法に用いられる2重鎖RNAはRNA-タンパク質結合モチーフ配列を9つ以上含むことが好ましく、例えば、9つまたは14個が挙げられる。

[0046] 本発明における、2重鎖RNAは、細胞毒性を低減させるため、通常のウリジン、シチジンに替えて、シュードウリジン、5-メチルシチジンなどの修飾塩基に置き換えても良い。修飾塩基の位置は、ウリジン、シチジンいずれの場合も、独立に、全てあるいは一部とすることができ、一部である場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができる。

実施例

[0047] 以下に、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は本発明を限定するものではない。

[0048] <DNAおよびRNAの調製>

すべてのDNAテンプレートは、Greiner Japanより購入した。インビトロトランスクリプションに使用するDNAテンプレートは、KOD-plus DNAポリメラーゼ (Toyobo) を使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって調製した。すべてのRNAは、MEGashortscript キット (Amibion) によって転写した。転写RNAは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって精製した。RNAの回収後、RNA濃度をNanoDrop (Thermo Scientific) によって測定した。本実施例に用いたRNA配列を表4に示す。2mKt-33bp、2mKt-28bpおよび2mKt-17bp-7bp中の変異K-turnは、long鎖において、表4中のmKtに適宜置き換えて作製した。また、biMGA-original stem、biMGA-stem A、biMGA-stem B、biMGA-stem C、biMGA-stem D、biMGA-stem EおよびbiMGA-stem Fを有するbiMGA-2Kt-28bpは、short鎖において、表4中の各stemに適宜置き換えて作製した。生細胞に導入するRNAナノマシン(1Kt-33bp, 3Kt-33bp, 6Kt-33bp, 9Kt-33bp, 14Kt-33bpと1mKt-33bp, 3mKt-33bp, 6mKt-33bp, 9mKt-33bp, 14mKt-33bp) 及びmRNAを調整する際には、は、免疫応答を低

減させるため、転写の際にウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、それぞれシュードウリジン-5' -三リン酸及びメチルシチジン-5' -三リン酸(TriLink BioTechnologies)を用いて調整を行った。

[0049] [表4-1]

配列番号	Name	Sequence
33	2Kt-33bp long	GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCA UGCGAGGAGGAAAUGAAGUCCAUGGCGUGAUGAGCCUCUACGGG AAGAGCAUGCCCAUGGCC
34	2Kt-33bp short	GGGCCAUGGGCAUGCUCUCCCCGUAGAGGCUCUGACCAUUGGACU UCAUUUCCUCCUCGCAUGGCUCUGACCGAUUACAGGCCUUUGCGC CUUGCUACGUCC
35	2Kt-28bp long	GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGGGCGUGAUGAGCCAUGCGA GGAGGAAAUGAAGUGGCGUGAUGAGCCGGGAAGAGCAUGCCCAUG GCCC
36	2Kt-28bp short	GGGCCAUGGGCAUGCUCUCCCCGGCUCUGACCACUUAUUUCCUC CUCGCAUGGCUCUGACCCAGGCCUUUGCGCCUUGCUACGUCCC
37	2Kt-30bp long	GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCA UGCGAGGAGGAAAUGAAGUCCGGCGUGAUGAGCCUCUACGGGAAG AGCAUGCCCAUGGCC
38	2Kt-30bp short	GGGCCAUGGGCAUGCUCUCCCCGUAGAGGCUCUGACCCGACUUA UUUCCUCCUCCGCAUGGCUCUGACCGAUUACAGGCCUUUGCGCCU GCUACGUCC
39	mKt long	GGCGGCCUGAGC
40	biMGA-2Kt-33 bp long	GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCA UGCGAGGAGGAAAUGAAGUCCAUGGCGUGAUGAGCCUCUACGGG AAGAGCAUGCCCAUGGCC
41	biMGA-2Kt-33 bp short	GGAGGUAACGAAUGGGGGCCAUGGGCAUGCUCUCCCCGUAGAGGC UCUGACCAUUGGACUUAUUUCCUCCUCGCAUGGCUCUGACCGAU UACAGGCCUUUGCGCCUUGCUACGUCCCCCGACUCC
42	biMGA-2Kt-28 bp long	GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGGGCGUGAUGAGCCAUGCGA GGAGGAAAUGAAGUGGCGUGAUGAGCCGGGAAGAGCAUGCCCAUG GCCC
43	biMGA-2Kt-28 bp short	GGAGGUAACGAAUGGACGGGCCAUGGGCAUGCUCUCCCCGGCUCU GACCACUUAUUUCCUCCUCGCAUGGCUCUGACCCAGGCCUUUGC GCCUUGCUACGUCCCCGUCCGACUCC
44	biMGA-original stem sense	GGAGGUAACGAAUGGC

[表4-2]

45	biMGA-original stem antisense	GCCCGACUCC
46	biMGA-stem A sense	GGAGGUAACGAAUGG
47	biMGA-stem A antisense	CCCGACUCC
48	biMGA-stem B sense	GUAGGUAACGAAUGG
49	biMGA-stem B antisense	CCCGACUAC
50	biMGA-stem C sense	GUGGUAACGAAUGGC
51	biMGA-stem C antisense	GCCCGACAC
52	biMGA-stem D sense	GGAGGUAACGAAUGGAC
53	biMGA-stem D antisense	GUCCCGACUCC
54	biMGA-stem E sense	GCGAGGUAACGAAUGGAC
55	biMGA-stem E antisense	GUCCCGACUCGC
56	biMGA-stem F sense	GCGAGGUAACGAAUGGACC
57	biMGA-stem F antisense	GGUCCCGACUCGC
58	2Kt-17bp long	GGGACAGCAGCUUCU-GGCGUGAUGAGC-CAUGCGAAGU-GGCGUG AUGAGC-CGAGGUGAGCCC
59	2Kt-17bp short	GGGCUACCCUCG-GCUCUGACC-ACUUCGCAUG-GCUCUGACC-AG AAGCUGCUGUCCC
60	2Kt-17bp-4bp short	GGACGGGCUACCCUCGGCUCUGACCACUUCGCAUGGCUCUGACC AGAAGCUGCUGUCCCGUCC

[表4-3]

61	2Kt-17bp-5bp short	GGAGCGGGCUCACCCUCGGCUCUGACCACUUCGCAUGGCUCUGAC CAGAAGCUGCUGUCCCGUCC
62	2Kt-17bp-6bp short	GGACACGGGCUCACCCUCGGCUCUGACCACUUCGCAUGGCUCUGA CCAGAAGCUGCUGUCCCGUGUCC
63	2Kt-17bp-7bp short	GGACACCGGGCUCACCCUCGGCUCUGACCACUUCGCAUGGCUCUG ACCAGAAGCUGCUGUCCCGGUGUCC
64	2Kt-17bp-8bp short	GGACAACCGGGCUCACCCUCGGCUCUGACCACUUCGCAUGGCUCU GACCAGAAGCUGCUGUCCCGGUUGUCC

[表4-5]

67	1Kt-33bp long	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGCAUGAUGAACGU GGUGCUCAUCCUGGUCGAGCUGUCCC
68	1Kt-33bp short	GGGACAGCUCGACCAGGAUGAGCACCACGUUCUGACCUCUUGUGA ACAGCUCCUCACUCUUGCUACCC
69	3Kt-33bp long	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGCAUGAUGAACGU GGUGCUCAUCCUGGUCGAGCUGUAAGCGUGAUCGAUGACACGUAA CAGGUCACAAGUUCAGCCGCAUGAUCAGAGUCAGACGAGUUCGAG AUCGAUGACCCC
70	3Kt-33bp short	GGGGUCAUCGAUCUCGAACUCGUCUGACUCUGUGACGGCUGAACU UGUGACCUGUUCAGUGUCAUCGUGACUUCAGCUCGACCAGGAUG AGCACCAGUUCUGACCUCUUGUGAACAGCUCCUCACUCUUGCUA CCC
71	6Kt-33bp long	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGCAUGAUGAACGU GGUGCUCAUCCUGGUCGAGCUGUAAGCGUGAUCGAUGACACGUAA CAGGUCACAAGUUCAGCCGCAUGAUCAGAGUCAGACGAGUUCGAG AUCGAUGACAUGCAUGAUGCUUUCAGGACAGCUGACCUGUCAGUU CAUGGCGUGAUGAGCGCACCACUUGCAAGCUGCCAGUGCAAUGCA UGAUCUCGCACCACUCUCGUGACCACGCUGAACCCC
72	6Kt-33bp short	GGGGUUCAGCGUGGUCACGAGAGUGGUGCGAGUGACAUUGCACU GGCAGCUUGCAAGUGGUGCGCUCUGACCAUGAACUGACAGGUCAG CUGUCCUGAAAGCUGACAUGUCAUCGAUCUCGAACUCGUCUGACU CUGUGACGGCUGAACUUGUGACCUGUUCGUGUCAUCGUGACUUA CAGCUCGACCAGGAUGAGCACCACGUUCUGACCUCUUGUGAACAG CUCCUCACUCUUGCUACCC
73	9Kt-33bp long	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGCAUGAUGAACGU GGUGCUCAUCCUGGUCGAGCUGUAAGCGUGAUCGAUGACACGUAA CAGGUCACAAGUUCAGCCGCAUGAUCAGAGUCAGACGAGUUCGAG AUCGAUGACAUGCAUGAUGCUUUCAGGACAGCUGACCUGUCAGUU CAUGGCGUGAUGAGCGCACCACUUGCAAGCUGCCAGUGCAAUGCA UGAUCUCGCACCACUCUCGUGACCACGCUGAACUGGCGUGAUCAA CAGCGUGCAGUGCUUCAGUUGCUACCAUGCGUGAUGACAACCACA UGAAGCAGCAGACUUCUCCGCAUGAUGGUAGUCAUCCAUGUCC GAAGGCUACGUUCCC

[表4-6]

74	9Kt-33bp short	GGGAACGUAGCCUUCGGACAUGGAUGACUACCUGACGGAAGAAGU CGUGCUGCUUCAUGUGGUUGUCUGACAUGGUAGCAACUGAAGCAC UGCACGCUGUUGUGACCAGUUCAGCGUGGUCACGAGAGUGGUGC GAGUGACAUUGCACUGGCAGCUUGCAAGUGGUGCGCUCUGACCAU GAACUGACAGGUCAGCUGUCCUGAAAGCUGACAUGUCAUCGAUCU CGAACUCGUCUGACUCUGUGACGGCUGAACUUGUGACCUGUUACG UGUCAUCGUGACUUCAGCUCGACCAGGAUGAGCACCACGUUCUG ACCUCUUGUGAACAGCUCCUCACUCUUGCUACCC
75	14Kt-33bp long	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGCAUGAUGAACGU GGUGCUCUCCUGGUCGAGCUGUAAGCGUGAUCGAUGACACGUAA CAGGUCACAAGUUCAGCCGCAUGAUCAGAGUCAGACGAGUUCGAG AUCGAUGACAUGCAUGAUGCUUUCAGGACAGCUGACCUGUCAGUU CAUGGCGUGAUGAGCGCACCACUUGCAAGCUGCCAGUGCAAUGCA UGAUCUCGCACCACUCUCGUGACCACGCUGAACUGGCGUGAUCAA CAGCGUGCAGUGCUUCAGUUGCUACCAUGCGUGAUGACAACCACA UGAAGCAGCACGACUUCUUCGCAUGAUGGUAGUCAUCCAUGUCC GAAGGCUACGUUCAGCAUGAUCACCGAGCACACCAUCUUCUCAA GGACGAAGCGUGAUGUUCGCAACUACAAGACACGUGCAGAGGUGG GCAUGAUCCAUGUUCGAGUACGACACCCUGGUGAACUAGCAUGAU GUGCAUCGAGCUGAAGUACAUCGACUUCAAUGCGUGAUCUGAAGG ACGGCAACAUCUGUAUCACAACCC
76	14Kt-33bp short	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGUGACAUUGAAGUC GAUGUACUUCAGCUCGAUGCACUGACUAGUUCACCAGGGUGUCGU ACUCGAACAUGGUGACCCACCUCUGCACGUGUCUUGUAGUUGCGA ACUGACUUCGUCCUUGAAGAAGAUGGUGUGCUCGGUGUGACUGAA CGUAGCCUUCGGACAUGGAUGACUACCUGACGGAAGAAGUCGUGC UGCUUCAUGUGGUUGUCUGACAUGGUAGCAACUGAAGCACUGCAC GCUGUUGUGACCAGUUCAGCGUGGUCACGAGAGUGGUGCGAGUG ACAUUGCACUGGCAGCUUGCAAGUGGUGCGCUCUGACCAUGAACU GACAGGUCAGCUGUCCUGAAAGCUGACAUGUCAUCGAUCUCGAAC UCGUCUGACUCUGUGACGGCUGAACUUGUGACCUGUUACGUGUCA UCGUGACUUCAGCUCGACCAGGAUGAGCACCACGUUCUGACCUC UUGUGAACAGCUCCUCACUCUUGCUACCC
77	1mKt-33bp long	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGAUACGCAUUGAA GUCGAUGUACUUCAGCUCGAUGCCCC

[表4-7]

78	1mKt-33bp short	GGGGCAUCGAGCUGAAGUACAUCGACUCAAUGUCACUGAAGGAC GGCAACAUCCUGUAUCACAACCC
79	3mKt-33bp long	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGAUACGCAUUGAA GUCGAUGUACUUCAGCUCGAUGCACAUAUGCUAGUUCACCAGGG UGUCGUACUCGAACAUGGAUCAUGCCCACCUCUGCACGUGUCUUG UAGUUGCGACCC
80	3mKt-33bp short	GGGUCGCAACUACAAGACACGUGCAGAGGUGGGUACCAUGUUCG AGUACGACACCCUGGUGAACUAGUCAGUGCAUCGAGCUGAAGUAC AUCGACUCAAUGUCACUGAAGGACGGCAACAUCCUGUAUCACAAC CC
81	6mKt-33bp long	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGAUACGCAUUGAA GUCGAUGUACUUCAGCUCGAUGCACAUAUGCUAGUUCACCAGGG UGUCGUACUCGAACAUGGAUCAUGCCCACCUCUGCACGUGUCUUG UAGUUGCGAACAUACGCUUCGUCCUUGAAGAAGAUGGUGUGCUC GGUGAUCAUGCUGAACGUAGCCUUCGGACAUGGAUGACUACCAUC AUGCGGAAGAAGUCGUGCUGCUUCAUGUGGUUGCCC
82	6mKt-33bp short	GGGCAACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUCCGUCAGGUAGUCAU CCAUGUCCGAAGGCUACGUUCAGUCACACCGAGCACACCAUCUUCU UCAAGGACGAAGUCAGUUCGCAACUACAAGACACGUGCAGAGGUG GGUCACCAUGUUCGAGUACGACACCCUGGUGAACUAGUCAGUGCA UCGAGCUGAAGUACAUCGACUCAAUGUCACUGAAGGACGGCAAC AUCCUGUAUCACAACCC
83	9mKt-33bp long	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGAUACGCAUUGAA GUCGAUGUACUUCAGCUCGAUGCACAUAUGCUAGUUCACCAGGG UGUCGUACUCGAACAUGGAUCAUGCCCACCUCUGCACGUGUCUUG UAGUUGCGAACAUACGCUUCGUCCUUGAAGAAGAUGGUGUGCUC GGUGAUCAUGCUGAACGUAGCCUUCGGACAUGGAUGACUACCAUC AUGCGGAAGAAGUCGUGCUGCUUCAUGUGGUUGUCAUCACGCAUG GUAGCAACUGAAGCACUGCACGCUUGAUAUCACGCCAGUUCAGCG UGGUCACGAGAGUGGUGCGAGAUCAUGCAUUGCACUGGCAGCUUG CAAGUGGUGCGCCCC

[表4-8]

84	9mKt-33bp short	GGGGCGCACCACUUGCAAGCUGCCAGUGCAAUGUCACUCGCACCA CUCUCGUGACCACGCUGAACUGGUCACAACAGCGUGCAGUGCUUC AGUUGCUACCAUGUCAGACAACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUUC CGUCAGGUAGUCAUCCAUGUCCGAAGGCUACGUUCAGUCACACCG AGCACACCAUCUUCUUAAGGACGAAGUCAGUUCGCAACUACAAGA CACGUGCAGAGGUGGGUACCAUGUUCGAGUACGACACCCUGGUG AACUAGUCAGUGCAUCGAGCUGAAGUACAUCGACUUCUAAUGUCAC UGAAGGACGGCAACAUCUGUAUCACAACCC
85	14mKt-33bp long	GGGUUGUGAUACAGGAUGUUGCCGUCCUUCAGAUACGCAUUGAA GUCGAUGUACUUCAGCUCGAUGCACAUAUGCUAGUUCACAGGG UGUCGUACUCGAACAUGGAUCAUGCCCACCUCUGCACGUGUCUUG UAGUUGCGAACAUCACGCUUCGUCCUUGAAGAAGUUGGUGUGCUC GGUGAUCAUGCUGAACGUAGCCUUCGGACAUGGAUGACUACCAUC AUGCGGAAGAAGUCGUGCUGCUUCAUGUGGUUGUCAUCACGCAUG GUAGCAACUGAAGCACUGCACGCGUUGAUCACGCCAGUUCAGCG UGGUCACGAGAGUGGUGCGAGAUCAUGCAUUGCACUGGCAGCUUG CAAGUGGUGCGCUCAUCACGCCAUGAACUGACAGGUCAGCUGUCC UGAAAGCAUCAUGCAUGUCAUCGAUCUCGAACUCGUCUGACUCUG AUAUGCGGCGUAACUUGUGACCUGUUCGUGUCAUCGAUCACGC UUACAGCUCGACCAGGAUGAGCACCACGUUCAUCAUGCCUCUUGU GAACAGCUCCUACUCUUGCUACCC
86	14mKt-33bp short	GGGUAGCAAGAGUGAGGAGCUGUUCACAAGAGGUCAGAACGUGGU GCUCAUCCUGGUCGAGCUGUAAGUCACGAUGACACGUAACAGGUC ACAAGUUCAGCCGUCACAGAGUCAGACGAGUUCGAGAUCAUGAC AUGUCAGCUUUCAGGACAGCUGACCGUGCAGUUAUGGUCAGAGC GCACCACUUGCAAGCUGCCAGUGCAAUGUCACUCGCCACCACUCUCG UGACCACGCUGAACUGGUCACAACAGCGUGCAGUGCUUCAGUUGC UACCAUGUCAGACAACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUUCGGUCAG GUAGUCAUCCAUGUCCGAAGGCUACGUUCAGUCACACCGAGCACA CCAUCUUCUUAAGGACGAAGUCAGUUCGCAACUACAAGACACGU GCAGAGGUGGGUACCAUGUUCGAGUACGACACCCUGGUGAACUA GUCAGUGCAUCGAGCUGAAGUACAUCGACUUCUAAUGUCACUGAAG GACGGCAACAUCUGUAUCACAACCC

[0050] <RNAのCy3および Cy5のラベル化>

Cy3または Cy5でラベルされたRNAを、T4 RNAリガーゼ (Ambion) および pCp-Cy3 (Jena Bioscience) または pCp-Cy5 (Jena Bioscience)を使用した

ライゲーションによって調製した。Cy3または Cy5のラベル化は、10 μ l の 10% (v/v) DMSO中、10 UのT4 RNAリガーゼ、3 nmolのpCp-Cy3 または pCp-Cy5と、150 pmolのRNAを16°Cで36~48時間混合した。Cy3またはCy5ラベルRNAをRNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)で精製した。RNAの回収後、Cy3 または Cy5およびRNA濃度をNanoDrop (Thermo Scientific)で測定した。

[0051] <電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) >

1.5 mM MgCl₂ および 150 mM KClを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)中、L-RNA および S-RNA (各50 nM)の混合液を80°Cで3分間加熱した後、室温で10分間冷却した。L7Ae (100, 300, および 600 nM)を添加した後、混合液を室温で10~30分インキュベートした。該混合液を10×添加液 (0.25% ブロモフェノールブルー、30% グリセロール) と混合し、室温で0.5×Tris/Borate/EDTA 緩衝液を使用した未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後のゲルをSYBR I および II (Lonza)で10分間染色した。Gel Doc EZ Image(画像) r (BIO-RAD) または Typhoon FLA-7000 laser scanner (GE Healthcare)を使用してゲル画像を得た。

[0052] <高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)>

RNA および RNPのナノ構造体は、溶液中で観察された。本サンプルは、EMSAにおいて記載した通りに調製した。ばね定数約0.1 N/m、および水中約300-600 kHz、気中約1500 kHzの共振振動数で、スモールカンチレバー (small cantilevers) (長さ9 μ m, 幅2 μ m and厚さ130 nm; BL-AC10DS, Olympus, Tokyo, Japan)およびHS-AFM (Nano Live Vision, Research Institute of Biomolecules Metrology Co.)を使用してAFM画像を得た。シャーププローブを各カンチレバーに置き、Nano-tools instrument (Munich)を用いた電子ビーム蒸着を使用した。0.2-1.0フレーム/秒 (fps)の走査速度で320 × 240ピクセル画像を得た。新しいマイカ表面を0.1% APTES (3-aminopropyltriethoxy silane)で被覆した。本サンプル (600 nM タンパク質がある場合とない場合における50 nM RNA ナノ構造体) をRNP binding buffer中で調製し、AFM obser

vation buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), および 10 mM MgCl₂)で10倍希釈した。その後、室温で5分間マイカにアプライして緩衝液で洗浄した。画像シーケンスは、Image(画像) J および WSxM softwareで解析した。

[0053] <蛍光共鳴エネルギー移動解析>

Cy3- および Cy5-標識RNA (各50 nM) を80℃で3分間加熱し、1.5 mM MgCl₂および150 mM KClを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)中で室温10分間冷却した。タンパク質緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)、1.5 mM MgCl₂、150 mM KCl、40% グリセロール) またはL7Ae (600 nM)および0.1% tween-20を混合液に添加し、室温で10~30分間インキュベートした。励起波長は512 nmであり、放出および励起バンド幅は10 nmであった。蛍光測定はInfinite M1000 Plate-Reader (TECAN)を用いて行った。

[0054] <バイナリーマラカイトグリーンアプタマー(biMGA)の蛍光測定>

biMGA-結合RNA ナノ構造体 (100 nM)を80℃で3分間加熱し、1.5 mM MgCl₂および150 mM KClを含む20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)中で室温10分間冷却した。マラカイトグリーン(2 μM)、タンパク質緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)、1.5 mM MgCl₂、150 mM KCl、40% グリセロール) またはL7Ae (600 nM) および0.1% tween-20を混合液に添加し、室温で10~30分間インキュベートした。励起波長は610 nmであり、放出および励起バンド幅はそれぞれ10および20 nmであった。蛍光測定はInfinite M1000 Plate-Reader (TECAN)を用いて行った。

[0055] <細胞培養>

HeLa細胞を、5% CO₂下37℃の、10% ウシ胎児血清(Japan Bio Serum)、可欠アミノ酸(Invitrogen)、ピルビン酸ナトリウム(Sigma)、およびAntibiotic Antimycotic solution (Sigma)を含む、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 高グルコース(Nacalai tesque)で培養した。

[0056] <RNAトランスフェクションおよびフローサイトメトリー解析>

5×10⁴の細胞を12ウェルプレートに播種した。24時間培養後、RNAナノマシン(8 pmol)およびmRNA (500 ng)を2 μLのStem Fect (STEMGENT)を使用

して細胞にコトランスフェクトした。2時間後培地を交換した。トランスフェクションの12時間後に細胞をPBSで洗浄し、37℃で3分間、200 μ Lの0.25% Trypsin-EDTA (Nacalai tesque)中でインキュベートした。2%ウシ胎児血清を含むダルベッコPBSを100 μ L添加した後、FACS Aria セルソーター(BD Bioscience)で細胞を解析した。Cy3蛍光を検出するために、532 nmレーザーおよび575/25 nm光学フィルタを使用した。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に帰するCy5蛍光を検出するために、532 nmレーザーおよび670/30 nm光学フィルタを使用した。フローサイトメトリー解析において、FSCに対するSSCのドットプロットを用いて死細胞を除去した。Cy3およびCy5の蛍光強度比の平均を計算することによって、RNAナノマシンの発動によるFRETシグナル変化を評価した。得られた平均値は、MS2CP mRNAおよび2mKt-10bp-7bpでトランスフェクトしたネガティブコントロール細胞の平均値によって標準化した。

[0057] <細胞死測定アッセイ>

5×10^4 個の細胞を24-well platesに播種し、24時間培養後、RNA nanostructures (0.1 pmol)およびmRNA (10 ng)を1 μ LのStem Fect (STEMGENT)を用いて、細胞に共導入した。2時間後、培地を交換した。細胞の形態分析は、RNA導入後24時間後に行った。培養上清および細胞を回収し、Pacific Blue-labeled Annexin V (Life Technologies)を用いて染色した。死細胞は、必要に応じて、SYTOX AADvanced Dead Cell stain (Life Technologies)で追加染色した。染色された細胞は、FACS Aria cell sorter (BD Bioscience)を用いて解析した。405 nmおよび488 nmのレーザーでそれぞれPacific BlueおよびSYTOX AADvanced Dead Cell stainの励起に用いた。450/50 nmおよび660/20 nmの光学フィルタを用いて、それぞれPacific BlueおよびSYTOX AADvanced Dead Cell stainを検出した。Pacific Blueの高い蛍光強度細胞を有する細胞を、アポトーシスおよび死細胞として計数した。

[0058] [実施例1] <タンパク質作動性のRNAナノマシンのデザインと構築>

RNAナノマシンを構築するため、2つのL7Ae-K-turn相互モチーフを含む2種類のRNPナノ構造体をデザインした(図1a)。K-turnモチーフは、L7Aeとの結

合がない状態においては、柔軟な立体構造を取るが、L7Ae-K-turn相互作用により、K-turnモチーフにおいて約60°Cで屈曲することで立体構造の変化を引き起こす。3回転および2.5回転のらせん回転に対応するように33塩基対、30塩基対および28塩基対の3つの二重鎖RNAの間に2つのK-turnモチーフを設置した(それぞれ、2Kt-33bp、2Kt-30bpおよび2Kt-28bpと言う)(図1a、図7および図8)。2Kt-33bpおよび2Kt-28bpは、L7Ae導入により立体配座変化を引き起こし、それぞれ、三角形およびZ型構造を形成するようデザインされた。また、2Kt-30bpは、その中間の構造を示すことが想定された。RNAナノマシンは、互いに相互作用する長鎖(L鎖: K-turnモチーフにおいて長い)と短鎖(S鎖: K-turnモチーフにおいて短い)から成る。Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)によって、2Kt-33bpおよび2Kt-28bpのL7Ae-K-turn相互作用を調べた。この二つのRNAナノマシンは、濃度依存的に2つのバンドが呈されL7Aeと相互作用することが確認された(図2a)。一方、2つのK-turnに変異体を有するRNAナノ構造体(2mKt-33bpおよび2mKt-28bp)(図8)では、L7Aeの存在下においてもこのようなバンドシフトは見られなかった(図9)。これらの結果は、2つのK-turnモチーフにL7Aeが特異的に結合することによって、RNPナノ構造体が形成されたことを示唆している。続いて、Cy3およびCy5をラベルした2Kt-33bpを用いてForster resonance energy-transfer (フェルスター共鳴エネルギー移動、FRET)によりL7Aeによる2Kt-33bpの構造変化を確認した。2Kt-33bpのL鎖およびS鎖の3'末端をそれぞれCy3およびCy5でラベルした。L7Aeの存在下および非存在下においてCy3およびCy5でラベルした2Kt-33bpの蛍光スペクトルを測定した。その結果、L7Aeの存在下では、565 nm (F_{565})のCy3シグナルの減弱および665 nm (F_{665})のCy5でシグナルの増加が確認された(図2b左図)。一方、Cy3およびCy5ラベルした2mKt-33bpでは、L7Aeによって蛍光スペクトルの影響は確認されなかった(図2b右図)。2mKt-33bpでは、シグナル比(F_{665}/F_{565})の変化はなかったが、2Kt-33bpでのシグナル比(F_{665}/F_{565})は、RNP形成前後で1.4倍の増加が見られた。以上の結果より、L7Ae-K-turn相互作用に起因する構造変化によってFRETが惹起されることが示された。

[0059] RNAナノマシンの構造変化を観察するため、2Kt-33bpおよび2Kt-28bpへのL7Aeの添加前後で高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)にて解析した(図2cおよびd)。L7Aeの非存在下では、2Kt-33bpおよび2Kt-28bpは、不均一なRNA構造を示したが、L7Aeの存在下では、単一の構造を示した。2Kt-33bpおよび2Kt-28bpは、L7Ae導入により立体配座変化を引き起こし、それぞれ、三角形およびZ型構造を形成するようデザインされていることから(図2c、図2dおよび図10)、AFMを用いて、末端間の距離を測定した(図2eおよびf)。L7Aeの非存在下において、2Kt-33bpでの当該距離は、2つのK-turnモチーフに柔軟性があることから、10-44 nmに分布していた。一方、L7Aeの存在下においては、当該距離の分布は収束していた。L7Aeの非存在下と存在下における平均距離は、それぞれ24.0 nmおよび4.9 nmであった(図2e)。これは、L7Ae-K-turn相互作用により、三角形構造を取ることで構造が限定したためであると考えられる。一方、2Kt-28bpでは、Z型構造を取ると想定しており、RNPナノ構造体の当該平均距離は、20.8 nmであり、これは、3Dモデルによる想定値とよく一致している。これらの結果より、L7Ae-K-turn相互作用により、所望のRNAナノマシンの構造変化を導入できることが示唆された。

[0060] <タンパク質応答型RNAナノマシンによる機能性RNAの制御>

RNAナノマシンの構造変化は、L7Ae-K-turn相互作用により制御できることが示されたため、続いて、RNAナノマシンがRNP形成応答によって分割されたRNAアプタマーの活性を制御できるかを検討した。分割したbinary malachite green aptamer (biMGA)をそれぞれ末端に付加したRNAナノマシンを構築した。biMGAプローブは、2Kt-33bpおよび2Kt-28bp 付加し、RNP形成によるアプタマーの活性化と抑制の制御を検討した。biMGA付加RNAナノマシン(それぞれ、biMGA-2Kt-33bpおよびbiMGA-2Kt-28bpと言う)をmalachite green (MG)の存在下でL7Aeの接触の前後において蛍光スペクトルを測定することで、構造変化による機能的RNAの制御の検討を行った。biMGA付加RNAナノマシンの構築のため、RNAナノマシンとbiMGA間のリンカーの長さ(0~4塩基対)およびbiMGAのステム配列(biMGA-original stem、biMGA-stem A、biMGA-stem B、biMGA-

stem C、biMGA-stem D、biMGA-stem EおよびbiMGA-stem F)を検討し、リンカーの長さは、0塩基対で、biMGA-2Kt-33bpではstem Aで、biMGA-2Kt-28bpではstem Dが最適であることを確認し(図11から図18)、RNP形成によりbiMGAを活性化または抑制できるbiMGA-2Kt-33bpおよびbiMGA-2Kt-28bpの2つのbiMGA付加RNAナノマシンを製造した(図3a)。当該biMGA-2Kt-33bpおよびbiMGA-2Kt-28bpのL7Aeの非存在下および存在下の構造をHS-AFMを用いて観察した(図3bおよびc)。L7Aeの非存在下のbiMGA-2Kt-33bpおよびbiMGA-2Kt-28bpのAFM像によれば、開放構造や閉鎖構造など不均一なRNA構造を呈した(図3bおよびcの左図)。一方、L7Aeの存在下では、biMGA-2Kt-33bpおよびbiMGA-2Kt-28bpはそれぞれ、三角形構造またはZ型構造のRNPナノ構造体を形成することが確認された(図3bおよびcの右図)。RNP形成前後における閉鎖状態の分画の変化を調べるため、L7Aeの存在下および非存在下での閉鎖および開放状態の分画を定量化した(図3d)。biMGA-2Kt-33bpにおいて、RNP形成前後における閉鎖および開放状態の分画はそれぞれ19%および81%であった。RNP形成後、閉鎖状態のbiMGA-2Kt-33bpの分画は92%まで増加した。一方、biMGA-2Kt-28bpの開放状態の分画は、RNP形成により47%から75%まで増加した。これらの結果は、biMGAの活性は、RNP相互作用に応答してRNAナノマシンの構造変化により制御できることが示された。

[0061] <生細胞内で発現するタンパク質によるRNAナノマシンの作動>

L7Aeにより起動するRNAの構造および機能を活性化するナノマシンの構築を試みた。タンパク質は、機能表現を呈することができる生体適合材料として用いることができる。そこで、RNAナノマシンが細胞内で発現するL7Aeに応答して作動することができるか否かを検討した。細胞内のRNAナノマシンの構造変化を検出するため、Cy3およびCy5でラベルしたRNAナノマシンを用いてFRET解析によるフローサイトメトリーを行った(図4aおよびb)。RNAナノマシンによるインターフェロン活性を抑制するため、3つの17bpの二重鎖RNAを含む2つのK-turnモチーフを有する2Kt-17bpを構築した。4, 5, 6, 7および8塩基対の短鎖二重鎖RNAを2Kt-17bpに取り込み、RNP相互作用により環状構造からZ様

型へと変化するRNAナノマシンを製造した(それぞれ2Kt-17bp-4bp, 2Kt-17bp-5bp, 2Kt-17bp-6bp, 2Kt-17bp-7bpおよび2Kt-17bp-8bpと言う)(図4aおよび図19)。In vitroでのRNP形成の前後におけるFRETシグナルの変化を検出するため、Cy3およびCy5でラベルしたRNAナノマシンの蛍光スペクトルを測定した(図4c)。2Kt-17bp-4bpおよび2Kt-17bp-5bpの蛍光スペクトルは、L7Aeの存在下で微小な変化を示した。一方、2Kt-17bp-6bp, 2Kt-17bp-7bpおよび2Kt-17bp-8bpの場合、RNP形成により565 nmのCy3のシグナルが増加し、665 nmのCy5のシグナルが減少した。FRETシグナルの変化は、二重鎖RNAの長さによって増加し、7塩基対で最も大きい変化に到達した。従って、RNAナノマシンとして2Kt-17bp-7bpを以後の実施例に用いた。

細胞内でのRNP相互作用を調べるため、2mKt-17bp-7bp(変異K-turnモチーフを有する陰性対照)L7AeおよびMS2CP(RNA結合タンパク質の陰性対照)mRNAを構築した。RNAナノマシン(2Kt-17bp-7bpまたは2mKt-17bp-7bp)およびL7AeまたはMS2CPをコードするmRNAをHeLa細胞へ同時導入した(図4b)。細胞内のRNAナノマシンのFRETシグナルの変化への関与をフローサイトメーターを用いて解析した(図4dおよびe)。MS2CPを発現するHeLa細胞のフローサイトリー解析結果は、2Kt-17bp-7bp and 2mKt-17bp-7bp間のFRETシグナル値に有意な違いは見られなかった。L7Aeを発現するHeLa細胞では、2Kt-17bp-7bpを導入した細胞において最も高いFRETシグナル値を示したが、2mKt-17bp-7bpを導入した細胞では、MS2CPを発現する細胞での結果と同様にFRETシグナル値に有意な違いは見られなかった(図4e)。以上の結果から、L7Aeを発現する細胞における2Kt-17bp-7bpのFRETシグナルの増加は、細胞内におけるL7Ae-K-turn相互作用に起因することが示唆された。RNAナノマシンはL7Aeを発現する細胞でL7Aeを検知し、L7Ae-K-turn相互作用により発動することができることが確認された。

[0062] <RNP相互作用を介した細胞内タンパク質凝集によるヒト細胞の制御>

RNP相互作用を介した細胞内タンパク質凝集と当該凝集の感知によるヒト細胞制御を試みた。ヒト細胞の制御のため、デスエフェクタードメイン(death

effector domain) 欠損caspase-8をL7Aeと融合し(以下、L7Ae-caspase-8と言う)(配列番号65および66)、RNP相互作用によるL7Ae-caspase-8を凝集させ、当該凝集caspase-8の活性化により引き起こされる細胞死が誘導できるかを検討した(図5a)。1個、3個、6個、9個または14個のK-turnモチーフを有するRNAナノ構造体(それぞれ、1Kt-33bp, 3Kt-33bp, 6Kt-33bp, 9Kt-33bpおよび14Kt-33bpと言う)を設計した(図5b)。また、対応する変異K-turnモチーフを有する変異体(それぞれ、1mKt-33bp, 3mKt-33bp, 6mKt-33bp, 9mKt-33bpおよび14mKt-33bpという)を陰性対照として用いた。細胞死はRNAナノ構造体のK-turnモチーフ上にL7Ae-caspase-8が凝集することによって引き起こされるかを検討するため、各RNAナノ構造体とL7Ae-caspase-8 mRNAをHeLa細胞へ同時導入した。細胞形態の解析によりK-turnモチーフの数が増加するごとに細胞死が誘導されることが示された(図5cの上図)。一方、変異K-turnモチーフを有するRNAナノ構造体では細胞死が確認されなかった(図5cの下図)。細胞死を定量化するため、Pacific Blue Annexin Vで染色し、フローサイトメーターを用いて解析した。細胞死を引き起こしていると推測されるPacific Blue陽性細胞は、RNAナノ構造体中のK-turnモチーフの数と比例して増加することが確認され、14Kt-33bp導入細胞において最も多く観察された。一方、変異K-turnモチーフを有するRNAナノ構造体ではこのようなK-turnモチーフの数による細胞死の増加は見られなかった(図5dおよびe)。さらに、14Kt-33bpまたは14mKt-33bpと共にL7Aeまたはcaspase-8 mRNAを導入した場合、すべての組み合わせではほとんど細胞死が確認できなかった(図6)。以上の結果から、RNAナノ構造体上のL7Ae-K-turn相互作用を介したL7Ae-caspase-8の凝集により細胞死の制御が可能であることが示された。

[0063] <caspase-8活性測定>

2×10^5 の細胞を6ウェルプレートに播種した。24時間培養後、RNAナノ構造(0.4 pmol)およびmRNA (40 ng)を4 μ LのStem Fect (STEMGENT)を使用して細胞にコトランスフェクトした。2時間後培地を交換した。caspase-8活性測定はトランスフェクション6時間後に行った。Caspase-8活性は、APOPCYTO Casp

ase-8 Fluorometric Assay Kit (MBL)を用いて測定を行った。

[0064] caspase-8の活性化を介したアポトーシスによって細胞死が誘起されるかを調べるために、14Kt-33bpまたは14mKt-33bpと L7Ae-caspase mRNA (配列番号 65) をHela細胞にトランスフェクションし、蛍光発生基質IETD-AMCを用いてcaspase-8活性を測定した。14Kt-33bpと L7Ae-caspase mRNAの組み合わせの際に最も高いcaspase-8活性を観測し、その活性は、caspase-8阻害剤の添加により明らかに減少した。

[0065] <アポトーシスアッセイ>

5×10^4 の細胞を24ウェルプレートに播種した。24時間培養後、RNAナノ構造 (0.1 pmol) およびmRNA (10 ng) を1 μ LのStem Fect (STEMGENT)を使用して細胞にコトランスフェクトした。2時間後培地を交換した。細胞を回収した後、Pacific Blue-labelled Annexin V (Life Technologies)とSYTOX AADvanced Dead Cell stain (Life Technologies)で染色を行った。その染色した細胞は、FACS Aria cell sorter (BD Bioscience)またはBD LSRFortessa (BD Bioscience)を用いて解析を行った。高いPacific Blueの蛍光強度を示す細胞をアポトーシス細胞としてカウントした。

[0066] 細胞死がRNA-タンパク質相互作用により起こるかどうか調べるためにRNAナノ構造体 (14Kt-33bpまたは14mKt-33bp)とmRNA(L7Ae [配列番号 92], dcasp-8 [配列番号 87], L7Ae-dcasp-8 (L7Ae-caspase-8) [配列番号 65], L7Ae-dcasp-8-CS [配列番号 88], DED-caspase-8 [配列番号 89], L7Ae-DED-caspase-8 [配列番号 90] またはL7Ae-DED-caspase-8-CS [配列番号 91])を導入し、細胞死が起こるかどうかを調べた。L7Ae-DED-caspase-8はL7Ae-dcasp-8にDED配列を付加したmRNAである。L7Ae-dcasp-8-CS及びL7Ae-DED-caspase-8-CS は、対応するL7Ae-dcasp-8及びL7Ae-DED-caspase-8のcaspase活性化を引き起こさない変異体である。14Kt-33bpとL7Ae-dcasp-8及びL7Ae-DED-caspase-8において高い細胞死活性が観測された。一方でその他の組み合わせではほとんど細胞死が確認できなかった。以上の結果から、RNAナノ構造体上のL7Ae-K-turn相互作用を介したL7Ae-caspase-8の凝集によりcaspase-8

が活性化し、細胞死を引き起こすことが示された。

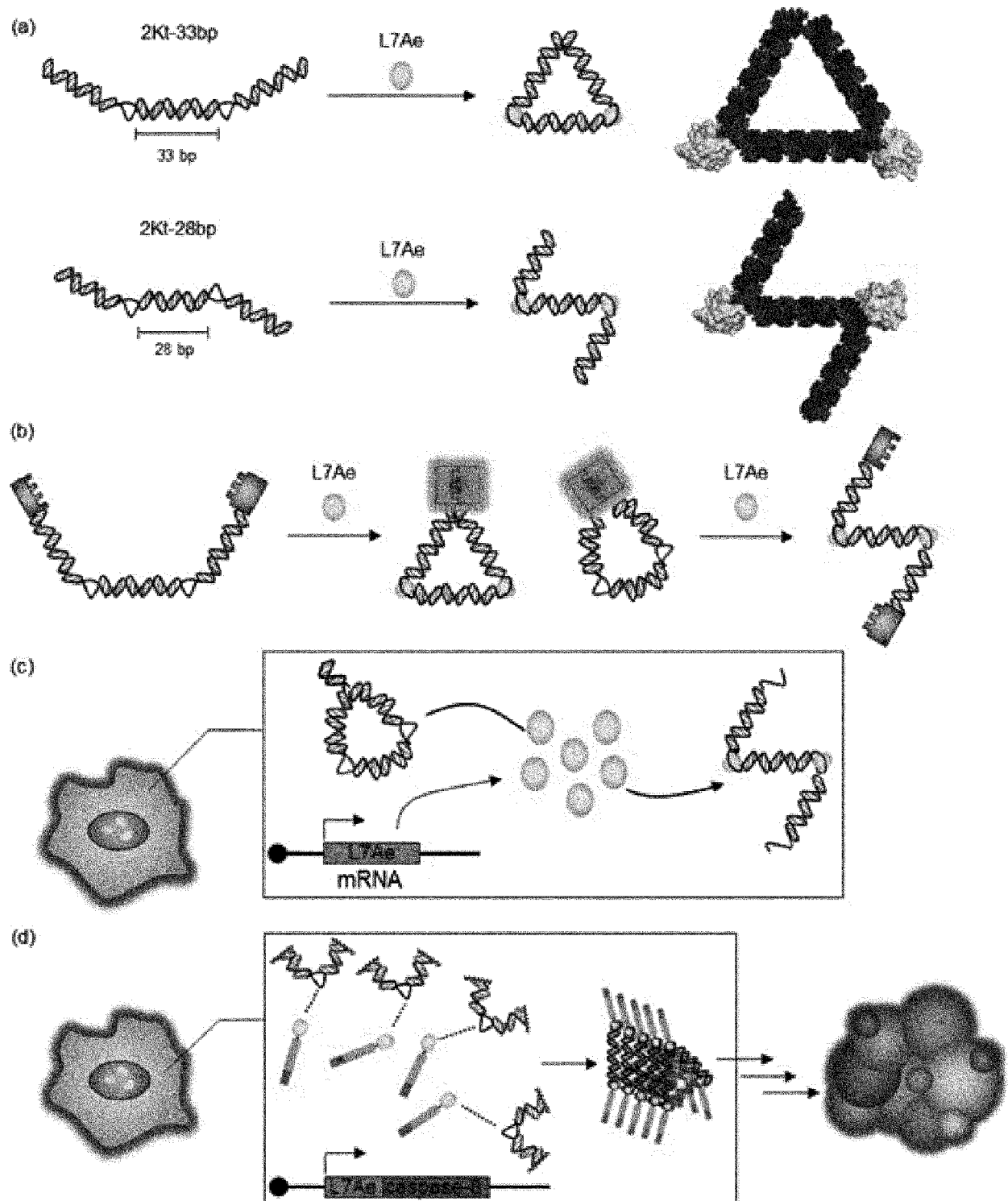
請求の範囲

- [請求項1] 次の（１）および（２）を含むRNA-タンパク質複合体；
- （１）RNA-タンパク質結合モチーフ配列を２つ含む２重鎖RNAであって、当該２重鎖RNAの両端に機能的分子を有するもの、および
- （２）前記（１）のRNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質。
- [請求項2] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、２０塩基対から２４塩基対、または３１塩基対から３５塩基対、または４２塩基対から４６塩基対である、請求項１に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項3] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、１５塩基対から１９塩基対、または２６塩基対から３０塩基対、または３７塩基対から４１塩基対である、請求項１に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項4] 前記２重鎖RNAの両端に互いに相補鎖となる６塩基対以上のオーバーハングを有する、請求項３に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項5] 前記機能的分子が、アプタマーである、請求項１から４のいずれか１項に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項6] 請求項１から５のいずれか１項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、ヒト細胞。
- [請求項7] 前記RNA-タンパク質複合体における、RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離が、２０塩基対から２４塩基対、または１５塩基対から１９塩基対である、請求項６に記載のヒト細胞。
- [請求項8] RNA-タンパク質結合モチーフ配列を２つ含み、両端に機能的分子を有する２重鎖RNAと当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで、当該機能的分子の相互作用を制御する方法。

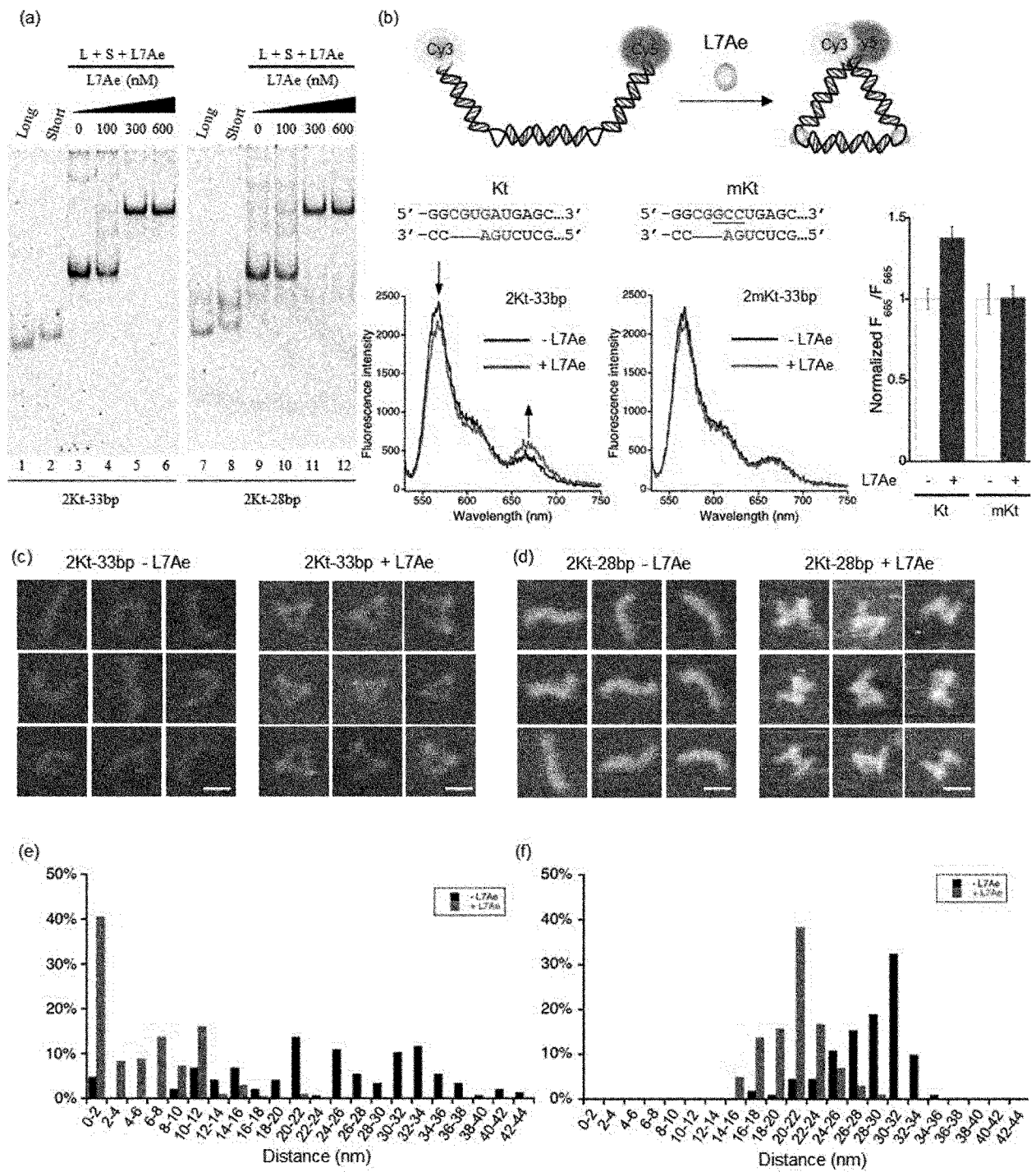
- [請求項9] 前記2重鎖RNAのRNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を調整することで、前記相互作用を正または負へ制御する、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を20塩基対から24塩基対、または31塩基対から35塩基対、または42塩基対から46塩基対にすることで、当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで前記相互作用を正へ制御する、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記RNA-タンパク質結合モチーフ配列間の距離を15塩基対から19塩基対、または26塩基対から30塩基対、または37塩基対から41塩基対にすることで、当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質を結合させることで前記相互作用を負へ制御する、請求項9に記載の方法。
- [請求項12] 前記2重鎖RNAの両端に互いに相補鎖となる6塩基対以上のオーバーハングを有する、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 前記機能的分子が、アプタマーである、請求項8から12のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項14] 前記2重鎖RNAと前記融合タンパク質とをヒト細胞内で結合させる、請求項8から13のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項15] 次の(1)および(2)を含むRNA-タンパク質複合体；
(1) RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNA、および
(2) 当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質との融合タンパク質。
- [請求項16] 前記2重鎖RNAが、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を9つ以上含む、請求項15に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項17] 前記被凝集タンパク質が、カスパーゼ8またはその断片である、請求項15または16に記載のRNA-タンパク質複合体。

- [請求項18] 請求項15から17に記載のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、ヒト細胞。
- [請求項19] RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ以上含む2重鎖RNAと、当該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質を融合した融合タンパク質とを結合させることで、被凝集タンパク質の凝集を制御する方法。
- [請求項20] 前記2重鎖RNAが、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を9つ以上含む、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 前記被凝集タンパク質が、カスパーゼ8またはその断片である、請求項19または20に記載の方法。
- [請求項22] 前記2重鎖RNAと前記融合タンパク質とをヒト細胞内で結合させる、請求項19から21のいずれか1項に記載の方法。

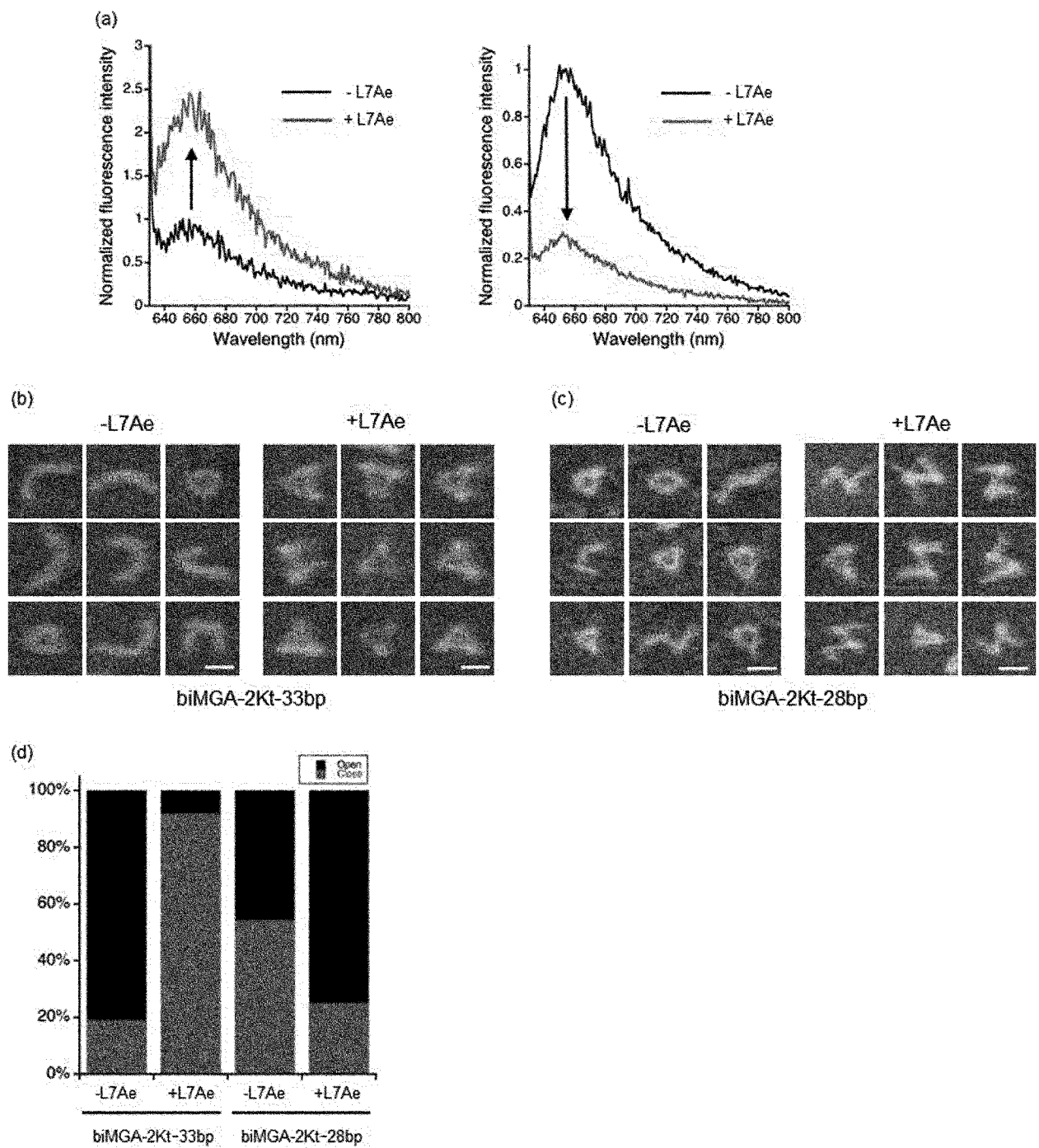
[図1]



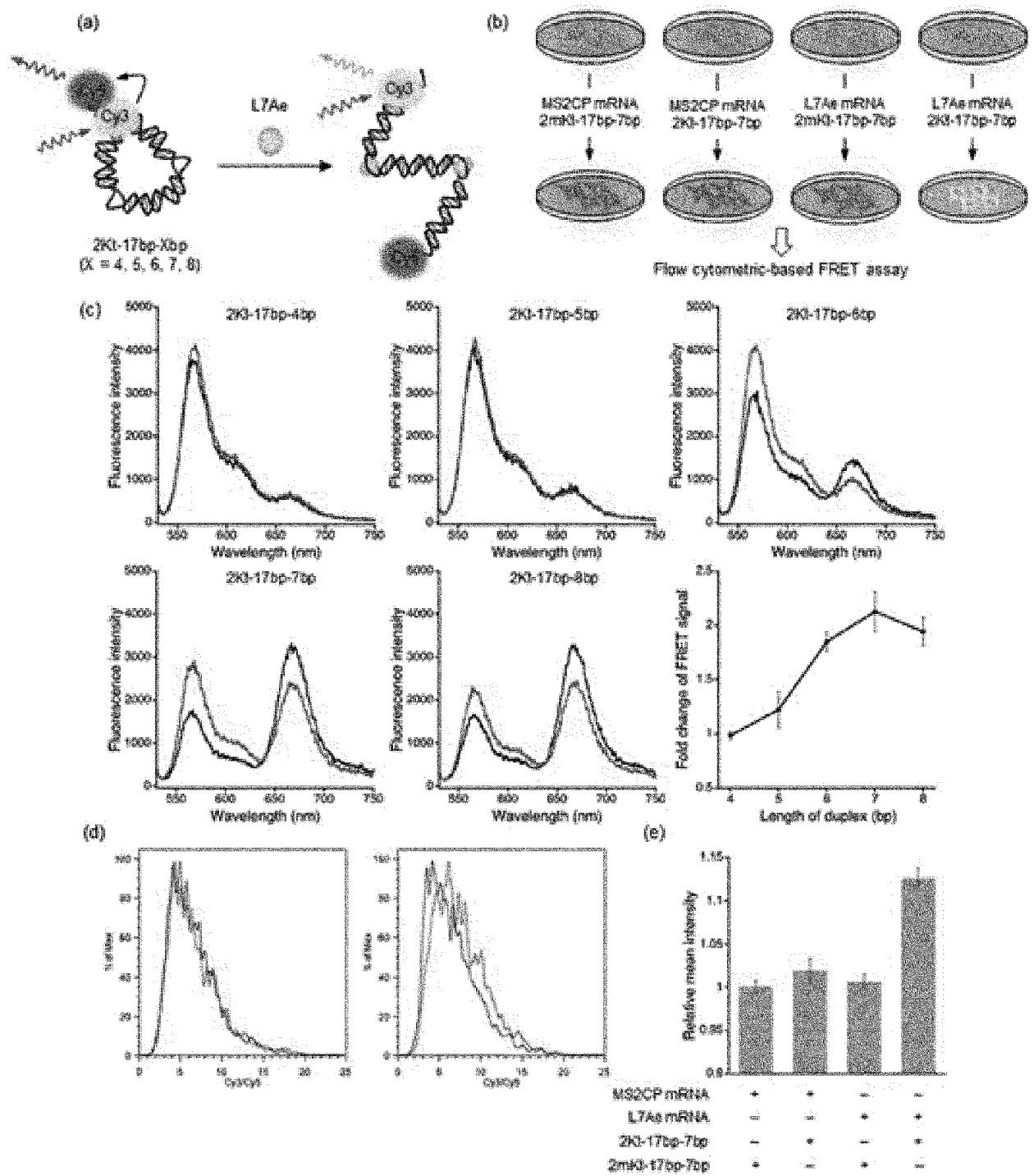
[2]



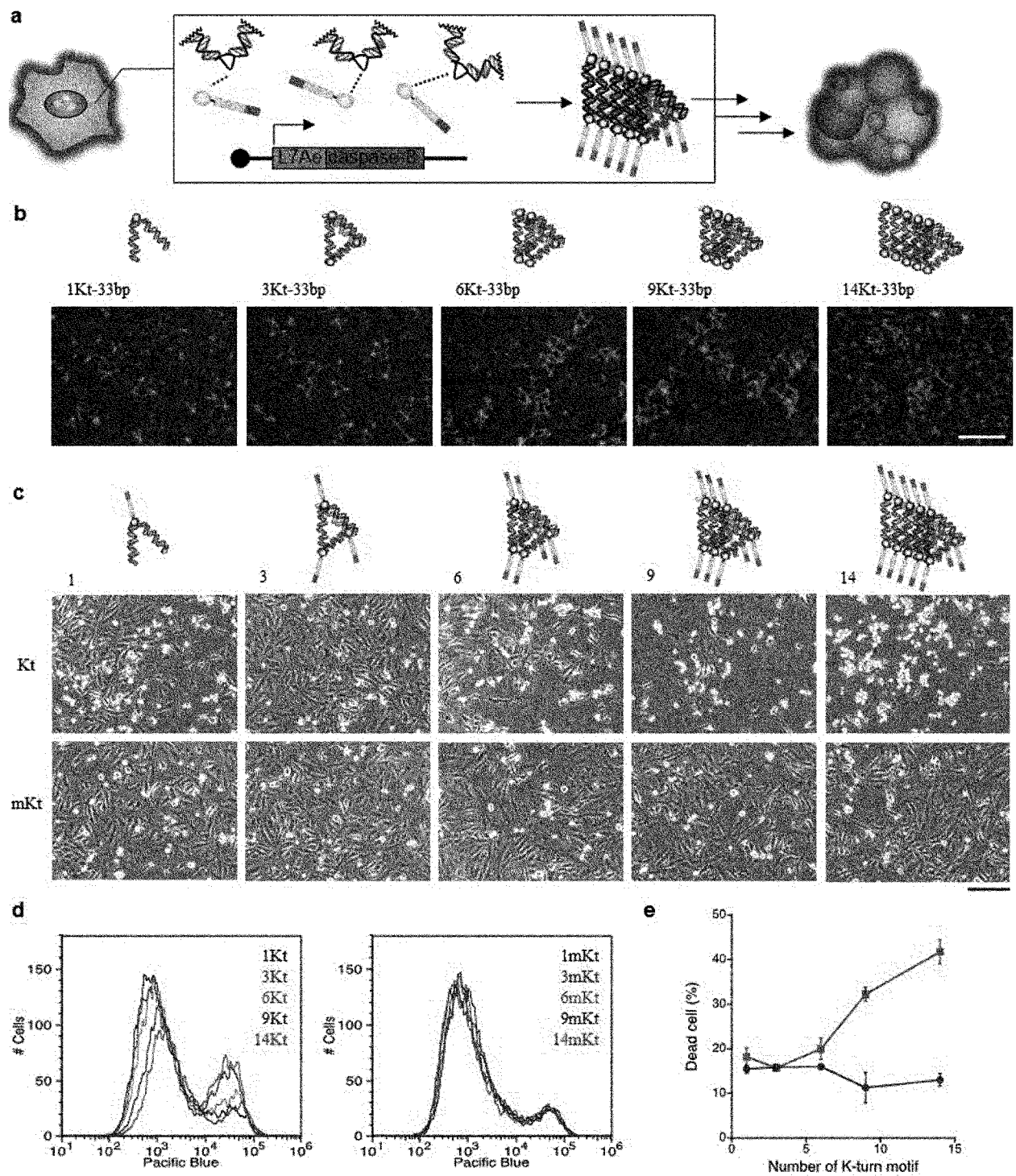
[図3]



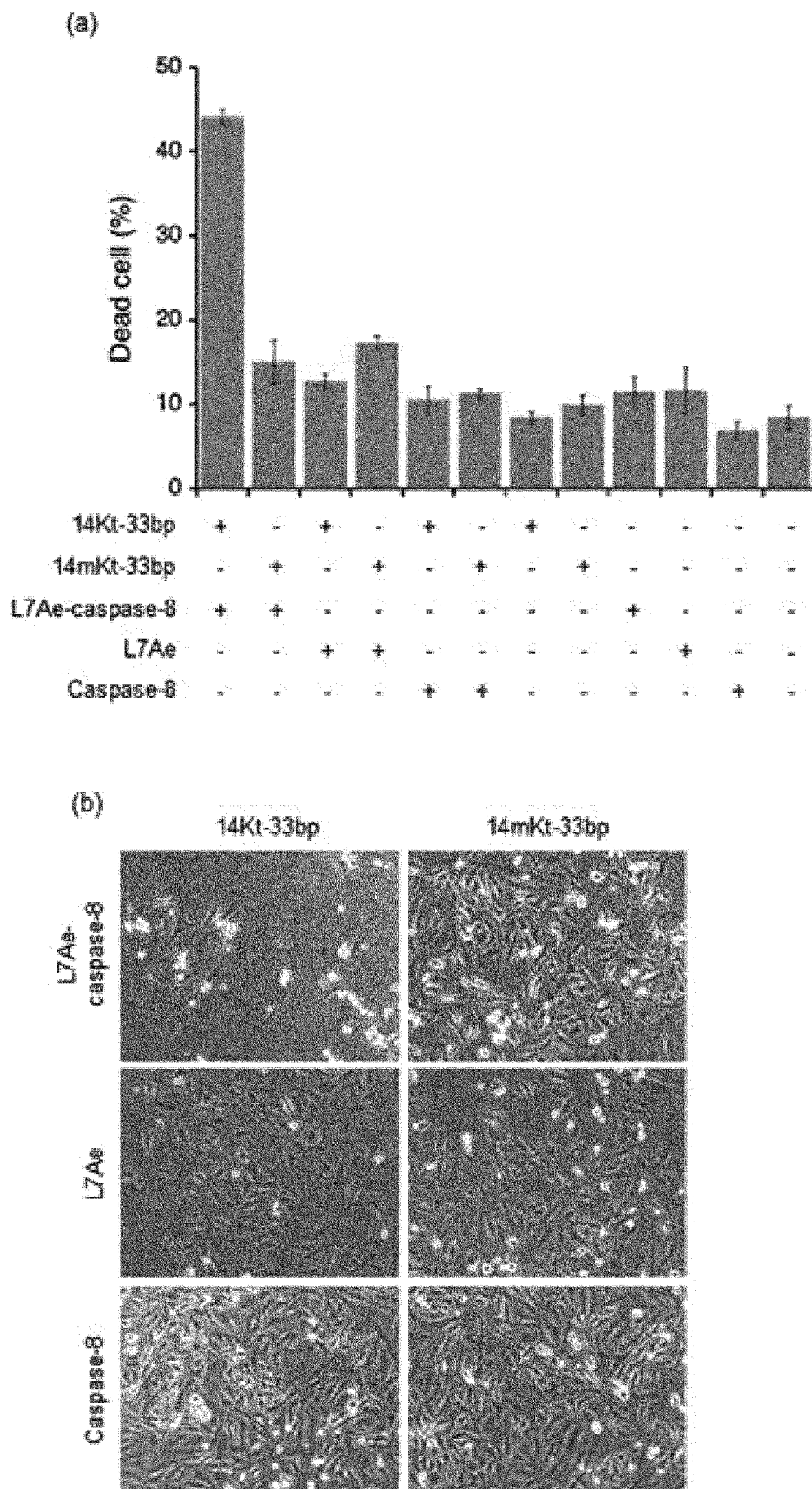
[図4]



[図5]

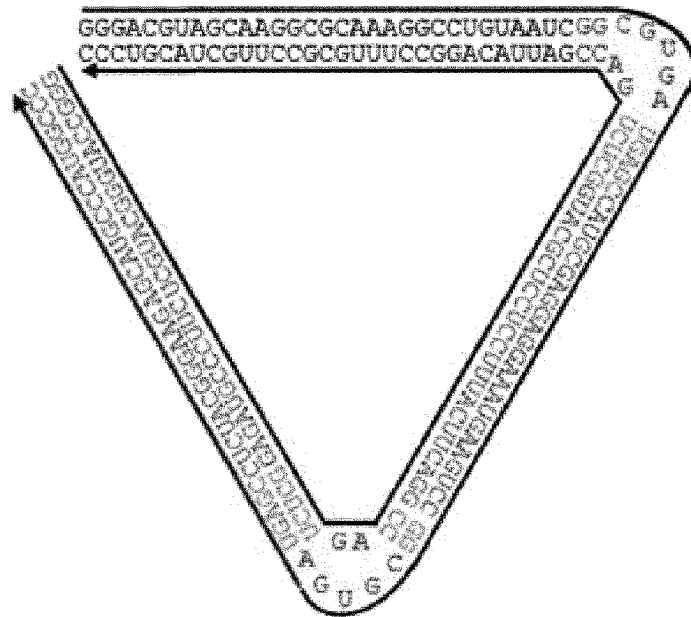


[図6]



[図7]

a 2Kt-30bp



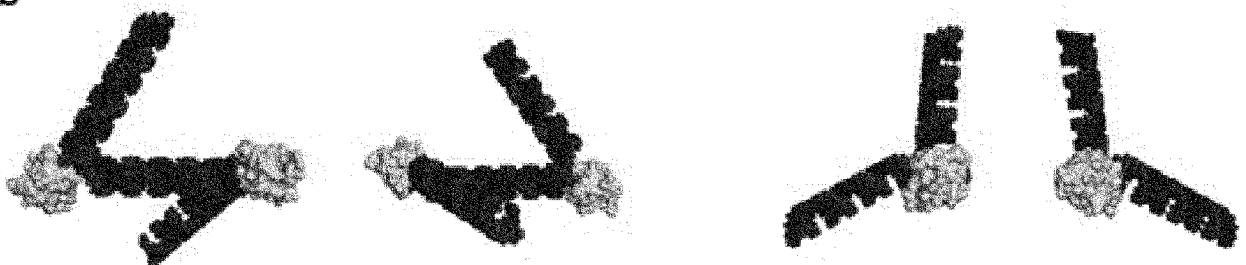
2Kt-30bp-long

GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUGCGAGGAGGAAAUGAA
GUCCGGCGUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUGCCCAUGGCC

2Kt-30bp-short

GGGCCAUGGGCAUGCUCUUCGGUAGAGGCUCUGACCGGACUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGC
UCUGACCGAUUACAGGCCUUUGCGCCUUGCUCACGUCC

b



[図8]

2Kt-33bp

```

5'-GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
3'-CCGUCAGCUGUCCGCGUAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA

```

2mKt-33bp

```

5'-GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
3'-CCGUCAGCUGUCCGCGUAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA

```

2Kt-33bp-long: GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
GGAGGAAUUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUGC
CCAUGGCC

2mKt-33bp-long: GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
GGAGGAAUUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUGC
CCAUGGCC

2Kt-33bp-short: GGGCCAUGGGCAUGCUCUUCGCCUGAUGAGCCUCUACCAUUGGACUUCAUU
UCCUCUCGCAUGGCCUCUGAGCCGAUUAACAGGCCUUGGCCCUUGCUCACGU
CC

2Kt-28bp

```

5'-GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
3'-CCGUCAGCUGUCCGCGUAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA

```

2mKt-28bp

```

5'-GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA
3'-CCGUCAGCUGUCCGCGUAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCCUGAUGAGCCAUUGC GA

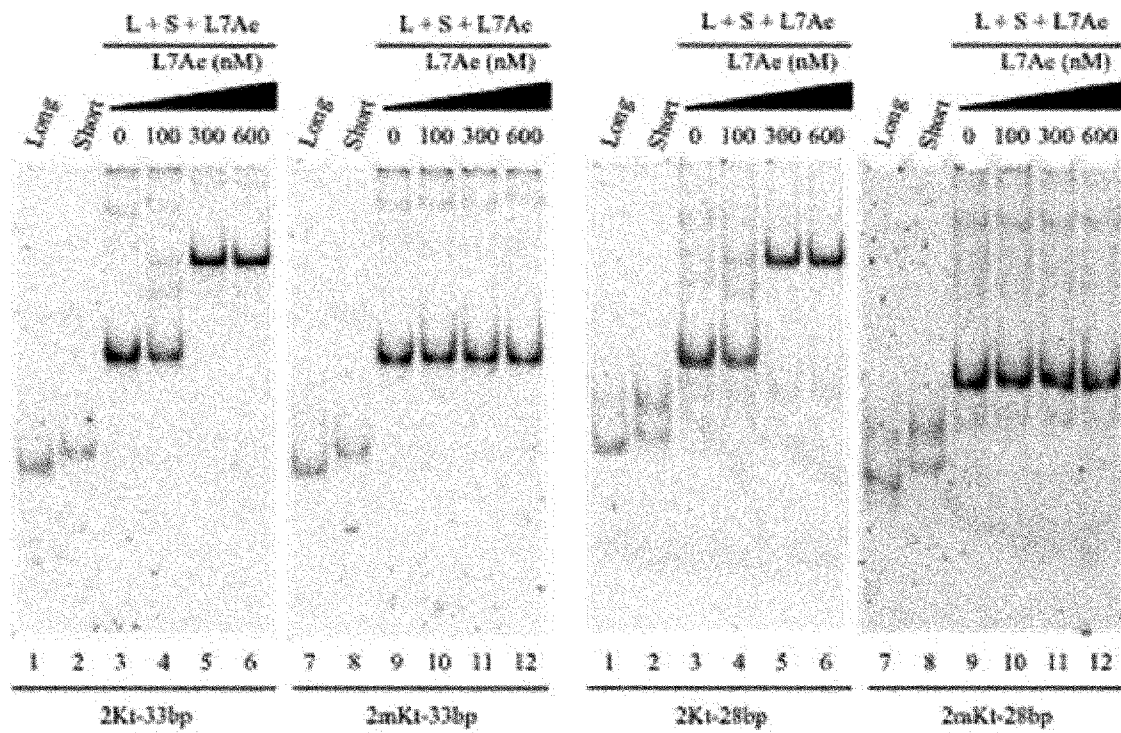
```

2Kt-28bp-long: GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGGCGGCGUGAUGAGCCAUUGC GAGGAGG
AAUUGAAGUAGCGCGUGAUGAGCCGCGGAAGAGCAUGCCCAUGGCC

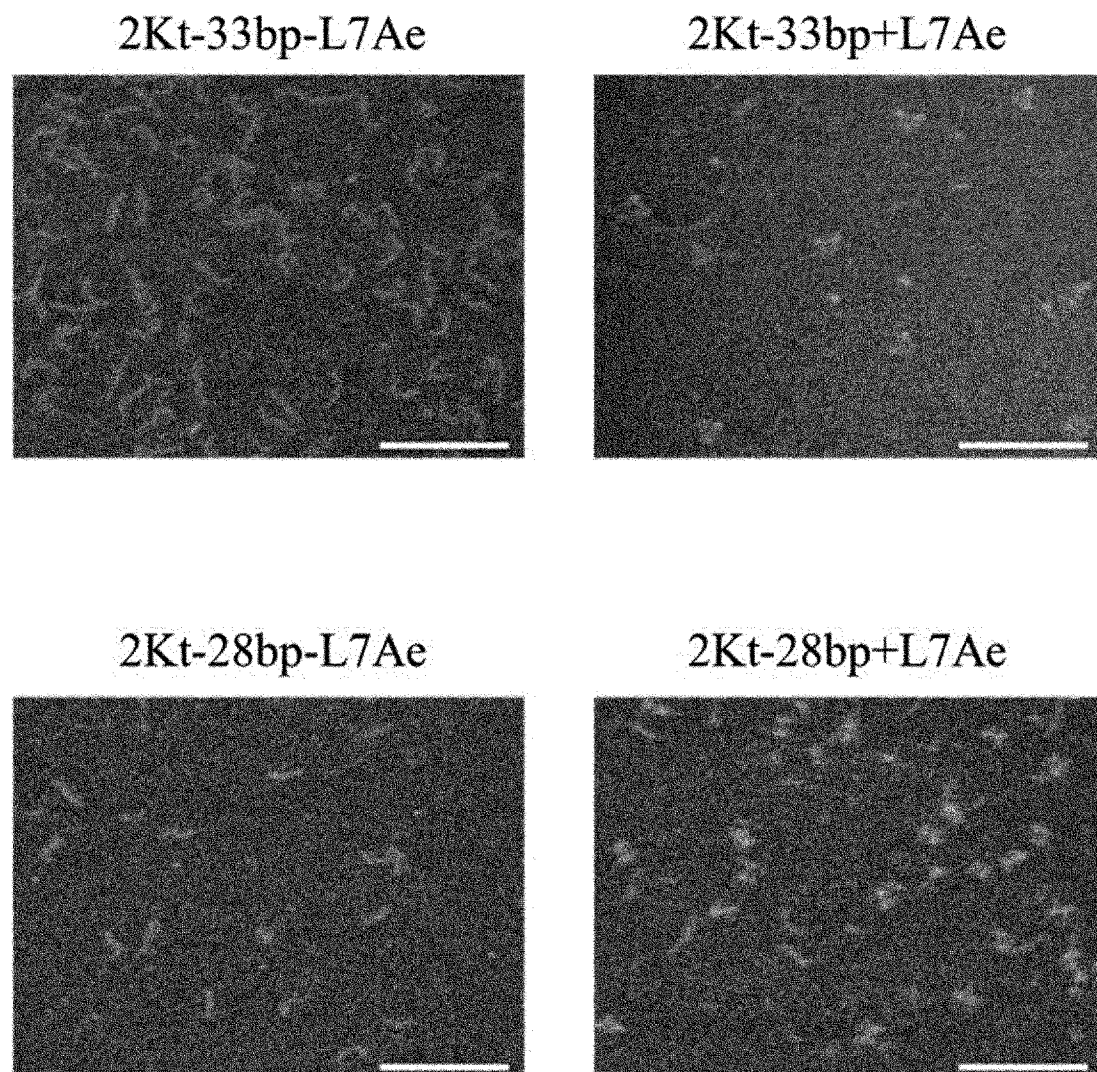
2mKt-28bp-long: GGGACGUAGCAAGGCGCAAAGGCCUGGCGGCGUGAUGAGCCAUUGC GAGGAGG
AAUUGAAGUAGCGCGUGAUGAGCCGCGGAAGAGCAUGCCCAUGGCC

2Kt-28bp-short: GGGCCAUGGGCAUGCUCUUCGCCUGAUGAGCCACUUCAUUCCUCUCGC
AUGGCCUGAGCCAGGCCUUGCGCCUUGCUCACGUCCC

[図9]



[図10]



[図11]

biMGA-2Kt-33bp-U0 (original stem)

```

5'-GGGACGUAAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUUGCGA
GGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUUGC
CAUUGGCC-3'

```

biMGA-2Kt-33bp-U2 (original stem)

```

5'-GGGACGUAAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUUGCGA
GGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUUGC
CAUUGGCC-3'

```

biMGA-2Kt-33bp-U4 (original stem)

```

5'-GGGACGUAAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUUGCGA
GGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUUGC
CAUUGGCC-3'

```

2Kt-33bp-long+C: GGGACGUAAGCAAGGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUUGCGA
GGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCCUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUUGC
CAUUGGCC

biMGA-2Kt-33bp-short-U0: GGAGGUAACGAUUGGCCUGGGCCAUUGGCAUGGCUCUCCCCGUAGAGGCUCG
(original stem) ACCAUUGGACUUCAUUUCUCCUCUGCAUGGCUCUGACCGAUUACAGGCCU
UUGCGCCUUGCUACGUCCCCGCCCGACUCC

biMGA-2Kt-33bp-short-U2: GGAGGUAACGAUUGGCCUGGGCCAUUGGCAUGGCUCUCCCCGUAGAGGCUC
(original stem) UGACCAUUGGACUUCAUUUCUCCUCUGCAUGGCUCUGACCGAUUACAGGC
CUUUGCGCCUUGCUACGUCCCCGCCCGACUCC

biMGA-2Kt-33bp-short-U4: GGAGGUAACGAUUGGCCUGGGCCAUUGGCAUGGCUCUCCCCGUAGAGGC
(original stem) UCUGACCAUUGGACUUCAUUUCUCCUCUGCAUGGCUCUGACCGAUUACAG
GCCUUGCGCCUUGCUACGUCCCCGCCCGACUCC

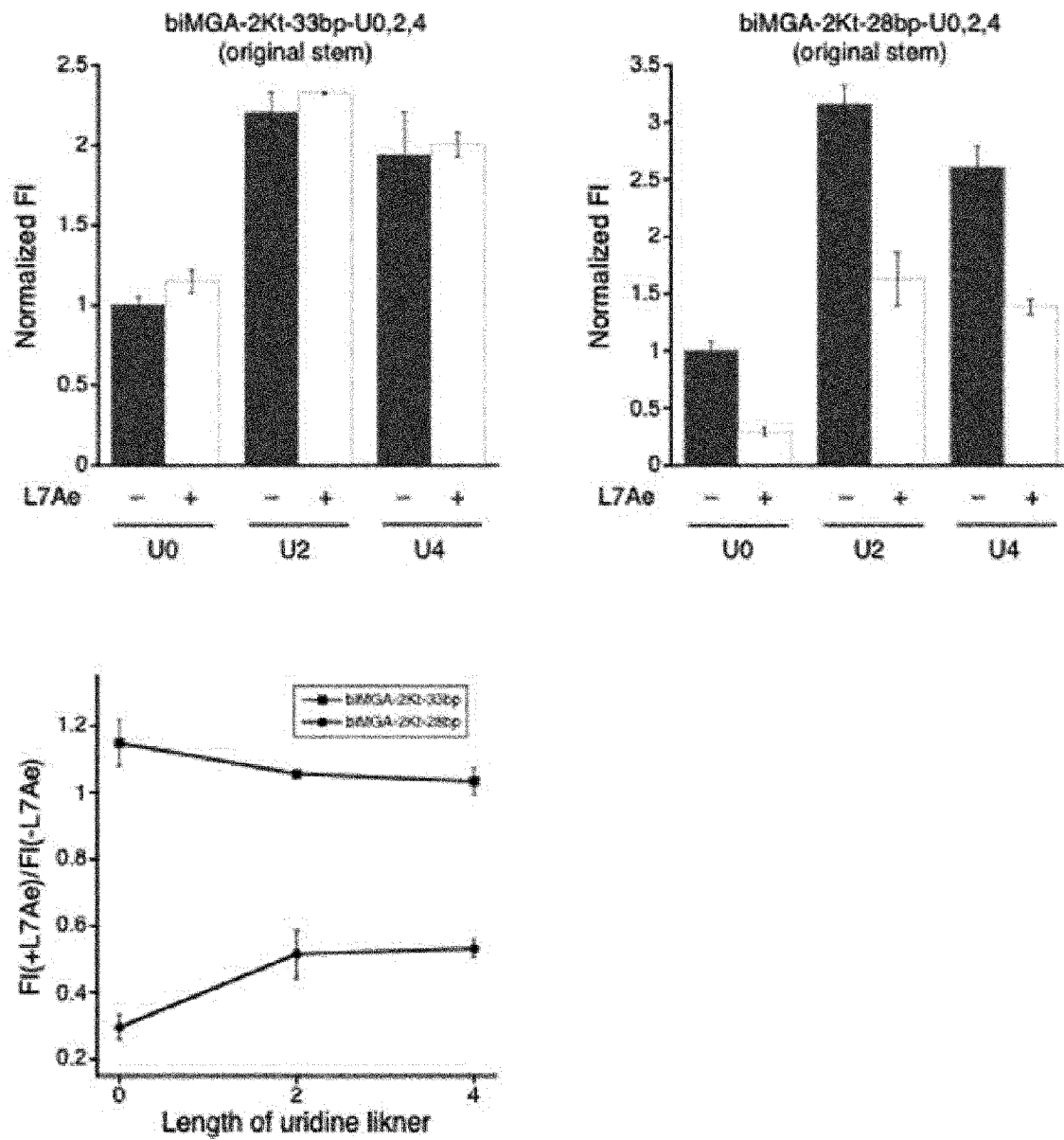
```

      UA  A
      G  A  AU
5'-GGAG  CG  GCC...
      ||||  ||  |||
3'-CCUC  A  G  C  CCG...

```

UA A
 G A AU
 5'-GGAG CG GGC-
 |||| || ||
 3'-CCUC A GC CCG-

[図13]



stem C

UA A
G A AU

5'-GUG CG CGC
3'-CAC A GC CCG

[図15]

biMGA-2Ki-28bp-U0 (stem D)



biMGA-2Ki-28bp-U0 (stem E)



biMGA-2Ki-28bp-U0 (stem F)

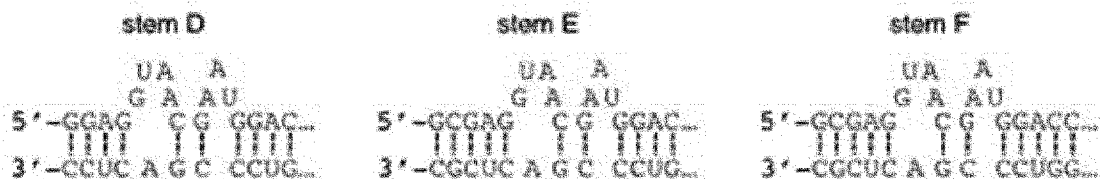


2Ki-28bp-long: GGGACGUAAGCAAGGCGCAAAGGCCUGGGCGUGAUGAGCCAUUGCGAGGAGG
 AAUUGAAGUGGCGUGAUGAGCCGGAAGAGCAUGCCCAUGGGCCC

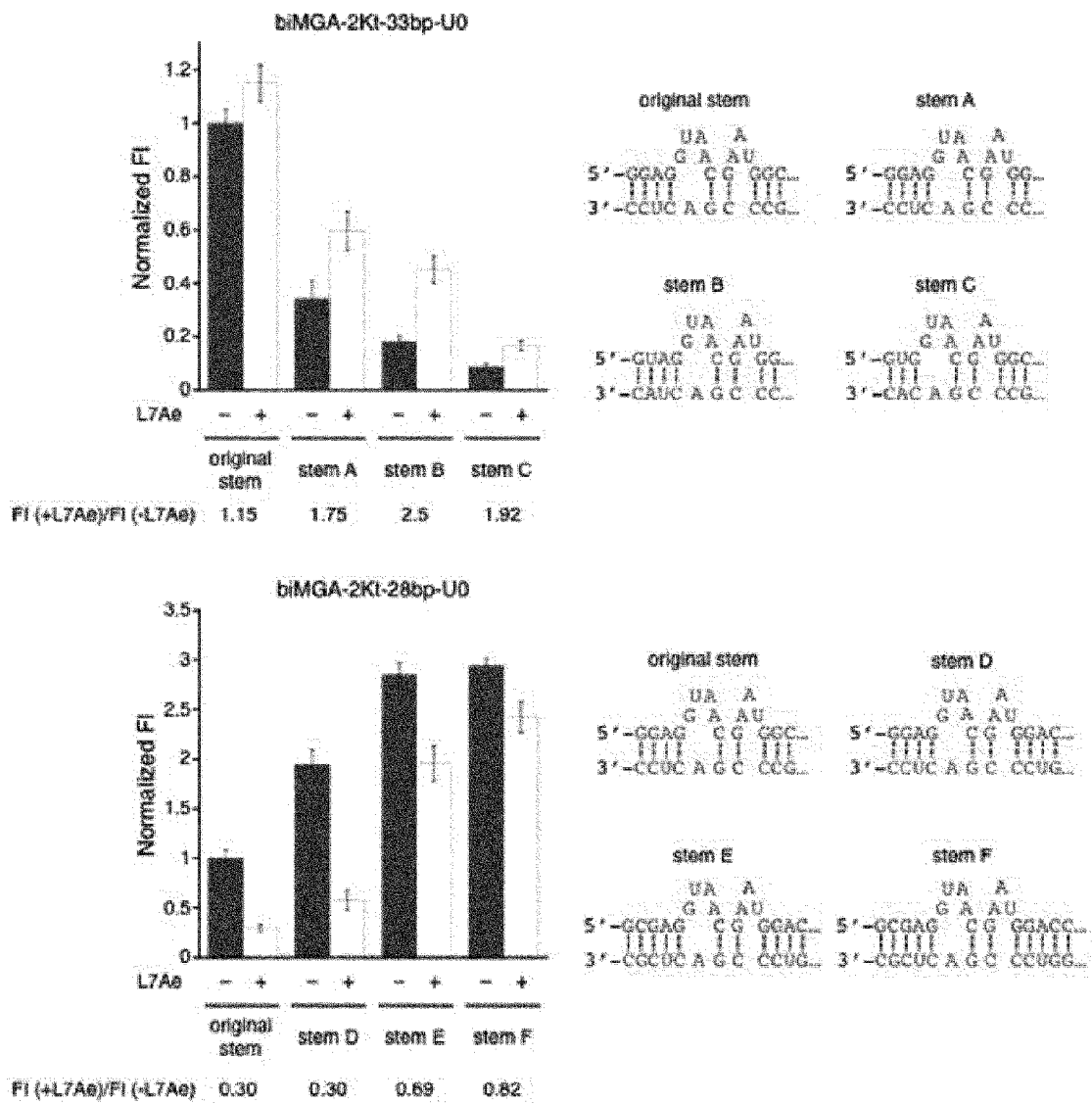
biMGA-2Ki-28bp-short-U0: GCGAGGUAACGAUUGGACGGGCGCAUGGGCAUGCUCUCCCCGGGCUUGAGCC
 (stem D) CUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGCCUCUGAGCCAGGCCUUUGCGCCUUGCUAC
 GUCCCCGUCCCCGACUCC

biMGA-2Ki-28bp-short-U0: GCGAGGUAACGAUUGGACGGGCGCAUGGGCAUGCUCUCCCCGGGCUUGAGCC
 (stem E) ACUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGCCUCUGAGCCAGGCCUUUGCGCCUUGCUA
 CGUCCCCGUCCCCGACUCC

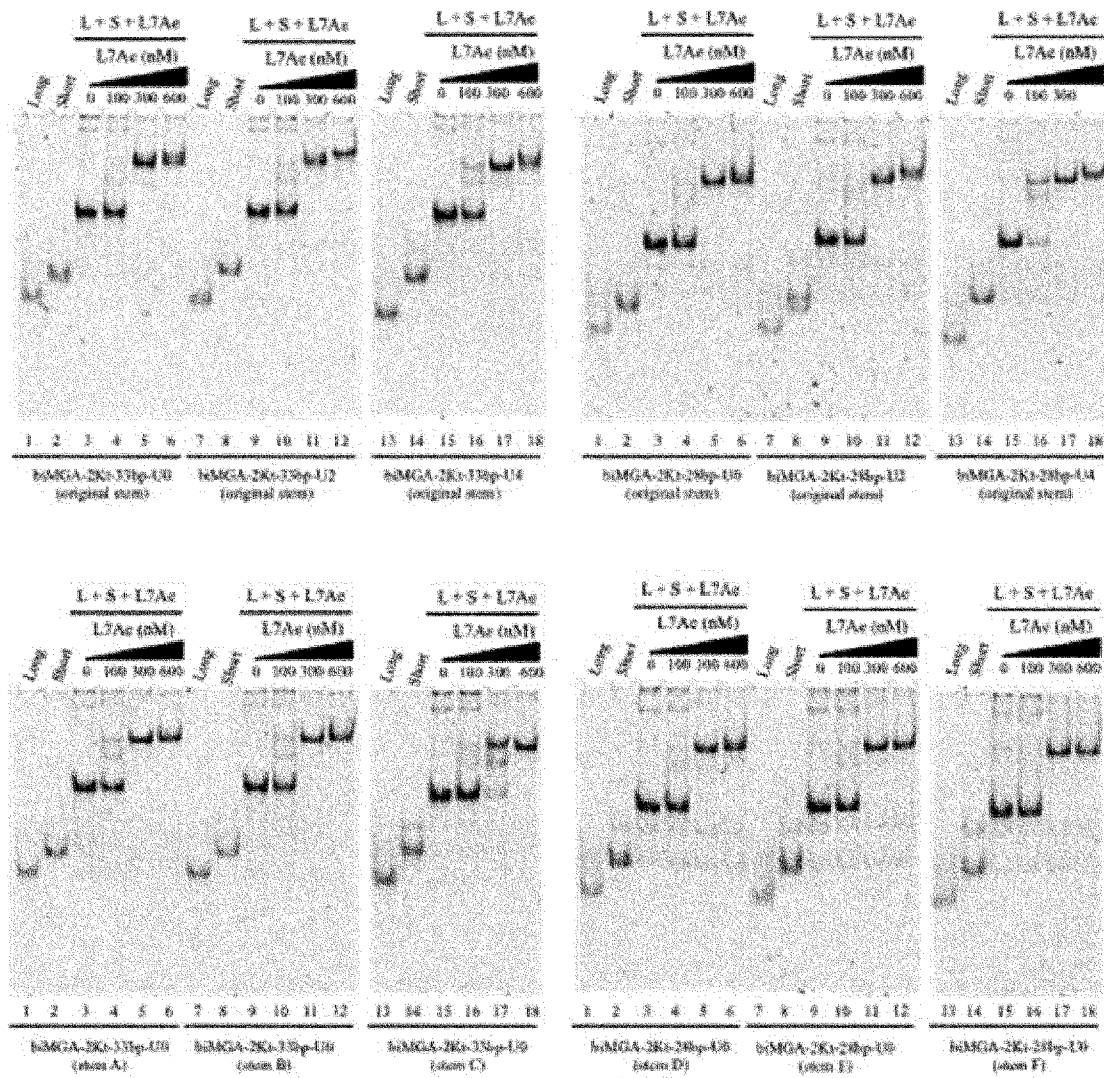
biMGA-2Ki-28bp-short-U0: GCGAGGUAACGAUUGGACGGGCGCAUGGGCAUGCUCUCCCCGGGCUUGAGCC
 (stem F) CACUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGCCUCUGAGCCAGGCCUUUGCGCCUUGCU
 ACGUCCCCGUCCCCGACUCC



[図16]

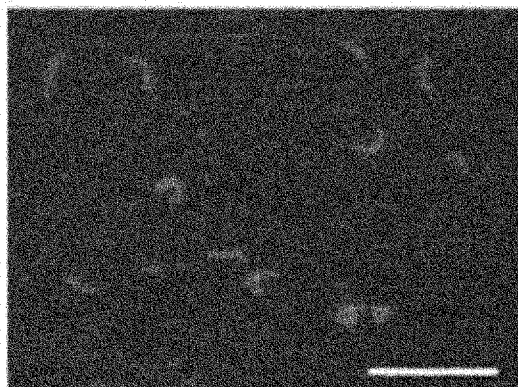


[図17]

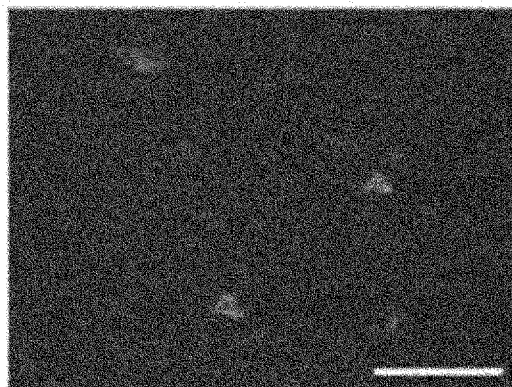


[図18]

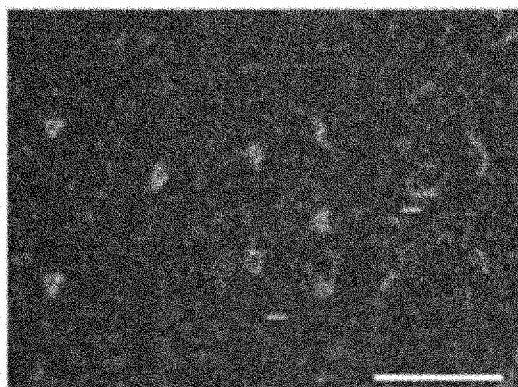
biMGA-2Kt-33bp-L7Ae



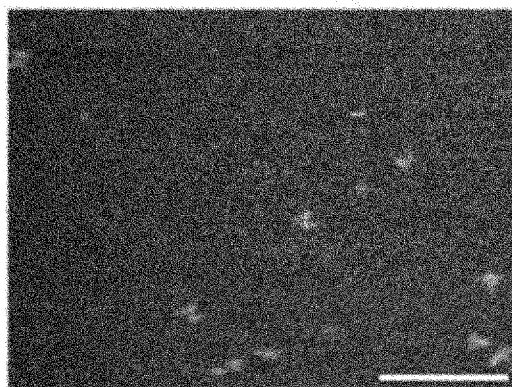
biMGA-2Kt-33bp+L7Ae



biMGA-2Kt-28bp-L7Ae



biMGA-2Kt-28bp+L7Ae



[図19]

2Kt-17bp-4bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

2Kt-17bp-5bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

2Kt-17bp-6bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

2Kt-17bp-7bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

2mKt-17bp-7bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

2Kt-17bp-8bp

5'-GGGACAGCAGCUCUCUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAAGUGGCGGGAUGAGCCAGGCCAGGCC(Cy3)-3'
 3'-(Cy5)CCUGGCGGCGGCGGCGGGAAGACC---AGUCUCGGUACGCUUCACC---AGUCUCGGCUCACUCGGGCAAG-5'

4bp

5'-GGAC...
 3'-CCUG...

5 bp

5'-GGAGC...
 3'-CCUG...

6bp

5'-GGACAC...
 3'-CCUGUG...

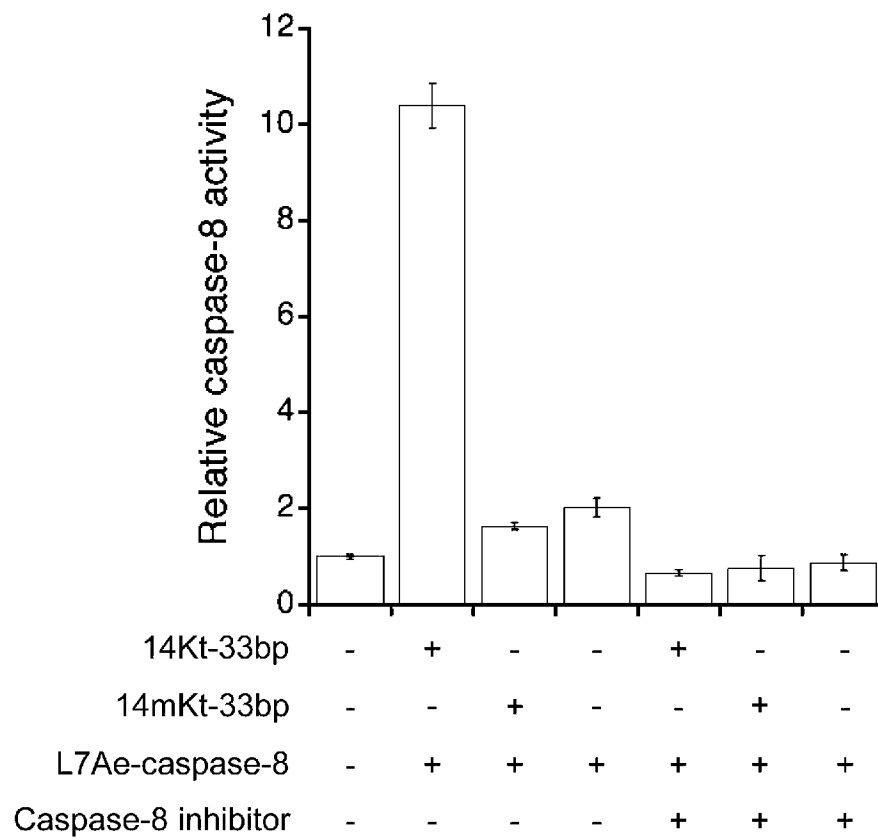
7bp

5'-GGACACC...
 3'-CCUGUGG...

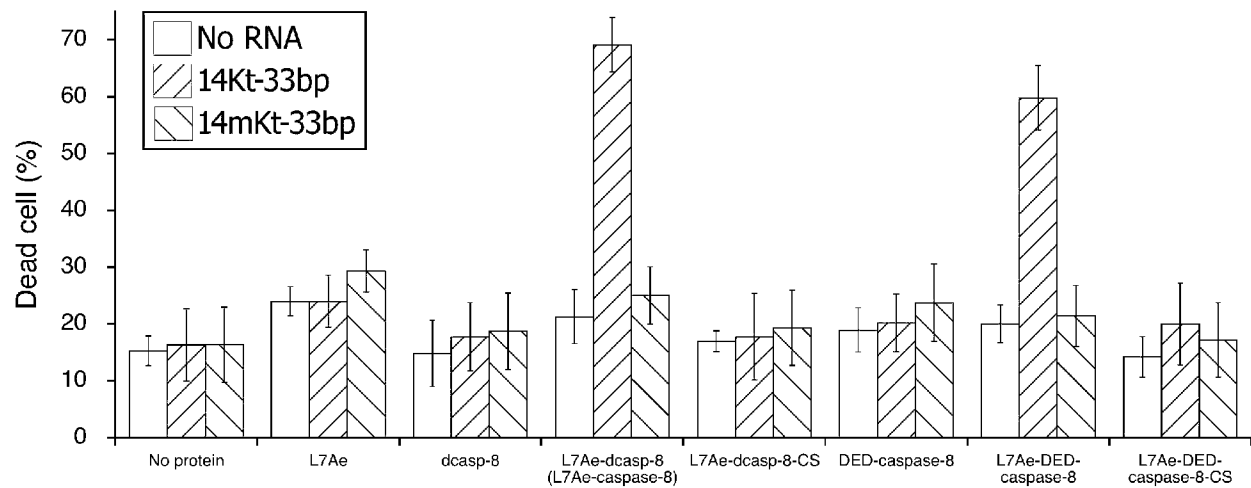
8 bp

5'-GGACAACC...
 3'-CCUGUUGG...

[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C12N5/22(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i

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)

C12N15/09, B82Y5/00, C07K14/00, C12N5/22, C12N9/64, C12N15/115

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	SHIBATA T et al., RNA-protein nanomachines for controlling both RNA structures and functions, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry Program & Abstracts, 2014.11.17, p.380-381, particularly, page 381, lines 1 to 25, Figure 1	<u>1-14</u> 1-22
Y	WO 2010/010862 A1 (Japan Science and Technology Agency), 28 January 2010 (28.01.2010), claim 1; paragraphs [0040] to [0041], [0064] to [0065]; fig. 3, 6 (Family: none)	1-22



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

"I" 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
14 September 2016 (14.09.16)

Date of mailing of the international search report
27 September 2016 (27.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OSADA E et al., Engineering RNA-Protein Complexes with Different Shapes for Imaging and Therapeutic Applications, ACS NANO, 2014, Vol.8, No.8, p.8130-8140, particularly, page 8131, left column, 3rd paragraph to page 8132, left column, 1st paragraph, page 8133, left column, 3rd paragraph to page 8135, left column, 1st paragraph, Figure 4(a), Summary	1-22
Y	OHNO H et al., Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle, Nature Nanotech, 2011.02, Vol.6, No.2, p.116-120, particularly, Summary, page 118, Figure 1	1-22
P,X	SHIBATA T et al., Synthetic RNA-protein nanomachines that function in vitro and in live cell, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry Program & Abstracts, 2015.12.16, p.72-73	1-22
P,Y	WO 2016/006628 A1 (Kyoto University), 14 January 2016 (14.01.2016), (Family: none)	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071029

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: SHIBATA T et al., Dai 41 Kai International Symposium on Nucleic Acids Chemistry Program & Abstracts, 2014.11.17, p.380-381

The inventions described in claims 1-22 share a common technical feature in which the inventions relate to an RNA-protein complex comprising double-stranded RNA that contains two RNA-protein conjugate motif sequences and a protein that can bind to the RNA-protein conjugate motif sequences.
(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071029

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Therefore, the following two inventions are involved in claims.

(Invention 1) Claims 1-14; inventions relating to: an RNA-protein complex comprising double-stranded RNA that has functional molecules respectively at both terminals thereof and contains two RNA-protein conjugate motif sequences and a protein that can bind to the RNA-protein conjugate motif sequences; and a use of the RNA-protein complex.

(Invention 2) Claims 15-22; inventions relating to: an RNA-protein complex comprising double-stranded RNA that contains two RNA-protein conjugate motif sequences and a fusion body that is composed of a protein capable of binding to the RNA-protein conjugate motif sequences and a protein to be agglutinated; and a use of the RNA-protein complex.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, B82Y5/00(2011.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C12N5/22(2006.01)i, C12N9/64(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i

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. C12N15/09, B82Y5/00, C07K14/00, C12N5/22, C12N9/64, C12N15/115

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed

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 請求項の番号
X Y	SHIBATA T et al., RNA-protein nanomachines for controlling both RNA structures and functions, 第41回国際核酸化学シンポジウム Program & Abstracts, 2014.11.17, p.380-381, 特に第381頁第1行~第25行, Figure 1	<u>1-14</u> 1-22
Y	WO 2010/010862 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2010.01.28, 請求項1, [0040]-[0041], [0064]-[0065], 図3, 図6 (ファミリーなし)	1-22

☑ 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

14.09.2016

国際調査報告の発送日

27.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

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)

伊藤 良子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3644

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 請求項の番号
Y	OSADA E et al., Engineering RNA-Protein Complexes with Different Shapes for Imaging and Therapeutic Applications, ACS NANO, 2014, Vol. 8, No. 8, p. 8130-8140, 特に第 8131 頁左欄第 3 段落～第 8132 頁左欄第 1 段落, 第 8133 頁左欄第 3 段落～第 8135 頁左欄第 1 段落, Figure 4(a), 要旨	1 - 2 2
Y	OHNO H et al., Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle, Nature Nanotech, 2011.02, Vol. 6, No. 2, p. 116-120, 特に要旨, 第 118 頁, Figure 1	1 - 2 2
P, X	SHIBATA T et al., Synthetic RNA-protein nanomachines that function in vitro and in live cell, 第 4 2 回国際核酸化学シンポジウム Program & Abstracts, 2015.12.16, p. 72-73	1 - 2 2
P, Y	WO 2016/006628 A1 (国立大学法人京都大学) 2016.01.14, (ファミリーなし)	1 - 2 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1：SHIBATA T et al., 第41回国際核酸化学シンポジウム Program & Abstracts, 2014. 11. 17, p. 380-381

請求項1-22に係る発明は、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含む2重鎖RNAと、該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質とのRNA-タンパク質複合体に関するという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。したがって、請求の範囲には以下に示す2の発明が含まれる。

（発明1）請求項1-14；2重鎖RNAの両端に機能的分子を有し、RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含む2重鎖RNAと、該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質とを含む、RNA-タンパク質複合体及びその利用に係る発明

（発明2）請求項15-22；RNA-タンパク質結合モチーフ配列を2つ含む2重鎖RNAと、該RNA-タンパク質結合モチーフ配列へ結合するタンパク質と被凝集タンパク質との融合体とを含む、RNA-タンパク質複合体及びその利用に係る発明

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。