

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6804467号  
(P6804467)

(45) 発行日 令和2年12月23日(2020.12.23)

(24) 登録日 令和2年12月4日(2020.12.4)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 9/10 (2006.01)  
C 12 N 15/54 (2006.01)C 12 N 9/10  
C 12 N 15/54 Z N A

請求項の数 3 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2017-555346 (P2017-555346)	(73) 特許権者	507243164 ユニバーシティ・オブ・シンシナティ アメリカ合衆国・オハイオ・45221-0623・シンシナティ・クリ夫トン・アヴェニュー・2624
(86) (22) 出願日	平成28年4月25日(2016.4.25)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(65) 公表番号	特表2018-512883 (P2018-512883A)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(43) 公表日	平成30年5月24日(2018.5.24)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/029151	(72) 発明者	バラスプラマニヤム・アップデパッリ アメリカ合衆国・オハイオ・45040-メーソン・アイザック・レーン・4943
(87) 國際公開番号	W02016/172678		
(87) 國際公開日	平成28年10月27日(2016.10.27)		
審査請求日	平成31年4月12日(2019.4.12)		
(31) 優先権主張番号	62/151,546		
(32) 優先日	平成27年4月23日(2015.4.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/151,640		
(32) 優先日	平成27年4月23日(2015.4.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え型ヌクレオシド特異的リボヌクレアーゼ及びその生成法と使用法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

組換え型リボヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドであって、前記ヌクレオチド配列が、ウリジン特異的組換え型RNaseMC1をコードする配列番号2である、ポリヌクレオチド。

## 【請求項2】

配列番号2のヌクレオチド配列によってコードされるウリジン特異的組換え型RNaseMC1である組換え型リボヌクレアーゼを作製する方法であって、

宿主に組換え型DNA配列を導入する工程、

宿主内の組換え型DNA配列の発現を活性化し組換え型リボヌクレアーゼを生成する工程であって、組換え型リボヌクレアーゼがウリジン特異的組換え型RNaseMC1である、工程、及び

宿主から組換え型リボヌクレアーゼを単離する工程を含む、方法。

## 【請求項3】

宿主が大腸菌である、請求項2に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、いずれもその全容が参照により本明細書に組み込まれている、2015年4月23日に出願された米国仮特許出願第62/151,546号、及び更に2015年4月23日に出願された米国仮特許出願第62/151,640号に関するものであり、その優先権を主張するものである。

#### 【 0 0 0 2 】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって与えられたGM058843及びアメリカ国立科学財団によって与えられたCHE-1156449の下で政府の支援によってなされた。政府は、本発明において確固たる権利を有する。

#### 【 0 0 0 3 】

1つ又は複数の配列表に関する参照

10

本明細書に組み込まれその一部分を構成する添付の配列表は、本発明の実施形態を例証するものであり、上記の本発明の一般的記載及び下記の詳細な記載と共に本発明の原理の説明として役立つ。

#### 【 0 0 0 4 】

本発明は一般に、組換え型リボヌクレアーゼの分野、より詳細には組換え型リボヌクレアーゼを使用したRNA配列を分析する方法に関する。

#### 【背景技術】

#### 【 0 0 0 5 】

ヌクレオシド特異的リボヌクレアーゼ(本明細書で以後「RNase」)は、一般にRNA修飾マッピングと呼ばれる方法によりRNA配列において発見され得る、120を超える修飾ヌクレオシドの位置を突き止めるのに重要なツールである。RNA修飾は、構造的役割と機能的役割の両方によって様々なヒトの疾患と関連し得る。RNA配列全体内のヌクレオシド修飾の確認及び位置マッピングは、ヌクレオシド修飾の生物学的役割を決定するのに重要である。従来、RNA塩基配列決定技術は、ワトソンクリック型塩基対形成を介した、デオキシリボヌクレオチドへのRNAの重合依存的複製に主に依存していた。しかしながら、この複製は原型RNA配列の修飾情報の消失をもたらす。

20

#### 【 0 0 0 6 】

質量分析法(本明細書で以後「MS」)は、RNA修飾と関連した質量移動を直接測定することができる。1つのRNAマッピング手法は、ヌクレオシドを得るための標的RNAの加水分解に関する。したがって、MSを使用してヌクレオシド修飾の調査を行い、標的RNAのヌクレオシド特異的RNaseによる消化を使用して修飾配置を確認する。1つのヌクレオシド残基の組成値の知識は、所与の質量値に関して考えられる塩基組成の数に制約を課す。したがって、RNase消化産物のMS分析を簡潔にするため、多大な努力を払い少なくとも1つのヌクレオシド残基の組成値を決定する。実際、RNAの塩基特異的RNase消化、次に分離、及びイオノンペア試薬、逆相液体クロマトグラフィー、即ちIP-RP-LC-MSと衝突誘起解離タンデム質量分析法、即ちCID-MS/MSを使用したMSによって、修飾ヌクレオシドを原型RNA配列にマッピングすることができる。

30

#### 【 0 0 0 7 】

わずかなヌクレオシド特異的又はヌクレオシド選択的RNaseが市販されている。グアノシン特異的RNaseT1及びピリミジン選択的RNaseAの両方が市販されており、MSベースのRNA修飾マッピングに適合する。プリン選択的RNaseU2も市販されているが、ただし非常にわずかである。しかしながら、最適なRNA修飾マッピングは、多数のRNaseから充分な重複消化産物を生成し消化産物配列と修飾配置の冗長性を減らすことを必要とする。

40

#### 【 0 0 0 8 】

重複消化産物を生成するための代替戦略は存在する。これらは部分的RNase消化、非特異的ヌクレアーゼの使用、及びアルカリ加水分解を含む。しかしながら、これらの戦略も、過多又は過少消化を引き起こす消化の非特異性と非効率的反応条件を含めた幾つかの欠点を被る。これらの欠点は、乏しい分析再現性と多大な労働力を要する最適化プロセスをもたらす。したがって、RNA修飾マッピングにおいて使用される相補的ヌクレオシド特異性を有する新たなRNaseが有用となり得る。

50

**【 0 0 0 9 】**

RNaseMC1、ゴーヤー( bitter gourd)種子から最初に単離されたRNaseT<sub>2</sub>ファミリーのメンバーは、RNAのウリジン特異的切断を示すことが知られている。更に、キュウリ種子由来のクサチビン(Cusativin)は、RNAのシチジン特異的切断を示すことが知られている。しかしながらこれらのRNaseは、商業的又は大規模に利用可能ではない。

**【先行技術文献】****【非特許文献】****【 0 0 1 0 】**

【非特許文献 1】<http://www.idtdna.com/CodonOpt>

【非特許文献 2】<http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-01igo>

10

【非特許文献 3】<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【 0 0 1 1 】**

記した欠陥を克服するための試みにおいて、本発明の幾つかの態様は組換え型Rnaseを対象とする。

**【課題を解決するための手段】****【 0 0 1 2 】**

本発明は、宿主のリボソームタンパク質及び延長因子等の高発現遺伝子の使用に似せるために、コドン配列を選択的に修飾して、標的遺伝子の使用の調節を可能にするという認識を前提とする。したがって、大腸菌(*Escherichia coli*、以後、「*E. coli*」)等の宿主中の望ましい非宿主遺伝子の過剰発現を高めることができる。本発明の第一の実施形態は組換え型Rnaseを対象とする。一実施形態では、組換え型Rnaseは組換え型RNaseMC1である。別の実施形態では、組換え型Rnaseは組換え型RNaseクサチビンである。

20

**【 0 0 1 3 】**

本発明の更なる実施形態は、RNA配列を分析する方法を対象とする。この方法は、組換え型リボヌクレアーゼでRNAを消化しRNA配列のヌクレオチドを含む消化産物を得る工程、及び分析法を使用して消化産物を分析し少なくとも数個のヌクレオチドの同一性を得る工程を含む。組換え型リボヌクレアーゼはウリジン特異的組換え型RNaseMC1とシチジン特異的組換え型RNaseクサチビンの少なくとも1つを含む。一実施形態では、分析法はハイスループットスクリーニングを含むことができる。同じ又は異なる実施形態では、分析法は質量分析法を含むことができる。

30

**【 0 0 1 4 】**

本発明の更に別の実施形態は、組換え型RNaseを作製する方法を対象とする。この方法は、宿主に組換え型DNA配列を加える工程、宿主内の組換え型DNA配列の発現を活性化し組換え型リボヌクレアーゼを生成する工程、及び宿主から組換え型リボヌクレアーゼを単離する工程を含む。組換え型リボヌクレアーゼはウリジン特異的組換え型RNaseMC1とシチジン特異的組換え型RNaseクサチビンの少なくとも1つを含む。

**【 0 0 1 5 】**

本発明の目的及び利点は、本明細書中に与える以下の詳細な説明及び図面に照らして更に理解される。

40

**【 0 0 1 6 】**

本明細書に組み込まれその一部分を構成する添付の図面は、本発明の実施形態を例証するものであり、上記の本発明の一般的記載及び下記の詳細な記載と共に本発明の原理の説明として役立つ。

**【図面の簡単な説明】****【 0 0 1 7 】**

【図1A-1】図1Aは、RNaseMC1のアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコドンの一覧を与える図である。

【図1A-2】図1Aは、RNaseMC1のアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコ

50

ドンの一覧を与える図である。

【図1B】組換え型RNaseMC1に関するヌクレオチド配列を与える図である。

【図2A-1】図2Aは、RNaseクサチビンのアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコドンの一覧を与える図である。

【図2A-2】図2Aは、RNaseクサチビンのアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコドンの一覧を与える図である。

【図2B】図2Bは、RNaseクサチビンに関する天然ヌクレオチド配列を与える図である。

【図2C】図2Cは、組換え型RNaseクサチビンをコードするヌクレオチド配列を与える図である。

【図2D】図2Dは、RNaseクサチビンをコードする天然ヌクレオチド配列と組換え型ヌクレオチド配列のアライメントを与える図である。

【図3】図3は、RNaseT1及びRNaseMC1からの消化産物の比較の図である。

【図4】図4Aは、組換え型RNaseMC1を生成するために使用した大腸菌細胞の代表的増殖曲線の図である。図4Bは、様々なOD<sub>600</sub>値で採取した細胞から精製したタンパク質の量の比較の図である。図4Cは、精製した組換え型RNaseMC1のSDS-PAGEの図である。図4Dは、様々な量のRNaseMC1で観察したA<sub>260</sub>の比較の図である。

【図5】図5は、C消化産物に関するMSデータの図である。

【図6】図6は、UCC消化産物に関するMSデータの図である。

【図7】図7は、UCCCCCACCCACCA消化産物に関するMSデータの図である。

【図8】図8は、UGGGG[2<sup>4</sup>U]消化産物に関するMSデータの図である。

【図9】図9は、UCGAAGG[m<sup>5</sup>U]消化産物に関するMSデータの図である。

【図10】図10は、CGAA消化産物に関するMSデータの図である。

【図11】図11は、U[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]A消化産物に関するMSデータの図である。

【図12】図12は、CM-セルロースカラムからのクサチビンの溶出後の、各溶出画分の280nmにおける吸光度を示す図である。

【図13】図13は、約23～25kDaのポリペプチドの存在を検証するために使用したSDS-PAGEを示す図である。

【図14】図14は、Sephadex G-75カラムからのクサチビンの溶出後の、各溶出画分の280nmにおける吸光度を示す図である。

【図15】図15は、RNaseクサチビン精製の経過を示すためのSDS-PAGEの図である。

【図16】図16は、37℃で2時間サンプルをインキュベートした後の、様々なタンパク質濃度を使用したときの吸光度を示す図である。

【図17】図17は、50℃で2時間サンプルをインキュベートした後の、様々なタンパク質濃度を使用したときの吸光度を示す図である。

【図18】図18は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図19】図19は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図20】図20は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図21】図21は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図22】図22は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図23】図23は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図24】図24は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図25】図25は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図26】図26は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図27】図27は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図28】図28は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図29】図29は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図30】図30は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図31】図31は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図32】図32は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図33】図33は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図34】図34は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図35】図35は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図36】図36は、クサチビンの各消化産物に関する定量データのグラフを示す。

【図37】図37は、合成遺伝子の増幅をモニタリングするために使用したアガロースゲルを示す図である。

【図38】図38は、大腸菌における組換え型プラスミドの存在をモニタリングするために使用したアガロースゲルを示す図である。

【図39】図39は、組換え型プラスミドの消化がインサートの存在をうまく示したかどうかを、視覚化するために使用したアガロースゲルを示す図である。

10

【図40】図40は、クサチビン生成大腸菌の1コロニーから回収したカラム画分に関するSDS-PAGEゲルを示す図である。

【図41】図41は、クサチビン生成大腸菌の別コロニーから回収したカラム画分に関するSDS-PAGEゲルを示す図である。

【図42】図42は、37℃で2時間サンプルをインキュベートした後の、様々なタンパク質濃度を使用したときの吸光度を示す図である。

【図43】図43は、50℃で2時間サンプルをインキュベートした後の、様々なタンパク質濃度を使用したときの吸光度を示す図である。

【図44】図44は、2コロニーのクサチビン生成大腸菌から精製したクサチビンの相対量を示すためのSDS-PAGEの図である。

20

【図45】図45は、クサチビン消化産物のLC-MS分析を示す図である。

【図46】図46は、クサチビン消化産物のLC-MS分析を示す図である。

【図47】図47は、クサチビン消化産物のLC-MS分析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

文脈から明らかに他に定義されない限り、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲に表した値の任意の範囲はそれぞれの端点、及び列挙範囲内の各全数又はその小数部分を含む。更に、近似した語句を適用して、それが関係する基本的機能の変化をもたらさずに、変動し得る任意の量表示を修正することができる。したがって、「約」及び「実質的に」等の1つ又は複数の用語によって修正される値は、指定された正確な値に限られない可能性がある。

30

【0019】

本発明の例示的実施形態によれば、組換え型RNaseを開示する。組換え型RNaseは組換え型核酸配列から調製される。一実施形態ではRNaseは、選択的に修飾され宿主内の発現が高まったコドン配列を有するウリジン特異的組換え型RNaseMC1である。一実施形態では、RNaseMC1は配列番号1を有する。別の実施形態ではRNaseは、同様に選択的に修飾され宿主内の発現が高まったコドン配列を有するシチジン特異的組換え型RNaseクサチビンである。一実施形態では、組換え型RNaseクサチビンは配列番号2を有する。

【0020】

幾つかの代替実施形態は、宿主内の高まった発現を引き起こすようにコドンが選択的に修飾されたRNaseMC1及び/又はRNaseクサチビンの他の配列を含むことができる。更に、宿主はタンパク質発現に必要な成分を与えることができる任意の系を含むことができる。違う言い方をすると、本発明は宿主としての大腸菌の使用のみに限られない。

40

【0021】

図1AはRNaseMC1のアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコドンの一覧を与え、一方図2AはRNaseクサチビンのアミノ酸配列をコードし得る可能性がある全てのコドンの一覧を与える。RNaseMC1の天然ヌクレオチド配列は知られていない。しかしながら、アミノ酸配列は知られており、図1A中に含有される情報基盤であり配列番号1として与えられる。組換え型RNaseMC1に関するヌクレオチド配列は図1B中に与えられる(配列番号2)。しかしながら、RNaseクサチビンに関する天然ヌクレオチド配列は知られており、図2B中

50

に表される(配列番号3)。図2Cは、宿主中での過剰発現を促進するよう設計された、組換え型RNaseクサチビンをコードするヌクレオチド配列を与える(配列番号4)。クサチビンのアミノ酸配列は配列番号5によって与えられる。図2Dは、RNaseクサチビンをコードする天然ヌクレオチド配列(配列番号3)と組換え型RNaseクサチビンをコードする図2Cの組換え型ヌクレオチド配列(配列番号4)のアライメントを与える。一実施形態では、組換え型RNaseMC1及びRNaseクサチビンをコードするそれぞれのヌクレオチド配列を与えるが、本発明の幾つかの実施形態では、他の組換え型コドンの組合せが機能性タンパク質を生成する可能性もあり、本発明が図1B及び図2C中に与えた2つの組換え型配列のみに限られないことを強調しなければならない。

#### 【0022】

10

組換え型RNaseMC1を調製するため、天然MC1アミノ酸配列をコドン修飾ツールにおける鋳型として使用した。制限部位を組換え型コドン配列の5'-及び3'末端に加えて、これらの利用可能な末端で酵素局在化用タグの融合と精製タグの融合を後に実施できるようにした。発現条件の最適化後、活性タンパク質をうまく精製し特徴付けした。組換え型RNaseMC1のウリジン特異性は実験によって確認した。

#### 【0023】

組換え型クサチビンを調製するため、天然クサチビンを多量のキュウリ種子から精製し、MSを使用して部分的タンパク質塩基配列決定を実施した。この部分的タンパク質配列の情報を使用して、キュウリゲノム内のクサチビン遺伝子のタンパク質コード配列を同定した。宿主内のタンパク質の過剰発現を改善するようにそのコドンが変化した、合成RNaseクサチビン遺伝子を設計した。宿主に関する発現条件を最適化した後、活性タンパク質をうまく精製し特徴付けした。組換え型クサチビンのシチジン特異性は実験によって確認した。

20

#### 【0024】

本発明の幾つかの実施形態では、組換え型RNaseを使用してRNA配列を分析することができる。RNA配列を分析するため、最初に組換え型RNaseによってRNAを消化しなければならない。次いで、分析法を使用して消化されたRNAを分析する。

#### 【0025】

RNA配列の消化中、何らかの特定理論によって縛られることを意図せずに、組換え型RNaseMC1は基質ヌクレオシド、ウリジンの5'末端でRNAを切断し、リン酸は先行ヌクレオシドの3'末端で保持されると考えられる。しかしながら、大部分の周知のRNaseは基質ヌクレオシドの3'末端でRNAを切断する。実際、組換え型クサチビンでこの挙動を観察し、それは高い特異性でホスホジエステル結合3'末端においてRNAを切断した。

30

#### 【0026】

分析法は、数ある方法の中で特に、1つ又は複数のMS、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(本明細書で以後「PAGE」)、及びハイスループット塩基配列決定法を含むことができる。

#### 【0027】

一実施形態では、消化されたRNAをMSによって分析することができる。例えば、数ある方法の中で特に、IP-RP-HPLC-MS、LC-MS、又はCID-MS/MSを使用して分析を実施することができる。当業者は、本発明の方法の特定の施用に適した分析技法を選択することができる。

40

#### 【0028】

同じ又は異なる実施形態において、分析法はハイスループット塩基配列決定法であってよい。例えば、ハイスループット塩基配列決定法はNext-Gen RNA-Seqであってよい。これらの方法を使用して、特にmRNA、tRNA、rRNA、lncRNAを含めた、コード又は非コードいずれかの任意のタイプの細胞RNAにおいて考えられる修飾を発見することができる。

#### 【0029】

MC1及びクサチビンの切断特異性を理解すると、一般的RNA修飾マッピング戦略内にこれらのRNaseを含むことの予想される利点は重要である。例えば、そのウリジン特異性が実

50

証されたRNaseMC1は、グアノシン特異的RNaseT1から得たデータを直接補完し、5つの非シユードウリジン修飾の4つを配列全体内に明確に配置することができる(Table 1(表1))。実際、tRNA<sup>Tyr</sup> (配列番号7)の塩基配列決定したT1消化産物(配列番号6、配列番号25)とMC1消化後ここで見られた消化産物(配列番号8、配列番号26、及び配列番号27)の比較は、図3中に示したように95%を超えるtRNA配列適用範囲につながる。図3中、下線イタリックで示した位置46と47におけるヌクレオチドはイソデコーダー tRNA<sup>Tyr</sup>のCAに置換され、47:7で位置47由来のUCAとUCGACの代わりに消化産物UCACAGACをもたらす。全3個の消化産物の検出によってサンプル中の両イソデコーダーの存在を示す。修飾ヌクレオシドは太字体の括弧付き文字によって表す。( )はシユードウリジンであり、(m<sup>5</sup>U)は5-メチルウリジンであり、(s<sup>4</sup>U)は4-チオウリジンであり、(Gm)は2'-0-メチルグアノシンであり、(Q)はクエオシンであり、(m<sup>2</sup>s<sup>6</sup>A)は2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-(3-メチル-2-ブテニル)アデノシンである。更に、RNaseクサチビンによる更なる消化(示さず)によってほぼ完全な配列適用範囲をもたらす。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

Table 1.

MC1 産物	T1 産物
pGGP ( <i>m/z</i> 787.2)	UGp
UGGGG[s <sup>4</sup> U]p ( <i>m/z</i> 1012.1)	[s <sup>4</sup> U]UCCCGp
U[Q]UA[m <sup>2</sup> s <sup>6</sup> A]Ap ( <i>m/z</i> 1100.5)	AGp
ΨCp ( <i>m/z</i> 628.3)	C[Gm]Gp
UGCCGp ( <i>m/z</i> 811.1)	CCAAAGp
UCAp ( <i>m/z</i> 957.2)	CAGp
UCGACp ( <i>m/z</i> 803.1)	ACU[Q]UA[m <sup>2</sup> s <sup>6</sup> A]AΨCUGp (配列番号 10)
UCGAAGG[m <sup>5</sup> U] ( <i>m/z</i> 1320.5)	CCGp
[Ψ]CGAAp ( <i>m/z</i> 815.1)	UCAUCGp
UCCp ( <i>m/z</i> 933.2)	ACUUCGp
UCCCCCACCA (配列番号 9) ( <i>m/z</i> 1325.3)	AAGp
	[m <sup>5</sup> U][Ψ]CGp
	AAUCCUCCCCCACCA (配列番号 11)

10

20

30

【 0 0 3 1 】

別のヌクレオシド特異的RNaseの更なる利点は、図8中に示したようにLC-MSによって、市販サンプル中の第二のイソデコーダー(tRNA<sup>Tyr</sup>)から生じるMC1消化産物、UCGCAGACp、*m/z*1284.3、位置46~53の検出によって記された。大量のオリゴヌクレオチド消化産物が生成されるはずなので、GC多量RNAがRNaseMC1分析により適していることは予測され得る。逆に、GC少量RNAはRNaseT1に適した状態のままであり、タンデムで使用する2つが好みの選択肢である。

【 0 0 3 2 】

質量分析法によるRNA修飾マッピングに関するRNaseMC1の別の重要な利点は、多数のシチジン及びウリジンを含有するオリゴヌクレオチドを特徴付ける際の固有の課題である。ウリジンはシチジンと1Da(0対NH)異なり、質量分析法によって容易に検出されるC-13アイソトープの存在は、これらピリミジンの数と配列位置を識別する際の課題を容易にもたらし得る。この課題は、「全光」(C-12)アイソトープピークがもはや最大ではない大きな消化産物に関して特に顕著である。MC1を用いた消化によって1つのウリジンが各消化産物の5'末端に存在することが確実になるので、シチジンの数も正確な質量測定に基づき更に容易に決定されるはずであり、事前の配列復元課題は最少となる。

【 0 0 3 3 】

(シユードウリジン以外の)修飾によって阻害されるウリジン特異的ヌクレアーゼの利点は他の領域でも正確であるはずである。例えばメチル化ウリジンは、各部位がMC1による

40

50

消化中に欠失し得るのでRNA-seq分析において検出可能なはずである。したがって、ゲノム予測に対する、このヌクレアーゼを使用して生じたRNA-seq転写産物の比較によって、ゲノム全般ベースでのこのような翻訳後修飾が明らかとなり得る。RNAフットプリントイング等のRNaseT1に効果的に限られている他の生化学的手法も、高特異性の別のRNaseから恩恵を被るはずである。

#### 【0034】

同様の利点がシチジン特異的クサチビンに有効になると予想される。更に、クサチビンはシチジン間のホスホジエステル結合の低い切断率を示す。RNAがシチジンをタンデムで有するとき、RNaseT1、U2、又はMC1等の他の酵素と異なり、クサチビンは低い切断率を示す。この特徴は、RNAのシチジン多量配列においてさえシチジン修飾をマッピングするのに有用である。このような特徴が、任意の他のRNaseで存在することは知られていない。

10

#### 【実施例】

##### 【0035】

###### 合成遺伝子の設計とクローニング

MC1アミノ酸配列を鋳型として使用し、大腸菌の天然コドンバイアスがある合成遺伝子を、<http://www.idtdna.com/CodonOpt>で利用可能なIntegrated DNA Technologies社からのコドン修飾ツールを使用して設計した。生じた配列は配列番号1として与えられる。Bam H1部位とHindIII部位をそれぞれ5'末端及び3'末端に加えて、pET22bベクター(EMD-Millipore社)のIPTG(イソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド)誘導的発現力セットへのクローニングを可能にした。このような戦略によって、peIBリーダーペプチドのN末端融合及びHis-タグ(His)<sub>6</sub>配列のC末端融合があるMC1ポリペプチドが生成すると予想した。peIBシグナルペプチドは原形質周辺空間に融合タンパク質を誘導し、これによって宿主細胞RNA機構に対するリボヌクレアーゼ活性の任意の考えられる有害な影響を未然に防ぐと予想される。

20

#### 【0036】

実験によって得た配列の翻訳を介して組換え型クローンの配列及びリーディングフレームを確認した後、組換え型pET22b-MC1を有するRosetta(DE3)細胞をMC1生成用に使用した。RosettaDE3細胞は組換え型pET22b(+)MC1プラスミドで形質転換し、LB-アンピシリン(50 μg/mL)及びクロラムフェニコール(34 μg/mL)プレート上に平板培養した。次いでシングルコロニーを、種培養用にアンピシリンとクロラムフェニコールを補充したLB-培地内で一晩増殖させた。その後種培養物を使用して、抗生物質を補充した0.20L(小規模)又は1L培地のいずれかに接種した。200rpmにおいて一定攪拌しながら30℃で、オービタルシェーカーにおいて細胞を増殖させた。プロス培地にIPTGを加えることにより発現を誘導した。

30

#### 【0037】

###### タンパク質発現条件の最適化

4つの異なる実験変数、タンパク質誘導の増殖段階、増殖温度、誘導時間、及びインデューサーの濃度を調べてRNaseMC1の誘導的発現に最適な条件を決定した。

#### 【0038】

具体的には、(0.3~0.9単位の範囲での600nmにおける光学濃度によって測定した)異なる細菌増殖段階をタンパク質誘導に関して評価した。アンピシリンとクロラムフェニコールを補充した200mLのLB培地の4つの異なるフラスコに、組換え型プラスミドを有するRosetta(DE3)細胞株の同じ種培養物から2mL接種した。1mLの細胞を決まった間隔(30~90分)で取り出し600nmにおける光学濃度を測定した。600nmで0.3~0.9単位の範囲において光学細胞濃度によって測定した対数期増殖曲線中の異なる段階で、IPTGを加えることによりMC1発現を誘導した。図4Aは、各増殖段階における誘導後の代表的増殖曲線を示す。ほぼ全ての場合、MC1の誘導的発現は、増殖から対数期に移行する増殖曲線の変化をもたらした。図4B中に示したように、約0.6のOD<sub>600</sub>で細胞を誘導したとき、採取した細胞から精製したタンパク質量の比較によって高収率が明らかとなった。

40

#### 【0039】

図4C中に示したように、精製したタンパク質をSDS-PAGEによりその相対分子質量と純度

50

に関して分析した。この分析によって、0.6及び0.9のOD<sub>600</sub>で細胞を誘導したとき、M<sub>r</sub>約24kDaで低分子質量の数個の少量ポリペプチドの主要ポリペプチドバンドが明らかとなった。MC1-(His)<sub>6</sub>融合タンパク質の予想分子質量(24.1kDa)はSDS-PAGEにおいて観察したそれと類似しており、細菌宿主中で予想されるポリペプチドの生成を示唆する。驚くべきことに、0.3及び0.7のOD<sub>600</sub>で細胞を誘導したとき、このようなポリペプチドは観察されなかった。各増殖曲線の試験は、0.7のOD<sub>600</sub>で3時間の誘導後に光学濃度は本質的に不变状態のままであることを示唆し、これらの宿主細胞における代謝活性の停止を示す。おそらく培養細胞の少ない細胞数及び低速増殖のため、初期対数期における誘導(0.3のOD<sub>600</sub>)によって予想されるポリペプチドが生成することはなかった。0.9のOD<sub>600</sub>での誘導によって約24kDaのポリペプチドが生じたが、生成したタンパク質収量は0.6のOD<sub>600</sub>で誘導を行ったときに観察した量より有意に少なかった。したがって0.6のOD<sub>600</sub>での誘導は、大腸菌宿主におけるMC1タンパク質の発現に最適であると考えた。

#### 【 0 0 4 0 】

MC1誘導の最適な時間は0.6のOD<sub>600</sub>でのIPTG添加地点から2時間であることを観察し、この場合タンパク質収量は培養物200mLあたり約5μgでピークに達した。30と37の間で増殖温度及び0.4mMと1.0mMの間でIPTG濃度を変更することによってタンパク質収量に対する有意な影響はなく、培養物200mLあたり約5μgで不变状態のままであった(データ示さず)。

#### 【 0 0 4 1 】

##### RNaseMC1の精製

誘導したMC1タンパク質を、バッヂプロセス又は製造者の説明に従いニッケル-セファロース樹脂(Novagen社)を使用したカラムクロマトグラフィーのいずれかによって精製した。最適発現条件の調査中バッヂ精製を利用し、カラムクロマトグラフィーは大規模精製のために実施した。精製したタンパク質収量はブラッドフォードアッセイによって測定した。溶出タンパク質は100mM酢酸アンモニウム(pH5.5)バッファーと交換し、Amicon Ultra 0.5mLフィルターを使用して濃縮した。

#### 【 0 0 4 2 】

##### ヌクレオシド修飾をマッピングするためのMC1の特徴付け

溶出画分中の推定MC1タンパク質の存在を、4%~20%変性ポリアクリルアミドゲル(Precise、Thermo Scientific社)上の約24kDaポリペプチドの検出によって確認した。精製タンパク質の非特異的RNase活性は、10μL体積中で1時間37において、200pmolの基質オリゴヌクレオチド、UAACUAUAACG(配列番号12)、及び所定量(100~800ng)のタンパク質をインキュベートすることによって試験した。260nmにおけるUV-吸光度測定値(A<sub>260</sub>)を、製造者の説明に従いナノフォトメーター(Implen社)でT<sub>0</sub>及び1時間後(T<sub>1h</sub>)において記録した。RNAオリゴマーを含有しタンパク質は含有しないバッファー対照も同一の形式でアッセイした。

#### 【 0 0 4 3 】

RNaseによる配列番号12の切断によって、A<sub>260</sub>値の増大をもたらす開始基質と比較してスタッキング相互作用が低減したオリゴヌクレオチド産物が生じる。3つのタンパク質量を試験した(200、400、及び800ng)。図4D中に示したように、200ngから400ngにタンパク質量を増大したときA<sub>260</sub>の増大を測定した一方で、800ngのタンパク質では更なる増大は検出されなかった。おそらく、多量のタンパク質はオリゴヌクレオチド基質の更なる切断はもたらさず、又はタンパク質量の増大はUV吸光度の任意の追加的変化の検出に干渉する。

#### 【 0 0 4 4 】

精製タンパク質によるRNAのヌクレオシド特異的酵素切断を、37における2時間の3μgの市販の大腸菌tRNA<sup>Ty<sup>1</sup></sup>(Sigma-Aldrich社)と所定量の精製酵素(100~2000ng)のインキュベーション、及びIP-RP-HPLC-MSによる消化産物の分析によって試験した。消化産物は、30μL/分の流速で移動相A(200mMヘキサフルオロイソプロパノール[HFIP][Sigma社]、8.15mMトリエチルアミン[TEA、Fisher Fair Lawn社]、水中[Burdick and Jackson社、ブリッジ

10

20

30

40

50

ポート]、pH7.0)及び移動相B(100mM HFIP、4.08mM TEA、50%メタノール中[Burdick and Jackson社]、pH7.0)を利用して1×150mmのXBridge C18カラム(Waters社)において分離した。勾配は以下の通りであった。5%B～20%Bを5分間、20%B～30%Bを2分間、30%B～95%Bを43分間、95%Bを5分間保持、次いで更に15分間5%Bで平衡化。

#### 【0045】

溶出した消化産物に、Thermo Scientific社のLTQ-XL質量分析計を使用して質量分析を施した。各質量選択前駆体イオンのタンデム質量スペクトルの自動収集のための機器設定は知られており、更なる記載はしない。イオン化ソースにおけるシースガス、助剤ガス、及びスイープガスは、それぞれ25、14、及び10任意単位(au)に設定した。スプレー電圧は4kVであり、キャピラリー温度は275 であり、キャピラリー電圧は-23Vであり、チューブレンズは-80Vに設定した。

10

#### 【0046】

推定消化産物(ウリジン特異的と非特異的の両方)及び対応する衝突誘起解離(CID)フラグメントイオンの理論上のm/z(質量/電荷)値を、Mongo Oligo(<http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo>)を使用してコンピューターで計算した。消化に関するウリジン特異性を確認するため、大腸菌tRNA<sup>Tyr</sup>のRNaseMC1消化から設定したLC-MS/MSデータを記載したように収集した。それぞれのMS/MSスペクトルを、典型的ヌクレオチドのc<sub>1</sub>産物イオン質量に対応するm/z328.1(A)、344.2(G)、304.1(C)、及び305.1(U)の存在に関して分析した。同様にMS/MSスペクトルを、典型的ヌクレオチドのy<sub>1</sub>産物イオン質量に対応するm/z346.2(A)、362.2(G)、322.1(C)、及び323.1(U)の存在に関して調べ、消化産物が3'-直鎖状リン酸と共に存在したと仮定した。これらのm/z値がいずれも観察されなかった場合(長鎖オリゴマー又は2',3'-環状リン酸のみの場合)、c<sub>2</sub>産物イオンの組合せ、例えば、UA/UG/UC/UU/AU/GU/CUに対応するm/z値を考えた。

20

#### 【0047】

ヌクレオチド特異的切断性を、その質量が3'-リン酸含有切断産物と一致する各オリゴヌクレオチド前駆体イオンからのMS/MSスペクトルの系統的考察によって決定した。これらのデータの評価によって、5'-ウリジン残基を示すオリゴヌクレオチド消化産物が明らかとなった。対照的に、消化産物の3'末端は非常に様々であった。ウリジンは3'末端におけるその不在が顕著であった。2つのこのような代表的消化産物、CとUCCは、それぞれ図5A～図5Dと図6A～図6D中に示す。図5A～図5D中、(A)はトータルイオンクロマトグラム(TIC)であり、(B)は消化産物 Cp(配列番号7の位置55～56)に対応するm/z628.3の抽出イオンクロマトグラム(XIC)であり、(C)は11.7分におけるXICと関連する質量スペクトルであり、(D)はm/z628.3前駆体イオンの衝突誘起解離(CID)のタンデム質量スペクトル(MS/MS)である。ホスホジエステル骨格上の切断位置を下付き文字で示した、観察した配列情報を示す産物イオン、(共通5'末端を有する)c及び(共通3'末端を有する)yを、当技術分野の標準的命名後に標識しプロットした。図6中、(A)は消化産物UCCp(配列番号7の位置55～56)に対応するm/z933.4のXICであり、(B)は24.5分におけるXICと関連する質量スペクトルであり、(C)はm/z933.4前駆体イオンのCIDタンデム質量スペクトルである。図5中と同様に、配列情報を示すフラグメントイオンを標識する。

30

#### 【0048】

MS/MSデータにおいてその5'末端を直接観察できなかった長鎖消化産物に関して、ウリジンの存在と一致する第二位置のフラグメントイオンを観察した。MS/MSデータのこの調査に基づいて、予想tRNA<sup>Tyr</sup>消化産物及びそれらの衝突誘起解離(CID)フラグメントイオンのm/z値の一覧を計算し、ウリジン残基での切断によって5'-ウリジン又は5'-修飾ウリジンヌクレオシドを含む消化産物が生じると仮定した。

40

#### 【0049】

これらの消化の法則を使用して、tRNA<sup>Tyr</sup>に関する全LC-MS/MSデータセットを調べた。予想消化産物の1つは、tRNAの3'末端由来の消化産物、UCCCCCACCACCA(配列番号9)であった。図7中に示したように、このシチジン多量消化産物を実験によって大量に検出した。図7中、(A)は消化産物配列番号9(配列番号7の位置73～85)に対応するm/z1325.1のXICであ

50

り、(B)は39.5分におけるXICと関連する質量スペクトルであり、(C)はm/z1325.2前駆体イオンのCIDタンデム質量スペクトルである。配列情報を示すフラグメントトイオンは図5中と同様に標識した。星印(\*)はc-タイプのフラグメントトイオンを示し、黒丸記号( )はy-タイプのフラグメントトイオンを示す。重要なことに、LC-MS/MSデータ内でシチジンにおける切断に対応する消化産物は観察されず、ウリジンに対する精製タンパク質の特異性が示された。

#### 【 0 0 5 0 】

実験データの更なる調査によって、消化産物に関する3'-直鎖状リン酸と2',3'-環状リン酸の存在が明らかとなった(代表的消化産物は図6中に示す)。図8中、(A)はm/z1012.3(直鎖状リン酸)とm/z1003.3(2',3'-環状リン酸)のXICであり、(B)は35分と33分におけるXICと関連するMSであり、(C)はm/z1012.3前駆体イオンのCIDタンデム質量スペクトルである。配列情報を示すフラグメントトイオンを標識する。環状リン酸の存在は、最終産物としての3'-直鎖状リン酸の形成前に2',3'-環状リン酸中間体を介して進行するRNaseT2機構と一致する。過剰な酵素(最大50倍の酵素)は環状リン酸レベルに影響を与えたかったので、この特徴は酵素濃度依存的ではなかった。環状リン酸の濃度非依存的形成は、低速のホスホジエステル結合加水分解と更に一致する。

#### 【 0 0 5 1 】

##### 転写後修飾ウリジンにおける切断の優先

tRNA<sup>Tyr</sup>基質によって、MC1の切断性に対する修飾ヌクレオシドの影響の初期研究が可能となった。このtRNAは多数の修飾ヌクレオシド、4-チオウリジン[s<sup>4</sup>U8]、2'-O-メチルグアノシン[Gm17]、クエオシン[Q34]、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37]、5-メチルウリジン[m<sup>5</sup>U54]、及び2つのシュードウリジン[ 39と 55]を含有する。ウリジンとシュードウリジンは質量に基づいて区別できない一方で、他の修飾は典型的非修飾ヌクレオシドからのその特徴的質量シフトによって直接確認することができ、MS/Mデータの調査によってtRNA<sup>Tyr</sup>配列全体内に配置することができる。

#### 【 0 0 5 2 】

##### 4-チオウリジンと5-メチルウラシル

特に興味深いのは、MC1の切断が修飾ウリジンの存在によって影響を受けるかどうかを決定することであった。tRNA<sup>Tyr</sup>は3つの修飾ウリジン(s<sup>4</sup>U、m<sup>5</sup>U、及び )を含有するので、LC-MS/MSデータは、s<sup>4</sup>Uとm<sup>5</sup>Uが切断に関して認識されるか又はされない予想消化産物をin silicoで生成し、これらの予想m/z値と実験データを比較することによって評価した。このデータによって、s<sup>4</sup>Uとm<sup>5</sup>UがMC1によって認識されないシナリオに対応するm/z値の存在が明らかとなった。例えば、消化産物UGGGG[s<sup>4</sup>U]pはm/z1012.3で検出し(図6A、図6B)、この配列はMS/MSによって確認された(図6C)。同様に、m/z1320.5での消化産物UCGAAGG[m<sup>5</sup>U]の検出によって記したようにm<sup>5</sup>Uは切断基質として認識されず、図9中に示したように、これはMS/MSデータによっても確認された。図9中、(A)は消化産物UCGAAGG[m<sup>5</sup>U](位置47~54)に対応するm/z1320.2のXICであり、(B)は37.7分におけるXICと関連するMSであり、(C)はm/z1320.6前駆体イオンのCIDタンデム質量スペクトルである。MSにおいて観察した同時溶出イオン(m/z1284.6)は、tRNA<sup>Tyr</sup>イソデコーダー(RY1661)に属するMC1消化産物(UCACAGAC、位置46~53)に対応する。配列情報を示すフラグメントトイオンを標識する。星印(\*)はc-タイプのフラグメントトイオンを示し、黒丸記号( )はy-タイプのフラグメントトイオンを示す。

#### 【 0 0 5 3 】

MC1がこれらの修飾ヌクレオシドを基質として認識した場合、消化産物は単一ヌクレオチド(s<sup>4</sup>U又はm<sup>5</sup>Uの5'-リン酸)であったと思われる。tRNA<sup>Tyr</sup>配列中でそれらにウリジン又はシュードウリジンのいずれかが続くからである。s<sup>4</sup>U又はm<sup>5</sup>Uにおいて部分的切断が起らなかったことを確認するため、m/z851.1における(3)-UGGGG-(7)及びm/z1160.1における(56)-UCGAAGG-(62)等の切断と一致する予想二重帯電消化産物もこのデータ内で検索した。これらのm/z値に関するイオンは検出されず、s<sup>4</sup>Uとm<sup>5</sup>UはMC1により基質として認識されないことを確認した。

10

20

30

40

50

## 【0054】

## シュードウリジン

MC1がシュードウリジンを基質として認識する場合、 $m/z$ 628.4(C)及び $m/z$ 815.1(CGA)で予想消化産物を予想する。前者は図5中に例示したように発見し、後者と一致するデータは図10中に示す。図10中、(A)は消化産物 CGAAP(位置55~59)に対応する $m/z$ 815.4のXICであり、(B)は37.7分におけるXICと関連するMSであり、(C)は $m/z$ 815.4前駆体イオンのCIDタンデムMSである。配列情報を示すフラグメントトイオンを標識する。シュードウリジンを質量によってウリジンと区別することはできないが、配列UC又はUCGAAに対応する他のtRNA<sup>Tyr</sup>消化産物は予想されない。したがって、ウリジンとシュードウリジンはMC1のヌクレオシド特異性の点で区別できない。

10

## 【0055】

## 欠如した切断

MC1によるtRNA<sup>Tyr</sup>の切断パターンの分析によって、多量の修飾ヌクレオシドがウリジンに先行する場合、切断が観察されなかつたことも明らかとなった。例えば、図11中に示したように、オリゴヌクレオチドU[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]Aに関してそれぞれ3'-直鎖状リン酸と2',3'-環状リン酸消化産物と一致する $m/z$ 1100.5と $m/z$ 1091.7で検出した消化産物によって記したように、位置34におけるクエオシンはU35でMC1による切断を阻害した。これらの前駆体イオンのタンデムMSによって配列を確認し、ウリジンの認識及び切断に対する5'-ヌクレオシドの影響が明らかとなった。図11中、(A)は $m/z$ 1091.5のXICであり、(B)は48.3分におけるXICと関連するMSであり、(C)は $m/z$ 1091.7前駆体イオンのCIDタンデムMSであり、配列情報を示すフラグメントトイオンを標識する。質量スペクトルによって、U[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]Aの直鎖状( $m/z$ 1100.5)と2',3'-環状リン酸( $m/z$ 1091.7)消化産物(配列番号7の位置33~38)の両方に関する二重帶電イオンが明らかとなる。オリゴヌクレオチドにおける115Daの損失によるクエオシンの断片化をMSにおいて示す。

20

## 【0056】

ウリジンにおける部分的消化が起こるかどうか決定するため、tRNA<sup>Tyr</sup>基質を様々な量のMC1とインキュベートした。低い酵素/基質比(tRNA3 μgあたりタンパク質0.05~1 μg)で、連続したウリジンにおける部分的消化が記された。これらの部分的消化は、酵素/基質比の増大によって排除することができた(tRNA3 μgあたりタンパク質2.5 μg)。

30

## 【0057】

## 粗製クサチビンタンパク質抽出物の調達及び精製

ピクルス型品種のキュウリ(Cucumis sativus)の乾燥種子を粉末状にすりつぶし、激しく攪拌しながら0.14MのNaClを含有する5mMリン酸ナトリウム(pH7.2)を使用し一晩4度で抽出した。次いで抽出物を4層のチーズクロスを介して濾過し、20%氷酢酸を用いてpH4まで酸性状態にした。次いで濾過物を20分間10,000rpmで遠心分離し、ペレットは廃棄した。次いで上澄みを更に30分間15,000rpmで遠心分離し、生成したペレットは再度廃棄した。次いで抽出物をWhatman No.1濾過紙を介して濾過し、大部分の残存粒子を除去した。

## 【0058】

次いで濾過物を、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)で平衡状態にしたSephadex G-25カラム(2.5mL床体積)に供した。フロースルーはイオン交換クロマトグラフィーの後工程用に使用した。

40

## 【0059】

次いで溶出物を、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)で平衡状態にしたCM-セルロースカラムに供した。次いでカラムを5mMリン酸ナトリウム(pH7)で洗浄し、溶出物は廃棄した。次いでタンパク質を、50mM、100mM、200mM、及び500mM NaClを含有する5mMリン酸ナトリウム(pH7)の不連続勾配でカラムから溶出させた。溶出物は2mL画分で回収し、プラッドフォードアッセイ又は280nmでのUV吸光度のいずれかを使用してタンパク質を含有する画分を同定した。

## 【0060】

CM-セルロースカラムでのイオン交換クロマトグラフィー後まで、タンパク質の存在は

50

モニタリングしなかった。CM-セルロースカラムからのタンパク質の溶出後、図12中に示したように、各溶出画分の280nmにおける吸光度をモニタリングした。最大吸光度を示したタンパク質含有イオン交換クロマトグラフィー画分を変性ゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、タンパク質サイズ標準(EZ run Recタンパク質サイズ標準、Fisher scientific社)との比較に基づいて、約23~25kDaのポリペプチドの存在を検証した。図13中に示したように、標的タンパク質(約25kDa)は200mM NaClを含有する5mMリン酸ナトリウムにおいて大部分が溶出したことが分かった。更に、多くの低分子タンパク質(5~10kDa)もこれらの画分中に溶出した。

#### 【0061】

25kDaタンパク質を含有する画分をspeedvac(Thermo Scientific社)で2mL以下の複合体積に濃縮し、500mM NaClを含有する5mMリン酸ナトリウム(pH7)で平衡状態にしたSephadex G-75カラム(床体積おおよそ36mL、GE Life Sciences社)におけるサイズ排除クロマトグラフィーに供した。約1.5カラム体積の500mM NaClを含有する5mMリン酸ナトリウム(pH7)でタンパク質を溶出した。1.5mLの画分を回収し、プラッドフォードアッセイを実施して、どの画分がタンパク質を含有していたか決定した。図14参照。サイズ排除カラム画分における23~25kDaのポリペプチドの存在はSDS-PAGEによって検証した。標的酵素は約1~1.2カラム体積のバッファー(画分30~34)がカラムを通過した後に溶出した。

10

#### 【0062】

約23~25kDaのポリペプチドを含有するサイズ排除クロマトグラフィー画分をプールし、濃縮し、Amicon Ultra-5遠心濾過デバイス(サイズ=3k)を使用してオートクレーブ処理水で脱塩した。次いで280nmにおける吸光度を使用して、純タンパク質(356 μg/mL)のおおよその濃度を決定した。

20

#### 【0063】

図15中に示したように、精製の各工程で得たタンパク質含有アリコートをSDS-PAGEに供してRNaseクサチビン精製の経過を示した。初回抽出及び遠心分離後、標的酵素(サイズ約23~25kDa)はゲル上で目に見えず、非常な低濃度でのその存在が示された。Sephadex G-25におけるゲル濾過後その標的酵素は依然として目に見えなかった。Sephadex G-25は低分子のみを濾過するからである。それをCM-セルロースカラムにおけるイオン交換クロマトグラフィーに供して、これらの画分中に多くの他の低分子タンパク質と共に溶出する標的タンパク質を濃縮した。高塩濃度でのSephadex G-75におけるサイズ排除クロマトグラフィーによって最終的に低分子タンパク質から標的タンパク質を分離し、比較的純粋な酵素を生成した。

30

#### 【0064】

##### 純酵素のクサチビン活性の確認

濃縮純タンパク質のアリコート(2.5 μL、5 μL、7 μL)を、1 μLの220mM酢酸アンモニウム及び200pmolのRNAオリゴヌクレオチド配列、AUCACCUCCUUUCU(配列番号13)と組み合わせた。オートクレーブ処理水を使用して10 μLの一定体積にサンプルを希釈した。次いでこれらのサンプルを37 又は50 のいずれかで2時間インキュベートし、260nmにおける吸光度をモニタリングした。ブランク(オートクレーブ処理水及び酢酸アンモニウム)と陰性対照(オートクレーブ処理水、酢酸アンモニウム、及びRNAオリゴヌクレオチド)の両方もインキュベートした。A<sub>260</sub>における吸光度の増大は活性酵素の存在に原因があると考えられた。

40

#### 【0065】

ポリ(C)及びポリ(U)を使用して一般的な酵素活性のアッセイを最初に実施すると、インキュベーション後に吸光度の増大を観察しなかった。図15中に示したように、RNAオリゴヌクレオチド及び精製した(より濃縮した)タンパク質を使用して活性のアッセイを実施すると、図16及び図17中に示したように、陰性対照(0 μLタンパク質)と比較して吸光度の有意な増大を観察した。これらの吸光度の増大は、37 及び50 両方で2時間のサンプルのインキュベーション後に観察された。LC-MSにおける消化RNAの初回分析は如何なる消化産物も示さなかつたが、しかしながら、希釈酵素を使用すると消化産物を観察した。

50

## 【0066】

幾つかの濃度の精製酵素を、大腸菌tRNA<sup>Ty1</sup>(配列番号7)と37又は50のいずれかで1~2時間インキュベートした。1μL(約35.6ng)、2μL(約71.2ng)、又は5μL(178ng)の希釈酵素(水で10μLに希釈した1μLストック酵素)及び1μLの非希釈酵素(356ng)を両方の温度でtRNA<sup>Ty1</sup>とインキュベートした。次いでtRNA<sup>Ty1</sup>消化産物をIP-RP-LC-MS/MSによって分析した。仮定したRNAのシチジン特異的切断及び消化産物前駆体イオンのCID後のそれらの産物イオンに基づき、理論上予想した消化産物の質量/電荷(m/z)値を、Mongo Oligo Mass Calculator(<http://mods.rna.albany.edu/masspec/Mongo-Oligo>)を使用してコンピューターで計算した。

## 【0067】

tRNA<sup>Ty1</sup>の修飾ヌクレオチド配列は知られているので、tRNA<sup>Ty1</sup>の理論上の消化産物をCpN結合切断に関して編集し、消化産物前駆体イオンの各m/zに関する生MSデータを最初に検索した。これらの前駆体イオンのヌクレオチド配列をCIDによって更に確認し、配列情報を示す産物イオンの存在を記録した。更に、他の核酸塩基における切断から生じた消化産物も査定して、クサチビン酵素によるRNAの特異的切断を評価した。クサチビンによる特定ウリジンでの周知のRNAの不定期切断のため、これは必要であった。tRNA<sup>Ty1</sup>と1μLの希釈タンパク質(約36ng)のインキュベーション後、この試験において見られた消化産物をTable 2(表2)中に示す。36ngの酵素で見られたこれらの消化産物各々を他のサンプル中のそれらの存在に関する検索し、この場合異なる量の精製タンパク質を使用した。消化産物前駆体イオンの各々に関するイオンクロマトグラムのピークはXcaliburソフトウェアを使用して一元化した。各消化産物に関するこの定量データのグラフは図18~図36中に示す。3'-直鎖状リン酸は全てのシチジン特異的産物において見られたが、一方3'-環状リン酸はウリジン特異的産物においてのみ見られた。

## 【0068】

## 【表2】

Table 2.

シチジン特異的-切断欠如なし	シチジン特異的-切断欠如あり	ウリジン特異的-少量
GAGC	GGUGGGGG[s <sup>4</sup> U]UCCC(配列番号 14)	GGU 3'>p
AAAGGGAGC	[Gm]GCC	AGACU 3'>p
AGAC	UGCC	GU 3'>p
U[Q]UA[ms <sup>2</sup> i <sup>6</sup> A]A[Ψ]C	GAAUCC	
UGC / GUC	UUCCCCC	
GUC	ACC	
AUC	ACCA	
GAC	UUCCCCCACCA(配列番号 15)	
UUC		
GAAGG[m <sup>5</sup> U][Ψ]C		

## 【0069】

## 合成遺伝子の設計、増幅、及び精製

精製したタンパク質をトリプシンで消化した。タンパク質分解酵素トリプシンでの処理後クサチビンのLC-MS分析によって同定したトリプシンによって生じたペプチドをTable 3(表3)中に示す。2つの他の低分子シードコートタンパク質に関するトリプシンによって生じたペプチドも発見した。表中に挙げた最初の2つペプチドは文献中で以前から知られている。トリプシンによって生じたペプチドの一部のアミノ酸配列を、Protein Lynx(Waters社)を使用してキュウリタンパク質データベース(GCF\_0000040752\_ASM407V2\_protein.aa)に対してブラスト処理して、RNaseMC様タンパク質として予想ポリペプチドを同定した。

## 【0070】

10

20

30

40

50

## 【表3】

Table 3.

本発明の試験におけるトリプシンによって生じたペプチド	文献からのトリプシンによって生じたペプチド
SFTIHGLWPQK (配列番号16)	SFTIHGLWPNK (配列番号16)
YFQTAINMR (配列番号17)	YFQTAINMR (配列番号17)
HGIDLLSVLR (配列番号18)	PPXGHEXNK (配列番号19)
	IAHLENDLNVVWPNVVTGNNK (配列番号20)
	YVGR (配列番号21)
	ASNGQVLLTEIVMXFDDDXXTL (配列番号22)

10

## 【0071】

NCBIデータベースにおける保存型ドメイン構造検索は、クサチビンがT2-タイプRNaseであることを示す。同様の結果をInterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)の使用によって得た。

## 【0072】

修飾コドンを有する合成遺伝子を同定したアミノ酸配列に基づいて設計し、配列番号4で与えた大腸菌におけるタンパク質発現の増加を可能にした。制限部位を両末端に加えて、タンパク質発現ベクター、pET22b(Novagen社)へのクローニングを可能にした。合成DNA (651bp)をIDTDNA技術により遺伝子プロックとして作製した。

20

## 【0073】

遺伝子はPCRによって増幅した。5 μLの10×PCRバッファー、1 μLのdNTP、0.5 μLの合成DNA鉄型、及び0.6 μLのPfuTurbo DNAポリメラーゼを組み合わせた。更に、それぞれ5'及び3'末端に制限エンドヌクレアーゼのBglIII及びHindIIIに関する配列も有する、それぞれ0.5 μLのフォワードプライマー及びリバースプライマー、ATGGAAAAATGGAAAAGACCAAAAGTGT CGATG(配列番号23)及びAAAAATAAATGAGCCTGCGCAATTGG(配列番号24)をそれぞれ混合物に加えた。プライマー濃度は100pmol/ μLであった。これらのプライマーはこの例示的な系における遺伝子配列の容易な増幅を可能にしたが、他のプライマーを本発明の他の実施形態中で使用することができる。生成した混合物は50 μLの合計体積まで水で希釈した。合計3サンプルを調製し、以下のPCRサイクルに供した。2分間94°、0.5分間92°、0.5分間57°及び2分間72°の35サイクル、並びに5分間72°の1サイクル。アガロースゲル(1.0%)電気泳動を実施してPCR産物のサイズを検証した。

30

## 【0074】

増幅した遺伝子はQIAquick PCR精製キット(スピンドロトコール)を使用して精製した。図37及び図38中に示したように、1.0%アガロースゲルを使用して精製の成功を調べた。

## 【0075】

制限酵素BglIII及びHindIIIを使用して遺伝子を消化した。以下の50 μL反応混合物、15 μLのDNA、5 μLのNEB2.1バッファー、1.5 μLのBglIII、1 μLのHindIIIを2時間37°でインキュベートした。更に、10 μLのDNAを使用して第二の実験を実施した。消化したDNAはQIAquick PCR精製キット(スピンドロトコール)を使用して精製した。

40

## 【0076】

精製した遺伝子はpET-22b(+)ベクターに連結させた。このベクターは事前にBamHI及びHindIIIで消化した。連結反応混合物は以下の通りであった。9.5 μLのDI水、2 μLの10×リガーゼバッファー、2 μLのpET-22b(+)ベクター、6 μLの消化遺伝子、及び0.5 μLのリガーゼ。この反応混合物は1時間室温に保ち、次いで約5日間4°で冷却した。

## 【0077】

次いで連結混合物をBL21大腸菌細胞に形質転換した。10 μLの連結混合物を、BL21大腸菌細胞の2本の異なる1.5mLチューブに加え攪拌した。次いでチューブを30分間氷上に置き、2時間42°でインキュベートし、次いで2分間氷上に戻した。200 μLのSOC培地をそれぞ

50

れのチューブに加え、次いでそれらをインキュベートし、1時間と10分37'で攪拌した。次いで形質転換細胞をLB+ampプレート上に平板培養した。次いでプレートを、15分間室温で放置した後、一晩37'インキュベーター中に置いた。

#### 【0078】

一晩のインキュベーション後、10コロニーをプレートから回収した。オートクレーブ処理したピペットの先端をコロニーに突き刺すことによって、コロニーを回収した。次いでこの先端をPCRチューブの底にこすりつけ、次いで1mLのLB培地及び0.05 μg/mLのアンピシリンを含有する試験管中に落とした。試験管は250rpm及び37'で一晩インキュベートした。(遺伝子の増幅に使用した混合物と類似し、コロニーを鑄型に置き換えた)38 μLのPCR混合物をそれぞれのPCRチューブに加えた。次いでコロニーを以下のPCRサイクルに供した。

94'で2分間、92'で0.5分間、57'で0.5分間次いで72'で2分間の30サイクル、及び最後に72'で5分間。PCR産物の1.0%アガロースゲルを実施して、どのコロニーが遺伝子を含有したか目に見える状態にした。

#### 【0079】

遺伝子を含有するコロニーに、0.05mg/mLのアンピシリンを補充した10mLのLB培地を加えた。これらの培養物は一晩37'においてシェーカー(Innova社)でインキュベートした。テリフィックプロス(terrific broth)を含めた他の培地で実験を実施し、自己誘導も試みた。

#### 【0080】

0.5mLの各コロニーを0.5mLの65%グリセロール中に置き、急速冷凍して後の培養ストックとして役立てた。各コロニーの残りの培養物はペレット状にした。ペレット化は、6700 rpmで1分間遠心分離した1.5mLエッペンドルフチューブを使用して実施した。次いで上澄みを廃棄した。更なる細胞培養物をチューブに加え遠心分離除去した。全ての細胞培養物がペレット状になるまで、このペレット化手順を繰り返した。Qiagen miniprepキットを使用して、ペレットからプラスミドを精製した。

#### 【0081】

精製したプラスミドは、次いで以下のレシピを使用して消化した。5 μLのプラスミド、5 μLのNEBバッファー2.1、1.5 μLのBglIII、1 μLのHindIII、及び37.5 μLの水。図39中に示したように、反応混合物は37'で2時間インキュベートし、1.0%アガロースゲル上に供し、消化が成功したかどうか目に見える状態にした。

#### 【0082】

精製したプラスミドは、次いで塩基配列決定用に調製した。塩基配列決定データによって、精製プラスミドはクサチビン遺伝子が挿入されたpET-22b(+)ベクターであったことを確認した。これらの補正プラスミドを含有する(急速冷凍状態の)ストックコロニーを、次いで0.05mg/mLのアンピシリンを含有する500mLのLB培地において培養した。培養物にIPTGを加えることにより、これらの細胞を誘導して組換え型酵素を生成した。His-タグカラムクロマトグラフィーを使用して、過剰発現後細胞からタンパク質を精製した。Table 4(表4)は、ブラッドフォードアッセイにより決定した各溶出画分中のタンパク質含有量を示す。このデータに基づき、それぞれ500mLの培養によって、3個の溶出画分を組み合わせて合計約34 μgの標的タンパク質が生じたことが分かった。図40及び図41は、各クローニングから回収したカラム画分に関するSDS-PAGEゲルを示す(少なくとも5 μgのタンパク質を各レーンに充填した)。各精製における全3個の溶出画分が標的タンパク質を含有したことが分かり、したがってそれらは全て濃縮し、活性アッセイ用に使用した。

#### 【0083】

## 【表4】

Table 4.

画分番号(合計体積)	クローン4	クローン9
画分1(500μL)	50μL中に0.5μg	50μL中に0.5μg
画分2(950μL)	50μL中に1μg	50μL中に1μg
画分3(500μL)	50μL中に1μg	50μL中に1μg

## 【0084】

溶解物を調製するため、2mgのリゾチームをそれぞれ1mLの細胞懸濁液に加えた。次いで懸濁液を30分間4℃で冷却した。4℃でのインキュベーション後、懸濁液を15000rpmで30分間遠心分離した。次いで上澄みは0.45 μmのDuraporeフィルターを介して濾過した。濾過した上澄みは、帯電ニッケルカラムに三回充填した。次いでカラムを10カラム体積の1×結合バッファーで洗浄し、次いで5カラム体積の1×洗浄バッファーで洗浄した。組換え型酵素は3画分に溶出させた。第一の画分は500 μLの溶出バッファーであり、第二の画分は(二回カラムに充填した)750 μLの溶出バッファー及び更に200 μLの溶出バッファーであり、第三の画分は500 μLの溶出バッファーであった。次いでカラムを、6カラム体積の1×ストリップバッファーで被覆をはがした。ブレッドフォードアッセイを使用し各画分のタンパク質濃度を決定して、各画分に関して少なくとも5 μgのタンパク質をSDS-PAGEにより分析し23~25kDaのタンパク質の存在を調べた。各クローンからのタンパク質溶出画分を濃縮し、Amicon Ultra-5遠心濾過デバイス(サイズ=3k)を使用して水で脱塩した。

## 【0085】

ヌクレオシド修飾をマッピングするための組換え型クサチビンの特徴付け

酵素の活性を、タンパク質のアリコートとRNAをインキュベートし $A_{260}$ を調べることによって試験した。活性アッセイは、1 μLの1:10希釈濃縮タンパク質、1 μLの濃縮タンパク質、2 μLの濃縮タンパク質、及び5 μLの濃縮タンパク質を使用して実施した。それぞれのサンプルは10 μLの合計体積を有しており、200pmolのRNAオリゴヌクレオチド配列、AUCAC CUCCUUUCU(配列番号13)、及び1 μLの220mM酢酸アンモニウムを含有していた。プランクはタンパク質又はRNAを含有しておらず、陰性対照はタンパク質を含有していなかった。サンプルは37と50の両方でインキュベートし、吸光度はNanodropを使用して調べた。

## 【0086】

1 μLの濃縮タンパク質と1 μLの1:10希釈タンパク質は、RNAオリゴヌクレオチドとのインキュベーション後、 $A_{260}$ の如何なる増大も示さなかった。しかしながら、2 μL(0.02 μg)と5 μL(0.1 μg)の濃縮タンパク質を使用すると、吸光度は増大した。これらの吸光度の増大は図42及び図43中に示す。

## 【0087】

SDS-PAGEを使用して濃縮画分中に含有されたタンパク質の量を見積もった。1つのゲルに、各クローンから濃縮した1 μLと5 μLのタンパク質を施した。別のゲルには、各クローンから20 μLのタンパク質を施した。各ゲルには、0.1 μgのBSA、0.5 μgのBSA、1 μgのBSA、3 μgのBSA、及び6 μgのBSAを施したレーンもあった。図44中に示したように、濃縮クローンの9個の溶出画分は20 μL中に約0.2 μgのタンパク質を含有しており、一方濃縮クローンの4個の溶出画分はより少量のタンパク質を含有していた。各濃縮タンパク質サンプルは約100 μLの合計体積を有していた。

## 【0088】

各消化産物用のエッペンドルフチューブ中に3 μLのtRNA<sup>Ty1</sup>を放置することによって、RNA消化産物を調製した。次いでtRNAを95℃で2分間、次に4℃で2分間インキュベートした。次いで、10 μLの220mM酢酸アンモニウム及び指定量のタンパク質(5 μLの濃縮、1 μLの1:5希釈、1 μLの1:10希釈、及び1 μLの1:20希釈)を各サンプルに加えた。次いでサンプルを2時間インキュベートしSpeedVac中で乾燥した。

## 【0089】

10

20

50

30

40

50

図42及び図43中に示したように、組換え型酵素はRNase活性を示した。観察したA<sub>260</sub>のわずかな増大は、種子から精製した酵素で観察した活性と非常に類似している(図16及び図17)。

#### 【 0 0 9 0 】

図45は、tRNA<sup>Ty</sup>r由来のクサチビン消化産物、U[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]A[ ]CのLC-MS分析を示す。組換え型タンパク質(0.1 μg)を使用して大腸菌tRNATyr(2 μg)を消化し、LC-MSによって分析した。図45中、(A)は分析中に観察した全消化産物前駆体イオンのTICであり、(B)はU[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]A[ ]Cの直鎖状リン酸に対応するm/z1406.4のXICであり、(C)は2',3'-環状リン酸に対応するm/z1397.4のXICであり、(D)は多重帯電イオンを示すMSであり、(E)は3'-リン酸を有するU[Q]UA[ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A]A[ ]CのCIDベースの塩基配列決定である。そこから配列を復元する配列情報を示す産物イオン(共通5'末端を有するc<sub>n</sub>と共通3'末端を有するy<sub>n</sub>)をスペクトルにおいて標識する。  
10

#### 【 0 0 9 1 】

更にクサチビンは、RNaseMC1と異なり修飾シチジンでRNAを切断する。図46は、酵母tRNA<sup>Phe</sup>由来のクサチビン消化産物、UGGAA[m<sup>7</sup>G]UC[m5C]>pのLC-MS分析を示す。図46中、(A)はTICであり、(B)は環状リン酸に対応するm/z1479.4のXICであり、(C)は二重帯電イオンを示す32.94分でのピーク保持時間に対応するMSであり、(D)は2',3'-環状リン酸を有するUGGAA[m<sup>7</sup>G]UC[m5C]のCIDベースの塩基配列決定である。観察した配列情報を示す産物イオン(共通5'末端を有するc<sub>n</sub>と共通3'末端を有するy<sub>n</sub>)の一部をスペクトル中に示す。最大量存在した(m/z1396.2)分子イオンからの[m<sup>7</sup>G]の消失に対応する特徴的な産物イオンを示す。  
20

#### 【 0 0 9 2 】

図47中に示したように、クサチビンはRNAのシチジン特異的切断を示すが、クサチビンはタンデムで多数のシチジン間におけるホスホジエステル結合の低い切断率を示す。図47は、酵母tRNA<sup>Phe</sup>由来のクサチビン消化産物、UUCCCCC>pのLC-MS分析を示す。(A)はTICであり、(B)は環状リン酸に対応するm/z1067.8のXICであり、(C)は二重帯電イオンを示す35.9分でのピーク保持時間に対応するMSであり、(E)はUUCCCCC>pのCIDベースの塩基配列決定である。観察した配列情報を示す産物イオン(共通5'末端を有するc<sub>n</sub>と共通3'末端を有するy<sub>n</sub>)の一部をスペクトル中に示す。  
30

#### 【 0 0 9 3 】

本発明を、本発明を実施する様々な方法と共に記載してきた。しかしながら、本発明自体は、添付の特許請求の範囲によってのみ定義されるべきである。

【図1A-1】

21.	G	S	C	G	S	G	L	T	F	F	T	G	H	L	W	P	Q	Q	
	TGT	AGT	TGT	CCT	GAT	AGT	GCT	CTC	GCG	AGC	TTC	ATT	ATC	GAC	GCG	TTC	GCG	CAA	CAG
	GGA	AGC	TGT	CGG	CGA	AGG	GGG	TGA	AGC	GAC	TTC	ACC	ATC	GAT	GCG	TGA	TCC	CAG	CAG
	GCG	TGG	TCA	CCC	GGG	TGG	GCG	TTC	GAC	AGT	ATC	AGC	ATA	AGG	TTC	GGG	TTC	TCA	TCA
	GCG	TCA	TCC	TCC	TCC	TCC	GCG	CCT	GCG	ACA	AGA	ATA	AGG	CTT	GCG	CTT	GCT	TCT	TCT
	TCT			TCT			CCT	AGG							CTC				
41.				TCC			CIA	AGA							CIA				

TCT	TCT CTC	TCC	TCT
TCC	TCC CTA	TCA	TCC

61.

L	Q	S	Q	L	N	T	L	W	P	N	V	L	R	A	N	N	N	Q	F
CTC	CAG	AGC	CAG	CTG	ATG	AGC	CTG	TGG	CCG	AGC	CTG	CTG	CCT	GCT	GCG	ATG	AGC	CAG	TGG

CTG	AGC	AGC	CTG	CTT	ATT	ACC	CTG	TGG	CCC	AGC	CTG	CGT	GCC	AT	AAC	CAG	CAG	TTC
TCT	TGG	TCA	TAT	ATG	TCA	TTC	TGG	CCT	AAA	ATG	TTC	GCG	AAC	ATC	AAA	CTG	AAA	TTC
TGC	TCT	TTC	TTC	ATC	TTC	TTC	TGC	ATC	TTC	TTC	GTC	TGC	CGA	GCA				
CTT	AGT	CTT	AGT	CTT	AGT	CTT	CCC	GTA	CTT	CGG	GCT							
CTC	TCT	CTC	CTC	TCT	CTC	TCT	CCC	GTA	CTT	CGG	GCT	CTC	AGG					
CTA	TCC	CTA	AGA															

**Figure 1A**

【図1A-2】

A	K	F	G	K	F	P	G	L	R	C	R	T	D	P	Q	T	K	V	S
GCG	AAA	TTT	GCT	AAA	TTT	CGG	GCG	TAA	GCT	TGT	CCT	ACC	GAT	CCT	CAA	AGC	AAA	GTT	TGC
GCA	AGG	TTC	GAA	AGG	TTC	CGG	GCT	CAG	GTC	CGG	CCT	ACG	GAC	CCT	AGG	AGG	GTC	GTC	TGC
GCA	GGG			CGG	GGG	TCA	GGG			CCT	CGG	ACT	CCA	ACT			GTC		
GCT	GGG			CCC	GGG	CCT	CGG			CCT	CGG	ACA	CCC	ACA			GTA	AGT	
												CTR	AGG	AGG				TCT	
												CTR	AGA	AGA				TCC	

CCT	GTA	GTA	GTA	GCT	GCT	GGG	AGT	ACA	CCT	ACA
CTC						TCT		CTC		
CTA						TCC		CIA		

R D T C G A N F I F

**Figure 1A (cont'd)**

【図1B】

TTC GAC TCC TTT TGG TTT  
GTT CAG CAG TGG CCC CGC  
GCA TTT TGC AGT TCT CAA  
AAA AGT GGT AGT TGC CCTT  
GGT AGT GGT CTG CGC ACC GGC  
ATT ACT ATC CAT GGC CTGG  
TGG CGG CAA CAG AGC GGC  
AAC AGC CTC ACT AGC TGTG  
CCG GGT TCT CCG TTT GATG  
CTG AAC AAG ATC AGC GAC  
CTG CAG AGC CTC CCT AATG  
ACC CGT TGG CGG ACG TGTG  
CTG CGT GCC AAT AAC CAA  
CTG TTT TGG AGT CAC GAGG  
TGG AGC AAA CCT GCA GCC  
TGC TCC GAA GAC ACC TTTG  
AAC CAA GCG GCC TAC TCTG  
AAA CTT GCG GTC GAC ATGC  
CGC AAC AAC TAT GAT GATC  
ATC GGG GCC TTG CGT CGCC  
CAC GCA GCA GGC CGC AAC  
GGC CGT ACC AAA TCA CGTG  
CAG CGC ATC AAA GGG TTGG  
CTG AAA GGG AAA TTT TTGGT  
AAA TTT CCG GGC TTA CGTG  
TGT CGT ACC GAT CGG CAGA  
CGC AAA AGT GTC ATT CTGCG  
AGC AAA AGT GTC ATT CTGCG  
GTC CAA GTC GTC GCA TGGG  
TTC CGC CAG GAT GTC GATC  
ACC TTA ATT GAT TGT ACCCG  
CGC GAC AGC TGT GGC GCGC  
ATT TTC ATC ATT TCG

(配列番号 2)

**Figure 1B**

## 【図2A-1】

1.	M	E	K	T	K	S	V	D	V	V	F	F	V	F	V	Y	L	T	I	L	R
ATG	GRA	AAC	AAA	AGT	GCA	GAT	GCG	GIG	GTC	TTC	TTC	TTC	GTA	TTC	GTC	CAG	CAC	ATC	CIG		
GAG	AAA	AGC	AGG	GTC	GTC	GAC	GTC	TGC	TTC	ACC	ATC	TAA	TTC								
ACT		TCG	GNC			GTC		GTC							GTC	TTC	ACC	ATC	TTC		
ACA		TCA	GTA			GTA		GTT							GTA	TTC	ACA	CCT			
		TCT													CCT			CTC			
		TCC													CTA			CTA			

61.	CTA				TCA				AGA				AGA				AGA TCC					
	G	C	T	G	W	P	C	Q	G	C	R	S	T	G	N	C	G	N	Q	F	I	
GGC	CTG	TGG	WW	PA	CC	QAG	AAA	GCG	G	G	CCT	AGT	ACT	TGT	TCT	TCT	GGT	ATC	GGT	AC	TTT	GA
GGG	CTG	TGG	TTTG	CTT	CCG	AAA	AGG	GGG	GGG	GGG	CGG	TGC	GGT	TAC	ATG	TGC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG
GGG	CTT	TGG	TTTG	CTT	CCG	AAA	AGG	GGG	GGG	GGG	CGG	TGC	GGT	AAT	TGC	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG	GGG

TCT TCC TCG TCC TCG

**Figure 2A**

【図2A-2】

**Figure 2A (cont'd)**

【図2B】

```

ATG GAA AAA ACA AGA AGT GTC GAT GTT GTG TTC TTC GGT GGG TTT
GTC TTA ACC ATT TTG TTT CTC ATT GTT AAA TCG CAA CCT ATT TTC
GAT GAT TTT TGG TTT GTT CAG CAA TGG CCA CCA GCT GTT TGT
ACT TCA CAA TCA CGG CGA CCA TGT GTG GGA CGA CGA GGG ACT CGA TCC
TTC ACA ATT CAT GTT TTG TGG CCT CAA AAC CGG CGA CCT TCT
GTG ACT ATT TGT ACT GGC ATT CAA CCT ATT GTT GTC ATT ACT AGA ATT
GCA CAT TTA GAA AAC GAT CTC AAC AGT GTC ATT TGG CGG CCT ATT GTG
GTG ACC GGA AAC AAC AAA TCT TTT TGG CGT CAT GAA TGG AAC
AAA CAT GGG ATT TGC TCA GAG AGC AGG ATT TGC GAA CGG AAC
TAC TTC CAA ACA CGG ATA AAC ATG AGG CAC GGT ATC GRC CTT
CTT AGT GTG CTG AGA ACT GGT GGA GTA GGA CCA ATT GGA GCC
TCC AAG CGA AAC CAA AGG GTC GAA ACC CGG ATT TCA CCT CAT
TTT GGA AAA GAT CCA ATT CTC CGA TGT AAA AAC CGA TCA AAC
GGC CAA CGC TTA TTG ACG GAG ATT GTG ATG TGC TTC GAT GAC
GAT GGT GTC ACC CTT ATA AAC TGT AAC AAA GCA AGA TCC ATT
TGT GCT GGG AGC ATT ATT TTT

```

(配列番号3.)

**Figure 2B**

【図2c】

```

ATG GAA AAG ACC AAA AGT GTC GAT GTG GTG TTT TTT GTC TTT
GTC CTG ACT ATC CTG TTC CCG ATC GTC AAG AGT CAG ACA ATT
GAC GAT TTC TGG TTT GTC CAA CAA TGG CTC CCG GCG GTT TGT
ACG TTA CAG TCT GGC CGC TGT GTT GGT CGT GGA ACT CCG TCA
TTT ACT ATT CAT GGC CTG TGG CCA CAG AAA GGC GGC CTC AGT
GTT ACG AAC TGT ACT GGT AAC CAG TTT GAT TTT ACG AAA ATT
GCA CAC CTG GAA AAC GAT TTG AAC GTT GTC TGG CCG AAC ATT GTG
TGT AGC GGC ATT AAC AAA TTC TTT TGG CCG CAT GAG TGG AAT
AAG CAC GGC ATG TGT CCA GAA TCC AAA TTT GAT GAA GGC AAA
TAT TCC CAG ACC GGG ATT AAC ATG CGC CAT GGC ATC GAT CTG
TTG AGC GTC CTC CGT ACC GGC GGT GTT GGT CCA ATT GGC GCT
ACG AAA CCC AAA CAA CGC GTG GAA ACC GGC ATT ATC TCC CCC CAC
TTT GGT AAG GAT CGG ATT CTG CGG TGC AAA AAG CGC TGG AAC
GGC CAA GTG CTG CTG ACG GAG ATT GTG ATG TGC TTT GAT GAC
GAC GGC GTC ACC CTG ATC ATT TGT ATT AAG GCG CGC TCC ATT
TTC GCA GGC TCA ATT ATT TTT

```

(配列番号4)

Figure 2C

【図2D】

〔 四 3 〕

配列番号3	1	ATGGAAAANAAAACAAGGAGGTGCGAATGCTGCTGTTTGTCTTACACCATTTGTTT	60
配列番号4	1	ATGGAAAAGACCCAAAAGGTGCGATGGTGTGTTTTGGTATTTGCTCAGCATATGCTTC	60
配列番号3	61	CTTATCTGTTAATGCGAACATTCTGATGATTTTGGTTTGTCTGACGAAATGCCAACAGCT	120
配列番号4	61	CGGATGTCAGATGTCACATTTGACGTTTCTGGTTTGTCTAACATGCCCTCCGGG	120
配列番号3	121	GTTTGACTTTAACATCAAGGGACGATGTTGATGGGAGCTGGATCTGATCTTACAAATTCTA	180
配列番号4	121	GTTTGACTTTAACATCAAGGGACGATGTTGATGGGAGCTGGATCTGATCTTACAAATTCTA	180
配列番号3	181	GGTTTGGGGCTCCAAAGGGACGATCTCTGATCTGATCTTGTGCAAGATGCTGCTTACATTGAT	240
配列番号4	181	GGCTTGTGGCCACAGAAGGGGGCGTGTGATGCGAATGTTCTGCTGAAACGATTTGAT	240
配列番号3	241	TTCTAACATGTTGACACATTAGAAAACGATCTAACGTTAGTTGGCCGAAATGGTGTGAC	300
配列番号4	241	TTCTACGAAAATTGACACATTGAAAACGATTTGACGTTAGTTGGCCCAATGGTGTGAC	300
配列番号3	301	GGAAACACAAATTCTTGGGTCAAGTAAGGACAAACATGGAAATTGCTAGAGGAC	360
配列番号4	301	GGCAAAATCAAAATTCTTGGGGCATGATGAAATTAACGCGGAACTGTGTCAGAATTCC	360
配列番号3	361	AGTTTGGCAAGGGAGTACTCTCAACACGGCTTAACATGGCCCTGGATACGGCTT	420
配列番号4	361	AAATTGTGAGGCAAAATTCTCAGACGGCAATTAACTGGCTATGGCATGCTG	420
配列番号3	421	CTTAGTGTGCTGGAGAACATTGGTGTGAGTAGACCAAAATGGAGCTTCAAGGCAAAAGAAGA	480
配列番号4	421	TTGAGGGCTTCTCAGTGGGGGTGTGGTGCCTAAATGGGGCTGCAACGGCAAAACGG	480
配列番号3	481	GTGCAAAACCGGATTTCATCCATTGGAAAAGATCTTCTGATGTTAAAAAGCA	540
配列番号4	481	GTGAAAACCGGATTTCATCCATTGGAAAAGATCTTCTGATGTTAAAAAGCA	540
配列番号3	541	TAACGACGGCCAAAGTCTTGTACGGGAGATTGTCAGCTCTGGATGACGCTGGTCAC	600
配列番号4	541	TGCAACGCCCAAGTGTCTGACGGAGATTGATGTTGATGCTTGTGACCAAGGGCTCACC	600
配列番号3	601	CTTAAATACCTGAAACCAAGTCATTGGCTGGAGCTTATTATT	651
配列番号4	601	CTGATTAATTGTAATAGCGGCCCTCAATTGGCAGGATCTTATTATT	651

Figure 2D

Figure 3

【図4】

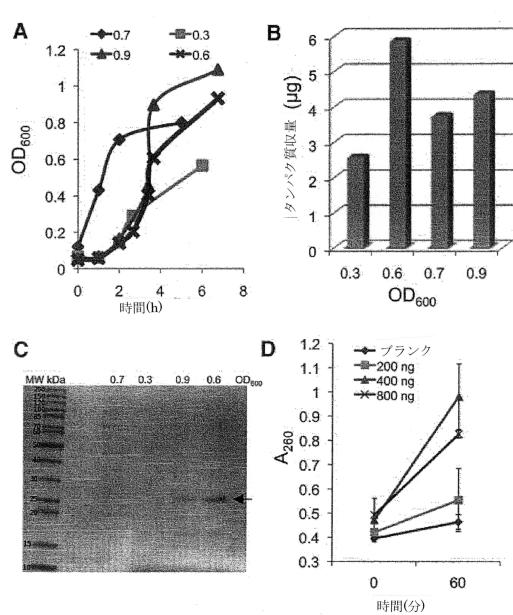


Figure 4

【図5】

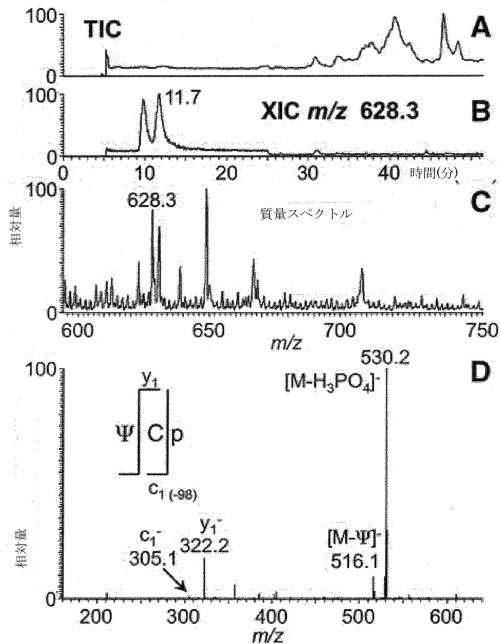


Figure 5

【図6】

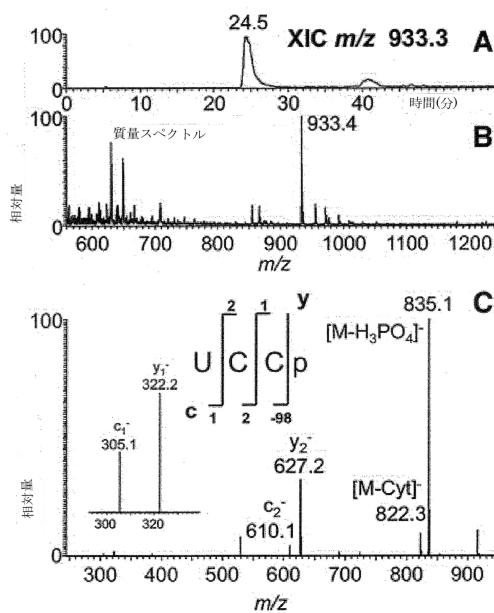


Figure 6

【図7】

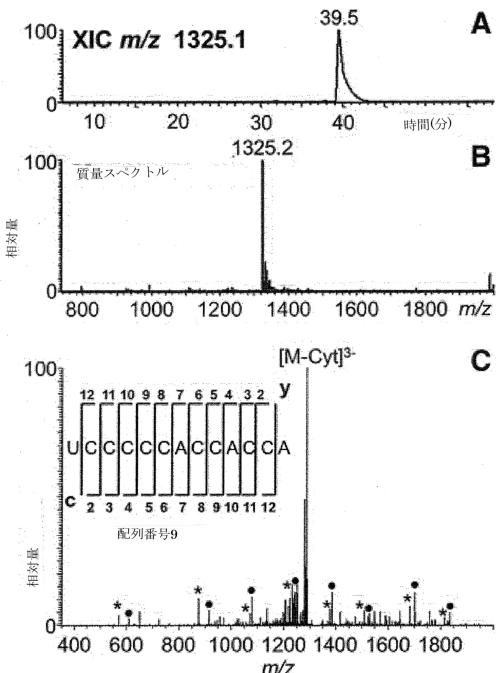


Figure 7

【図 8】

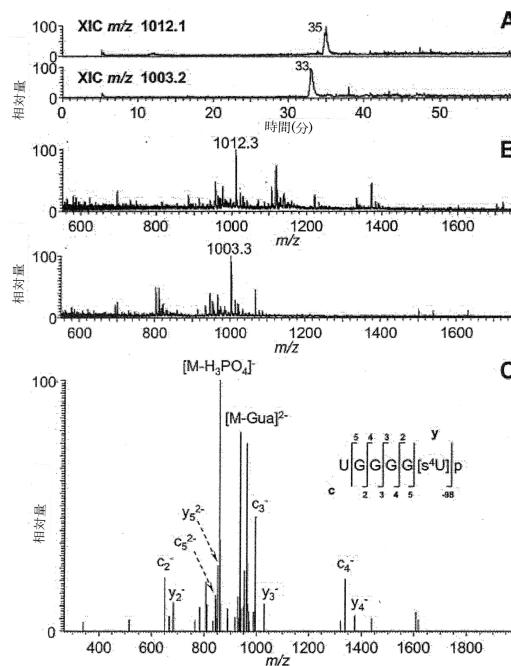


Figure 8

【図 9】

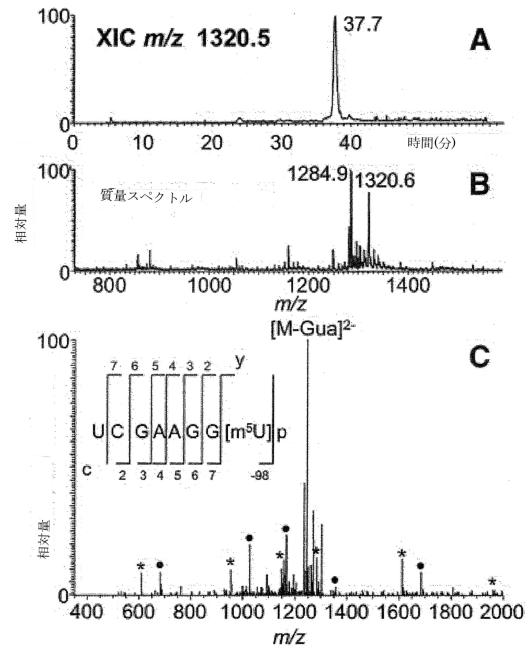


Figure 9

【図 10】

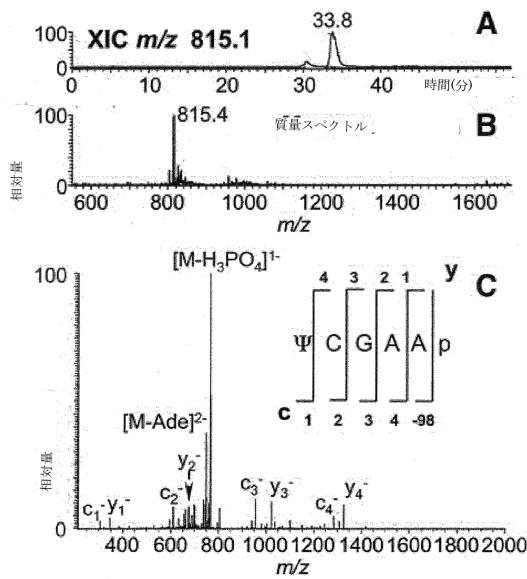


Figure 10

【図 11】

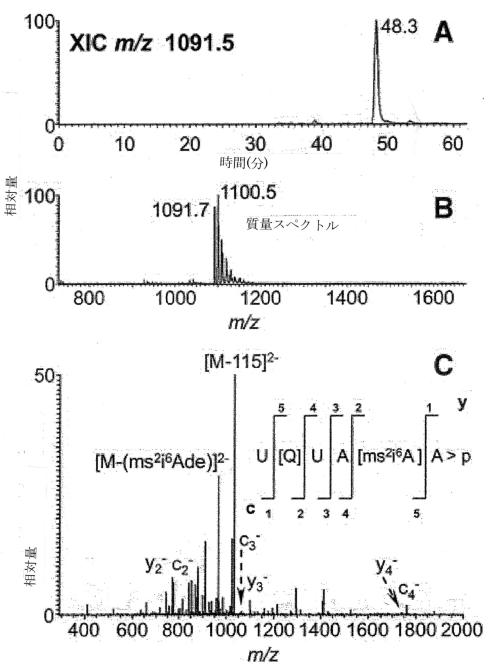


Figure 11

【図12】

CM-セルロース分画のUV吸光度モニタリング

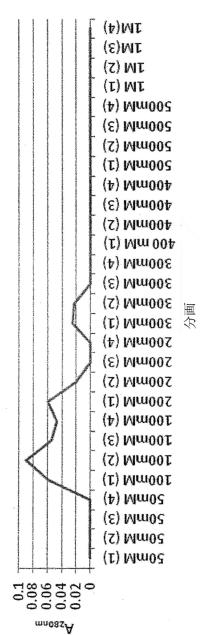


Figure 12

【図13】

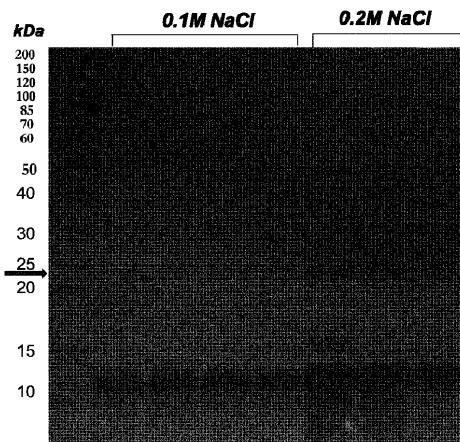


Figure 13

【図14】

Sephadex G-75分画のUV吸光度モニタリング

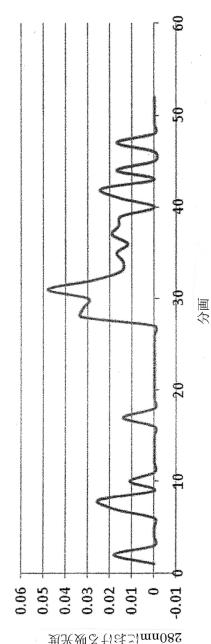


Figure 14

【図15】

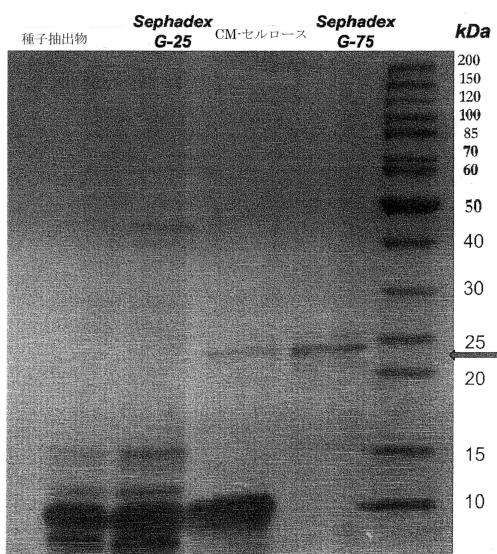


Figure 15

【図16】

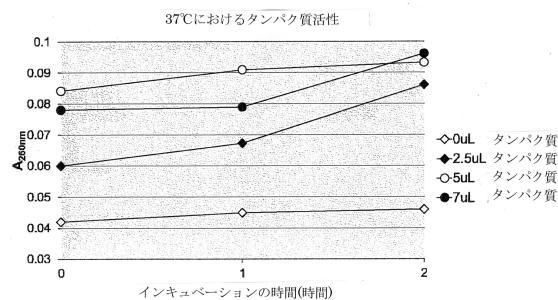


Figure 16

【図 17】

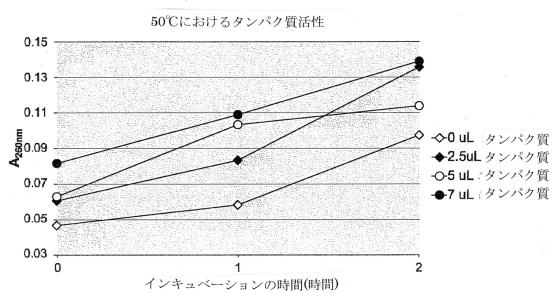


Figure 17

【 20 】

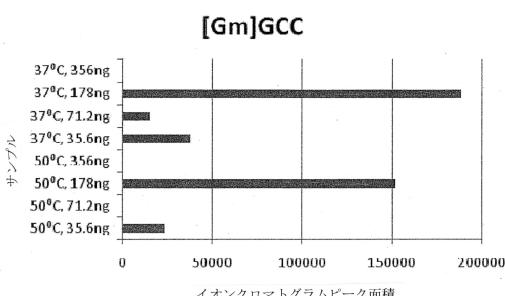


Figure 20

【 図 2 1 】

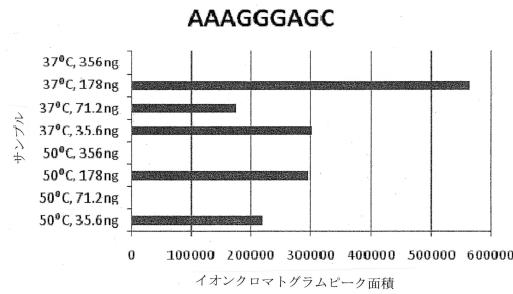


Figure 21

【 図 1 8 】

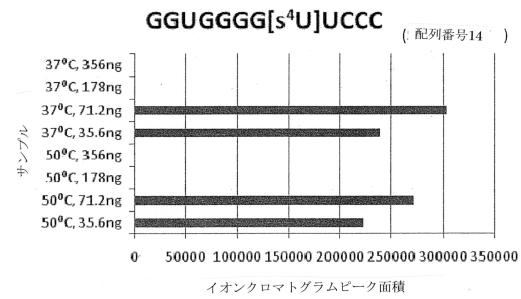


Figure 18

【 図 1 9 】

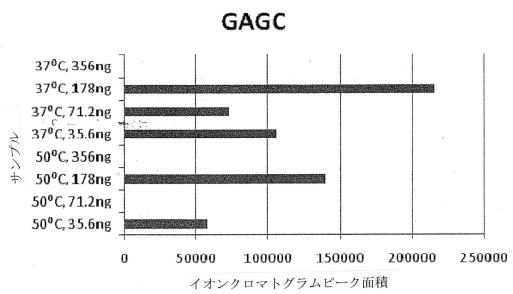


Figure 19

( 図 2 2 )

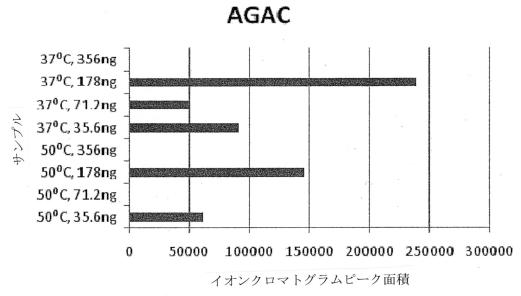


Figure 22

【図23】

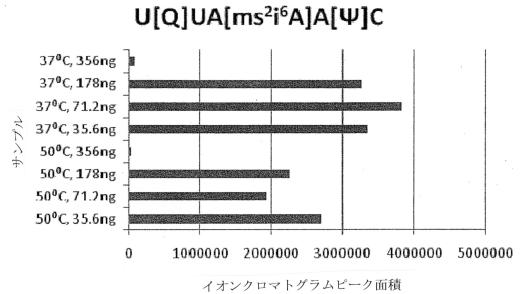


Figure 23

【図24】

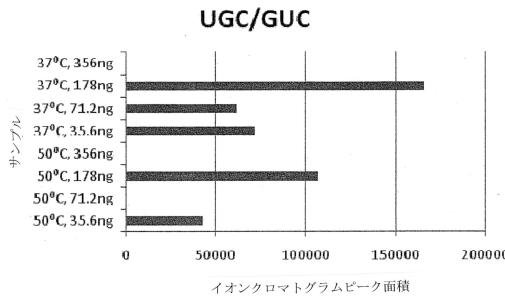


Figure 24

【図26】

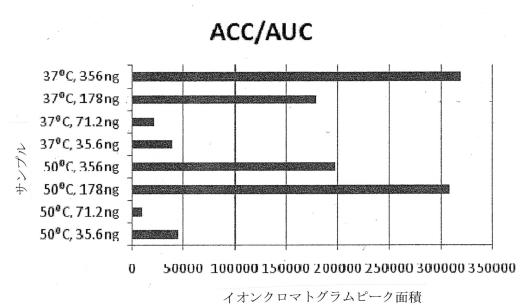


Figure 26

【図25】

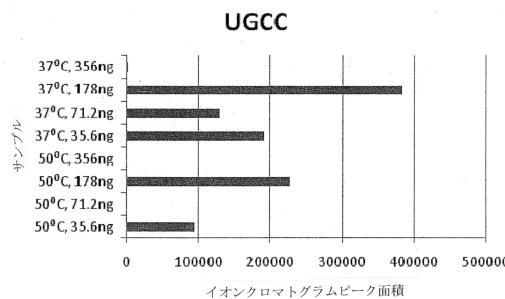


Figure 25

【図27】

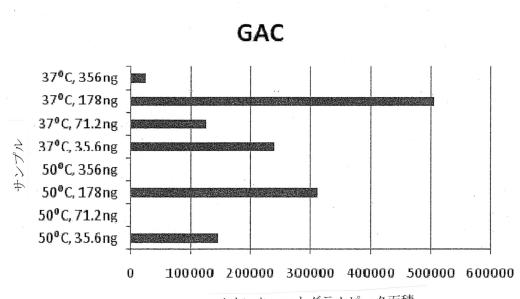


Figure 27

【図28】

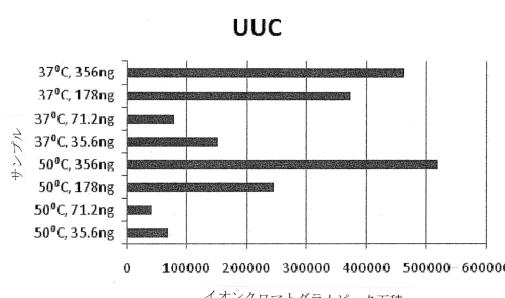


Figure 28

【図30】

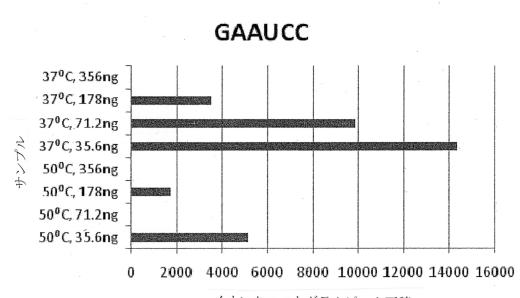


Figure 30

【図29】

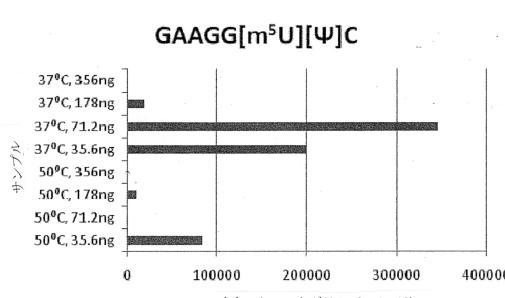


Figure 29

【図31】

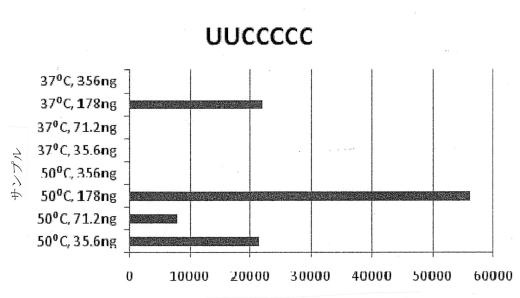


Figure 31

【図32】

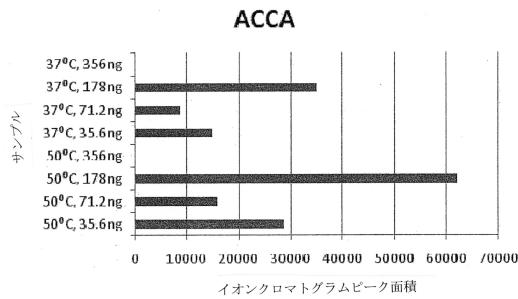


Figure 32

【図34】

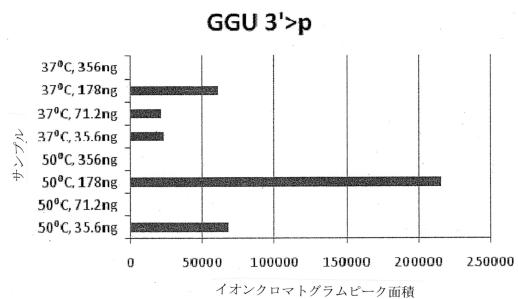


Figure 34

【図33】

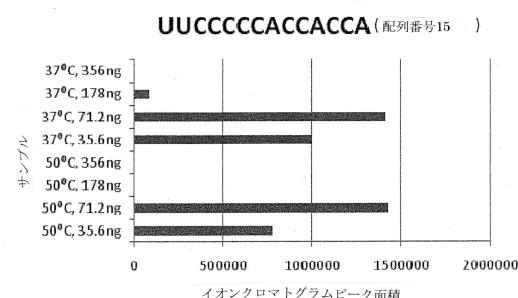


Figure 33

【図35】

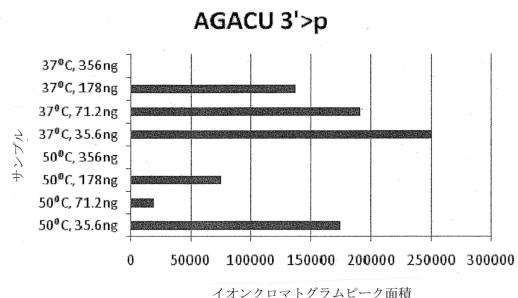


Figure 35

【図36】

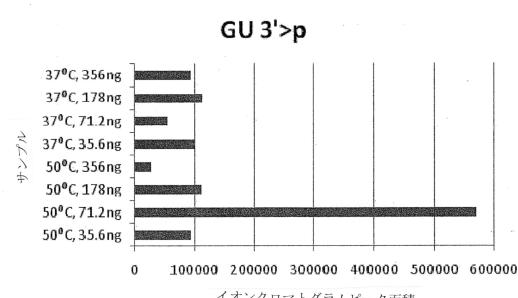


Figure 36

【図37】

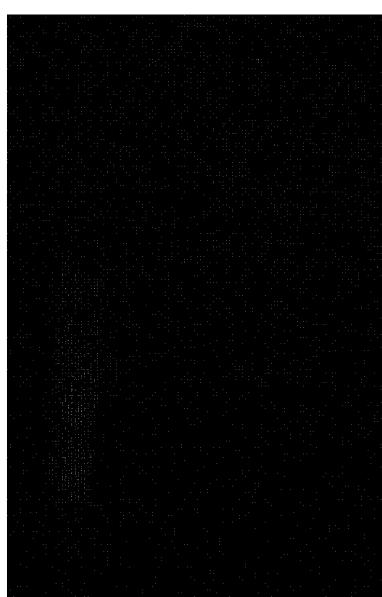


Figure 37

【図38】

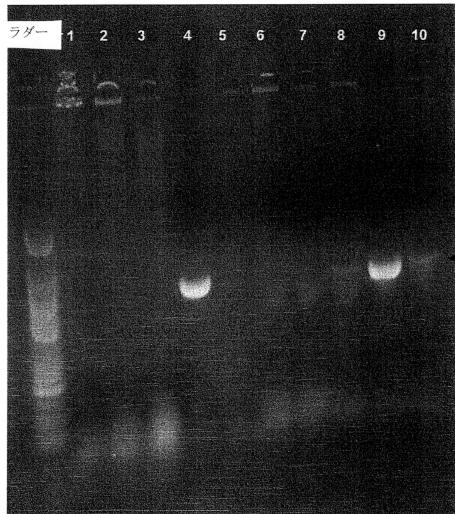


Figure 38

【図39】



Figure 39

【図40】

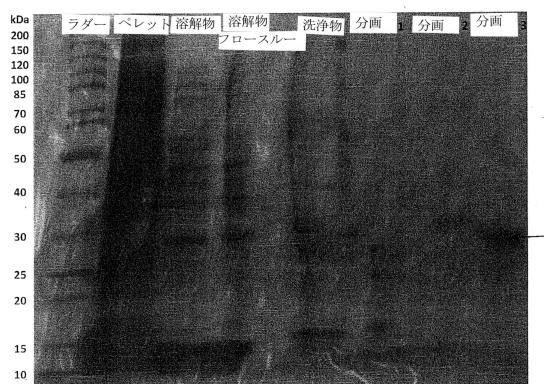


Figure 40

【図41】

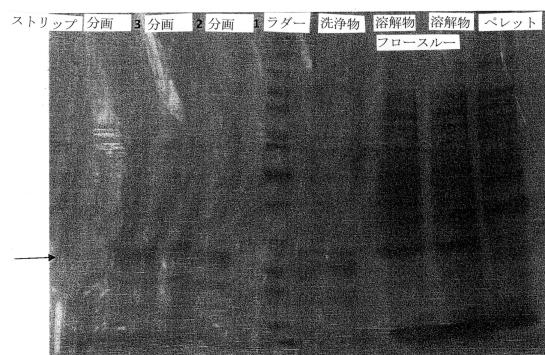


Figure 41

【図42】

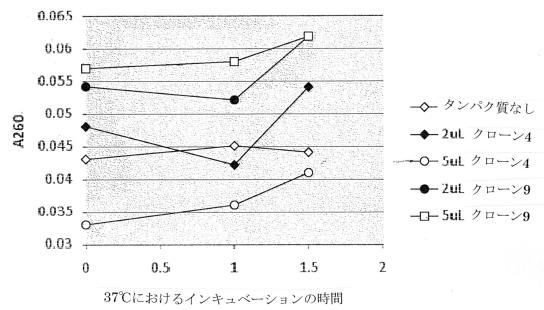


Figure 42

【図43】

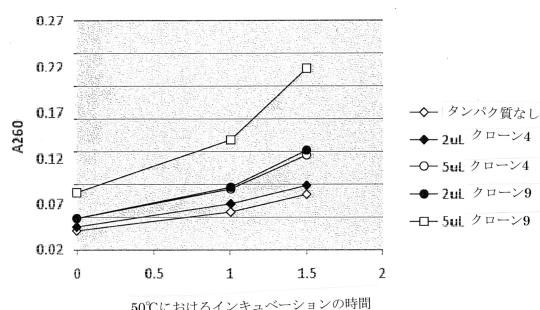


Figure 43

【図44】

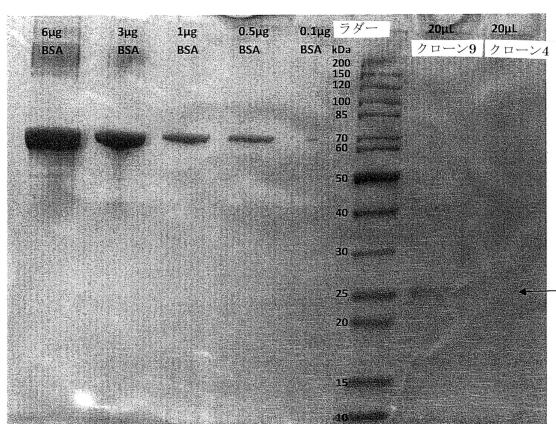


Figure 44

【図45】

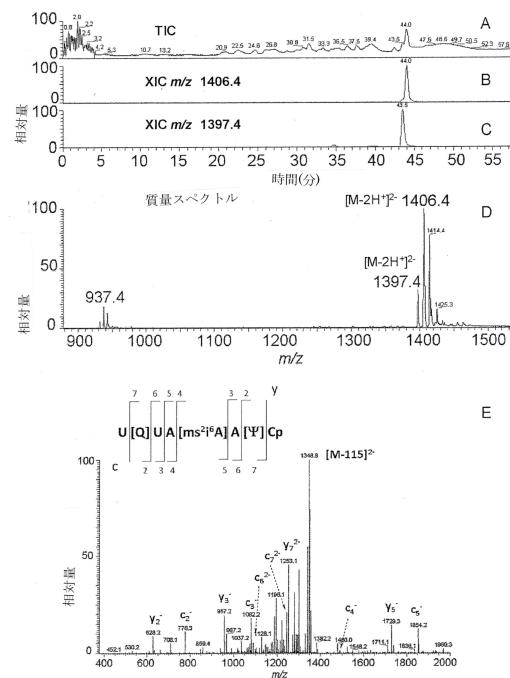


Figure 45

【図46】

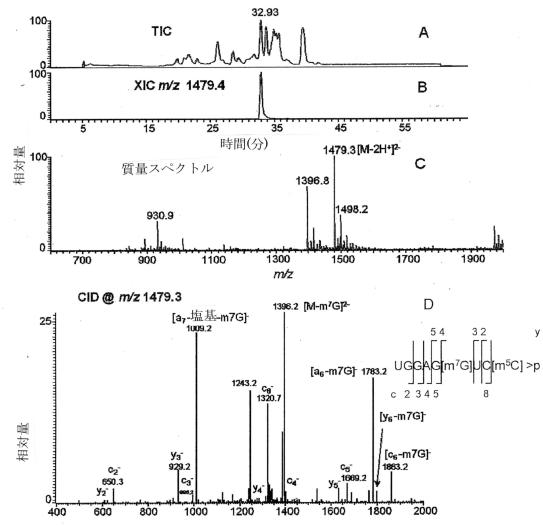


Figure 46

【図47】

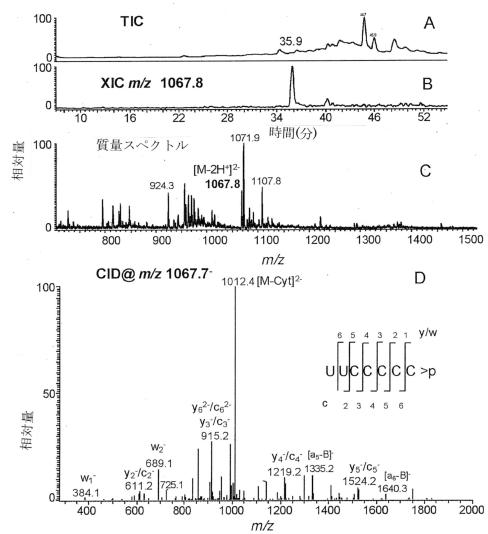


Figure 47

【配列表】

[0006804467000001.app](http://0006804467000001.app)

---

フロントページの続き

(72)発明者 ニコラス・ポール・レスナー

アメリカ合衆国・オハイオ・44001・アマースト・ドッグウッド・コート・375

(72)発明者 パトリック・アラン・リンパック

アメリカ合衆国・オハイオ・45230・シンシナティ・メイド・マリアン・ドライブ・6929

(72)発明者 サラ・ヴィーナス

アメリカ合衆国・オハイオ・44286・リッチフィールド・ホーキンズ・ロード・4702

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 Database NCBI[online], Accession:XM\_004147451, 2015-03-23 uploaded, [retrieved on 2020-06-15], <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/449459529?sat=47&satkey=135761033>> , Definition:PREDICTED: cucumis sativus ribonuclease MC1-like (LOC101213213), mRNA. J. Virol. (2000) Vol.74, No.22, pp.10822-10826 BIO VIEW (2008) Vol.55, pp.42-43 Virology Journal (2009) Vol.6, No. 1, pp.e118 Database RCSB PDB[online], Accession No.1BK7, 1998-7-15 uploaded, [retrieved on 2020-2-21], <<https://files.rcsb.org/header/1BK7.pdb>> , TITLE: RIBONUCLEASE MC1 FROM THE SEED OF BITTER GOURD Database UniProt[online], Accession No.A0A0A0LC37, 2015-4-1 uploaded, [retrieved on 2020-2-21], <<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0A0LC37.txt?version=3>> , Definition: SubName: Full=Uncharacterized protein

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 9 / 1 0

C 12 N 1 5 / 5 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

W P I D S / W P I X ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q