

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6687282号
(P6687282)

(45) 発行日 令和2年4月22日 (2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月6日 (2020.4.6)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 H 19/167 (2006.01)	C O 7 H 19/167 C S P
C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6806 Z

請求項の数 12 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2017-561420 (P2017-561420)	(73) 特許権者	517406205
(86) (22) 出願日	平成28年7月14日 (2016.7.14)		インマジーナ ビオテクノロジー エス.
(65) 公表番号	特表2018-528157 (P2018-528157A)		アール. エル.
(43) 公表日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		イタリア国、トレント 3 8 1 2 3 2 1
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/054210		/ 1 2、ヴィア デル カステル
(87) 国際公開番号	W02017/013547	(74) 代理人	110000877
(87) 国際公開日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		龍華国際特許業務法人
審査請求日	平成30年10月5日 (2018.10.5)	(72) 発明者	クラマー、マシミアーノ
(31) 優先権主張番号	102015000036631		イタリア国、トレント 3 8 1 2 3 2 1
(32) 優先日	平成27年7月21日 (2015.7.21)		/ 1 2、ヴィア デル カステル インマ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	イタリア (IT)		ジーナ ビオテクノロジー エス. ア
			ール. エル. 内
		最終頁に続く	

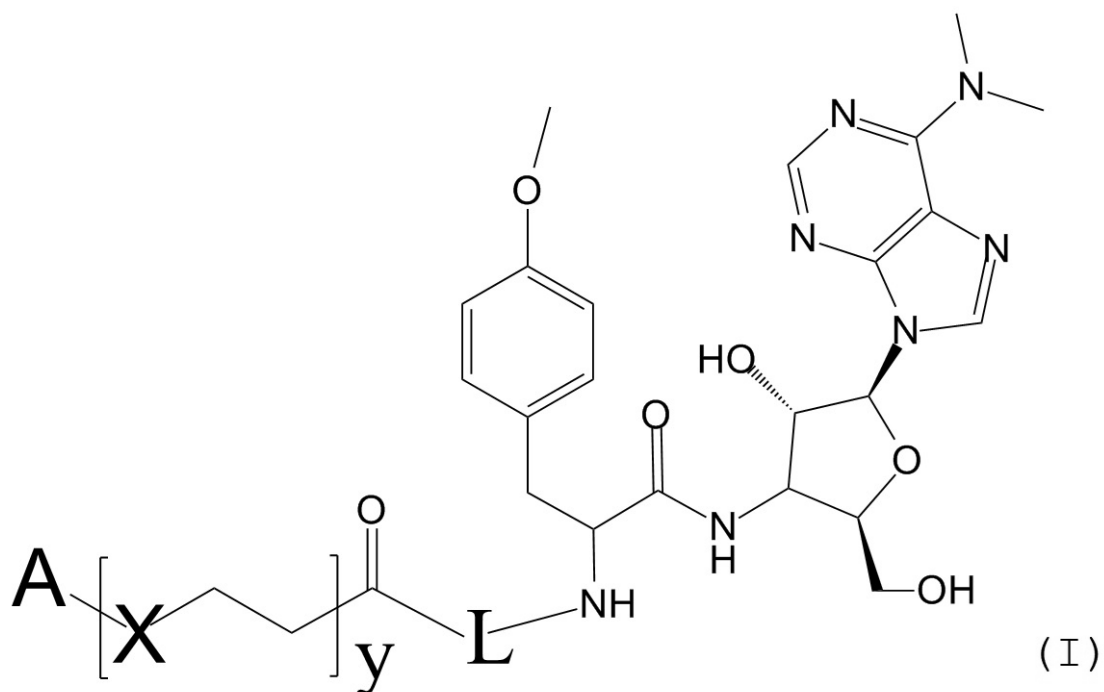
(54) 【発明の名称】 ポリリボソーム、リボソームの単離のための新たな分子、それらの使用およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

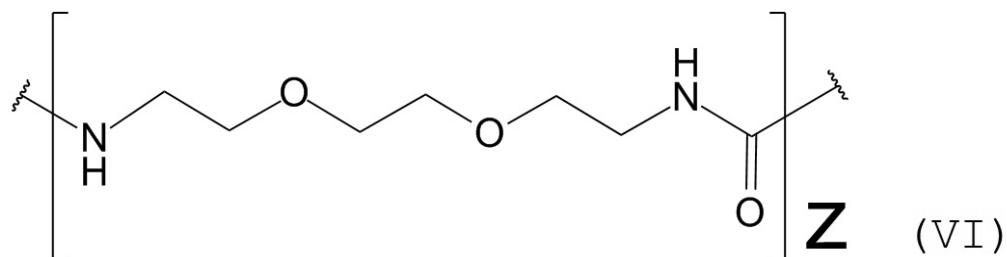
一般式 (I)

【化 I】



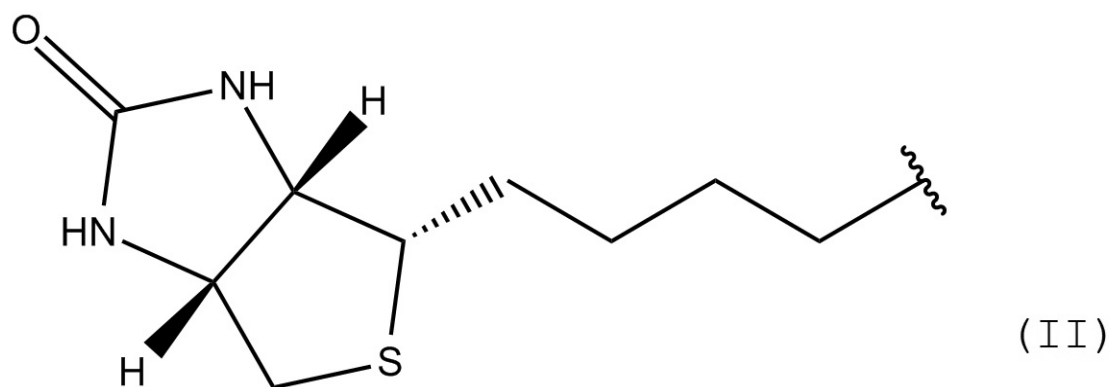
の分子およびそれらのエナンチオマーであって、式中、
 Aは、レセプターリガンド系のレセプタまたはリガンドから選択され、
 Xは、酸素原子（O）またはCH₂基から選択され、
 yは0から10までの整数であり、
 Lは一般式（VI）の分子であり、

【化 VI】

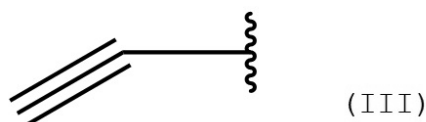


Zは、2から10までの範囲内に含まれる整数であり、
 Aは、以下の基

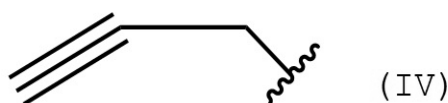
【化 II】



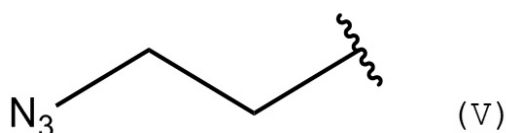
【化 I I I】



【化 I V】



【化 V】



10

から選択される、
分子。

【請求項 2】

y は 0 に等しい、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 3】

z は 2 に等しい、請求項 1 または請求項 2 に記載の分子。

20

【請求項 4】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の分子の、生体サンプルから少なくとも 1 種の活性リボソームを単離することへの使用。

【請求項 5】

前記生体サンプルは、細胞または組織溶解物である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記細胞は、細菌性細胞、古細菌細胞、または真核細胞であり得る、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 種の活性リボソームは、RNA、mRNA、またはタンパク質に関連する、請求項 4 から請求項 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

30

【請求項 8】

請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の分子のリボソームプロファイリングへのインビトロの使用。

【請求項 9】

生体サンプルから少なくとも 1 種の活性リボソームを単離するためのキットであり、前記キットは、

i) 請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の分子を少なくとも 1 種含む第 1 試薬と、

ii) 固相であって、前記固相はレセプターリガンド系の前記レセプターまたは前記リガンドのうちの他方によって官能化され、これにより前記第 1 試薬に結合する前記固相と、を備える、キット。

40

【請求項 10】

前記第 1 試薬は、液体の状態または固体の状態である、請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記キットは、

a) 前記第 1 試薬が固体の状態である場合に、前記第 1 試薬を可溶化させるための可溶化溶液、

b) 前記第 1 試薬を前記生体サンプルとインキュベートするためのインキュベーション溶液、

50

- c) 前記生体サンプルと接触させた後に、前記固相の表面を洗浄するための洗浄溶液、
- d) 前記固相からRNアーゼを除去するためのRNアーゼ除去および再懸濁溶液、
- e) 陰性対照、および
- f) 使用のための使用説明書、

のうちの少なくとも1つをさらに備える、請求項9または請求項10に記載のキット。

【請求項12】

前記固相は、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、アビジン、アジド残基、アルキン残基のうちの1つにより官能化されている、請求項9から請求項11のいずれか1項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、活性タンパク質合成に関与する天然ポリリボソームおよびリボソームのタグフリー単離のための新たな分子、それらの使用およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

リボソームは、新たなタンパク質の合成を触媒する巨大分子機械である。複数のリボソームがmRNAをリクルートする場合、それらはポリリボソームを形成する^{1, 2}。ごく最近になって科学者達は、この「アンサンブル」³⁻⁹（すなわち、核酸およびタンパク質の集合）の超分子構造および機能的複雑さを解明しようと試みてきた。遺伝子発現の調節におけるポリリボソームの極めて重要な役割は、リボソームタンパク質、イニシエーション因子、並びにポリリボソームと相互作用する延長因子に影響を及ぼす多くの癌関連突然変異の発見によって強調されている¹⁰。翻訳機構の多くの成分が、今日では、癌およびその他の病状（リボソーム病）の治療に対する重要な標的と考えられている¹¹。それに加えて、ストレス条件¹²および薬物治療¹³が、ポリリボソーム内の関連するmRNAを特異的に変えられることを、最近の発見が示してきた。これら全ての証拠は、タンパク質合成のプロセスおよび病状におけるポリリボソームの極めて重要な役割を明確に示している。さらに、ポリリボソームにおけるRNAのリクルートメント（トランスレートーム）に関する植物¹⁴、酵母菌¹⁵、および哺乳類の細胞¹⁶に対するますます多くの遺伝子発現研究が、遺伝子発現調節におけるポリリボソームの重要性を強調している。

【0003】

残念ながら、翻訳を調査するための既存のツールおよび方法は依然として改良される必要があり、トランスレートームおよび複雑なポリリボソームを単離および調査するための革新的な方法が必要とされている。現在の手順は、高価であり、多くの時間と労力を要し、転写とタンパク質変化の間の転写後プロセスおよび翻訳プロセスを詳細に分析するには十分に正確ではない（すなわち、天然型の活性ポリリボソームのみを捕捉することができない）。翻訳に関する情報を得るための可能性のある手法は、その発現が組織特異的プロモーターによって制御される、アフィニティータグされたリボソームタンパク質の発現によって表される。タグされたリボソーム（および、関連するmRNA）がアフィニティ精製（RAPまたは翻訳RAP、TRAP）によって精製され得る¹⁷。この方法は、特異的マウスモデルおよび／または特異的遺伝子構成、最後には多用途性の乏しい系となる長いパスを必要とする。配列決定およびプロテオミクス技術における進歩は、リボソーム保護されたフラグメントの深い配列決定（リボソームプロファイリング）¹⁸、開始リボソームの全体的且つ定量的プロファイリング（GTI-seq、QTI-seq）^{19, 20}、または、新たに合成されたプロテオームのゲノム規模での定量化（Punch-PおよびpSILAC）^{21, 22}を含む、翻訳をプロファイルするための高解像度（単一のヌクレオチドまたは単一のペプチド）の「オミクス」技術の開発を呼び起こした。リボソームプロファイリングは、また、酸素欠乏下でトランスレートームをマッピングするためのTRAP（遺伝子学的に操作された有機体を使用した翻訳リボソームアフィニティ精製）と組み合わせて使用されてきた²³。これに対して、Punch-PおよびpSILAC

LACは、タンパク質レベルでの遺伝子発現調節を研究するための相補的な技術である。これらの様々な手法によってカバーされる様々な生物学的疑問に加えて、これらの全ての技術は、通常、ポリリボソームに関連する（またはポリリボソームによって生成される）mRNAおよびタンパク質の半定量的解析を必要とする^{2 4}。

【0004】

線形ショ糖密度勾配における超遠心分離法によるポリリボソームの単離は、1960年代から使用されている技術であり、遺伝子発現翻訳の研究にとって現在の「究極の基準」である。ポリリボソームに関連するメッセンジャーRNAが、未結合のRNA、小さな（40S）リボソームサブユニット、大きな（60S）リボソームサブユニット、および80Sモノソームから分離される。RNAおよびタンパク質が勾配から抽出され、RT-qPCR、RNA-seqによって、または免疫ブロット法および質量分析法によって解析され得る。この手順は比較的安価（1サンプル当たり〜70ユーロ）であり、トランスレートーム研究への道を開いたものの^{2 5}、^{2 6}、いくつかの欠点を有する。第1にこの技術は、高価な機器の操作経験を必要とし、時間がかかる（〜6時間）。第2は感度である。検出可能な信号プロファイルのためには、フラクションの収集の間に大きなサンプル量（ $>10^5$ 細胞）が必要である。第3は汚染である。不活性ポリリボソームの存在が依然として議論されているものの、少なくともニューロンにおいて、ポリリボソームフラクションが非翻訳（すなわち、タンパク質合成において活性ではない）ポリリボソームを含み得ることが知られている^{2 7}、^{2 8}。さらに、ショ糖フラクションが、他の高分子量複合物によってわずかに汚染され得る⁴。

【0005】

従って、簡単で、速く、より正確かつ安価な技術は、全ての遺伝子発現研究に対して強い影響を及ぼすであろう。

【0006】

この方向における革新的な手法は、リボソーム構造および機能の詳細な理解を含むことを無視できない。真核細胞リボソームは、それらの細菌性の同等物よりも〜40%重く、全質量4.5MDaに対して2つのサブユニット（60Sおよび40S）、4つのリボソームRNAおよび79のリボソームタンパク質を含む^{2 9}。リボソームは、A部位、P部位、およびE部位と指定された、大サブユニット中に位置する3つの活性部位を含む。A部位はアミノアシルtRNA（aa-tRNA）を受け入れ、P部位はペプチジルtRNAを受け入れ、E部位は遊離したtRNAがリボソームから抜け出ることを可能にする。大サブユニットによって触媒される反応の基質は、A部位に入ってくるアミノアシルtRNAおよびP部位のペプチジルtRNAである。反応はペプチジルトランスフェラーゼ中心（PTC）において起こる。aa-tRNAのαアミノ基は、カルボニルの炭素を攻撃し、ペプチジルtRNAの3'-ヒドロキシル基をアシル化する。これは、分解して、A部位に結合されたtRNAに対してエステル化されたアミノ酸を1つ分延長されたペプチド、およびP部位の脱アシル化されたtRNAを生じる。その後、リボソームは、1コドン前に転座させる。

【0007】

真核細胞リボソームは、翻訳阻害剤として作用する多くの小さな分子の標的である。これらの分子の大フラクションが優先的にPTCを標的にする^{3 0}。この領域は、リボザイム（すなわち、触媒活性リボソーム）の触媒コアであり^{3 1}、周囲のリボソームエリアに対して高次構造の系統的保存を共有する^{3 2}、^{3 3}。さらに、これは、ペプチド結合形成に必須なRNA構造要素によって形成される。小分子阻害剤の中で、ピューロマイシン（アミノヌクレオシド抗生物質^{3 4}）は、3'末端がチロシル化されたtRNAの類似体であり、原核細胞リボソームおよび真核細胞リボソームの両者においてリボソーム触媒活性を阻害することが可能であり^{3 5}、A部位に入ることによってPTC中心を形成する対称V型キャビティを結合させる^{3 1}、^{3 6}。この薬剤は、ペプチド結合形成のメカニズムを理解することを目的とした生化学的実験において中心的役割を果たした^{3 6 - 4 0}。もっと最近になって、リボソームと結合し、ポリペプチド新生鎖に効率的に組み込まれるその

能力のため、ピューロマイシンが、放射性ピューロマイシン^{4 1}または抗ピューロマイシン抗体^{4 2}を用いてタンパク質合成機能をアッセイするためのツールとして、広範囲に使用されてきている。さらに、ピューロマイシンはまた、mRNAをそのコード化されたタンパク質へ化学的に結合するためにも使用されてきている^{4 3}、^{4 4}。これらの方法は、ピューロマイシンのα-アミノ基の、カルボニルの炭素との不可逆反応に基づいており、ペプチジル-tRNAの3'ヒドロキシル基をアシル化する。ピューロマイシンのアミドが開裂され得ないので、この反応は分解して、末端がピューロマイシン化されたペプチドを生じる。この後、タンパク質合成が停止する。作用のそのメカニズムを考えると、そのα-アミノ基の反応後、新生鎖にピューロマイシンが組み込まれる。

【発明の概要】

10

【0008】

本発明の目的は、活性タンパク質合成において天然ポリリボソームおよびリボソームを捕捉することの可能な新たな分子（およびそれらのキット）を提供することである。

【0009】

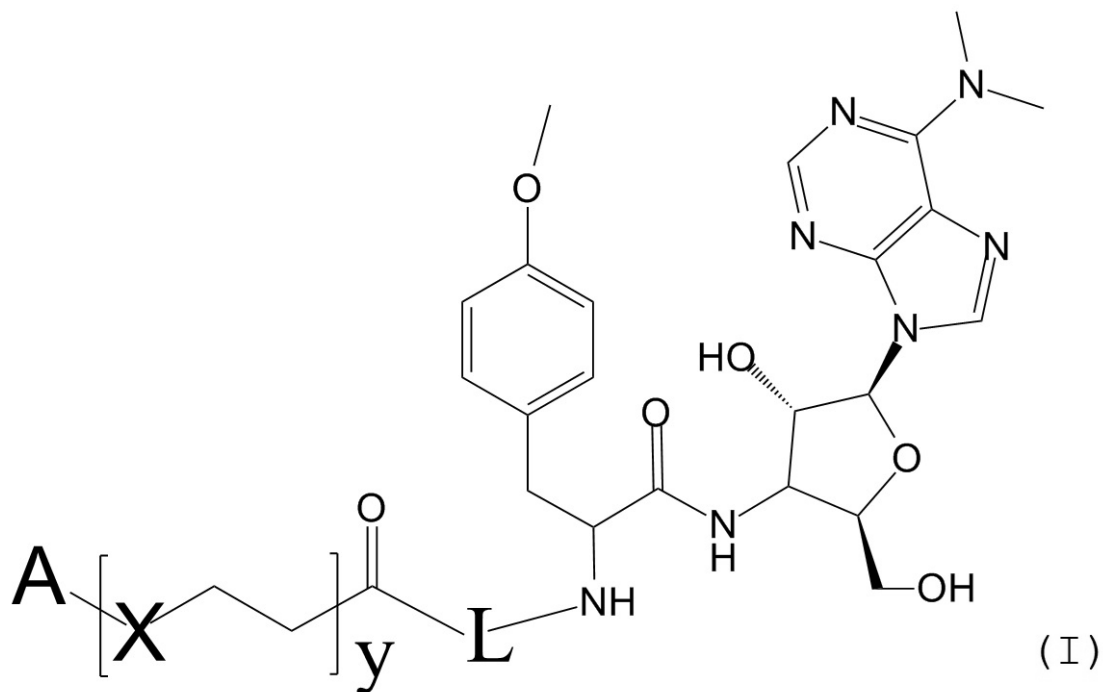
本発明によると、上記の目的は、本記載の不可欠な部分を形成するものと理解される、以降の特許請求項にて規定される方法のおかげで実現される。

【0010】

一実施形態において、本開示は、一般式（I）の分子およびそれらのエナンチオマーを開示する。

【化I】

20



30

式中、

40

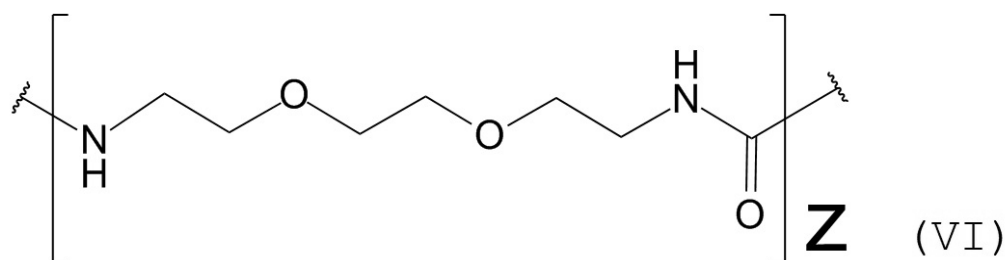
Aは、レセプターリガンド系のレセプタまたはリガンドから選択され、

Xは、酸素原子（O）または炭素原子（C）から選択され、

yは0から10までの整数であり、

Lは一般式（VI）の分子であり、

【化 V I】



Zは2から10の範囲に含まれる整数である。

10

【0011】

さらなる実施形態によると、本記載は、生体サンプルから少なくとも1種の活性リボソームを単離するための、一般式(I)の分子の使用を開示する。

【0012】

またさらなる実施形態によると、本記載は、生体サンプルから少なくとも1種の活性リボソームを単離するためのキットに関する。これは、

- i) 一般式(I)の分子を少なくとも1種含む第1試薬、および、
- ii) レセプターリガンド系のレセプタまたはリガンドの他方によって官能化されている固相であって、これにより、この固相が第1試薬に結合する、固相、を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

ここで本発明は、単なる例としての添付の図面を参照して説明されよう。

【0014】

【図1】3P構造のスキーム ビオチンは表面に結合する残基である。2つの2, 2'-エチレンジオキシビス-エチルアミンユニットは、「L」リンカーを形成し、ピュロマイシンはリボソームに結合する残基である。NHSはN-ヒドロキシスクシンイミド、CDIはN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジェフアミン(jeffamine)は2, 2'-エチレンジオキシビス-エチルアミン。

【0015】

30

【図2】3P分子のLCESI-MS解析 上図：全イオン電流(TIC)クロマトグラム(上)、およびλ280nmにおけるUVクロマトグラム(中)が、RP18カラム(Phenomenex Kinetex、#00G-4601-E0、5μm C18 100Å - 250×4.6mm)、溶出液 98%水 2%アセトニトリルで5分間、その後、35分間の100%アセトニトリルへ、を使用して得られた。17.5分におけるピーク(下)は、報告されている構造と一致するESI(+)-MS(イオントラップ質量分析器)フルスキャン質量スペクトルを示す。特に、m/zが1046.5における[M+H]⁺は、その分子式C₄₇H₇₂N₁₁O₁₄S⁺と一致する。

【0016】

【図3】3P分子のUV-VISスペクトル 図2に示されるクロマトグラムにおける主要なピーク(3P)の、フォトダイオードアレイによってオンラインで取得されたUVスペクトル。

40

【0017】

【図4】3P分子の¹H-NMRスペクトル DMSO-d₆中で5mMの3Pの溶液の、300Kで検出された400MHzの¹H-NMRスペクトルである(ppmスケールキャリブレーションに対する参照として残留信号が使用される、δ_H=2.50ppm)。緩和遅延20秒、パルス幅8μ秒、過渡数128。

【0018】

【図5】3P分子の¹³C-NMRスペクトル DMSO-d₆中で5mMの3Pの溶液の、300Kで検出された100MHzの¹³C-(1Hはデカップリングされている)N

50

MRスペクトルである（ppmスケールキャリブレーションに対する参照として残留信号が使用される、 $\delta_c = 39.5$ ppm）。緩和遅延10秒、パルス幅15 μ 秒、過渡数5600。

【0019】

【図6】3PのCOSYスペクトル DMSO d₆中で5mMの3Pの溶液の、300Kで検出された400MHzの¹H-¹H COSY-NMRである（ppmスケールキャリブレーションに対する参照として残留信号が使用される、 $\delta_H = 2.50$ ppm）。緩和遅延3秒、 2048×512 取得マトリクス。

【0020】

【図7】3P合成の全体の略図

10

【0021】

【図8】ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズによる3Pの枯渇 ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズの添加後に、上澄みの吸光度（a. u.、275 nm）が測定される。ビーズは磁気ラックでプルダウンされる。ビーズ量の増加は、溶液中の遊離した3Pの漸進的減少を引き起こす（Nanodrop ND-1000 UV-VIS分光光度計により測定される）。データは、三重反復実験（n=3）の平均を表す。

【0022】

【図9】ルシフェラーゼ遺伝子のインビトロ無細胞発現に対する3Pおよびピューロマイシンの効果 様々な濃度のピューロマイシンおよび3Pが存在する中でのルシフェラーゼタンパク質生成（左のパネル）。εラベルしたビオチン化されたリジン-tRNAを反応に対して添加して、蛍光ルシフェラーゼがインビトロで発現される（90分）。ストレプトアビジン-HRPによるインキュベーション後、化学発光によってタンパク質が視覚化される。散布図は、様々な濃度のピューロマイシン（0 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、および10 μ M）が存在する中でのルシフェラーゼ発現の阻害を示す（中央のパネル）。黒線は、ピューロマイシン濃度の関数としての、ルシフェラーゼ発現の減衰を説明する最良のフィッティングである（ $y = A \times e^{x/b}$ ）、ここで、 $A = 100$ および $b = 0.020 \pm 0.003$ ）。ヒストグラムは、様々な濃度の3P（0 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、および10 μ M）が存在する中でのルシフェラーゼ発現の阻害を示す（右のパネル）。最終的な体積50 μ L。エラーバーは、三重反復実験（n=3）から算出されたs. d.を表す。（*）= t検定p値<0.01。

20

30

【0023】

【図10】3Pの存在下での蛍光ルシフェラーゼおよび高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）の発現 （a、上図）ルシフェラーゼタンパク質発現に対する3Pの効果。εラベルされたビオチン化されたリジン-tRNAが、タンパク質生成をSDS-PAGEによってモニタリングするために使用される。（a、下図）対照（インプット、3P無しの反応混合物）に対し、ウェスタンブロット（上）に報告されるバンドの相対的定量化（密度倍率変化）を表したヒストグラム。反応は、最終的な体積50 μ LのIVTT euk-mix中で実行される。エラーバーは、二重反復実験から算出されたs. d.を表す。（b、上図-左）EGFP発現に使用されるプラスミドのスキーム。遺伝子をクローン化するために使用される制限部位が報告される。（b、上図-右）ウェスタンブロット解析によってモニタリングされる、EGFP発現に対する3Pの効果。反応は、最終的な体積50 μ LのIVTT euk-mix（上）またはIVTT pro-mix（下）で実行される。（b、下図）IVTT euk-mix中でのEGFP発現に対する3Pおよび3PPの効果。

40

【0024】

【図11】インビトロ転写／翻訳、タンパク質合成の単離および検出、使用された手法のスキーム （a）陽性対照（蛍光ルシフェラーゼ、LUC SP6、G）および陰性対照（空pGEMEXベクター、R）として使用された2つのプラスミドの略図、および、RNAおよびタンパク質視覚化に使用されるベクターおよび方法の概略図。ビオチン化された

50

タンパク質測定のためのPCR、発光アッセイ、およびSDS-PAGEにより、RNAの発現および特異的に官能化されたビーズ上の転写産物の濃縮を検出することが可能となる。(b) 無細胞インビトロ転写-翻訳の間に生成された転写産物をプルダウンするために使用される手順。段階1から6まで次のとおり。(1) インビトロ転写-翻訳反応にプラスミドが加えられた。(2) 3PおよびmPによってビーズが官能化された。(3) 40分のインキュベーション後、官能化されたビーズにIVTT euk-mixが加えられ、4℃において、2rpmでの軌道回転中で1時間インキュベートされた。(4) 非特異的な結合を除去するため、ビーズは、それらが磁石から分離しないように洗浄された。(5/a) Trizol抽出およびイソプロパノール沈殿の後、(5/b) DNA汚染の可能性を回避すべくRNAがDNアーゼIによって消化され、(5/c) cDNA合成に使用される。(6) ルシフェラーゼ遺伝子の存在および陰性対照転写産物を検出するため、RT-qPCRによってサンプルが解析された。

10

【0025】

【図12】 活性翻訳中のmRNAの選択的濃縮 (a) 実験手順の略図。段階1から6まで次のとおり。(1) それぞれ0.25μgの蛍光ルシフェラーゼプラスミド(G)および陰性対照プラスミド(R)に対するプラスミドエンコーディングが、製造業者の使用説明書(TNT Quick coupled transcription/translation, Promega)に従って、インビトロで転写および翻訳される。翻訳を阻害すべく、時間(t)=0において薬剤が加えられる。インキュベーション時間(Δt1)は、34℃において40分。G+Hは、ハリントニン(H、2μg/mL)を有するルシフェラーゼ遺伝子。G+Pは、ピューロマイシン(P、5μg/mL)を有するルシフェラーゼ遺伝子。(2) その後、サンプルは、シクロヘキサミド(CHX、10μg/mL)によって、34℃において3分間インキュベートされる。(3) 活性翻訳中のリボソームが3PビーズまたはmPビーズによってプルダウンされる。(4) ビーズが分離され、洗浄される。(5/a-c) RNAが抽出され、DNアーゼIで処理され、ランダムヘキサマーによって単一ストランドのcDNAへと逆転写される。(6) 各サンプルからの等しい量のRNA(60ng)がRT-qPCRに使用される。手順の詳細な説明は「材料および方法」に報告される。(b) 対照ビーズ(mP)と比べて3Pビーズによって捕捉された転写産物の全量に対するLog2スケールの倍率変化(fold change)値であり、以下では「濃縮」と呼ばれる。(*)=t検定p値=0.03(G対G+H)、p値=0.02(G対G+P)、p値=0.04(G対R)。n=5。エラーバーは、s.d.を表す。使用されたビーズはDynabeads、Life Technologies、#65001。

20

30

【0026】

【図13】 インビトロ転写/翻訳系によって生成されたタンパク質およびRNA (a) 非放射性検出システム(Transcendent, Promega、#L5080)と結合されたインビトロ転写/翻訳(TNT Quick In Vitro transcription translation system, Promega、#L2881)90分後の陽性ベクター(G、蛍光ルシフェラーゼ)および陰性ベクター(R、空ベクター)の全翻訳。膜へのゲル移動が化学発光で視覚化された後、タンパク質がSDS-PAGEにて移動された。(b) mPまたは3P官能化されたビーズによる精製後に得られた単一ストランドのcDNAから生成されたPCR生成物(詳細な手順は「材料および方法」を参照のこと)。ゲルはTAEアガロース1%。分子量「a」およびフラグメント長「b」が、明確さのためにラダーの側に報告されている。

40

【0027】

【図14】 RT-qPCRからのPCR生成物によるアガロースゲル 図12のaに説明される手順に従って得られた陽性(G、蛍光ルシフェラーゼ)、陰性(R、空ベクター)、および18S rRNAのPCR増幅からのアンプリコン。陽性対照G、ハリントニン(2μg/mL)でインキュベートされた陽性対照G+H、ピューロマイシン(10μg/mL)でインキュベートされた陽性対照G+P、陰性ラダーのフラグメント長Rが左に報

50

告されている。アガロースゲルTAE 1%。

【0028】

【図15】EGFPタンパク質のインビトロ発現後の活性に翻訳されたGFP転写産物の単離 (a、左) EGFP発現に対して使用される2つのプラスミド (pBluescript II KS+、Genscript; pPR-IBA2、IBA、#2-1391-000)。このスキームは、EGFP遺伝子の上流側の特徴を示す (濃い灰色の長方形はEGFP、黒はLacZ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、白は翻訳エンハンサーリボソーム結合シーケンス、灰色はT7プロモーター)。(a、右)タンパク質発現に対する溶液中の遊離した3Pおよびハリントニンの効果を報告するウエスタンブロット (図に報告される濃度、インキュベーション時間は1時間、30℃にて、2 μ gのプラスミド、50 μ LのIVTTEuk-mix)。(b、左)pBluescript II KS+プラスミドからの反応50 μ L中でのEGFP発現の全免疫沈降 (IP)を示すウエスタンブロット (混合物中2 μ gのプラスミド、露出時間は500秒。20 μ LのDynabeads Protein G、2 μ gの抗GFP抗体、Life tech、#A11122によって官能化されたInvitrogen、#10003DによってIPが実行される)。(b、中央)pPR-IBA2プラスミドからのEGFP発現 (IVTTEuk-mix中の300ngのプラスミド、露出時間は5秒。1 μ Lの反応混合物がゲルに充填される)。(b、右)2つの反応混合物中のEGFP RNAのRT-qPCR解析： h^- および h^+ 。相対存在量が $2^{-(39-Cq)}$ として報告される。ここで39はサイクル数であり、Cqは定量化サイクルである)。(c、左)IVTTEuk-mixによる25分間のインキュベーション後の、mPビーズに対する3Pビーズでの活性に翻訳されたEGFP RNAの倍率変化濃縮 (50 μ Lの混合物中2 μ gのプラスミド、30℃)。(c、右)タンパク質発現の様々な時点における、3Pビーズによって捕捉されたEGFP RNAの倍率変化濃縮 (IVTTEuk-mix)。pBluescript II KS+プラスミドからのEGFP。反応条件は、50 μ Lの混合物中2 μ gのプラスミド、30℃。使用したビーズはStreptavidin Mag Sepharose (商標)。

【0029】

【図16】精製されたショ糖フラクションにおけるRibolace (左)凡例に報告されるように、非処理の細胞 (薬剤無しIおよび薬剤無しII。ここで、IおよびIIは2つの独立な生物学的複製)、または、ハリントニンで処理された細胞 (薬剤有り) から得られたポリソームプロファイル。TE=全体の翻訳効率^{4 5}。MCF7細胞の溶解物から得られたショ糖密度勾配ポリソームプロファイル。(右)全rRNAに対する3Pビーズで抽出されたrRNAの間の比として各フラクションについて算出されたrRNA濃縮。80S (フラクション1)に対して正規化されている。これらの値は、1%のTBEアガロースゲル中の18Sおよび28Sの両者のバンドのデンストメトリー解析から得られている。使用したビーズはStreptavidin Mag Sepharose (商標)。

【0030】

【図17】活性翻訳中のリボソームを細胞溶解物から捕捉するための最適化された手順 (a、左) リボソームタンパク質 (RPL26、RPS6) および翻訳開始に関連するタンパク質 (eIF4B、eIF4A1) のウエスタンブロット。3Pビーズ (3P) および対照ビーズ (mP) によるストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズが3P分子によって官能化される (段階1)。その後、3Pビーズは、粗製MCF7溶解物に加えられる (段階2) (通常5-20 μ L、 $\sim 0.4-1.5 \times 10^5$ 細胞に対応する)。ビーズプルダウン、上澄みの分離、および洗浄の後、タンパク質およびRNAが回収され得る (段階3および4)。洗浄段階の間、ビーズは磁石から分離されない (詳細な手順は「材料および方法」を参照のこと)。

【0031】

【図18】官能化されたビーズにおけるタンパク質濃縮 (a、左) リボソームタンパク質 (RPL26、RPS6) および翻訳開始に関連するタンパク質 (eIF4B、eIF4A1) のウエスタンブロット。3Pビーズ (3P) および対照ビーズ (mP) によるブ

ルダウンが、未結合フラクション（未結合、全未結合タンパク質含有量のうちの1/10が各ウェルに充填されている）中の相対タンパク質含有量と一緒に報告されている。「材料および方法」に説明されるように、MCF7細胞株から細胞溶解物が得られる。（a、右）リボソームタンパク質の捕捉に対する塩濃度の効果。10mMから500mMへのNaCl濃度の増加は、3Pビーズによるリボソームタンパク質の捕捉を阻止する。NSC-34細胞株からの細胞溶解物。（b、左）捕捉効率に対する様々な刺激の効果。非処理の細胞（N）、12時間の血清飢餓後にEGF（1μg/mL、4時間）で処理された細胞（E）、および、12時間にわたる血清飢餓中の細胞（S）からの、3PビーズおよびmPビーズによるプルダウン後のRPS6およびRPL26のウェスタンブロット。右側の最後の3つの線は、ショ糖密度勾配超遠心分離法の後で、全フラクション（N-全）、ポリリボソームフラクション（N-ポリ）、および、サブポリリボソームフラクション（N-サブ、右側のパネル）から抽出された全タンパク質を示す。（b、右）左側は、密度倍率変化比を表した相対定量化（3P/mP、Log2スケール）。データは全タンパク質含有量に正規化されている。右側は、ポリソームタンパク質含有量に対する3Pビーズおよび全サブポリソームタンパク質含有量についてのRPL26倍率変化比（Log2スケール）。（*）t検定p値=0.02（RPL26）、t検定p値=0.01（RPS6）、t検定p値=0.01（サブ/ポリ）。n=3。各サンプルに対して充填される体積は10μL。

10

【0032】

【図19】ポリソームに関連した、または関連していないタンパク質の3PビーズまたはmPビーズによる分離 ビーズからのタンパク質抽出後、ACTBおよびGAPDHのようなポリリボソームに関連していないタンパク質は検出されなかった。

20

【0033】

【図20】官能化されたビーズにおけるRNA濃縮 （a、左）非処理の細胞（N）、12時間の血清飢餓後にEGF（1μg/mL、4時間）で処理された細胞（E）、および、12時間にわたる血清飢餓中の細胞（S）から、ショ糖密度勾配分画、酸-フェノール抽出、およびイソプロパノール沈殿によって全RNAが回収された。（a、右）3PビーズおよびmPビーズから抽出された全RNA、ポリリボソーム（ポリ）フラクション、サブポリリボソーム（サブ）フラクション、および全RNAが、MOPS-ホルムアルデヒドアガロースゲル（1%のアガロース）において移動された。レーン：（N）非処理の細胞から抽出されたRNA、（E）EGF処理された細胞、（S）血清飢餓細胞から抽出されたRNA。28Sおよび18S rRNAに対応するバンドが示されている。MCF7細胞からの溶解物。（b、左）「a」で報告されるRNAのNanodrop定量化（y-左）およびRIN（y-右）。各条件について、全RNAに対する各サンプルの収量率が薄い灰色で報告されている。RIN値≥8（灰色の破線）はRNAサンプルの良好な品質を示す。（b、右）mPビーズによって抽出された全RNAに対する、3Pビーズから抽出された全RNAの相対倍率変化（n=6、t検定p値=0.04、n=3。MCF7非処理細胞からの溶解物）。

30

【0034】

【図21】ハリントニンで処理された、または処理されていない細胞溶解物から、Ribolaceによって抽出されたRNA （左）3P官能化されたストレプトアビジンビーズ（#28-9857-99、GELifesciences）によってMCF7細胞溶解物がインキュベートされた。3Pビーズにおける全RNAがTrizolによって抽出され、アガロースゲルに充填された。（右）Ribolace精製後に抽出され、SYBR（登録商標）Gold（#S11494、ThermoScientific）により染色された1%アガロースゲルに充填されたRNA。Mは0.5-10kb RNAラダー、#15623200、LifeTechnologies。h⁺はハリントニン（2μg/mL、2時間）で処理された細胞。h⁻はハリントニンで処理されていない細胞。または代替的に、FBS⁺は指数関数的な成長にある細胞。FBS⁻は血清飢餓（0.5%のFBS、18時間）下の細胞。TBEアガロースゲル。

40

50

【0035】

【図22】RNA-seq解析に使用される手順 それぞれ異なる条件からのMCF7細胞溶解物（非処理の細胞（N）、EGF処理された細胞（E）、血清飢餓細胞（S））が以下のように処理された（段階1-4）。（1）ショ糖密度勾配または官能化されたビーズに対して溶解物が加えられる。（2）ポリリボソームがビーズによって分離される。ポリリボソームフラクションおよび全細胞質RNAが並行して抽出される。ポリリボソームはP、全はT。（3）プロテイナーゼK（Life technologies、#E00491）消化の後、3Pビーズ（B）およびmPビーズ（M）から、およびショ糖密度勾配フラクション（それぞれ1mL）からRNAが抽出され、同じプロファイルからポリリボソームと全RNAの両者を得る。酸フェノール抽出によってRNAが抽出される。（4）Illumina TruSeqライブラリ調製キットを使用してライブラリが調製され、Illumina HiSeq2000によって配列決定が実行される。

10

【0036】

【図23】EGF処理されたサンプルおよび血清飢餓サンプルの相関 EGF処理されたもの（上）および血清飢餓（下）の読み（FPKM）の散布図。mP-FPKMよりも高い3P-FPKM数を有する遺伝子のみが解析に含まれる。EPはEGF処理された細胞からのポリソームRNA。ETはEGF処理された細胞からの全RNA。EBはEGF処理された細胞からの3PビーズRNA。SPは血清飢餓細胞からのポリソームRNA。STは血清飢餓細胞からの全RNA。SBは血清飢餓細胞からの3PビーズRNA。ピアソンの相関およびスピアマンの相関（ p 値 <0.05 ）が各グラフに対して報告されている。楕円は95%信頼水準を表す。 R^2 は自由度修正済み決定係数。

20

【0037】

【図24】対照サンプルの相関（a、左）この表は、データセットの厳密性を増加させた場合の（1倍から20倍まで、すなわち、対照に対して20倍多くのビーズ-FPKM）、様々なスピアマンの相関を報告する。（a、右）それぞれ3倍、5倍、および20倍のデータセットについての散布図。（b）20倍データセットに対するズームアウト（x、y、zの四角）。NPは非処理の細胞からのポリソームRNA。NTは非処理の細胞からの全RNA。NBは非処理の細胞からの3PビーズRNA。ピアソンの相関およびスピアマンの相関（規定されていない場合は p 値 <0.05 ）が各グラフに対して報告されている。楕円は95%信頼水準を表す。mP-FPKM数よりも高い3P-FPKM数を有する遺伝子のみが解析に含まれる。 R^2 は自由度修正済み決定係数。

30

【0038】

【図25】RT-qPCRデータとのRNA-seqデータ的一致 8つの遺伝子（PALLD、PLK3、IL27RA、NCS1、VEGFA、DUSP5、PDCD4、PAPSS2）および4つの異なるRNA精製である3P、mP、ショ糖密度勾配、および全RNAについて、ピアソン相関係数変化測定を使用した、RT-qPCRデータ（y軸）とのRNA-seq（x軸）の相関。

【0039】

【図26】RT-qPCRによるNGSデータの解析および検証：DEGおよびRT-qPCRの相関（a-左）3つのデータセットの共通部分によるベン図（左）。'++'は、EGF処理された細胞および血清飢餓細胞の両者において3P-fpkM>mP-fpkMを有する遺伝子。'ビーズFC>0'は、3Pビーズにおいて正の倍率変化（FC）を有する遺伝子。'p値<0.05'は、p値<0.05を有する遺伝子。各カテゴリに対する遺伝子の数が括弧内に報告されている。（a-右、上図）Log2スケールの'++'データセットに対する倍率変化の正規分布を説明する確率散布図（ $n=6, 223$ 遺伝子）。左から右へと向かって、3P-RNA、ポリリボソームショ糖密度勾配、全RNA、およびmP-RNAに対して得られた倍率変化。正規分布パラメータはミュー、正規分布の平均。シグマは正規分布の標準偏差。破線は理論上の分布。3Pビーズにおいて正の倍率変化を有するDEGは3, 247（薄い灰色の四角）。（a-右、下図）3つのデータセットの共通部分から現れる共通の遺伝子（ $n=70$ ）が比較される。散布図は左から右の

40

50

順で、EB/SB（3 P ビーズからのRNA）と比較したEP/SP（ポリリボソームシヨ糖密度勾配RNA）、EB/SBと比較したET/ST（全RNA）、およびET/STと比較したEP/SP。EPはEGF処理された細胞からのポリリボソームRNA。ETはEGF処理された細胞からの全RNA。EBはEGF処理された細胞からの3 P ビーズRNA。SPは血清飢餓細胞からのポリリボソームRNA。STは血清飢餓細胞からの全RNA。SBはRNA血清飢餓細胞からの3 P ビーズ。楕円は95%の信頼水準を表す。（b）妥当性を確認された8つの遺伝子（図26参照のこと）のうちから選択された4つの遺伝子（NC S 1、I L 2 7 R A、D U S P 5、V E G F A）に対するRNA-seqおよびRT-qPCR倍率変化（FC）を表したヒストグラム。ヒストグラムにおいて、黒の棒はRT-qPCR倍率変化、白の棒はRNA-seq倍率変化、t検定（*）= p値<0.05。

10

【0040】

【図27】RNA-seqデータのサブセットの相関 それぞれの四角の左にあるベン図は、プロットされた倍率変化（Log2スケール）データセットのサブグループを示す。'+ +'は、EGF処理された細胞および血清飢餓細胞のうち3 P-FPKM>mP-FPKMを有する遺伝子。'ビーズFC（Log2）>0'は、3 P ビーズで正の倍率変化を有する遺伝子。'p値<0.05'は、p値<0.05を有する3 P ビーズからの遺伝子。散布図は上図から下図への順で、'p値<0.05' DEGデータセット（n=488、四角I）、'p値<0.05'且つ'+ +'データセット（n=112、四角II）、'p値<0.05'且つ'+ +'且つ'FC（Log2）>0'遺伝子データセット（n=70、四角III）、'p値<0.05'且つ'+ +'且つ'FC（Log2）<0'遺伝子データセット（n=42、四角IV）。EPはEGF処理された細胞からのポリソームRNA。ETはEGF処理された細胞からの全RNA。EBはEGF処理された細胞からの3 P ビーズRNA。SPは血清飢餓細胞からのポリソームRNA。STは血清飢餓細胞からの全RNA。SBはRNA血清飢餓細胞からの3 P ビーズ。各グラフに対してスピアマンの相関が報告されている。楕円は95%の信頼水準を表す。R²は自由度修正済み決定係数。

20

【0041】

【図28】3 P ビーズから抽出されたRNAは、全タンパク質存在量における変化を予測するための、全RNAおよびポリソームRNAに対するより良好な代理である。（a）全（ET/ST）、シヨ糖密度勾配ポリリボソームフラクション（EP/SP）および3 P対mP比（Log2（EB/SB）-Log2（EM/SM））に対するEGF刺激に応答したLog2スケールFCの散布図。左から右へと順に、ET/ST（全RNA）と比較したEP/SP（シヨ糖密度勾配ポリリボソームRNA）、3 P対mP比と比較したEP/SP（シヨ糖密度勾配ポリリボソームRNA）、3 P対mP比と比較したET/ST（全RNA）。EPはEGF処理された細胞からのポリリボソームRNA。EPはEGF処理された細胞からのポリリボソームRNA。ETはEGF処理された細胞からの全RNA。EBはEGF処理された細胞からの3 P ビーズRNA。SPは血清飢餓細胞からのポリリボソームRNA。STは血清飢餓細胞からの全RNA。SBはRNA血清飢餓細胞からの3 P ビーズ。各プロットに対して相関値およびp値が報告されている。楕円は95%の信頼水準を表す。（b）タンパク質およびRNA倍率変化。黒の棒はRT-qPCR倍率変化、白の棒はRNA-seq倍率変化、薄い灰色の棒はタンパク質倍率変化。タンパク質バンド強度の定量的解析が、各プロット（n=3）の右側のウエスタンブロットへ参照される。PALLDは、通常のアクチン細胞骨格の組織に必要な細胞骨格タンパク質であり、細胞形態学、運動性、細胞接着、および、細胞-細胞外マトリクス相互作用に関与する。PLK3（ポロ様キナーゼ）は、細胞周期調節およびストレス反応に関与するセリン/スレオニン-タンパク質キナーゼである。ハウスキーピングタンパク質はACTB、GAPDH、RPL26。ACTBはベータアクチン、RPL26はリボソームタンパク質L26。t検定（*）= p値<0.05。EはEGF処理されたものであり、Sは血清飢餓。R²は自由度修正済み決定係数。

30

40

【0042】

50

【図29】倍率変化の相関 各欄の第2および第3のプロットは、3P倍率変化信号からバックグラウンド（対照ピーズ倍率変化）を引いたものを含んでいる。左から右へと順に、図26には報告されなかった異常値を含む' p 値<0.05'遺伝子データセットの散布図（ $n=436$ 、左の四角）、' p 値<0.05'且つ'++'データセットの散布図（ $n=108$ 、中央の四角）、' p 値<0.05'且つ'++'且つ' $FC>0$ '遺伝子データセットの散布図（ $n=59$ 、右の四角）。EPはEGF処理された細胞からのポリソームRNA。ETはEGF処理された細胞からの全RNA。EBはEGF処理された細胞からの3PピーズRNA。SPは血清飢餓細胞からのポリソームRNA。STは血清飢餓細胞からの全RNA。SBは血清飢餓細胞からの3PピーズRNA。 R^2 は自由度修正済み決定係数。

10

【0043】

【図30】EGF刺激に応答したRNAおよびタンパク質倍率変化 右側のウェスタンブロットを参照してのタンパク質バンド強度の定量的解析（ $n=3$ ）。ハウスキーピングタンパク質はGAPDH、 t 検定（*）= p 値<0.05。EはEGF処理されたもの、Sは血清飢餓。白のヒストグラムはRNA-seq倍率変化。薄い灰色はタンパク質倍率変化。hb-EGFはヘパリン結合EGF様成長因子（上図）。CYP27A1はシトクロムP450ファミリー27サブファミリーAメンバ1（下図）。

【0044】

【図31】RiboLaceによるリボソームプロファイリング 本文「3Pに対する追加的な用途：リボソームプロファイリング」で説明される段階1-7の略図。

20

【0045】

【図32】3PピーズRNAにおけるリボソーム保護されたフラグメントの濃縮（a、左）ハリントニン（ $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ）によって2時間にわたって処理されたMCF7細胞（h+）または処理されていないMCF7細胞（h-）が、次のスキームに説明されるように処理される。（i）溶解、（ii）RNアーゼIによる消化、（iii）3P-dynabeadsピーズによる精製、（iv）TBE1%アガロースゲルにおけるRNA単離。（a、中央）単離されたリボソーム保護されたフラグメント（RPF）を報告するTBE-尿素ゲル（15%）。灰色の四角は、Ribo-seq解析にとっての対象となるバンドを特定し、長さが~30ヌクレオチドのフラグメントに対応する。（a、右）バイオアナライザに基づいた、3Pピーズによって捕捉されたRPFの相対倍率変化（ h^-/h^+ ）。（b）MCF7細胞溶解物およびマウス脳（TBE-尿素ゲル15%）から得られたRPFの間の比較。使用したピーズはDynabeads、Life Technologies、#65001。

30

【0046】

【図33】3P活性に対して提案されるメカニズム tRNA分子（上図、左）、ピュロマイシン（上図、中）、および3P（上図、右）。tRNA、ピュロマイシン、および3Pの間の相違が灰色で描かれている。リボソームに対する3Pの作用について提案されるメカニズム（下図）は、3P（薄い灰色のフォーク）が、活性翻訳中のリボソームのPTC中心に近いアクセプタ部位（A）に結合する。黒のフォークはtRNA。灰色ドットはアミノ酸鎖。RNAが黒線。5'末端が黒ドット。60Sおよび40Sリボソームサブユニットが楕円。Eは出口部位。Pはペプチジル転移部位。Aはアクセプタ部位。

40

【発明を実施するための形態】

【0047】

以下の説明においては、実施形態の完全な理解を提供すべく、多くの具体的な詳細が与えられる。これらの実施形態は、具体的な詳細の1または複数が無くても実施され得る。または、その他の方法、成分、材料などによって実施され得る。他の場合において、周知の構造、材料、または工程は、これらの実施形態の態様を曖昧にすることを回避すべく、示されていないか、または、詳細には説明されていない。

【0048】

本明細書を通して「1つの実施形態」または「一実施形態」との参照は、その実施形態

50

に関連して説明される特定の特徵、構造、または特性が、少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。従って、本明細書を通した様々な箇所における「1つの実施形態において」または「一実施形態において」というフレーズの出現は、必ずしも全てが同一の実施形態を指すものではない。さらに、特定の特徵、構造、または特性は、任意の適切なやり方で、1または複数の実施形態において組み合わせられてよい。

【0049】

本明細書において提供される見出しは、単なる便宜上のものであって、実施形態の範囲または意味を解釈するものではない。

【0050】

本記載において、活性ポリリボソームおよびリボソームの単離のための新たなピューロマイシン含有分子が開示される。この新たなピューロマイシン含有分子は、(i)細胞溶解物からのポリリボソームに関連したリボソーム、タンパク質、およびRNAの精製、および(ii)リボソームプロファイリング研究を可能にする。我々はこの技術を「Ribolace」と呼んだ。精製後、ポリリボソームに関連するRNAおよび単離されたタンパク質の検出が、標準的な(免疫ブロット法またはRT-qPCR)または「オミクス」技術(LC-MS/MSまたはRNA-seq)によって実行され得る。Ribolaceは、より高速(〜2時間)であり、30倍〜20倍少ない材料を必要とし、標準的な手法よりも安価で、あらゆる細胞溶解物からのトランスレートームの定性的または定量的スナップショットを生成するために迅速に使用され得る。

10

【0051】

ショ糖密度勾配分画を除くと、生体サンプルからのポリリボソームの多用途な単離に対して一般に使用されている他の技術は、現在のところ無い。より重要なこととして、抗体を使用せずに活性翻訳中の天然ポリリボソームを選択的に捕捉することのできる技術は無い。

20

【0052】

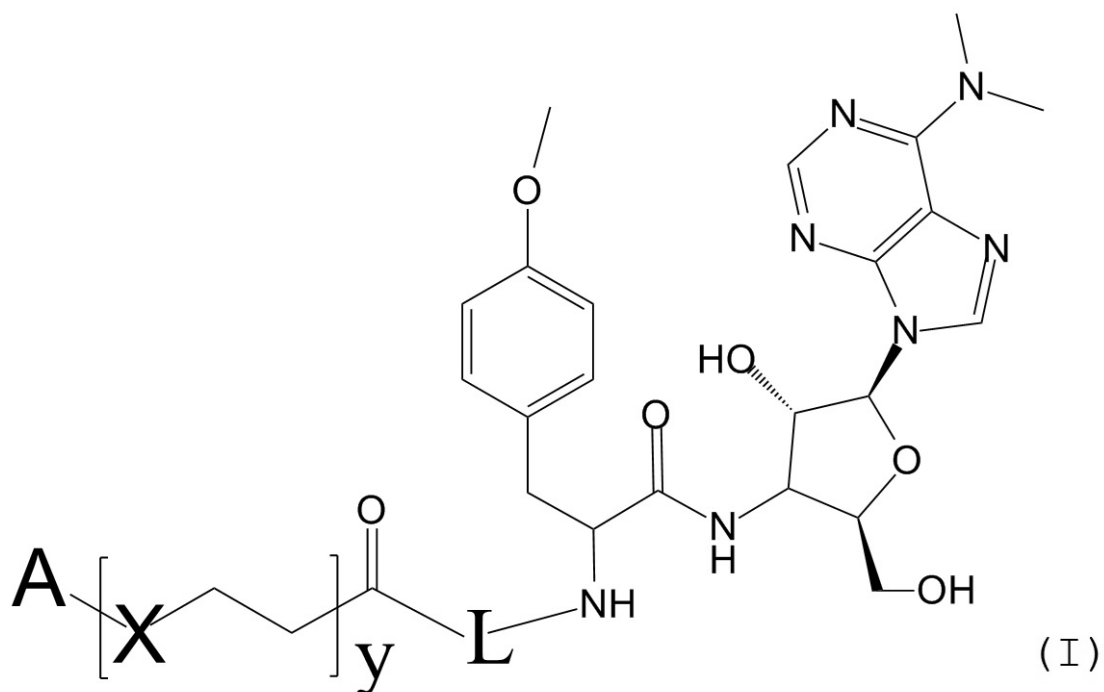
本記載は、活性翻訳下にある天然ポリリボソームおよびリボソームの抗体フリーおよびタグフリーな単離の第1の例である。新たなピューロマイシン含有分子の使用が、従来の「オミクス」解析に対する準備となる。これは、従来のショ糖密度勾配精製を置き換え、研究および診断の両者における新たな用途を切り開く。従って、本記載において証明される結果は、実用的な示唆、並びに基本的な示唆を有する。

30

【0053】

一実施形態によると、本記載は、一般式(I)の分子およびそれらのエナンチオマーに関する。

【化 I】



式中、

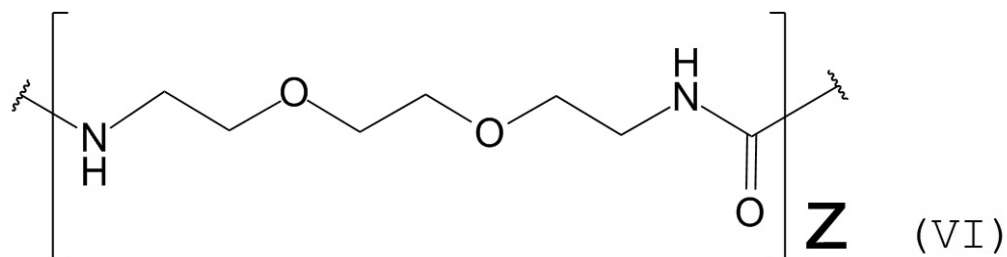
Aは、レセプターリガンド系のレセプタまたはリガンドから選択され、

Xは、酸素原子（O）または炭素原子（C）から選択され、

yは0から10までの整数であり、

Lは一般式（V I）の分子であり、

【化 V I】

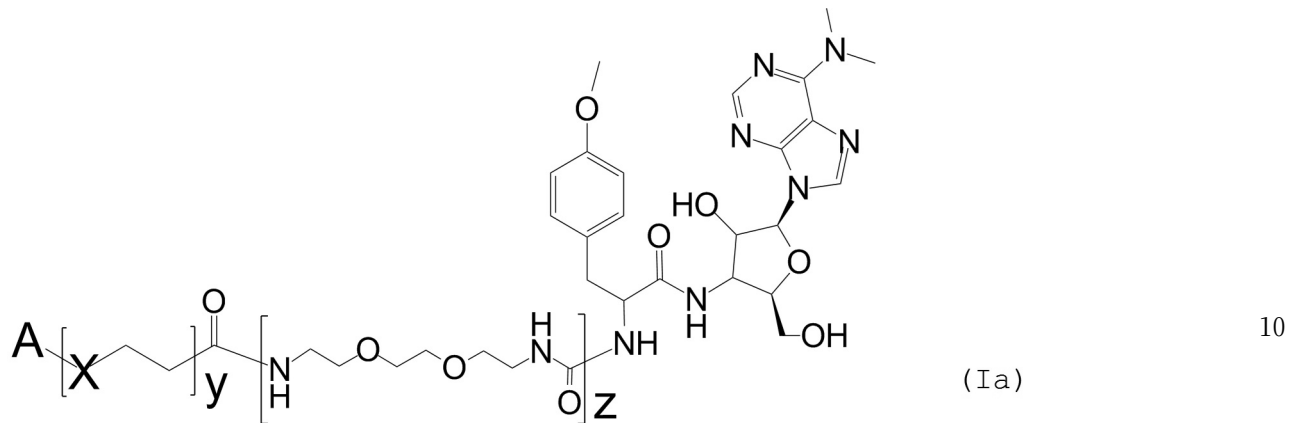


Zは2から10の範囲に含まれる整数である。

【0054】

残基Lの末端基NHおよびNH-C（O）は、式（I a）に示されるように、式（I）のC（O）基およびNH基とそれぞれ結合される。

【化 I a】



【0055】

一実施形態によると、「A」は、固相を結合させることの可能な反応基であり（共有結合または非共有結合によるものであり、レセプターリガンド系のリガンドまたはレセプターから選択される）、分子の十分な密度を固相に提供して、活性リボソームの結合を効果的に可能とする。

【0056】

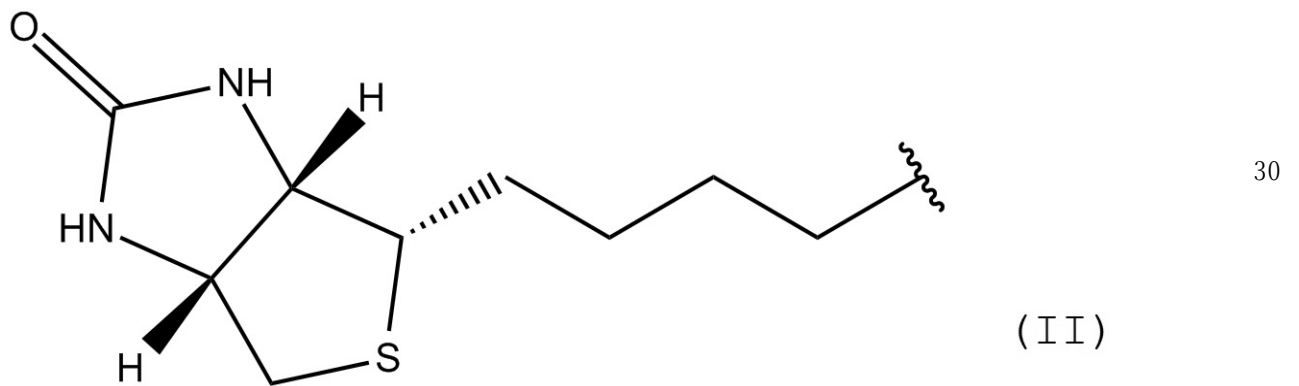
好ましい実施形態によると、このリガンドーレセプター系は、ビオチンーアビジン、ビオチンーstreptavidin、ビオチンーneutravidin（neutravidin）、アルキン残基ーアジド残基から選択される。

20

【0057】

さらなる好ましい実施形態において、「A」は以下の基から選択される。

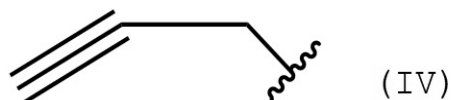
【化 I I】



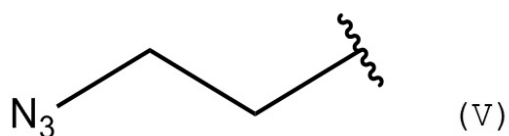
【化 I I I】



【化 I V】



【化 V】



50

ここで、式 (I I) はピオチン (I I) を含む分子を表し、式 (I I I) および (I V) はアルキン残基を表し、式 (V) はアジド残基 (V) を表す。

【0058】

好ましい実施形態において、「L」は、図1に示されるように、カルボニル基 (CO) を伴って繰り返される2つの2, 2'-エチレンジオキシービス-エチルアミンユニット (ジェフアミン (j e f f a m i n e)、詳細は「材料および方法」を参照のこと) から成る。

【0059】

ピューロマイシン分子 (化学式 (I) の右手側にある) は、リボソームにおいて活性な部分である。ピューロマイシンおよびその誘導体は、タンパク質合成を阻害し、その1級アミノ基によるtRNAのアミノアシル化に続いてリボソームを分解し^{4 6}, ^{4 7}、新生ピューロマイシン化されたペプチドをリボソームから放出すること^{4 8}が知られている。本明細書において、我々は、「材料および方法」において説明されるように、結合剤カルボニルジイミダゾール (CDI) を使用することによって、N-BOC保護されたジェフアミンを結合するピューロマイシンのα-アミノ基を化学的に保護する。

【0060】

好ましい実施形態によると、式 (I) の分子を含むピューロマイシン (3 P分子と名付ける) が、一般式 (I) から生成された。ここで、図1に示されるように、「A」はピオチン残基において特定され、「y」は0に等しく、nは2に等しい。完全な合成の概略図は、図7に報告されている。

【0061】

本記載は、式 (I) の新たなピューロマイシン含有分子を、高い結合能力を有する固相と一体化する手順を開示し、この手順を、活性タンパク質合成に参与するポリリボソームの濃縮の解析に対して許容できる信号対ノイズ比へと最適化する。

【0062】

式 (I) の新たなピューロマイシン含有分子は、適切に官能化された固相 (すなわち、残基「A」のレセプターリガンド系のレセプタまたはリガンドのうちの他方によってコーティングされている) を結合させる。これは、溶液中で遊離した場合、無細胞系における翻訳を阻害する。これは、翻訳を受けている転写産物を特異的に捕捉し、複雑な生体サンプル (すなわち、細胞溶解物) において使用され得る。その点に関しては、どんな1つの理論にも束縛されることは望まないが、発明者達は、式 (I) の分子がリボソームにおけるピューロマイシンの結合部位、ほぼ確実にA部位、に可逆的に結合する (図33) ということをこの結果が示唆していると信じる理由を有する。

【0063】

全体的に見て、式 (I) の新たなピューロマイシン含有分子の使用は、少なくとも3つの重要な利点を組み合わせる。(i) 必要なサンプルの量が小さい ($A_{260} < 45 \text{ a.u.}$ 、100mmΦペトリ皿において80%コンフルエンスMCF7細胞からの300μLの全細胞溶解物の~1/30、すなわち、 $0.75 - 1.5 \times 10^5$ 細胞を意味する)、(ii) 簡単、迅速 (~2時間)、および安価 (1サンプル当たり~5ユーロ) な手順、並びに、(iii) 「究極の基準」方法に対し、タンパク質レベルを画定することにおけるより高い精度。

【0064】

最後に、我々は、ポリソームプロファイリングに対してのみでなく、リボソームプロファイリング研究に対してもまたこれが使用され得ることを示し、この技術の柔軟性を立証する。

【0065】

本記載の別の実施形態は、本明細書に開示される式 (I) の新たな分子を含む、ポリリボソーム単離/精製および/またはリボソームプロファイリングのためのキットもまた包含する。

【0066】

10

20

30

40

50

一実施形態によると、このキットは以下を含む。

(i) 一般式 (I) を有する分子を 1 または複数含む第 1 試薬。好ましい実施形態において、この分子は乾燥した固体状態である。バイアルを含む第 1 試薬への水性サンプルの添加は、乾燥した試薬の可溶化をもたらす、これを生体物質と相互作用させる。

(ii) 式 (I) の活性分子の機能的結合に適しており、その結果、任意の生体サンプルの溶液からポリリボソームを分離するのに適した固相。この固相はレセプターリガンド系のレセプターまたはリガンドのうちの他方によって官能化されているので、その結合能力によってこの固相は特徴付けられる。好ましくは、この固相は、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、アビジン、アジド残基、アルキン残基のうちの 1 つによって官能化される。

10

【0067】

式 (I) の活性分子に向けたこの固相の結合能力は、 $10 \text{ pmol} / \mu\text{g}$ よりも高くなくとも、優先的には $200 \text{ pmol} / \mu\text{g}$ よりも高くなくともではない。(固相に結合された) 第 1 試薬を生体サンプルと混合した場合、後者は、(260 nm での吸光度単位で測定して) $0.002 \text{ a.u.} / \mu\text{L}$ から $2 \text{ a.u.} / \mu\text{L}$ まで濃縮されてよい。測定波長は、230 から 300 nm の範囲から、好ましくは 240 から 290 nm の範囲で適切に選択され得る。測定は、好ましくは、光の吸光度の強度を測定することの可能な光学的装置によって実行される。

【0068】

第 1 試薬による生体サンプルのインキュベーション時間は、10 分から 24 時間まで、優先的には 20 分から 1.5 時間の間であってよい。

20

【0069】

さらなる実施形態においてこのキットは、以下のうちの少なくとも 1 つを含んでよい。

(iii) 活性分子を可溶化させて、固体表面での適切な結合を可能にするために使用され得る可溶化溶液。この溶液は、以下の組成物を有してよい。2 M の NaCl、1 mM の EDTA、10 mM のトリス HCl、DEPC 水中にて pH 7.5。エタノール有りまたは無し (エタノール/水 1:1)。銅 (II) 有りまたは無し。アスコルビン酸ナトリウム有りまたは無し。銅のリガンド有りまたは無し (好ましくは、トリス (3-ヒドロキシプロピルトリアゾリルメチル) アミン、#762342、Sigma-Aldrich のようなトリアゾリルメチルアミン誘導分子)。

30

(iv) 官能化された固体表面によるポリリボソームの最適化されたインキュベーションのために使用され得るインキュベーション溶液。この溶液は、以下の組成物を有してよい。10 mM の NaCl、10 mM の MgCl_2 、 $20 \mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミド、10 mM の HEPES、DEPC 水中にて pH 7。インキュベーション時間は、約 10 分から 24 時間、優先的には 20 分から 1 時間の間であってよい。インキュベーション温度は、1 から 25 °C の間、優先的には 1 から 7 °C の間であってよい。

(V) 非特異的に結合された分子を洗い流すために使用され得る洗浄溶液。この試薬は、iv 試薬の組成と同一のものを有してよい。洗浄剤有りまたは無し (好ましくは、Tween 20、Triton X-100、および 4-ノニルフェニルポリエチレングリコールから選択され、濃度は 0.001 % から 5 %、優先的には 0.01 % から 1 % の間)。

40

(vi) もし、固相が無 RNアーゼではない場合、このキットは、活性分子による官能化の前または後に使用されるべき、固体表面から RNアーゼを除去するための RNアーゼ除去溶液および再懸濁溶液をさらに含んでよい。RNアーゼ除去溶液 (A) および再懸濁溶液 (B) は、以下の組成物を有してよい。(A) 0.05 M の NaCl、0.05–1 M の NaOH、DEPC 処理水中、好ましくは、NaOH の濃度は 0.05 M から 0.2 M の間、より好ましくは約 0.1 M。および、(B) 0.05–1 M の NaCl、DEPC 処理水中、好ましくは、NaCl の濃度は 0.05 から 0.2 M の間、より好ましくは約 0.1 M。

(vii) このキットは、サンプルを調製するための機器、計時手段、および、サンプ

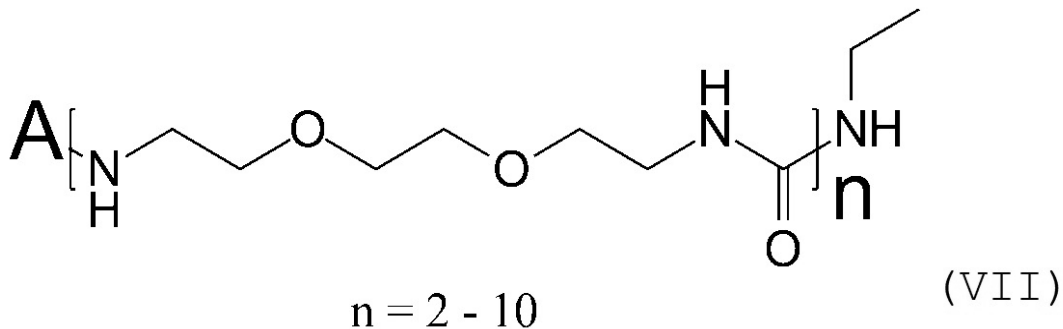
50

ルを希釈／再懸濁するための緩衝液をさらに含んでよい。

(v i i i) このキットは陰性対照をさらに含んでよい。この陰性対照に対して、活性分子（一般式 I）によって得られた結果が比較されてよい。陰性対照は、

(1) 一般式 (V I I) を有する分子、

【化 V I I】

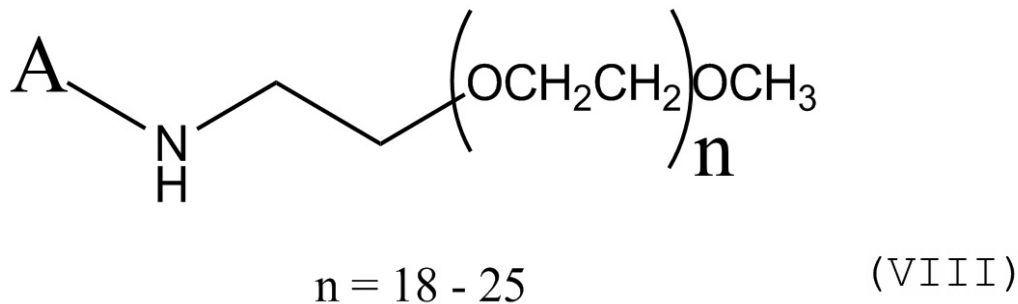


10

または、

(2) $n = 18 - 25$ の一般式 (V I I I) を有する分子、または、一般式 (I) の分子と等しい分子量 (± 500 ダルトン) を有する分子、

【化 V I I I】



20

であり得る。ここで、式 (V I I) または (V I I I) の分子は、固相上にコーティングされる。どちらの場合においても、「A」は、一般式 (I) におけるものと同一の意味を有する。

30

(i x) このキットを容易に使用するための詳細な使用説明書。

【0070】

本記載に開示されるこのキットは、第1試薬を可溶化溶液および固相と混合して利用され得る。第1試薬がひとたび固相に結合されると、インキュベーション溶液中に生体サンプルの適切な希釈液が調製され、第1試薬に結合された固相と混合され得る。インキュベーション後、この固相は溶液から分離され、洗浄溶液によって洗浄され、単離された活性ポリリボソームがRNAおよび／またはタンパク質の抽出によって解析され得る。

【0071】

このキットは、様々な方法で使用され得る。

1) ポリリボソーム関連分子（すなわち、RNAおよびタンパク質）に関する機能的研

40

究のための活性ポリリボソームの単離のための方法。

2) 刺激に応答してその翻訳が変調されるmRNAの特定のための方法。

3) リボソームプロファイリング研究のための方法。遺伝子発現翻訳調節を研究するた

めに使用される方法。

【0072】

全ての方法において（「結果」のセクションで広範囲に説明される）、濃縮解析を実行すべく内部陰性対照が含まれてよい。

【0073】

第1の方法は、(a) 細胞の個体群の溶解物を、固相に適切に結合された第1試薬と接

50

こと、(c) 試薬へ結合されたポリリボソーム並びに関連するRNAおよびタンパク質を単離すること、(d) 選択された標的に関する機能的な研究のためにRNAまたはタンパク質を単離すること、を含む。

【0074】

第2の方法は、次の段階を含む。(a) 細胞の個体群の溶解物を、固相に適切に結合された第1試薬と接触させること、(b) 活性翻訳中のリボソームに試薬が選択的に結合するのを可能にすること、(c) 試薬へ結合されたポリリボソーム並びに関連するRNAおよびタンパク質を単離すること、(d) 単離された材料中のmRNAを同定し、量を決定すること(例えば、RNA-seq解析によって)、(e) 生体対照サンプル中のmRNAを同定し、量を決定すること、および、(f) (d)のmRNAの量を(e)のmRNAの量と比較し、これにより、刺激に応答してその翻訳発現が変調されたmRNAを特定すること。

10

【0075】

代替的な実施形態においては、細胞溶解物によって第1試薬をインキュベートし、溶解物中に含まれる活性リボソームに対して第1試薬を結合させた後にのみ、この溶解物が固相に対して加えられる。

【0076】

第3の方法は、次の段階を含む。(a) 固相に適切に結合された第1試薬の調製、(b) (RNAアーゼIによって予め消化され、その後RNAアーゼ阻害剤によって処理された)細胞の個体群の溶解物を、固相に結合された第1試薬と接触させること、(c) 活性リボソームに第1試薬が選択的に結合するのを可能にすること、(d) 第1試薬へ結合されたリボソームおよび関連するmRNAフラグメントを単離すること、(e) リボソームRNAを枯渇させ、mRNAフラグメントを単離すること、(f) 変性SDS-PAGEゲルから抽出後のフラグメントの精製、(g) それぞれの遺伝子の翻訳レベル、並びに、mRNAに沿ったリボソームの位置を明らかにすべく、ゲノムに戻ってフラグメントを配列決定およびマッピングすること。

20

【0077】

一実施形態によると、固相は、アガロースビーズ、アガロース-アクリルアミドビーズ、セルロースビーズ、酸化鉄ビーズ、グラフェンビーズ、シリカまたはシリカ混合物ビーズ、ポリスチレンビーズ、ポリカーボネートビーズ、ポリプロピレンビーズ、および/または、それらの組み合わせから選択され得る。

30

【0078】

好ましい実施形態によると、固相は、マイクロウェル中に組み込まれ得る。

【0079】

好ましい実施形態によると、固相は、マイクロビーズの形態である。

【0080】

本明細書において、生体サンプルの例は、インビトロ無細胞溶解物、または、細菌、古細菌、もしくはヒト細胞を含む真核細胞からの任意の溶解物を含む。全ての方法が異所タンパク質の発現を必要とするものではない。故に、遺伝子発現の機能的組織をマッピングするための新たな手法を可能にさせる。説明された試薬、方法、およびキットは、以下の非限定的な例を参照して、さらに理解されるだろう。

40

【0081】

結果

【0082】

3P分子の合成

【0083】

(i) 細菌性リボソームとの共結晶構造におけるペプチジルトランスフェラーゼ中心を特徴付けるため^{31, 36, 49}、(ii) 新たに合成されたペプチドを捕捉するため^{21, 44}、または、(iii) 細胞中のタンパク質合成を検出するために⁵⁰、ピューロマイシン類似体が広範囲に使用されてきた。

50

【0084】

本明細書において、我々は、一般式（I）で示される化学構造を有する新たな分子（本明細書では、3 Pと呼ばれる）を設計した。この構造において「A」はビオチン化学基であり、ストレプトアビジン官能化された固相に結合することができる。「y」は0に等しい。「L」部分は、2つの2, 2'-エチレンジオキシービス-エチルアミンユニット（本明細書においては、ジェフアミンユニットと呼ばれる）によって表される。ピューロマイシンはリボソームを結合する部分である（図1）。

【0085】

（P部位の）ペプチジル-tRNAのエステル基に対するピューロマイシンの1級アミノ基による求核攻撃を阻止すべく、ピューロマイシンの α アミノ基が、結合剤カルボニルジイミダゾール（CDI）を使用することによって、N-BOC保護されたジェフアミンの一方の側に共有結合された。他方の側では、（そのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体として活性化された）ビオチンが、同一のジェフアミンユニットによってカルボキシル末端基においてアミド化された。ビオチン部分とピューロマイシン部分との間に組み込まれた2つのジェフアミンユニットの結合は、標的の生成物3 Pを、90%よりも高い純度で提供した（図2）。図3、図4、図5、および図6に説明されるように、 ^1H -NMR（400 MHz、DMSO- d_6 ）、 ^{13}C -NMR（100 MHz、DMSO）、ESI-MSおよびイオントラップ質量分析器が分子式と一致している（ m/z 1046.5における $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、 λ_{max} 272 nm）。完全な合成の概略図が図7に報告される（合成の詳細については「材料および方法」を参照のこと）。生成物3 Pは、さらなるバイオアッセイの全てにおいてそのまま使用された。

【0086】

3 P分子：結合、活性、およびユーザのための手順。

【0087】

固体表面にコーティングされたストレプトアビジンでの結合

3 P分子のビオチン化された部分の活性を検証すべく、ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズ上でのその結合活性を我々は試験した。増加する量のストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズ（Dynabeads, Life Technologies #65001）が、2 MのNaCl中の1 mMの3 P、1 mMのEDTA、10 mMのトリスHCl、DEPC水中にてpH 7.5を含む溶液50 μL 中にて懸濁される。3 Pは、272 nmに特異的な吸光度を持つ特徴的なピューロマイシンのUV-VISスペクトルを有するので、我々は、それを表面と結合させた後、溶液から3 Pを引いたものをモニタリングすることによってその結合活性を評価した（図8）（詳細な手順については「材料および方法」を参照のこと）。我々は、3 Pに対して結合能力を $\sim 250 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ と画定した。1 mMの溶液が、 $\sim 200 \mu\text{g}$ のビーズを飽和させることができる。この結果は、ビオチン官能基の機能的活性を立証し、また、全てのさらなる実験におけるビーズ官能化に対する作用条件として、5より大きな3 P/ビーズ比（3 Pは $\text{mol} \times 10^{-1}$ 、ビーズはg）を画定することを可能とした。

【0088】

ポリリボソームに向けた3 Pのインビトロ活性およびそれらの充填された転写産物

細菌性リボソームにおけるピューロマイシン誘導体の結合は十分に説明されているのに対し⁴⁹、今日まで、真核細胞リボソームとの複合物におけるピューロマイシン結合に関する構造的なデータは入手可能ではない。新たに合成された3 P分子は、タンパク質合成の阻害剤によって官能化されているので、我々は、翻訳に対する3 Pの阻害効果を試験した。特に、蛍ルシフェラーゼ遺伝子（Promega #L4741）を使用して、インビトロ無細胞翻訳系（以下、「IVTT euk-mix」と呼ぶ：TNT Quick coupled Transcription/Translation System, Promega #L2881）に対する3 Pの効果を我々は試験した。我々は、3 Pの競合活性をピューロマイシンの阻害効果と比較した。90分間のインキュベーション後、我々は、SDS-PAGEおよび発光アッセイによってタンパク質生成をモニタリン

グした(図9)。ピューロマイシン滴定すると、3Pが1 μMの濃度から始まって翻訳を著しく阻害できる間に、タンパク質合成の指数関数的減衰を我々は観測した(図9、図10)。

【0089】

原核インビトロ系および別のタンパク質、すなわち緑色蛍光タンパク質に対する3Pの効果を評価すべく、(図10のb)前述のIVTT euk-mix中および原核のもの(以下、「IVTT pro-mix」と呼ぶ: E. coli T7 S30 Extract System for Circular DNA、Promega、#L1130)中で、EGFP(高感度緑色蛍光タンパク質)を我々は発現させた。このEGFP遺伝子は、商用のベクター(pBluescript II KS(+)、GeneSc 10
ript)へとクローン化され、原核発現および真核発現の両者に対して過去に使用された^{51, 52}。我々は、EGFP発現に対する、溶液中の遊離した3P-アルキンバリアント(3PP)の効果もまた試験した。3PPにおいて、ビオチン部分はアルキン部分によって置換される(スキームVを参照のこと)。

【0090】

我々は、原核系および真核系の両者において、タンパク質合成の明らかな低下を観測した。そして、3P-アルキンバリアントの阻害効果は、3P分子に対して観測されたものと一致している(図10のb)。

【0091】

我々は、真核無細胞系および原核無細胞系の両者において、3Pが翻訳を妨げることが 20
できると結論付けた。

【0092】

もし3Pが、ピューロマイシンと同様なやり方でA部位において相互作用する場合(但し、新生ポリペプチド鎖への共有結合性の結合は無い)、粗製無細胞抽出物から活性リボソームを探し出すために3Pを使用することを我々は提案する。これを証明するため、我々はまず、上記にて説明されたように、ストレプトアビジンでコーティングされたビーズ(150 μg)を3Pで官能化し、立体的にアクセスできない結合部位を、市販のビオチン-メトキシポリエチレングリコールコンジュゲート(Creative Pegwor 30
ks #PLS-2056、本明細書ではmPと呼ぶ、1100 Da、1 mM作用濃度)によってエンドキャップした。非特異的結合に対する対照(陰性対照)として、我々は、ビーズの第2のバッチ(150 μg)をmPのみによって官能化した(詳細な手順については「材料および方法」を参照のこと)。我々は、翻訳しているリボソームを、網赤血球溶解物(IVTT euk-mix)を含むインビトロ無細胞転写/翻訳混合物から探し出すため、3P官能化ビーズおよびmP官能化ビーズ(それぞれ、3PビーズおよびmPビーズと呼ぶ)を使用した。我々は、以下のように構成される6段階の手順を最適化した(図11および図12)。

(1) 結合された転写/翻訳キット(Promega #L2881)を使用してLUC SP6対照ベクター(Promega、#L4741)に挿入された蛍ルシフェラーゼ(G、図12)に対する遺伝子エンコーディングの発現(40分、30℃にて)。

(2) 延長の間にリボソームを失速させるためのシクロヘキシミド(CHX、10 μg 40
/mL、Sigma #01810)の添加(CHXは、翻訳の複数のパラメータを研究するのに広範囲にわたって使用されている^{20, 53})。

(3) 3PおよびmPによる磁気ビーズの官能化、および、4℃における1時間のインキュベーションを伴う混合物への3PビーズおよびmPビーズの添加。

(4) 未結合フラクションのビーズからの分離。

(5) RNAの抽出、DNアーゼI処理およびcDNA合成。

(6) 濃縮に基づいたRT-qPCR解析(信号対ノイズ比、すなわち、3P-ΔΔctとmP-ΔΔctとの間の比、ハウスキーピング遺伝子は18S)。

【0093】

我々のデータは、対照(mPビーズ、図12のb)に対して、3Pビーズにおいてルシ 50

フェラーゼ転写産物（G）の～2倍の濃縮を示した。この結果は、翻訳を受けている転写産物を捕捉するために3Pが使用され得ることを立証する。そして、このデータは、RNA結合タンパク質に対する特異的抗体によるmRNA免疫沈降について観測された、報告されているRT-qPCR倍率変化⁵⁴、⁵⁵と一致する。

【0094】

トランスレートームを単離するための3Pビーズの効率をさらに調査するため、我々は、反応混合物に対して2つの異なる薬剤であるハリントニン（「G-H」と呼ぶ）またはピューロマイシン（「G+P」と呼ぶ）を添加して、同じ実験を実行した。第1の薬剤は、翻訳開始の有効な阻害剤である⁵⁶。これに対して第2の薬剤は、リボソームを分解し、溶液中で3Pの直接的な競合物である。追加の対照として、我々は、空ベクター（pGEMEX-1、Promega #P2211）から生成された非翻訳転写産物（R、図12）が存在する中で、並びに、ルシフェラーゼ遺伝子の同じプロモーター（SP6プロモーター）の対照のもとで、実験を実行した。Rは、リボソーム結合部位および終止コドンを持っていない。我々は、バイオチン化されたリジンの組み込みに基づいて、Gは転写されるのに対し、Rは転写されないことを確認した（図13のa）。我々は、「R」および非処理サンプルに対し、「G」による3PビーズRNAの濃縮、および、mPビーズに対して3Pビーズにおけるより大きなRNAの絶対量を観測した（図13のbおよび図14）。RT-qPCR濃縮解析（信号対ノイズ比3P/mP倍率変化、すなわち、3P-ΔΔctとmP-ΔΔctとの間の比、18Sがハウスキーピング遺伝子、転写産物の全量に対して正規化されている）は、非処理サンプルに関し、サンプルに対するルシフェラーゼ転写産物の著しい濃縮が無いことを立証するものである（図12）。「G+H」（Log2=-0.68±0.81）、「G+P」（Log2=-0.32±0.35）、および「R」（Log2=0.00±0.39）。

【0095】

この結果は、ルシフェラーゼ転写産物において、翻訳が行われる場合にのみ、3Pビーズが選択的に濃縮され得ることを裏付けるものである。信頼性のある結果のためには、信号対ノイズ比が解析に含まなくてはならないことは注目に値する。

【0096】

さらなる実験において、様々な動力学でインビトロ発現されたタンパク質に対する3Pの効果を評価するために、我々は、2つの異なるベクターであるpBluescript I I KS+ベクターおよびpPR-IBA2ベクターへこの遺伝子をクローン化することにより、EGFPを発現させた（図15のa）。

【0097】

1時間のインキュベーションの後、pBluescript I I KS+は、十分に検出可能なレベルのEGFPを発現させる（図15のa、右）。25分後、ほんのわずかなレベルの全EGFPが検出され得る（全タンパク質免疫沈降）のみである。これに対し、pPR-IBA2プラスミド中でクローン化された同じタンパク質は、pBluescript I I KS+ベクター中へクローン化されたものに対し、推定で500倍ものより大きな発現を有する（図15のb）。結合された転写／翻訳反応の後、ハリントニンによって処理されていない3Pビーズおよび処理されている3Pビーズの両者におけるeGFP RNAの選択的な濃縮を我々はモニタリングした（h⁺、図15のaおよび図15のb、Santa Cruzからのハリントニン、#sc-2040771）。ポリソームに関連するmRNAを精製し、この場合の非特異的結合を減少させるために、我々は、ポリスチレンビーズ（Dynabeads）の代わりに、アガロース磁気ビーズ（Streptavidin Mag Sepharose（商標）、GE Healthcare、#28-9857-38）を使用した。

【0098】

我々は、EGFP発現に対するハリントニンおよび3P（溶液中で遊離）の両者の阻害効果を確認した（図15のa）。転写の変化に起因するものではない、これら2つのサンプルの間のタンパク質レベルにおける相違を我々は観測した。実際のところ、全eGFP

RNAレベルは、 h^+ （薬剤有り）および h^- （薬剤無し）の両者において等しく、pPR-IBA2ベクターからタンパク質が発現されるサンプルにおいて、より低い（図15のb）。従って、タンパク質レベルの変化は、翻訳における異なる効率に基づいている。我々は、3Pビーズでの25分のインキュベーション後のeGFP RNAの濃縮が、（ハリントニン処理されたサンプルと比較して）E GFPが非常に多く発現されたサンプルにおいて、～5倍高いことを観測した（図15のc）。これは、タンパク質発現における変化と一貫した結果を立証している。その後、我々は、3Pビーズを使用してRNAを単離して、ポリソームにおけるmRNAリクルートメントの時間的経過を検討した（pBluescript II KS+プラスミドによるIVTT euk-mixの8、25、60、120分および24時間のインキュベーション）（図15のc）。8分、25分、および24時間においては濃縮が観測されなかったのに対し、RT-qPCR解析は、60分および120分後にeGFP RNAの濃縮を示した。この結果は、活性に翻訳されたRNAを捕捉するための3Pの効率性を立証し、我々の技術の時間分解能を示唆する。25分においては、混合物における転写産物の高いバックグラウンド（～0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）に起因して、RNA濃縮は観測されなかった。

【0099】

全体として、インビトロで翻訳を受けている転写産物を伴うサンプルを選択的に濃縮するためにRiboLace（新たな分子を含む、「手順および方法」）が使用され得ることを、我々は結論できる。

【0100】

精製されたポリソームフラクションにおけるRiboLace効率

【0101】

RNA翻訳をより良好に調査すべく、我々は、乳癌細胞株から得られたポリソームプロファイルの各フラクションにおいて、全rRNAに対して3Pビーズによって抽出された全rRNAを定量化しようとした。

【0102】

ショ糖密度勾配中での沈降の後、指数関数的に成長するMCF7細胞溶解物を使用して、我々は、このプロファイルの各フラクションからの全rRNAおよび3P-rRNA（3P官能化されたアガロースビーズから抽出されるrRNA）の両者の濃縮を評価した。2つの異なる生体条件を我々は試験した。すなわち、非処理の細胞、および、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハリントニンで2分間処理された細胞（ h^+ ）であり、両者ともに、続いてシクロヘキシミド（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3分）によってインキュベーションした。生体対照のみを使用すること（すなわち、mPビーズが無いこと）の利点は、より高速で、より安価且つより容易な手順であるという点にある。80Sの倍率変化に対して正規化された相対存在量は、軽いポリリボソーム（フラクション8から10まで）のレベルにおける濃縮を示す。これに対し、この効果は重いポリリボソームでは失われる（図16）。

【0103】

これら2つの非処理のサンプルは、全体的な翻訳効率（TE）の相違を示す^{4 5}。これは、ほぼ確実に、細胞の代謝状態を反映している。どちらのサンプルにおいても、我々は、より軽いフラクションにおけるrRNAの一貫した濃縮、および、より高いTEを有するサンプルにおけるより顕著な効果を観測した。

【0104】

活性リボソームがプロファイルに沿ってどこに分散されているのかは、現在のところ知られていない。リボソームごとの翻訳活性は、mRNAごとに結合されるリボソームの数とともに増加することを、いくつかの研究が報告している^{5 7, 5 8}。しかしこの研究結果は、幅広く再生されてきていない。

【0105】

我々のデータは、活性リボソームが、より軽いこれらのフラクションに集中しているであろうことを示唆する。

【0106】

ヒト細胞株の細胞溶解物からのポリリボソームでの活性

我々の研究結果に基づいて、我々は、この技術が、インビトロの翻訳系および精製されたポリソームフラクションよりも複雑な細胞質性の細胞溶解物から活性リボソームを捕捉するためにもまた作用し得るものと推測する。

【0107】

乳癌細胞株を使用することにより、我々は、まず、リボソームの構成成分であるタンパク質（すなわち、RPL26およびRPS6）、または、ポリリボソームに関連するものであると知られている翻訳開始因子（すなわち、eIF4BおよびeIF4A1）が、mPビーズに対して3Pビーズにおいて実際に濃縮されているかどうかをチェックした。この理由から、我々は、以下のように手順を最適化した（図17）。 10

(1) ビーズ（200 μ g）が3P（3Pビーズ）およびmP（mPビーズ）によって官能化された。

(2) 3PビーズおよびmPビーズが細胞溶解物（A260 = 0.3 – 1.7 a. u. / μ L）に直接加えられ、懸濁液を4℃において1時間インキュベートした。

(3) その後ビーズは、磁気分離によってプルダウンされ、10mMのNaCl、10mMのMgCl₂、10mMのHepes、20 μ g/mLのシクロヘキシミド（CHX）、DEPC水中にてpH7によって、（磁石からそれらを分離させることなく）2回洗浄された。

(4) タンパク質および／またはRNAが検出用に抽出された（詳細な手順は「材料および方法」を参照のこと）。 20

【0108】

我々は、対照ビーズに対して、RPL26については～8倍、RPS6については～4倍という著しい濃縮を観測した（図18）。翻訳開始の間にRNAの二次構造をほどくことに関与する因子もまた、3Pビーズサンプルにおいて濃縮される（図18のa）。これに対し、リボソーム活性に関与しないタンパク質（すなわち、アクチンBおよびGAPDH）は、ビーズ（3PビーズおよびmPビーズの両者、図19）には存在しない。我々は、2つの異なる細胞株を試験し、乳癌細胞（MCF7、ATCC、#HTB-22）からの溶解物および運動ニューロン様細胞（NSC-34、CEDALANE #CLU140、図18）からの溶解物の両者における濃縮を確認した。興味深いことに、10mMのNaClから500mMのNaClへのイオン強度の増加は、最後には精製活性の損失へと導く（図18のa）。異なる生体条件（MCF7に対するEGF処理および血清飢餓）の細胞からの細胞溶解物の解析がこの結果を裏付ける（図18のb）。これは、リボソームサブユニットの解離によって引き起こされるのだろう。最後に我々は、mPビーズに対する3PビーズでのRPL26およびRPS6の両者の著しい濃縮を観測した（図18のb）。しかし我々は、2つのタンパク質の間に著しい相違は観測しなかった（図18のb）。これは、3Pが、40S（RPS6はその成分）に結合された60Sサブユニット（RPL26はその成分）を効率的に捕捉できることを示唆している。 30

【0109】

我々の分子の活性についてさらに特性を明らかにするため、我々は、2つの主なりボソームRNA（rRNA 18SおよびrRNA 28S）に我々の解析を集中させた。3Pビーズが18Sおよび28S rRNAの両者において濃縮される。3Pは、mPに対して、～2倍多くのrRNAを捕捉することができる（図20のa）。この結果は、上記にて説明された我々のインビトロ実験と一致する。さらに、この手順は、回収されたRNAの良好な品質を保証する（Rna Integrity ナンバー（Rna Integrity Number）、RIN $\geq$ 8、図20のb）。全体として、我々は、RiboLaceがポリリボソーム関連タンパク質およびRNAを結合させることにおいて定量的に効率的であると結論する。 40

【0110】

生体対照のみによる細胞溶解物におけるRiboLace

対照ビーズが必要であるかどうかを試験するために、我々は、以前に使用され、図17 50

において説明された手順を適用したが、対照ビーズは無しとした。我々は、指数関数的成長中のMCF7細胞株からの細胞溶解物（ h^- /FBS $^+$ と呼ぶ）、18時間にわたる血清飢餓（0.5% FBS）下にあるもの（FBS $^-$ と呼ぶ）、または、2分間ハリントニン（2 μ g/mL）で処理されたもの（ h^+ ）まで、我々の解析を拡張した。

【0111】

FBS $^-$ に対し、FBS $^+$ において、3PビーズにおけるrRNAの ~ 3 倍の濃縮を我々は観測した。 h^+ サンプル（図21）は、対照（ h^- ）に対して、 $\sim 20\%$ 多くのrRNAを示す。

【0112】

観測された小さな相違（精製されたショ糖フラクションにおける我々の結果に対して）は、ほぼ確実に、（i）溶解物のより高い化学的複雑さ、（ii）溶解物から検出された翻訳信号の平均、（iii）溶解物中の、3P結合を阻止することのできる界面活性剤の存在、（iv）より良好なデータ解析のための対照ビーズが無いこと、に起因する。

【0113】

この実験は、翻訳が低下されないサンプルにおいてのみRNAを選択するための3Pの活性を裏付け、より良好な結果を得るために対照ビーズの使用が好ましいことを裏付ける。

【0114】

NGS解析：「究極の基準」とRiboLace技術との間の比較

RiboLaceによって捕捉されるRNAの品質および量に関するより多くの見識を得るため、および、活性翻訳に関与するリボソーム（すなわち、活性ポリリボソーム）を捕捉する能力を体系的にモニタリングするため、我々は、我々の技術を、RNA配列決定（RNA-seq）解析による標準的なショ糖密度勾配分画と比較した。我々は、3つの異なる生体条件にて実験を実行した（図22）。

（1，N）10%のFBS（Life technologies #10270-098）、2mMのL-グルタミン（Life technologies #25030-149）、100units/mLのペニシリン、および100mg/mLのストレプトマイシン（Life Technologies #15140-122）が補給された、レッドフェノール（Lonza #BE12-614F）を有するDMEM中で指数関数的成長中の細胞。

（2，E）12時間の血清飢餓（0.5%のFBS、2mMのL-グルタミン、100units/mLのペニシリン、および100mg/mLのストレプトマイシンが補給されたDMEM-レッドフェノール）後に、4時間にわたって上皮成長因子刺激（EGF、1 μ g/ μ L、RD系 #236E4）下におかれた細胞。

（3，S）12時間にわたって血清飢餓にある細胞。

【0115】

EGFは、そのレセプタ（EGFR）へ結合することによる細胞成長、増殖、および分化の調節において重要な機能を有し、その効果が転写レベルおよび転写後レベルの両者において検討されてきた¹⁶。mRNA上に延長するリボソームを捕捉するため、溶解前に、細胞は5分間にわたってCHX（10 μ g/mL）で処理された。その後、3P官能化されたビーズ（「B」と呼ぶ）を使用して、mP対照ビーズ（「M」と呼ぶ）を使用して、および、標準的なショ糖密度勾配分画方法によって（「P」と呼ぶ）、ポリリボソームが抽出された。全細胞質性RNA（「T」と呼ぶ）もまた、このプロファイルの全てのフラクションの集まりから抽出された（図22）。1 μ gの高品質RNA（RIN ≥ 8 ）から始まって、Illumina HiSeq 2000プラットフォームを使用して、ポリ-A濃縮RNA（すなわち、mRNA）の配列決定から結果が得られる（詳細な手順は「材料および方法」を参照のこと）。RNA-seqは、fragments per kilobase of exon per million mapped reads（FPKM）⁵⁹で測定された、遺伝子の発現レベルの定量的測定を可能にする。非特異的結合について正規化するため、すなわち、バックグラウンドの影響を考慮するため、

10

20

30

40

50

我々は、まず、EGF処理すると特異的に発現した遺伝子（DEG）を画定した。その後我々は、3P-FPKMの数がmP-FPKM数よりも高かった転写産物を解析した。我々は、ショ糖密度勾配から単離されたポリソーム転写産物（EP）のFPKMと3Pビーズから単離された転写産物（EB）のFPKMとの間に正の相関を観測した（スピアマンの相関=0.71）。この相関は、全FPKM（ET）と3P-FPKMの間ではより低い（EGF処理された細胞および血清飢餓細胞の両者に対してスピアマンの相関=0.66）。ショ糖密度勾配ポリリボソーム-FPKM（EP）と全FPKM（ET）との間の相関は~0.76である（図23）。血清飢餓条件に対して同じパターンが観測される（SBとSPの間のスピアマンの相関=0.69、図23）。非処理の細胞において、3P-FPKM（NB）と、ショ糖密度勾配ポリリボソーム-FPKM（NP）および全FPKM（NT）の両者との間の相関は、より高かった（図24、SB、STおよびSP間のスピアマンの相関~0.98）。mP-FPKMよりも20倍高く3P-FPKMによって選択された遺伝子（図24のa）は、ショ糖密度勾配ポリリボソーム-FPKM（NP）と3P-FPKM（NB）の間では0.61の、全FPKM（NT）と3P-FPKM（NB）の間では0.58の、ショ糖密度勾配ポリリボソーム-FPKM（NP）と全FPKM（NT）の間では0.54のスピアマンの相関を示した（図24）。これらの全ての情報は、3Pビーズからのトランスレートームとショ糖密度勾配ポリリボソームmRNAとの間に、統計的に有意な関係があるという結論をもたらした。

【0116】

8つの特異的に発現した遺伝子（PALLD、PLK3、IL27RA、NCS1、VEGFA、DUSP5、PDCD4、PAPSS2）がRT-qPCRによる検証のために選択された（図25および図26）。我々は、RT-qPCRとRNA-seq FC値との間に良好な一致を観測した（ピアソンの $r=0.89$ 、図25および図26のb）。

【0117】

（我々のインビトロ実験によって示唆されるように）アップレギュレートされた遺伝子が優先的に捕捉および検出されるべきなので、我々は、それらのアップレギュレートされた遺伝子に我々の解析を集中させることを決定した。従って、我々は、以下の特徴を有するDEGのサブセットを選択した（図26）。（i）EGF刺激（EB/SB）に応答して3P-FPKMの正の倍率変化を有する（すなわち、アップレギュレートされた）DEG（'ビーズFC>0'と表示する）、（ii）3P-FPKM p 値<0.05を有する遺伝子（'p値<0.05'と表示する）、および、（iii）mP-FPKMよりも高い3P-FPKMを有する遺伝子（'++'データセットと表示する）。まず、我々は、全てのサンプルにおいて'++'DEGの間に正規分布を観測した。3つのデータセットの共通部分から、我々は、3P倍率変化と全倍率変化との間の相関（スピアマン=0.46）よりも、3Pとショ糖密度勾配ポリリボソームとの間の倍率変化において著しく高い相関（スピアマン=0.60）を有する70DEGを特定した（図26のa）。RT-qPCRによって、それらのうちの4つが妥当性を確認された（図26のb）。それとは逆に、 p 値<0.05を有するが負の倍率変化を有する'++'遺伝子（ $n=42$ ）は、相関値に何の相違も示さない（EB/SB対EP/SPに対するスピアマン=0.55、EB/SB対ET/STに対するスピアマン=0.54、図27）。最後に、データセットの共通部分によって特定された70DEGのサブセットが、MCF7細胞株におけるEGF刺激の後に転写レベルにおいてアップレギュレートされることが知られている転写産物^{60, 61}の濃縮を示したことに我々は気付いた。それらのうち、我々はPALLD、PLK3、VEGFA、DUSP5、およびMAP3K14について言及する。

【0118】

これらの全ての結果は、3P-RNAの相関が、全RNAに対するより、ポリリボソームRNAと全体的により良好なことを裏付ける。

【0119】

濃縮（信号対ノイズ比 3P/mP）はタンパク質変動に従う

酵母、マウス、およびヒト細胞株に関する研究が、全トランスクリプトームとプロテオームとの間の低い相関を報告しており⁶²⁻⁶⁴、全RNA（トランスクリプトーム）が常にタンパク質変動を反映するものではないことを示唆した。3Pビーズによって抽出されたRNAが、標準的な技術に対し、タンパク質レベルを予測するためのより良好な解決策であることを立証するために、インビトロ無細胞アッセイに対して我々が行ったように、比較濃縮解析（ $\text{Log2 f p k m (EB/EM)} - \text{Log2 f p k m (SB/SM)}$ ）を我々は実行した。信号対ノイズ比は、3P/mPとポリソームDEGとの間では0.20の相関を示す（ p 値<0.05を有する全てのDEGに対して、 $n=437$ ）のに対し、3P/mPと全DEGとの間では相関は0.15である（スピアマン、図28のaおよび図29）。これらのデータは我々の結果を裏付け、ヒト細胞株における全mRNAとタンパク質との間の報告されている相関^{64, 65}と同等である。

10

【0120】

ショ糖密度勾配および全RNAの両者と比較して、翻訳を受けている転写産物のプールをRibolaceがより正確に捕捉するかどうかをさらに理解するため、我々はEGF刺激後の4つの遺伝子（PALLD、PLK3、hb-EGF、およびCYP27A1）のタンパク質レベルをモニタリングした。我々は、全タンパク質含有量を相対RNA存在量と比較した。免疫ブロット法により評価され、3つの異なるハウスキーピング（ACTB、GAPDH、およびRPL26）に対して正規化されたPALLDおよびPLK3の全量は、EGF処理しても変化しない（ $n=3$ 、図28のb）。倍率変化がRT-qPCR値およびRNA-seq値の両者における変化を顕著に示さない唯一のサンプルは3P/mP濃縮である。2つの追加的なタンパク質（hb-EGFおよびCYP27A1）に対し、タンパク質レベルは、3P/mP値に対して一貫した倍率変化で増加する（図30）。これらの結果は、細胞のタンパク質含有量を予測することにおいて我々の技術が現在の標準より良好であることを示し、インビトロ無細胞系によって得られた全ての結果と一貫している。

20

【0121】

全体として、我々の研究結果は、

(i) 3Pビーズによって捕捉されたリボソームのフラクシオンは、全mRNAよりも、ショ糖密度勾配からのポリリボソームmRNAと、より良好に相関する転写産物を保持する、

30

(ii) Ribolaceは、タンパク質存在量をより良好に説明する活性翻訳中のポリリボソームを選択的に捕捉することができる、

ということを立証した。

【0122】

3Pに対する追加的な用途：リボソームプロファイリング

リボソーム保護されたフラグメントの高解像度配列決定（リボソームプロファイリング）^{18, 53, 56}が、単一ヌクレオチド分解能で翻訳を研究するために、最近最も使用されている技術である。エンドリボヌクレアーゼによる細胞溶解物の処理は、ポリリボソームを、mRNA保護された短いフラグメントをそれぞれが捕捉する単量体リボソームに転換する。リボソーム保護されたフラグメントが精製され、配列決定され、ゲノムに戻ってマッピングされることができ、各遺伝子の全翻訳レベル並びにmRNAに沿ったリボソームの位置を明らかにする。保護されたmRNAフラグメントの長さの分布は、平均で28-29 nt（S. セレヴィシエ）または30-31 nt（哺乳類細胞）を示す。しかしながら、~16 nt、~21 nt、および40-65 ntのフラグメントもまた得られた。これらのフラグメントはエンドリボヌクレアーゼ消化の副生成物であり得たが、いくつかの研究は、それらを、延長の間のリボソームの立体配座変化に関連付けた^{56, 66, 67}。

40

【0123】

本明細書において、我々の手法の原理は、我々の精製の方策をリボソームプロファイリング技術と組み合わせることである。この理由により、我々は、エンドヌクレアーゼ消化、

50

活性単量体リボソームの選択、並びに、さらなる抽出およびNGS解析のためのゲル上のフラグメントの最終的な視覚化を含むべく、我々の手順を変更した。手短に言えば、我々は手順を以下のように最適化した（図31を参照のこと）。

(1) 細胞溶解物（A260=〜0.6 a. u. / μ L、MCF7細胞株より）が、5分間のCHXによる処理後に新たに調製された。

(2) ビーズ（200 μ g）が3P（3Pビーズ）およびmP（mPビーズ）によって官能化された。

(3) 室温にて45分間、RNアーゼI（A260における単位サンプル吸光度について0.01–0.02 a. u.）によって細胞溶解物が消化された。

(4) 氷上で10分間、RNアーゼ阻害剤（Life Technologies # 10 AM2696）の添加によってエンドヌクレアーゼが阻害された。

(5) 消化された細胞溶解物に対して3Pビーズが直接加えられ、4℃にて1時間、懸濁液をインキュベートした。

(6) ビーズは磁気分離によってプルダウンされ、10mMのNaCl、10mMのMgCl₂、10mMのHepes、20 μ g/mLのCHX、DEPC水中にてpH7によって洗浄され、タンパク質がプロテイナーゼKによって消化された。

(7) RNAがTrizol（Sigma #T9424）によって抽出された。もし必要であれば、この段階の後に、市販のrRNA除去キット（例えば、Ribo-Zero rRNA除去キット、Illumina、#MRZH11124）によってRNAは20

(8) その後、さらなる解析のため、15%のPAGE TBE–尿素ゲルにおいてRNAが移動される。

【0124】

さらに、ハリントニン（2分、2 μ g/mL）で処理された（h⁺）または処理されていない（h⁻）MCF7細胞溶解物からのリボソームを単離するために、3Pビーズが使用された。RNAが抽出され、TBE–尿素ゲルにおいて移動され（図32のa）、その後フラグメントの定量化が実行された（Agilent 2100 バイオアナライザ、Small RNAチップ、#5067–1548）。

【0125】

我々の結果は、3Pビーズが、非処理のサンプルに対して、翻訳が抑制されていない条件において、より多くのフラグメントを精製できることを示した（図32のa）。これらのフラグメントのいくつかは、以前に公開した研究¹⁸と一致する長さを有する。特に、我々のフラグメント濃縮解析は、非処理のサンプルにおいて、〜30 ntのフラグメントの〜7倍の増加を明らかにした。これらのフラグメントは、mRNAに沿ったリボソームの位置を特定するために配列決定（Ribo-seq解析）され得る。我々は、非処理のサンプルにおいて、〜22 nt および〜60 nt のより多くのフラグメントもまた観測した。

【0126】

最後に、我々は、マウス脳溶解物に対して同一の実験を実行した（図32のb）。この実験は、標準的な公開されている手順^{18,68}に対して、30倍少ない材料によって実行された。我々は、TBE–尿素ゲル上にて〜30 ntのフラグメントの存在を明らかに観測した。

【0127】

全体として、これらの結果は、リボソームプロファイリング研究に対するRiboLacの適用が可能なことを裏付け、式（I）の分子が活性および天然リボソームを捕捉できることを裏付ける（図33）。

【0128】

材料および方法

【0129】

インビトロ転写／翻訳に対するプライマー、Syber RT-qPCR

【0130】

陽性対照（ルシフェラーゼ SP6 control DNA、#L4741）の増幅に対するRT-qPCRにおいて使用されるプライマー対：

FOR：CGGCGCCATTCTATCCTCT - シーケンスID番号：1

REV：CCGATAAATAACGCGGCCAA - シーケンスID番号：2

【0131】

陰性対照（pGEMEX-1ベクター #P2211）の増幅に対するRT-qPCRにおいて使用されるプライマー対：

FOR：GCAGTACCTAAGCCCTCGAT - シーケンスID番号：3

REV：GGTGGACAGCAAATGGGTAC - シーケンスID番号：4

【0132】

18S rRNA（ハウスキーピング遺伝子）の増幅に対するRT-qPCRにおいて使用されるプライマー対：

FOR：GGATCCATTGGAGGGCAAGT - シーケンスID番号：5

REV：ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA - シーケンスID番号：6

【0133】

eGFP遺伝子の増幅に対するRT-qPCRにおいて使用されるプライマー対：

FOR：AAGCAGCACGACTTCTTCAA - シーケンスID番号：7

REV：ACGTTGTGGCTGTTGTAGTT - シーケンスID番号：8

【0134】

TaqManアッセイ

【0135】

TaqManアッセイによって解析されるそれぞれの遺伝子に対し、遺伝子名、別名、染色体位置、およびTaqMan IDが表1に報告されている。全てのTaqManプローブはLife Technologiesからのものであった。

【表1】

遺伝子名	別名	染色体位置	TaqManプローブID
VEGFA	MVCD1, RP1-261G23.1, VEGF, VPF	Chr.6: 43737946 - 43754224	Hs00900055_m1
PLK3	CNK, FNK, PRK, RP11-269F19.6	Chr.1: 45266036 - 45271667	Hs00177725_m1
DUSP5	DUSP, HVH3	Chr.10: 112257625 - 112271302	Hs00244839_m1
PALLD	PALLD	Chr.4: 169418217 - 169849608	Hs00363100_m1
IL27RA	CRL1, IL-27RA, IL27R, TCCR, UNQ296/PRO336, WSX1, zcytor1	Chr.19: 14142262 - 14164026	Hs00945029_m1
VEGFA	MVCD1, RP1-261G23.1, VEGF, VPF	Chr.6: 43737946 - 43754224	Hs00900055_m1
PDCD4	H731, RP11-348N5.4	Chr.10: 112631553 - 112659764	Hs00205438
PAPSS2	ATPSK2, BCYM4, RP11-77F13.2, SK2	Chr.10: 89419476 - 89507462	Hs00989928_m1
18S	Eukaryotic 18S rRNA		Hs99999901_s1

30

40

50

【0136】

3 P分子の化学合成（段階1－4）

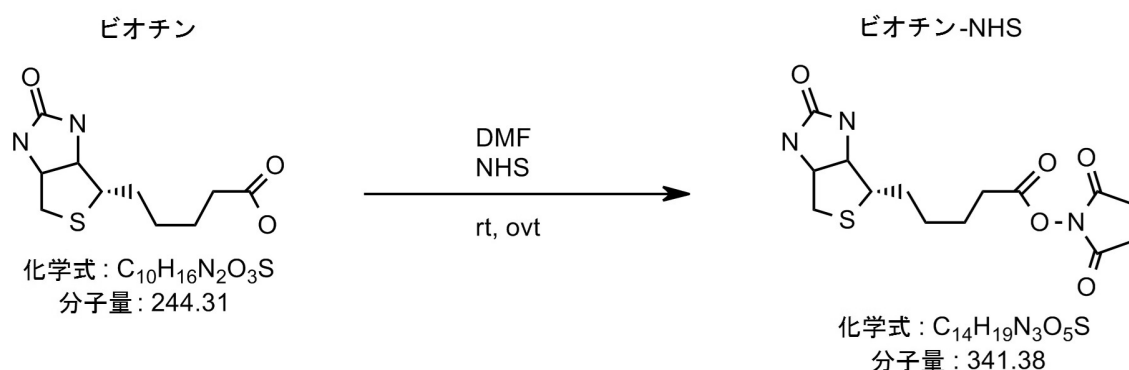
【0137】

1. ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドの合成（スキームI）

【0138】

D-ビオチン（0.49 g、2.0 mmol、Sigma #B4501）が20 mLのDMF（Sigma #227056）中でN-ヒドロキシスクシンイミド（0.3 g、2.7 mmol、Pierce #HC102040）に加えられ、材料のほとんどが溶解するまで、50℃まで加熱された。5 mLのDMF中のN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.45 g、2.1 mmol、Sigma #D80002）の溶液が、前述の溶液に対して、滴下により加えられた。生じた溶液は室温にて一晩攪拌され、この時間の間に、白色沈殿物が形成された。反応混合物がセライトを通してろ過され、ろ液はジエチルエーテル（Sigma #309966）によって粉砕された。この白色沈殿物は真空ろ過され、その後、ジエチルエーテルで洗浄されて白色の粉末を生じた。収量は0.52 g（～70%の最終的な効率）であった。

スキームI



【0139】

2. ビオチン-ジェフアミン中間体の合成（スキームII）

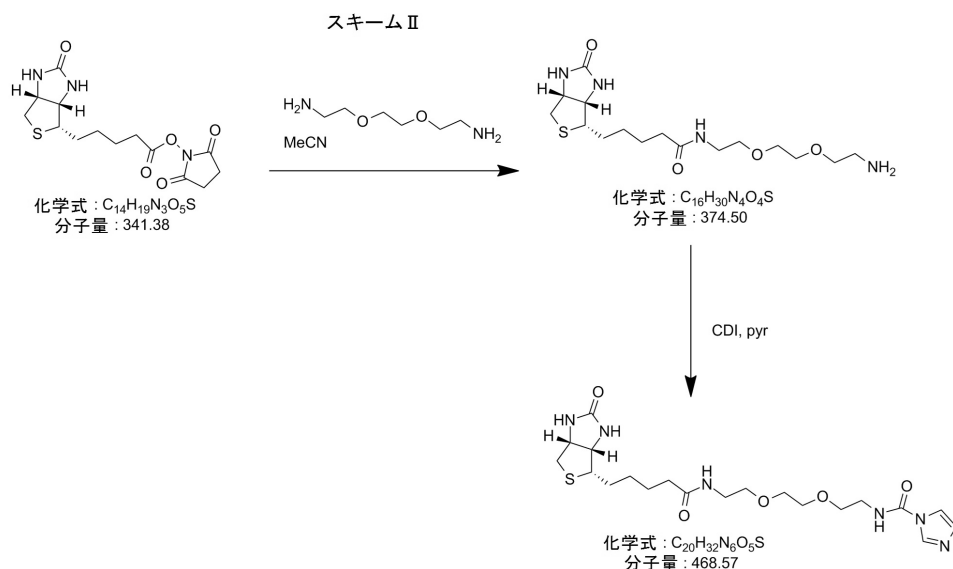
【0140】

2, 2'-(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)（Sigma 385506、以下ではジェフアミンと呼ばれる）（0.9 mL、5.8 mmol）が500 mLのアセトニトリル（MeCN、Sigma #34888）に溶解された。ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミド（B-NHS、0.3 g、0.88 mmol）がMeCN（100 mL）に溶解され、この溶液が滴下漏斗へと加えられた。このB-NHS溶液は、その後、ジェフアミン溶液に対して滴下により加えられ、N₂下、0－5℃にて一晩攪拌された。反応はろ過され、固体が、MeCN（2×10 mL）、その後ジエチルエーテル（2×10 mL）によって洗浄された。最後に、N₂下の乾燥で引かれ、白色で吸湿性の固体を生じた。TLC（10%のMeOH/DCM+5 dp sのNH₄OH）は、反応後には、明らかな出発原料を示さない。固体は、40℃にて乾燥MeOH（30 mL）に溶解され、シリカに充填され、10%のMeOH/DCM+1%のEt₃Nによって溶出された。フラクション25－45が収集され、黄色の固体/ゲルとなるまで気化された。最終的な収量は0.257 g（～80%の最終的な効率）。この生成物は、以下ではBJ1と呼ばれる。

【0141】

その後、Bj1（0.017 g、0.043 mmol）が乾燥ピリジン（5 mL、Sigma #270970）に溶解された。CDI（Sigma #21860）が、同じ体積のピリジン（0.074 g、0.45 mmol）に溶解され、Bj1に加えられた。生じた溶液は20℃において2.5時間攪拌された。このとき、完全な反応であることをTLCが明らかにした（1%のEt₃Nを伴う10%のMeOH/DCM、Sigma

T 0 8 8 6、 $R_f = 0.3$ ）。溶媒が気化され、粗製生成物が最小量の D C M（S i g m a # 3 2 2 2）中で戻され、その後、エーテルが過剰に加えられた。沈殿物が収集され、さらに精製することなく、次の段階において使用された。この生成物は、以下では B J 1' と呼ばれる。



10

20

【0142】

3. ピューロマイシン-ジェフアミン中間体の合成 (スキーム III)

【0143】

クロロホルム (138 mL) 中の BOC 無水物 (S i g m a # 3 6 1 9 4 1) の溶液が 0–5 °C を維持しながらクロロホルム (229 mL) 中のジェフアミンの溶液に加えられた。添加は 30 分で完了した。反応は、ゆっくりと温められ、18–20 °C にて一晩攪拌された。その翌日、反応は D C M (400 mL) に溶解され、食塩水で洗浄され、乾燥され (M g S O₄)、澄んだ油状物となるまで 40 °C にて気化された (～93% の最終的な効率)。

【0144】

ピューロマイシン (0.28 g、0.613 mmol、S i g m a # P 8 8 3 3) がピリジン (1 mL) に溶解され、C D I (D C M に溶解されている) がこの溶液 (0.103 g、0.635 mmol) に加えられた。

【0145】

この溶液は、D C M (250 mL) 中の BOC 保護されたジェフアミン (ジェフアミン 0.18 mL、1.2 mmol) の溶液に対して滴下により加えられ、反応溶液は 0–5 °C にて一晩攪拌された。T L C (10% の M e O H / D C M) は、主生成物 ($R_f = 0.5$) 並びに少量の出発原料を示す。

【0146】

生成物は D C M (250 mL) と水 (100 mL) との間で分割され、水 (2 × 100 mL) で洗浄され、粘着性の油状物を生じるまで 40 °C にて気化された。生成物は、40 °C にて 3 時間にわたって酢酸エチル (E t O A c、40 mL) 中で粉碎され、ゲル状の懸濁液を生じた。この懸濁液は 0–5 °C まで冷却され、ろ過され、E t O A c で洗浄され、真空中で 40 °C にて乾燥されて、白色の固体を生じた。

【0147】

代替的に、この分離は、シリカカラム (D C M 中の 10% の M e O H、1% の E t₃N) を通して実行され得る。この生成物は、以下では P J 1 と呼ばれる。

【0148】

トリフルオロ酢酸 (T F A、S i g m a # 3 0 2 0 3 1) が、25 °C にて D C M (40 mL) 中で攪拌されている P J 1 の懸濁液に対して滴下によって加えられた。2 時間後

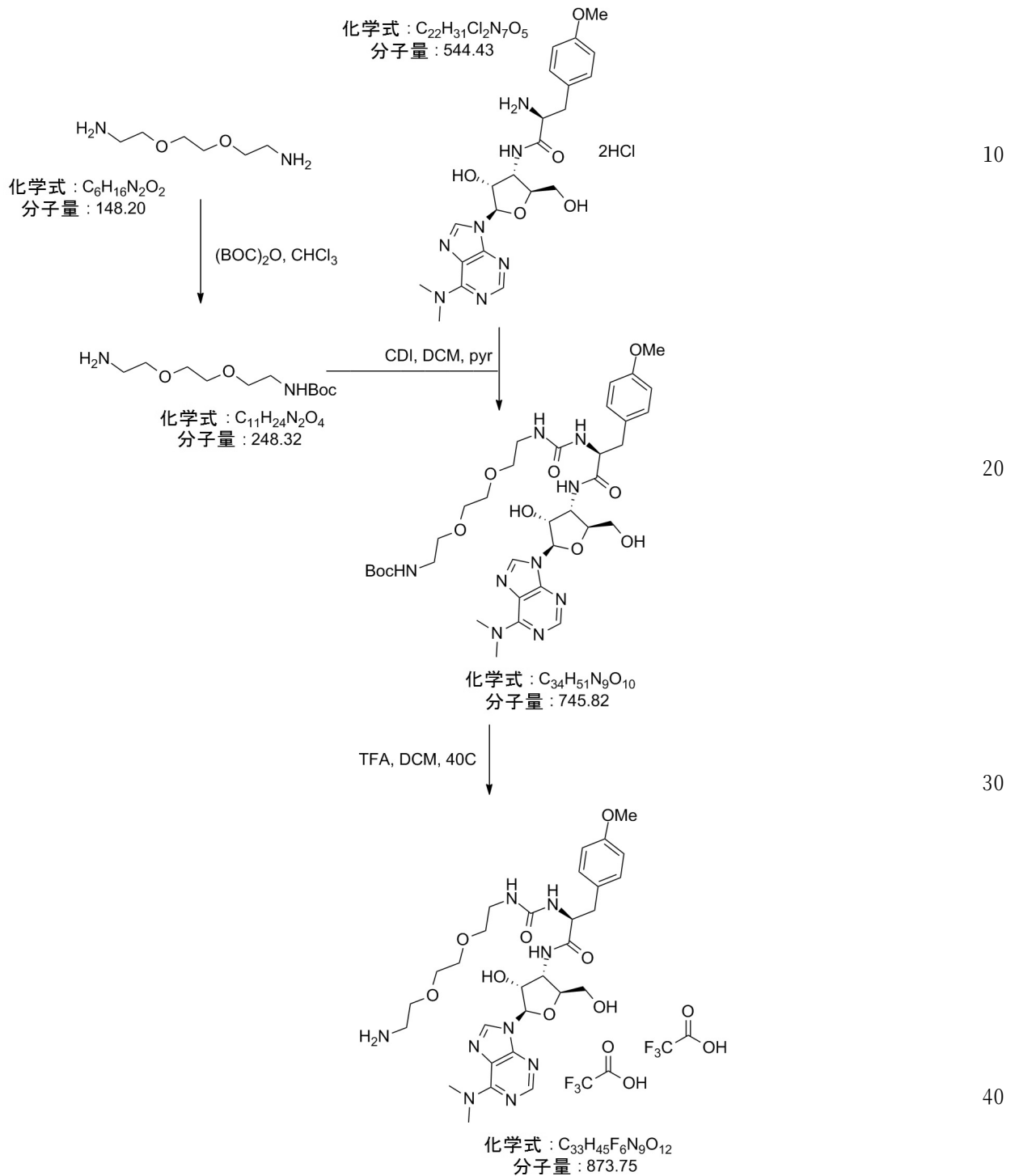
30

40

50

、この溶液は15－17℃に冷却され、一晚攪拌された。その翌日、溶液はクロロホルム（300 mL）で希釈され、真空中で40℃にて気化された。黄色の油状物を生じるまで、これは3回繰り返された。この生成物は、以下ではPJ1'と呼ばれる。

スキームⅢ



【0149】

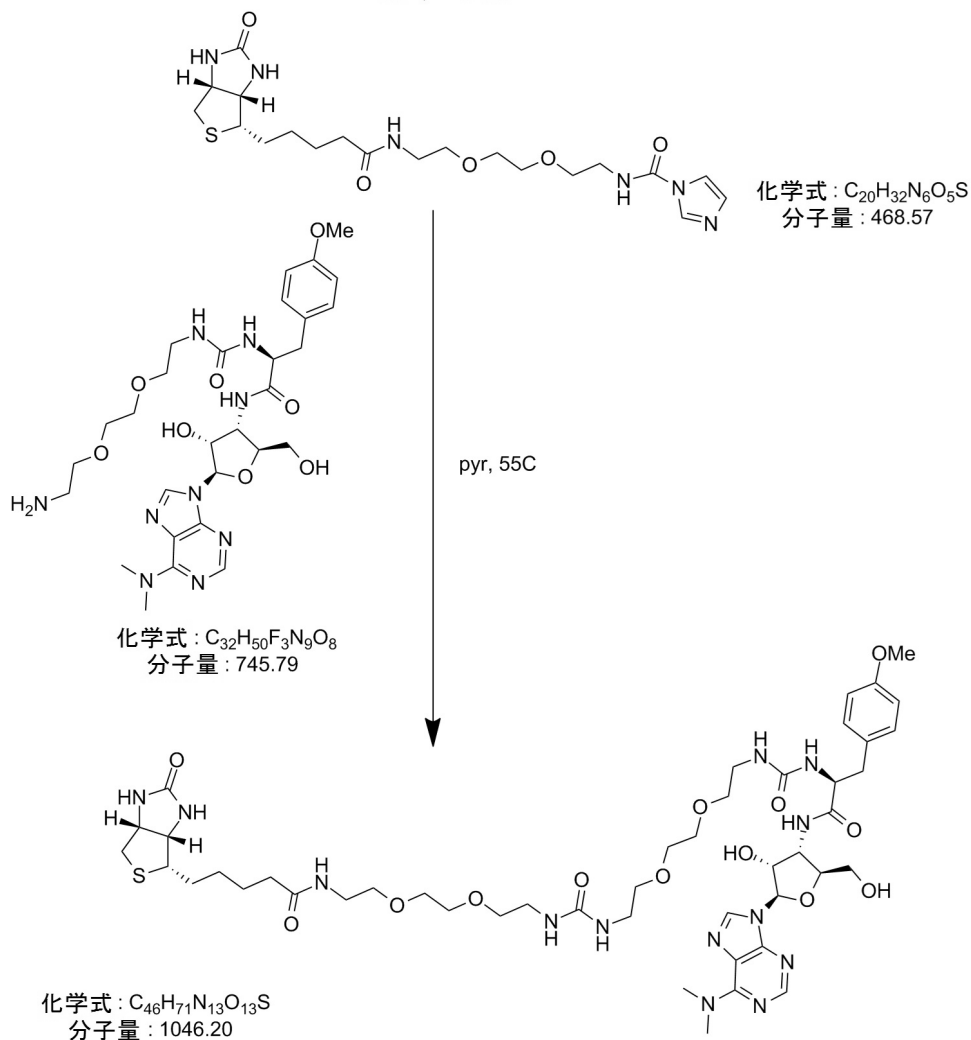
4. 3Pの最終的な合成（スキームⅣ）

【0150】

BJ1'（0.140 mmol）およびPJ1'（0.084 g、0.133 mmol）が6 mLのピリジンに溶解され、窒素（N₂）下において55℃にて一晚攪拌された。その後、（i）真空中で60℃にて溶媒が気化され、（ii）残留したピリジンがEtOAc（2×25 mL）と共沸され、（iii）油状の材料をEtOAc（3×25 mL）と

水（50 mL）との間で分割し、（i v）DCM（2 × 25 mL）によって水洗された。その後、水性相は1-ブタノール（25 mL）によって抽出された。

スキームIV



【0151】

1-ブタノールが真空中で40℃にて気化され、油状物を得た（TLC、10%のMeOH/DCM、UV光の下で $R_f = 0.5$ を有する主生成物を示す）。この最終的な油状の生成物は、シリカカラムクロマトグラフィによって精製され、フラクションが収集された（MeOH中に乾燥充填され、0.5%の NH_4OH /10%のMeOH/DCM中で溶出された）。所望の生成物はフラクション25-50中に存在し、気化後に0.006 gの黄色のろう状物質を生じる。生成物は、最後に分取HPLC（移動相は98%の水：2%のアセトニトリルで5分間、その後、1 mL/分の流量で35分の間に100%のアセトニトリルまで、 $\lambda 280\text{ nm}$ におけるUV検出器）によって精製された。この生成物は、以下では3Pと呼ばれる。

【0152】

生成物3PのNMRおよびLCMSデータ

【0153】

^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 8.43$ (s, 1H, Pur.), 8.23 (s, 1H, Pur.), 8.085 (d, $J = 7.7$, 1H), 7.836 (t, $J = 5.6$, 1H), 7.11 (d, $J = 8.6$, 2H, Pur.), 6.83 (d, $J = 8.6$, 2H, Pur.), 6.414 (s, 1H), 6.352 (s, 1H), 6.167 (m, 2H), 5.973 (s, 4H), 5.163 (s, 1H), 4.433 (m, 3H), 4.297 (m, 1H), 4.119 (m, 1H), 3.909 (

10

20

30

40

50

d t、J = 6. 9、3. 8、1 H)、3. 649 (m、1 H)、3. 491 (s、11 H)、3. 356 (m、7 H)、3. 118 (s、9 H)、2. 820 (m、2 H)、2. 687 (m、1 H)、2. 060 (s、2 H)、1. 484 (d、J = 8. 1、3 H)、1. 297 (m、2 H)。

【0154】

^{13}C NMR (100 MHz、DMSO) δ 172. 59、163. 04、158. 17、154. 72、152. 27、150. 07、138. 27、130. 03、120. 07、89. 79、78. 06、70. 23、69. 39、61. 54、59. 70、55. 91、40. 31、39. 72、38. 97、28. 90、25. 84。

【0155】

HPLC-MSによって純度(>90%)を確立した。固定相はRP18 (Phenomenex Kinetex #00G-4601-E0 C18 5 μm 250 $\times$ 4. 6 mm)、移動相は98%の水：2%のアセトニトリルで5分間、その後、35分の間に100%のアセトニトリルまで、 λ 280 nmにおけるUV検出器。化合物3 Pは17. 5分の保持時間を示す。正イオンモードESI検出を有するMSおよびイオントラップ質量分析器が、報告される構造と一致する、このピークのスキャン質量スペクトルを与える。特に、 m/z 1046. 5における $[\text{M}+\text{H}]^+$ は、その分子式 $\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{S}^+$ と一致する。

【0156】

ビーズ官能化

【0157】

Dynabeads (登録商標) MyOne (商標) ストレプトアビジンC1 (10 mg/mL、Life Technology #65001) が、磁気スタンドに固定された1. 5 mLのエッペンドルフチューブに1分間にわたって入れられて上澄みを除去し、DEPC処理水中の0. 05 MのNaCl、0. 1 MのNaOHを30 μL 使用して、3分間洗浄された。このチューブを1分間にわたって磁石上に置くことにより、この溶液が磁気ビーズから分離された。その後、ビーズは、DEPC処理水中の0. 1 MのNaClの溶液によって2回洗浄された(それぞれ3分間、磁石上で1分間)。最後に、ビーズは結合緩衝液(2 MのNaCl、1 mMのEDTA、10 mMのトリスHCl、DEPC水中にてpH 7. 5)に3分間浸漬された(1分の磁気分離)。

【0158】

その後、結合緩衝液(1 mM、50 μL)中の3 Pがビーズへ加えられ、サーモミキサーにおける室温(RT)での1000 rpmで1時間にわたるインキュベーションがこれに続いた。その後、室温において、1000 rpmで30分にわたり、ビーズはmP (1 mM)によってエンドキャップされた。最後に、200 μL のW緩衝液(10 mMのNaCl、10 mMのMgCl₂、20 $\mu\text{g/mL}$ のシクロヘキシミド、10 mMのHepes、DEPC水中にてpH 7)によってビーズは3回洗浄された(3分間の磁気分離)。その後、チューブは3分間にわたって磁石上に置かれ、上澄みを廃棄し、活性翻訳中のリボソームを採し出すために、官能化されたビーズの「ペレット」を使用した。陰性対照においては、以前に説明されたものと同じの条件を使用し、mPのみによってビーズが官能化された(50 μL 中で1 mM、90分、1000 rpm、室温にて)。

【0159】

ストレプトアビジンコーティングされたビーズによる3 Pの枯渇

【0160】

様々な量の磁気ビーズが、それらの懸濁液の溶液から、磁石を使用して分離される。2 MのNaCl、1 mMの3 P、1 mMのEDTA、10 mMのトリスHCl、DEPC水中にてpH 7. 5から成る溶液50 μL が、「乾燥」ビーズに対して加えられ、懸濁液を室温にて5分間インキュベートする。磁気ラック上でプルダウンした後、上澄みの吸光度が272 nmにおいて測定された。

【0161】

翻訳されたシーケンスおよび／または転写されたシーケンスのインビトロ無細胞選択

【0162】

全長のルシフェラーゼ (SP6 Control DNA、Promega #L474A) のインビトロ翻訳、および、陰性対照シーケンス (pGEMEX-1ベクター、Promega #P22211) の転写が、それぞれ陽性対照および陰性対照として、TNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega #L2881) を使用して、製造業者の使用説明書に従って得られた。手短に言えば、0.25 µg のプラスミドが、40 µL の TNT quick master mix、DEPC 水中 1 µL のメチオニンから成る、50 µL の IVTT euk-mix 反応に独立に加えられた。34 °C での 1000 rpm における 40 分間のインキュベーションの後、シクロヘキシミド (10 µg/ml) によって 3 分間にわたって反応がインキュベートされ、その後、400 µL の W 緩衝液 (10 mM の NaCl、10 mM の MgCl₂、20 µg/ml のシクロヘキシミド、10 mM の Hepes、DEPC 水中にて pH 7) によって、450 µL の全体積になるまで希釈された。この溶液は 3 つのバイアルに分けられた。そのそれぞれは反応の 150 µL を有する。第 1 番目のものは全 RNA (Trizol) の抽出に使用され、第 2 番目のものは 3 P ビーズに加えられ、第 3 番目のものは mP ビーズに加えられた。

10

【0163】

並行して、以前に説明された (「ビーズ官能化」の段落) ように、15 µL のビーズから始まって、ビーズ官能化が実行された。官能化されたビーズのペレットに IVTT euk-mix 溶液が加えられ、10 °C において、2 rpm での軌道回転中で (StarLab Rotator Mixer) 懸濁液を 1 時間インキュベートした。その後、チューブは、磁気スタンド上の氷上に 5 分間維持され、ビーズ結合されたリボソームをペレット化した。上澄みが分離され、1 つのアリコートが対照 (未結合フラクション) として維持され、500 µL の W 緩衝液によって 2 回ビーズを洗浄した。最後に、100 mM の NaCl、10 mM の MgCl₂、Trizma HCL、DEPC 水中にて pH 7.5 の 100 µL 中でビーズが再懸濁された。Trizol およびイソプロパノール沈殿によって、ビーズ結合されたリボソームから全 RNA が抽出された。30 µL の無 RNアーゼ水中で全 RNA が再懸濁された。この溶液から、600 ng の RNA が、2 µL (1 U/µL) の DNアーゼ I (Thermo Scientific、L. T. #EN0521) によって処理され、最終的な体積で 10 µL とした。消化されたサンプルが、製造業者の使用説明書に従って cDNA 合成 (RevertAid RT Reverse Transcription Kit、Thermo Scientific、L. T. #K1622) に使用された。

20

30

【0164】

製造業者の使用説明書に従って、Bright-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega、E2610) および Infinite 200 PRO reader (Tecan) を使用した発光信号を用いて、ルシフェラーゼ翻訳効率がモニタリングされた。並行して、Transcend (商標) Non-Radioactive Translation Detection Systems を使用して ε-ラベルされたビオチン化されたリジン-tRNA 複合物により、合成されたタンパク質の全プールがラベルされ、製造業者の使用説明書 (Promega #L5080) に従って、SDS-PAGE により効果的翻訳を検証した。

40

【0165】

pBluescript II KS+ および pPR-IBA2 プラスミドへとクローン化された全長 EGFP のインビトロ翻訳が、ルシフェラーゼ遺伝子と同じやり方で実行されたが、それぞれ 2 µg および 0.3 µg の DNA を IVTT euk-mix に添加した。

【0166】

MOPS-ホルムアルデヒドゲル

50

【0167】

2 μ Lの10倍MOPS緩衝液(200mMのMOPS、50mMの酢酸ナトリウム、10mMのEDTA、NaOHを有しpH7)、2 μ Lのホルムアルデヒド、9 μ Lの脱イオン化されたホルムアミド、および3.5 μ Lの無RNアーゼ水を添加して、等しい体積のRNAサンプル(2.5 μ L)が20 μ Lにされた。サンプルは70℃において10分加熱され、MOPS-ホルムアルデヒドアガロースゲル(1%のアガロース、IBIScientific #10D2002)に充填する前に氷上で冷やされた。

【0168】

細胞培養および処理

【0169】

乳癌細胞株MCF7(ATCC #ATCC(登録商標)HTB-22(商標))および神経芽細胞腫-脊髄(NSC34-CEDARLANE #CLU140)ハイブリッド細胞株が粘着板に播種され、10%のウシ胎仔血清(FBS)、2mMのL-グルタミン、100units/mlのペニシリン、および100mg/mlのストレプトマイシンが補給されたレッドフェノールを有するDMEM中において、37℃、5%のCO₂に維持された。溶解前に、80%コンフルエンスまで細胞が成長された。EGF処理のため、播種後、0.5%のFBS、2mMのL-グルタミン、100units/mlのペニシリン、および100mg/mlのストレプトマイシンが補給されたDMEM-レッドフェノール(飢餓条件)によって培地を交換する前に、MCF7細胞は80%コンフルエンスまで培養を維持された。細胞は、4時間にわたるEGF(1 μ g/ μ L)の添加の前に、37℃、5%のCO₂において、12時間にわたって飢餓状態に維持された。

【0170】

官能化ビーズによる細胞溶解物からの活性リボソームの単離

【0171】

MCF7またはNCS細胞が1.5 $\times 10^6$ cells/dishで播種され、それらを80%コンフルエンスまで成長させた。その後、細胞は、翻訳延長を阻害するため、溶解前に、37℃において5分間にわたり10 μ g/mlのシクロヘキシミドで処理された。その後、それぞれのディッシュに対し、細胞は、10 μ g/mlのシクロヘキシミドが補われたPBSによって4℃にて洗浄され、300 μ Lの溶解緩衝液(10mMのNaCl、10mMのMgCl₂、10mMのトリスHCl、pH7.5、1%のTriton X-100、1%のデオキシコール酸ナトリウム、0.2U/mlのDNアーゼI、RNアーゼ阻害剤、1mMのジチオスレイトール、および10 μ g/mlのシクロヘキシミド)によって、プレート上にこすり付けられた。核および細胞残屑が、4℃において、12,000gでの5分間にわたる遠心分離によって除去された(溶解物は等分され、2回以上の冷凍および解凍を回避しつつ、1ヶ月を超えない期間にわたり、-80℃において保存され得る)。Nanodrop ND-1000 UV-VIS分光光度計によって260nmにおける吸光度が測定された。溶解物は、W緩衝液(10mMのNaCl、10mMのMgCl₂、20 μ g/mlのシクロヘキシミド、10mMのHepes、DEPC水中にてpH7)によって0.3-1.7 a.u. A₂₆₀/ μ Lに希釈された。得られた溶液は官能化されたビーズに直接加えられ、4℃において、2rpmでの軌道回転中で(StarLab Rotator)懸濁液を車輪上で1時間インキュベートした。その後、チューブは、磁気スタンド上の氷上に5分間維持され、ビーズ結合されたりボソームをペレット化した。上澄みが捨てられ(未結合フラクション)、500 μ LのW緩衝液によって2回ビーズを洗浄した。最後に、100mMのNaCl、10mMのMgCl₂、30mMのTrizma HCl、DEPC水中にてpH7.5の(再懸濁緩衝液)50 μ L中でビーズが再懸濁された。

【0172】

RNA抽出

【0173】

製造業者の手順に従って、TRIzol試薬(Sigma #T94424)を添加す

10

20

30

40

50

ることにより、25 μ Lの再懸濁されたビーズ結合されたリボソームから、全RNAが抽出された。イソプロパノール沈殿の後、ペレットは、30 μ Lの無RNAアーゼ水中で再懸濁され、Nanodrop ND-1000 UV-VIS分光光度計により定量化され、その後、-80℃において保存された。

【0174】

RNA-seq実験のため、標準的なフェノール：クロロホルム（Sigma #P1944）抽出によってRNAが抽出された。ポリリボソームおよび全RNA抽出のため、対応するフラクションが収集され、200 μ g/mLのプロテインアーゼK（Life Technologies #EO0491）、DEPC水中の1%のSDS、およびRNAアーゼ阻害剤（0.4 a.u. / μ L）によって37℃にて1.5時間にわたり処理された。フェノール：クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿の後、ビーズで誘導された、ポリリボソームおよびサブポリリボソームRNAサンプルが、Nanodrop ND-1000 UV-VIS分光光度計によって定量化され、等分され、-80℃で保存された。RNA品質は、製造業者のガイドラインに従って、RNA 6000ピコキット（Agilent #5067-1513）を伴うAgilent 2100 Bioanalyzerによって確認された。

【0175】

ウエスタンブロット解析

【0176】

実験のタイプによって、細胞溶解物は、(i) ポリリボソーム溶解緩衝液中（10 mMのNaCl、10 mMのMgCl₂、10 mMのトリスHCl、pH 7.5、1%のTriton X-100、1%のデオキシコール酸ナトリウム、0.2 U/mlのDNアーゼI、RNAアーゼ阻害剤、1 mMのジチオスレイトール、および10 μ g/mlのシクロヘキシミド）で調製され、官能化されたビーズで処理されたもの、または、(iii) 放射性免疫沈降法アッセイ（RIPA）緩衝液（製造業者の手順に従って、150 mMのNaCl、0.1%のSDS、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、1%のTriton X-100、50 mMのトリス、pH 7.5であって、ペプスタチンA、Sigma、#P5818、プロテアーゼ、Sigma、#P8340、およびホスファターゼ阻害剤、Sigma、#P0044が加えられている）によって調製されたもの、であった。ブラッドフォード（Sigma #B6916）によってタンパク質が定量化され、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離され、PVDF膜上に移された。手短に言えば、5 μ Lの6倍Leammlローディング緩衝液（0.6 Mのジチオスレイトール、12%のSDS、60%のグリセロール、0.06%のプロモフェノール・ブルー、0.375 Mのトリス、NaOHを伴ってpH 6.8）が、5 μ gの全タンパク質に、または、25 μ Lの再懸濁されたビーズに加えられた。25 mMのトリス、192 mMのグリシン（Biorad #4569033）中のSDS-PAGEにて行われた簡単な遠心分離の後、サンプルは95℃において5分間加熱された。25 mMのトリス、192 mMのグリシン、20% v/vのメタノール、pH 8.3中にて、一定の280 mAにおいて2.5時間にわたり、PVDF膜上（IMMOBILON-P、Millipore #IPVH20200）でブロッティングが実行された。膜は、TBS-Tween（0.1%のTween）中の5%のBSA（Sigma、#05470）中で1時間にわたってブロックされ、一次抗体中で4℃において一晩インキュベートされ、その後、TBS-Tween（0.1%、TBS-T）中で3回、それぞれ10分間洗浄された。ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされた二次抗体によるインキュベーションの後、プロットがTBS-Tween中で3回（それぞれ5分間）洗浄され、サブライヤによって指示されたようにECL Plus検出キット（GE Healthcare、Amersham ECL Prime #RPN2232）によって処理された。

【0177】

SPS6（#2217）を認識する一次抗体はCell Signalingからのものであった（1:1,000希釈で使用）。RPL26（#ab59567）、eIF4

10

20

30

40

50

B (a b 6 8 4 7 4)、e I F 4 A 1 (a b 3 1 2 1 7)、h b - E G F (# a b 1 8 5 5 5)、C Y P 2 7 A 1を認識する一次抗体はA b c a mからのものであった(1:50希釈で使用)。P L K 3 (# P A 5 - 1 5 2 9 0) およびP A L L D (# M A 5 - 1 6 4 1)を認識する抗体はT h e r m o S c i e n t i f i cからのものであった(1:1,000希釈で使用)。E G F Pを認識する一次抗体はR o c h e (# 1 3 5 3 7 4 0)からのものであった(1:1,000希釈で使用)。H R Pコンジュゲートされた二次抗体はS a n t a C r u z b i o t e c h n o l o g yからのものであった(1:10,000希釈で使用、# s c - 2 0 0 4、# s c - 2 0 0 5)。これに対し、ストレプトアビジン-H R PはP r o m e g aからのものであった(T r a s c e n d e n t k i t、# L 5 0 8 0、1:1,000希釈で使用)。化学発光は、C h e m D o c - I t (B i o - R a d)によって取得され、I m a g e Jソフトウェア(v1.45s)を用いて解析された。全ての実験は生物学的三重反復で行われた。ウエスタンブロット前のメタノール/クロロホルムタンパク質抽出および沈殿は、結果の精度を改善しない。P r e c i s i o n P l u s P r o t e i n S t a n d a r d K a l e i d o s c o p e標準(B i o r a d # 1 6 1 - 0 3 7 5)が、ラダータンパク質マーカとして使用された。

10

【0178】

E G F P免疫沈降が、抗E G F P抗体(1:100希釈で使用、# A 1 1 1 2 2)により官能化された20 μ LのD y n a b e a d s P r o t e i n G (L i f e t e c h n o l o g i e s、# 1 0 0 0 3 D)を用いて実行され、エンドオーバーエンド回転機において、室温にて1-2時間にわたり、T B S緩衝液(pH7.5)中にて250 μ Lまで希釈されたI V T T e u k - m i xの50 μ Lによりインキュベートされた。

20

【0179】

ポリソームプロファイリング

【0180】

M C F 7細胞が1.5 $\times 10^6$ c e l l s / d i s hで播種された。処理(E G Fで4時間)後、37 $^{\circ}$ Cにおいて10 μ g/mlのシクロヘキシミドによって5分間細胞がインキュベートされ、mRNAにリボソームを捕捉した。細胞は、シクロヘキシミド(10 μ g/ml)が補われたP B Sによって洗浄され、300 μ Lの溶解緩衝液(10mMのN a C l、10mMのM g C l₂、10mMのトリスH C l、pH7.5、1%のT r i t o n X - 1 0 0、1%のデオキシコール酸ナトリウム、0.2U/ml、DNアーゼI、RNアーゼ阻害剤、1mMのジチオスレイトール、および10 μ g/mlのシクロヘキシミド)によってプレート上に直接こすり付けられた。核および細胞残屑が、4 $^{\circ}$ Cにおいて、12,000gでの5分間にわたる遠心分離によって除去された。上澄みは、100mMのN a C l、10mMのM g C l₂、30mMのトリスH C l、pH7.5を含む15-50%の線形ショ糖密度勾配上に直接移され、スイングロータ上のS o r v a l l超遠心分離機中で、4 $^{\circ}$ Cにおいて、180,000gで100分間にわたり遠心分離された。40S、60S、および80Sのピークに対応するフラクション、および、ポリソームに対応するフラクションが、254nmでの吸光度をモニタリングしながら収集された。各フラクションが液体窒素中で急速冷凍され、RNAまたはタンパク質抽出用に-80 $^{\circ}$ Cにて保存された。

30

40

【0181】

R N A - s e q

【0182】

酸性フェノールクロロホルム分離(S i g m a)によって(ビーズおよびショ糖密度勾配フラクションから)RNAが抽出された。RNAサンプルの品質は、A g i l e n t B i o a n a l y z e r 2 1 0 0およびN a n o d r o p N D - 1 0 0 0分光光度計(T h e r m o S c i e n t i f i c)を使用して評価された。全トランスクリプトームライブラリ調製が、R I N $\geq$ 8を有する1 μ gの全RNAから始まって実行された。ポリ-d Tオリゴ付着磁気ビーズを使用したポリ-A含有mRNA分子の濃縮に続いて、全

50

ての回収されたRNAが、Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina #FC-122-1001 #FC-122-1002) および手順v2 Rev. C. を使用して処理された。完成したライブラリが、DNA定量化およびバイオアナライザ解析 (平均フラグメント長=274bp) により評価され、その後、配列決定に提出された。バーコードを用いてRNA-seqが構成され、レーンごとに12サンプルの多重化を可能とした。単一読み出しにおける手順HCS 1.5.15.1を使用してIllumina HiSeq 2000で配列決定が実行された。

【0183】

NGSデータ解析

10

【0184】

Illumina HiSeq 2000によってサンプルが配列決定された。初期設定のパラメータを使用したTopHat (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) によって、未処理の配列決定の読み出し (100ntの長さ) が、ヒトゲノムおよびトランスクリプトーム (バージョンGRCh37) に対してマッピングされた。

【0185】

Ensembl 遺伝子アノテーション (Ensemblリリース74) に基づいて、Cufflinks パッケージ (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) 中のCuffdiffを使用して、位置合わせされた読み出しからFPKM値を算出し、差次的発現に対する試験を実行した。

20

【0186】

DEG検証

【0187】

ランダムヘキサマー、単一ストランド逆転写酵素 (RevertAid RT Reverse Transcription Kit, Life Technologies, #K1622) を使用してRTが実行され、TaqMan 遺伝子特異的プライマーを使用してリアルタイム定量的PCR (qPCR) が実行された。10µLの2倍TaqMan Universal Master Mix II (Life Technology #44400387)、1µLの20倍TaqMan Assay、1µLのcDNA (1:4希釈) および無RNAアーゼ水により、20µLの最終的な体積で、96ウェルプレートにおいてTaqMan qPCRが実行された。実験は三重反復で行われた。エラーバーは、三重反復実験から算出された±s.d. を表す。

30

【0188】

インビトロ無細胞系から抽出されたRNAに対するRT-qPCR

【0189】

官能化されたビーズから、および、全IVTT euk-mix 反応から全RNAを抽出するために、Trizol (Sigma) が使用された。各サンプルに対し、600ngのRNAがDNアーゼIによって消化された。製造業者の使用説明書に従ってRevertAid RT Reverse Transcription Kitを使用した単一ストランドcDNA合成のために、60ngの消化されたRNAサンプルが使用された。ランダムヘキサマーを使用してRTが実行された。製造業者の使用説明書に従ってKAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystem #KK4651) を使用した、転写産物量の定量化のためのRT-qPCRが設計された。手短に言えば、反応は、1µLのcDNAおよび以下のサイクル条件を使用して、20µLの最終的な体積で実行された。すなわち、3分、-95℃の活性化、2秒、-95℃の変性、20秒、-57℃のアニーリングおよび延長、25サイクル、65℃から95℃までの融解上昇 (melting ramp)。データはBio-Rad CFX-Manager 1.6ソフトウェアによって処理された。標的遺伝子の相対的定量化が、Pfaffl法に従って、18Sハウスキーピング遺伝子に対する交差閾値の差分 (ΔCt)、

40

50

および全RNAサンプルに対して算出された相対 $\Delta\Delta Ct$ を算出して決定された。

【0190】

図15のcに報告される正規化された倍率変化比が、処理されたサンプルの $\Delta\Delta Ct$ と処理されていないサンプルの $\Delta\Delta Ct$ との間の比として決定された。全RNAおよび対照(mPビーズ ΔCt)に対して算出された相対 $\Delta\Delta Ct$ に対し、交差閾値の差分(ΔCt)が決定された。

【0191】

マウス脳溶解物の調製

【0192】

以前にLunelli L.ら(2016)⁶⁸において説明されたようにマウス脳溶解物が調製された。

【0193】

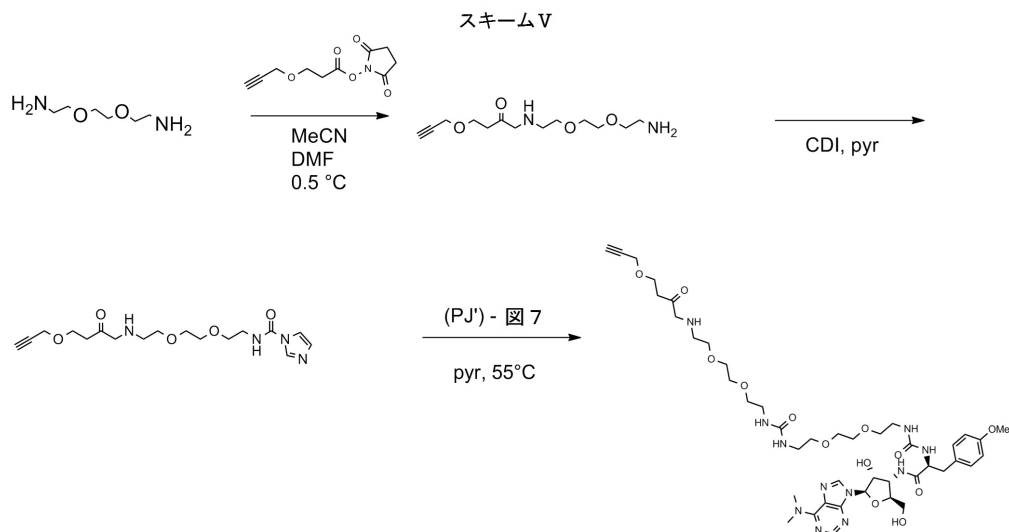
一般式(I)に対するその他の化学修飾

【0194】

好ましい実施形態において「A」は、アルキン残基、アジド残基、またはビオチン残基であり得る。一般式(I)において「A」を「L」と結合させる化学は、ジェフアミンに対して結合しているビオチン-NHSについて以前に説明されたように、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルとジェフアミンユニットの1級アミノ基との間の化学反応に基づいている。我々は、アジドおよびアルキン化学基を結合させるために同じ化学を使用した。

【0195】

3PPと呼ぶアルキン-3P分子の合成(スキームV-Va)



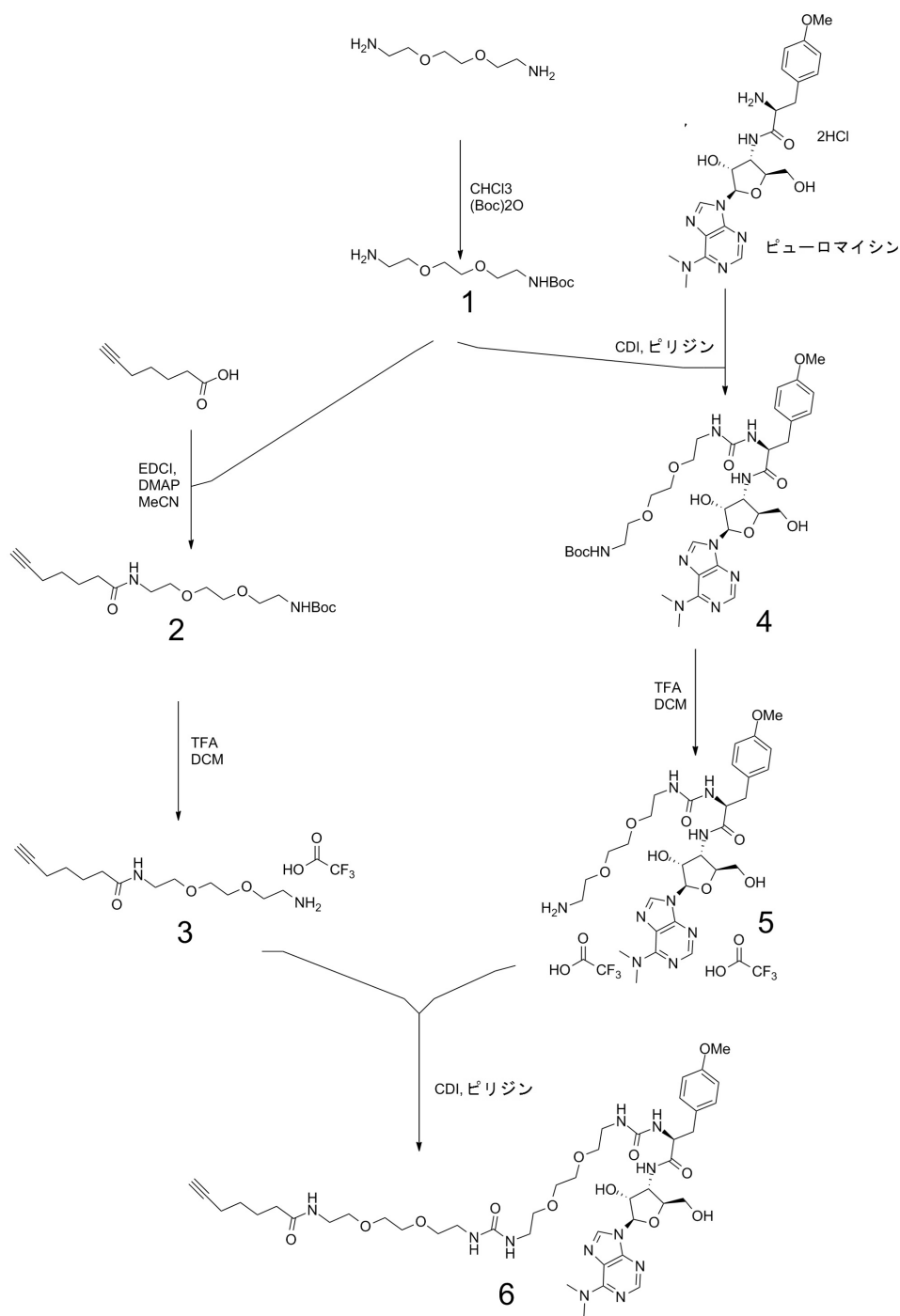
【0196】

アルキン残基を有する分子が、市販の前駆物質(例えば、アルキン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、#764221、Sigma; アルキン-PEG5-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、#764191、Sigma)から選択される。ジェフアミン(7mmol)が、500mLのアセトニトリル(MeCN、Sigma #34888)に溶解された。3mmolのアルキン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(アルキン-NHS)がDMF(10mL)に溶解された。この溶液が滴下漏斗中に加えられた。その後、アルキン-NHS溶液は、ジェフアミン溶液に滴下して加えられ、 N_2 下で0-5°Cにおいて、一晚攪拌された。気化後、生成物がMeCN中で再懸濁され、分取HPLCによって精製された。全長分子の合成は、CDIと反応させておいたジェフアミン結合されたピューロマイシンに対してこの化合物を添加することによって実現された。後者の化合物は、段落「3P分子の化学合成」(材料および方法)の段階3において調製される。後者の手順は、この材料に対する精製手順も含む。

【0197】

3 P Pの追加的な合成経路がスキーム V aに説明される。

スキーム V a



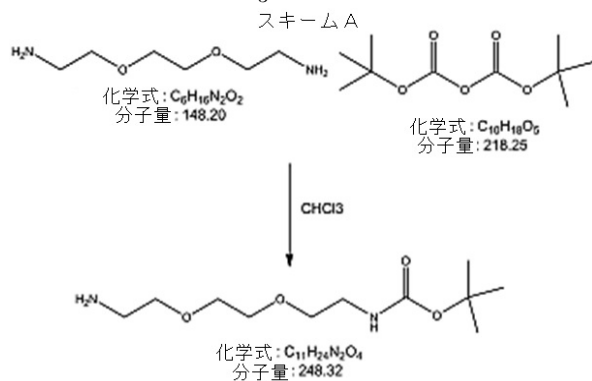
【0198】

1の合成 (スキーム A)

【0199】

2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタンアミン (440 mL のクロロホルム中10モル当量) が、温度を4℃に維持しながらクロロホルム溶液中でBOC無水物によって処理された。30分後、ゆっくりと温められ、15-18℃において攪拌された。有機溶液が飽和重炭酸塩で洗浄され、その後、飽和食塩水で洗浄され、最後に MgSO_4 で乾燥された。40℃における真空中 (in vacuo: iv) での気化により、澄んだ油状物として、所望のモノBoc保護されたアミンを生じる (1、6.86 g、80. 50

4%)。CDCl₃中の¹H-NMRスペクトルは、化合物1の構造と一致する。



10

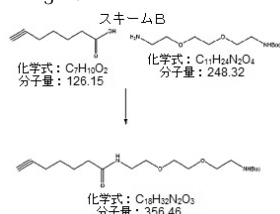
【0200】

2の合成(スキームB)

【0201】

アミン(1)(2g、MeCN溶液)が、EDCI・HClを使用して、18℃において週末にかけて攪拌することにより、1モル当量のヘプター6-イン酸に結合された。原料が40℃にて真空中で気化され、EtOAcに溶解され、水、0.5mMのHCl、水と飽和NaHCO₃によって順番に洗浄された。有機部分がMgSO₄で乾燥され、澄んだ無色の油状物として、所望のアミドを生じた(2、2.38g、82.9%)。CDCl₃中の¹H-NMRスペクトルは、化合物2の構造と一致する。

20



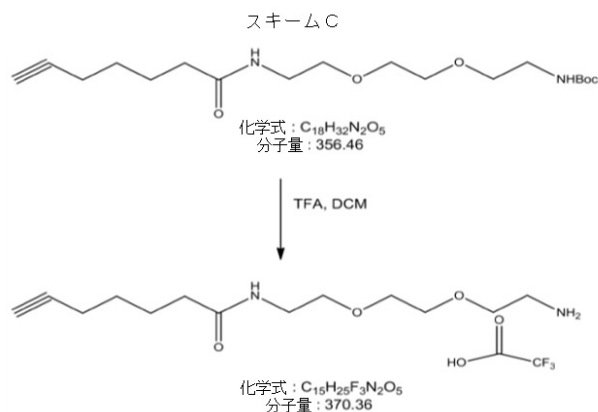
【0202】

3の合成(スキームC)

【0203】

25℃にて攪拌されたBocアミン(2)の溶液(48mLのジクロロメタン中2.38g)に対して純粋なトリフルオロ酢酸(10モル当量、TFA)が滴下して加えられ、42時間にわたって維持された。温度は45℃まで上げられ、完全に2が見えなくなるまで維持された。標準的な検査の後、澄んだ無色の油状物としてアミンTFA塩(3、100%)が得られた。最終的な質量は収量100%を超えた。CDCl₃中の¹H-NMRスペクトルは、化合物3の構造と一致する。

30



40

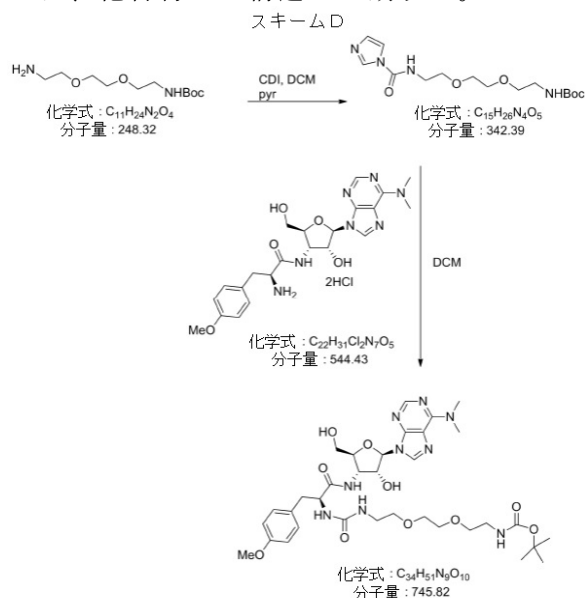
【0204】

4の合成(スキームD)

【0205】

50

ピリジン（21 mL）中の0.837 gのCDIが、温度を5℃よりも低く維持して、1モル当量のアミン（1）（1.28 g、73 mLのジクロロメタン）に対して滴下して加えられた。この溶液は温められ、1モル当量のプーロマイシン2HCl（2.997 g）によって2時間にわたって還流され、灰色がかった白色の粘着性の固体として所望の尿素を生じた（4、2.64 g、68.6%）。DMSO-d₆中の¹H-NMRスペクトルは、化合物4の構造と一致する。



10

20

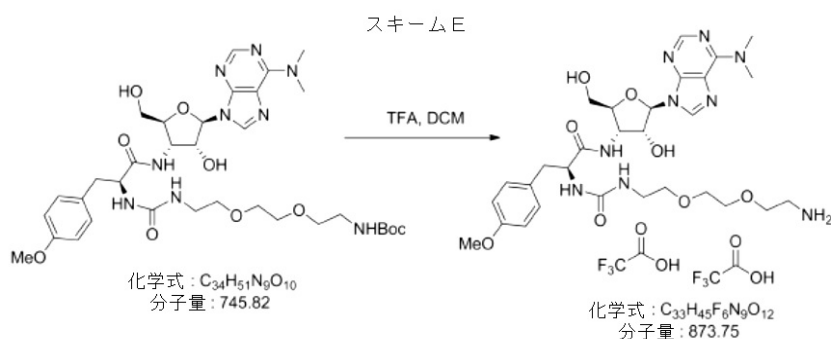
【0206】

5の合成（スキームE）

【0207】

このBocアミン（4）（53 mLのジクロロメタン中2.64 g）が、10モル当量の純粋なTFA（2.66 mL）によって脱保護され、澄んだ無色の油状物としてアミンTFA塩（5、～60%）を生じた。TFAの存在に起因して、最終的な質量は100%の質量収量を超えた（スキームX）。脱保護は、プリン部分の開裂を伴った。そのため、反応は57%の所望の生成物、26%のSMにて停止された（LCMSにより）。塩基を取り除き、（5）を精製する試みは分解につながる。

30



40

【0208】

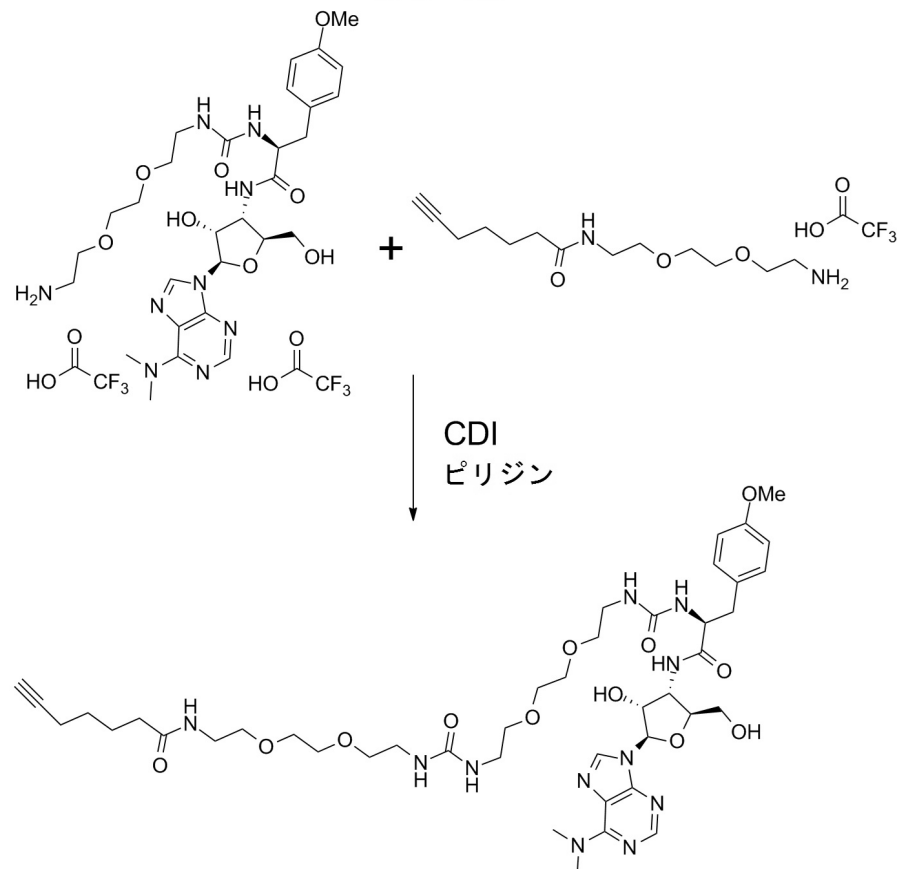
6の合成（スキームF）

【0209】

N₂下、0～5℃において、CDIがピリジン（10 mL）中で攪拌された。ピリジン中のアミンTFA塩（3）は10分を超えて充填され、LCMSがイミダゾール中間体の完全な形成を示すまで、混合物は室温まで暖まることを許された。ピリジン中の粗製プーロマイシンアミンTFA塩（5）の溶液が1分を超えて充填された。生じた混合物が室温まで温められ、所望の生成物（57%の変換）の形成が失速したように見えるまで、LCMSによって～24時間にわたって反応がモニタリングされた。混合物が検査され、所

50

スキーム F



生成物 3 P P の N M R および L C M S データ

¹H NMR (400 MHz、DMSO-d₆) δ = 8.43 (s、1H)、8.23 (s、1H)、8.09 (d、J = 7.7、1H、CONH)、7.836 (t、J = 5.6、1H、CONH)、7.11 (d、J = 8.6、2H)、6.83 (d、J = 8.6、2H)、6.16 (m、2H)、5.97 (m、3H)、5.16 (t、J = 5.3 Hz、1H)、4.43 (m、2H)、3.92 (m、1H)、3.72 (s、3H)、3.65–3.03 (一連のm)、2.86 (dd、J = 5.5、14.4、1H)、2.73 (t、J = 2.7、1H、-C≡CH)、2.70 (dd、J = 8.5、14.4、1H)、2.14 (dt、J = 2.7、7.0、2H、CH₂-C≡)、2.07 (t、J = 7.3 Hz、2H、NHCO-CH₂-C-C-C-C≡)、1.54 (m、2H、-CH₂-C-C-C≡)、1.40 (m、2H、-CH₂-C-C≡)。

HPLC-MSによって純度 (>90%)を確立した。特に、ESI(-)負イオンモードにおいて観測された m/z 927.5における $[M-H]^-$ は、その分子式が $C_{43}H_{65}N_{11}O_{12}$ と一致する。また、ESI(+)正イオンモードにおいて観測された m/z 951.4における $[M+Na]^+$ は、その分子式が $C_{43}H_{66}N_{11}NaO_{12}^+$ と一致する。

【 0 2 1 3 】

アジド-3 P分子の合成

アジド残基を有する分子が、市販の前駆物質（例えば、アジド-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、#88902、Life Technologies）から選択される。ジェフアミン（7mmol）が、500mLのアセトニトリル（MeCN、Sigma #34888）に溶解された。3mmolのアジド-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（アジド-NHS）がDMF（10mL）に溶解された。この溶液が滴下漏斗中に加えられた。その後、アジド-NHS溶液は、ジェフアミン溶液に滴下して加えられ、N₂下で0-5℃において、一晚攪拌された。その後、生成物が分取HPLCによって精製される。その後、全長分子の合成は、段落「3 P分子の化学合成」（材料および方法）の段階3から開始することができる。

10

【0214】

固体表面の官能化および官能化された（レセプタ様の）固体表面への分子の結合（スキームVIおよびVII）

アジドおよびアルキン官能基は、一般式（I）の「A」部分において交換可能であるので、本明細書にて、我々は、表面官能化のための2つの異なる経路

—経路A（アジド-3 P分子を結合する固体表面のアルキン）、

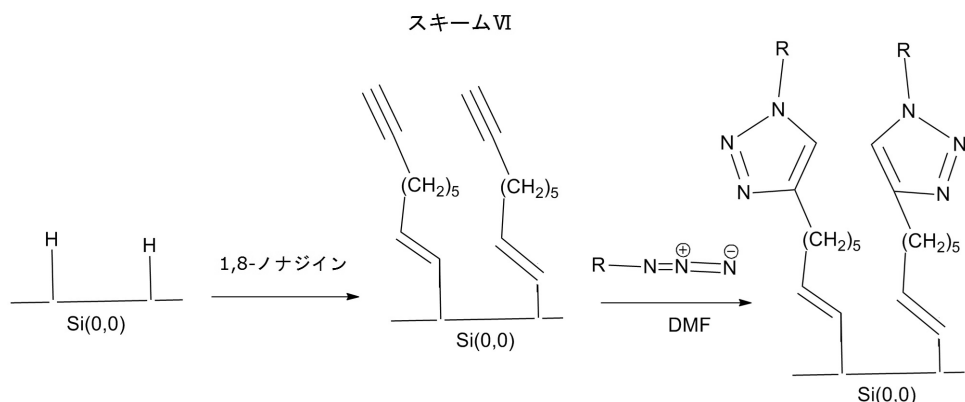
—経路B（アルキン-3 P分子を結合する固体表面のアジド）、

を説明する。

【0215】

経路A

20



30

【0216】

シリコンウエハが、水性フッ素溶液（2.5%のフッ化水素酸、1.5分）へ移される前に、熱ピラニア溶液（100℃、硫酸3volに対して質量で30%の水性過酸化水素1vol）中で30分間にわたってクリーニングされる。続いて、これらのサンプルは、シュレンクフラスコから完全に空気を除くように十分に注意しながら、1,8-ノナジイン（Sigma、#161306）の脱気されたサンプルへと移される。このサンプルは、170℃に設定されたオイルバス中に3時間にわたって反応槽が浸漬されていた間、アルゴンの流れの下に維持される。その後、フラスコは雰囲気に対して開かれる。そして、官能化された表面のサンプルを、解析するかまたは置換されたアジド種とさらに反応させるかのいずれかの前に、大量のクロロホルム、酢酸エチル、その後エタノールで連続してリンスした。

40

【0217】

典型的なクリック法において、アルキン官能化されたシリコン表面を含む反応バイアルに対し、(i) 10mMのアジド（R-N₃、ここでRはアジド3 P-分子である）、エタノール/水1:1、(ii) 硫酸銅（II）・五水和物（アジドに対して1mol%）、および(iii) アスコルビン酸ナトリウム（アジドに対して25mol%）が加えられる。反応は、反応環境から空気を除くことなく、室温で実行され、17から18時間後に停止される。調製された表面結合の[1, 2, 3]-トリアゾールサンプルが、大量の酢酸エチル、エタノール、および水によって連続してリンスされ、その後解析される。

50

【0218】

代替的に、アルキン残基によって官能化された市販の固体表面が、アジド官能化された分子を一般式（I）と共有結合させるために使用される。アルキンアガロースビーズ（# CLK-1032-2、Jena Bioscience）またはアルキン磁気ビーズ（CLK-1035-1、Jena Bioscience）が、この分子を共有結合的に付着させるための効率的なマトリクスである。

【0219】

経路 B

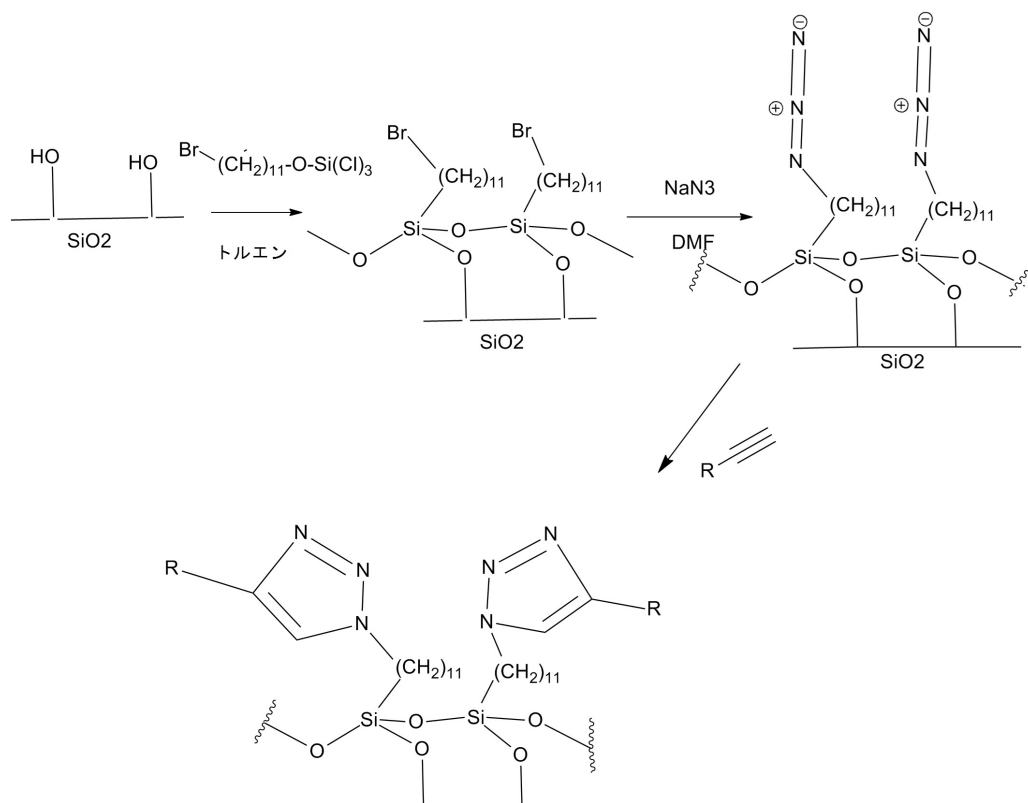
【0220】

シリコンウエハが、商用のクリーニングチャンバ中で、20分間、超音波処理およびUV/オゾン雰囲気中に露出される。トルエン中の11-ブロモウンデシルトリクロロシラン（代替的に（3-ブロモプロピル）トリクロロシランが使用され得る、Sigma、# 437808）の1mmol溶液中にこれらのウエハを45分間浸漬することによって、単分子層が吸着される。吸着質溶液から除去した後、これらのウエハは、トルエン中で超音波処理され、物理吸着した多分子層を除去するために、トルエンを染み込ませた織物によって穏やかにスクラブ処理され、トルエン、アセトン、およびエタノールでリンスされる。最後に、これらはエタノール中で超音波処理され、そして、高純度の窒素中で送風乾燥される。室温において48時間にわたりDMF中のアジ化ナトリウムの飽和溶液中にウエハを浸漬し、これに続いて、蒸留水、エタノール、アセトン、およびトルエンによって完全にリンスすることによって、アジド基に対する臭素の交換が実行される。

【0221】

粉末の基質に対するものと同様なやり方で、1mLの適切な末端アルキン（R-C≡CH、ここでRはアルキン3P-分子である）中に24時間にわたってウエハを浸漬することによって、アジド官能化されたウエハによる付加環化反応が実行される。

スキームVII



【0222】

代替的に、一般式（I）のアルキン官能化された分子が、アジド残基で官能化された市販の磁気ビーズ（# CLK-1036-1、Jena Bioscience）と共有結

合的に結合され得る。

【0223】

参考文献

1. Rich, A. Polyribosomes. *Sci. Am.* 209, 44-53 (1963).
2. Warner JR, Knopf PM, R. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 1963; 49(1) 122-129. 49, 122-129 (1963).
3. Myasnikov, A. G. et al. The molecular structure of the left-handed supra-molecular helix of eukaryotic polyribosomes. *Nat. Commun.* 5, 5294 (2014).
4. Mrazek, J. et al. Polyribosomes Are Molecular 3D Nanoprinters That Orchestrate the Assembly of Vault Particles. *ACS Nano* 6, 21-34 (2014). 10
5. Viero, G. et al. Three distinct ribosome assemblies modulated by translation are the building blocks of polysomes. *J. Cell Biol.* 208, 581-596 (2015).
6. Kopeina, G. S. et al. Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.* 36, 2476-88 (2008).
7. Brandt, F., Carlson, L.-A., Hartl, F. U., Baumeister, W. & Grunewald, K. The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells. *Mol. Cell* 39, 560-9 (2010).
8. Ortiz, J. O. et al. Structure of hibernating ribosomes studied by cryoelectron tomography in vitro and in situ. *J. Cell Biol.* 190, 613-621 (2010). 20
9. Brandt, F. et al. The Native 3D Organization of Bacterial Polysomes. *Cell* 136, 261-271 (2009).
10. Ruggero, D. Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).
11. Bhat, M. et al. Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 261-278 (2015).
12. Branco-Price, C., Kawaguchi, R., Ferreira, R. B. & Bailey-Serres, J. Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in Arabidopsis seedlings subjected to oxygen deprivation. *Ann. Bot.* 96, 647-60 (2005).
13. Larsson, O. et al. Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8977-8982 (2012). 30
14. Yanguéz, E., Castro-Sanz, A. B., Fernandez-Bautista, N., Oliveros, J. C. & Castellano, M. M. Analysis of genome-wide changes in the translome of Arabidopsis seedlings subjected to heat stress. *PLoS One* 8, e71425 (2013).
15. Arava, Y. et al. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3889-94 (2003).
16. Tebaldi, T. et al. Widespread uncoupling between transcriptome and translome variations after a stimulus in mammalian cells. *BMC Genomics* 13, 220 (2012).
17. Heiman, M. et al. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* 135, 738-48 (2008). 40
18. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218-23 (2009).
19. Gao, X. et al. Quantitative profiling of initiating ribosomes in vivo. *Nat. Methods* (2014).
20. Lee, S. et al. PNAS Plus: Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2424-E2432 (2012).
21. Aviner, R., Geiger, T. & Elroy-Stein, O. Genome-wide identification and 50

quantification of protein synthesis in cultured cells and whole tissues by puromycin-associated nascent chain proteomics (PUNCH-P). *Nat. Protoc.* 9, 751-60 (2014).

22. Schwanhaussner, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342 (2011).

23. Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J. & Bailey-Serres, J. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E203-12 (2014).

24. Warner, J. R., Knopf, P. M. & Rich, A. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. {U.S.A.}* 49, 122-129 (1963).

25. Arava, Y. et al. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3889-3894 (2003).

26. Lackner, D. H. et al. A Network of Multiple Regulatory Layers Shapes Gene Expression in Fission Yeast. *Mol. Cell* 26, 145-155 (2007).

27. Thermann, R. & Hentze, M. W. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875-878 (2007).

28. Graber, T. E. et al. Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16205-10 (2013).

29. Anger, A. M. et al. Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80-5 (2013).

30. Hansen, J. L., Moore, P. B. & Steitz, T. a. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* 330, 1061-1075 (2003).

31. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930 (2000).

32. Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., Haag, A. & Ban, N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* 331, 730-736 (2011).

33. Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M. & Ban, N. Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem. Sci.* 37, 189-198 (2012).

34. Yarmolinsky, M. B. & Haba, G. L. Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1721-1729 (1959).

35. Wilson, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 35-48 (2014).

36. Welch, M., Chastang, J. & Yarus, M. An Inhibitor of Ribosomal Peptidyl Transferase Using the Transition-State Analogy. *Biochemistry* 34, 385-390 (1995).

37. Pestka, S., Rosenfeld, H., Harris, R. & Hintikka, H. Studies on transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. XXI. Effect of antibiotics on peptidyl-puromycin synthesis by mammalian polyribosomes. *J. Biol. Chem.* 247, 6895-6900 (1972).

38. Odom, O. W., Picking, W. D. & Hardesty, B. Movement of tRNA but not the nascent peptide during peptide bond formation on ribosomes. *Biochemistry* 29, 10734-10744 (1990).

39. Kukhanova, M. et al. The donor site of the peptidyltransferase center of ribosomes. *FEBS Lett.* 102, 198-203 (1979).

40. Schmeing, T. M. et al. A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nat Struct Biol* 9, 225-230 (2002).

- 4 1. Gambetti, P., Hirt, L., Stieber, A. & Shafer, B. Distribution of puromycin in peptides in mouse entorhinal cortex. *Exp. Neurol.* 34, 223-228 (1972).
- 4 2. Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M. & Pierre, P. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat. Methods* 6, 275-277 (2009).
- 4 3. Biyani, M., Husimi, Y. & Nemoto, N. Solid-phase translation and RNA-protein fusion: A novel approach for folding quality control and direct immobilization of proteins using anchored mRNA. *Nucleic Acids Res.* 34, (2006).
- 4 4. Roberts, R. W. & Szostak, J. W. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12297-12302 (1997). 10
- 4 5. Bernabo, P. et al. Studying translational control in non-model stressed organisms by polysomal profiling. *J. Insect Physiol.* 76, 30-35 (2015).
- 4 6. Nathans, d. & Neidle, A. Structural Requirements for Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. *Nature* 197, 1076-1077 (1963).
- 4 7. Yarmolinsky, M. B. & Haba, G. L. Inhibition By Puromycin of Amino Acid Incorporation Into Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1721-1729 (1959).
- 4 8. ALLEN, D. W. & ZAMECNIK, P. C. The effect of puromycin on rabbit reticulocyte ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 865-874 (1962).
- 4 9. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. a. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å Resolution. *Sci.* 289, 905±920 (2000). 20
- 5 0. Starck, S. R., Green, H. M., Alberola-Ila, J. & Roberts, R. W. A general approach to detect protein expression in vivo using fluorescent puromycin conjugates. *Chem. Biol.* 11, 999-1008 (2004).
- 5 1. Afshar-Kharghan, V., Li, C. Q., Khoshnevis-Asl, M. & Lopez, J. A. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalph gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood* 94, 186-191 (1999).
- 5 2. Higashi, K. et al. Enhancement of +1 frameshift by polyamines during translation of polypeptide release factor 2 in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 281, 9527-9537 (2006). 30
- 5 3. Ingolia, N. T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat. Rev. Genet.* 15, 205-13 (2014).
- 5 4. Mura, M. et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene* 1-12 (2014).
- 5 5. Yoon, J.-H. et al. Scaffold function of long non-coding RNA hotair in protein ubiquitination. *Nat. Commun.* 4, 2939 (2013).
- 5 6. Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147, 789-802 (2011). 40
- 5 7. N. Oll, H., Staehelin, t. & Wettstein F. O. Ribosomal Aggregates Engaged in Protein Synthesis: Ergosome Breakdown and Messenger Ribonucleic Acid Transport. *Nature* 198, 632-638 (1963).
- 5 8. Wettstein, F. O., Staehelin, t. & Noll, H. Ribosomal Aggregate Engaged in Protein Synthesis: Characterization of the Ergosome. *Nature* 197, 430-435 (1963).
- 5 9. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621-628 (2008).
- 6 0. Nagashima, T. et al. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor 50

or signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. J. Biol. Chem. 282, 4045-4056 (2007).

6 1. Nagashima, T. et al. Feedforward regulation of mRNA stability by prolonged extracellular signal-regulated kinase activity. FEBS J. 282, 613-629 (2015).

6 2. Foss, E. J. et al. Genetic variation shapes protein networks mainly through non-transcriptional mechanisms. PLoS Biol. 9, (2011).

6 3. Ghazalpour, A. et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. PLoS Genet. 7, (2011).

6 4. Zhang, B. et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. Nature 1-21 (2014). doi:10.1038/nature13438

6 5. Gry, M. et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. BMC Genomics 10, 365 (2009).

6 6. Guydosh, N. R. & Green, R. Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. Cell 156, 950-962 (2014).

6 7. Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J. & Brown, P. O. Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments. Elife 2014, 1-16 (2014).

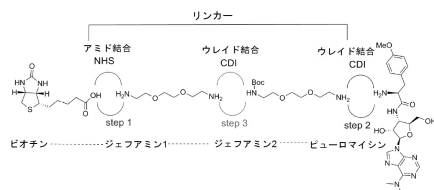
6 8. Lunelli, L. et al. Peering at Brain Polysomes with Atomic Force Microscopy. J. Vis. Exp. (2016).

【0 2 2 4】

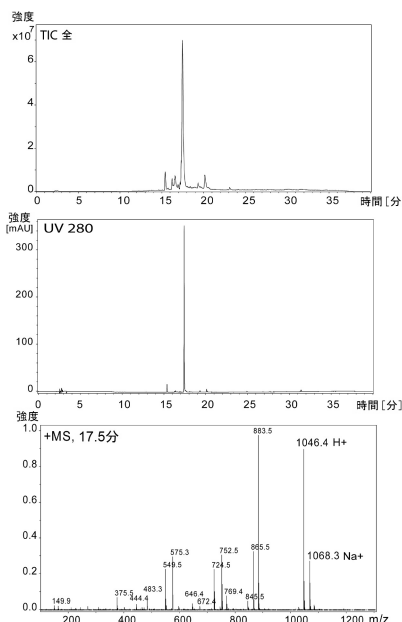
10

20

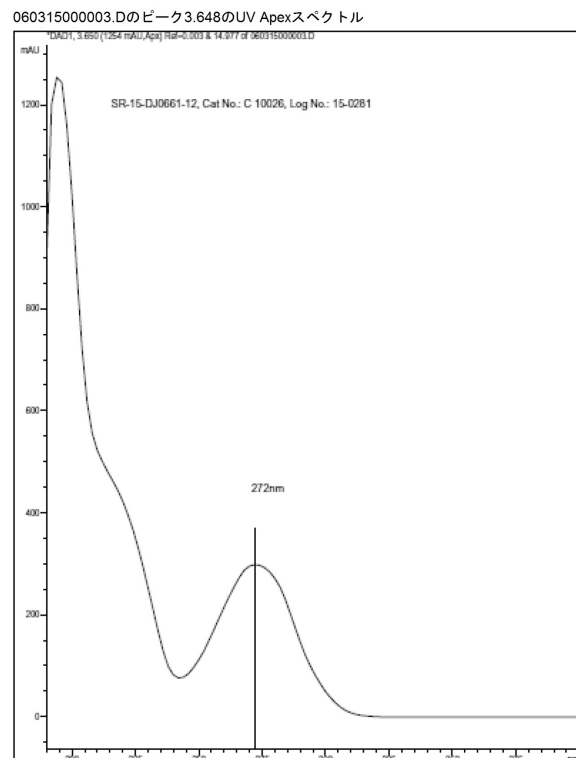
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 6】

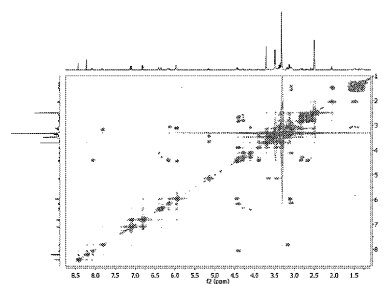


Figure 6

Figure 4

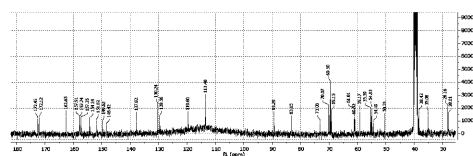
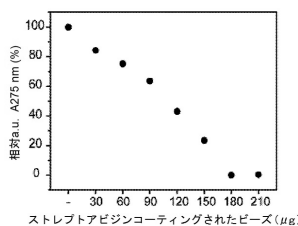
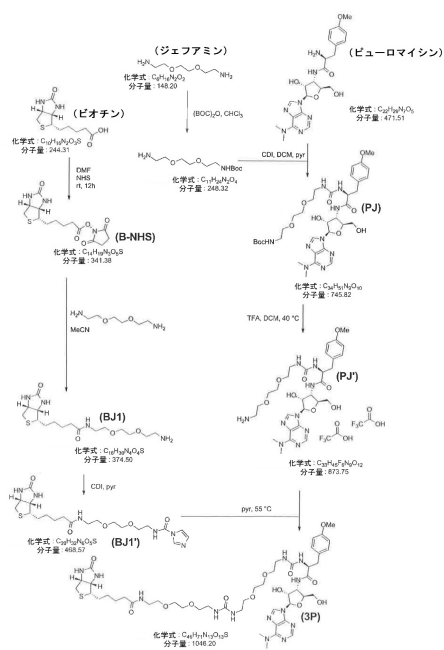
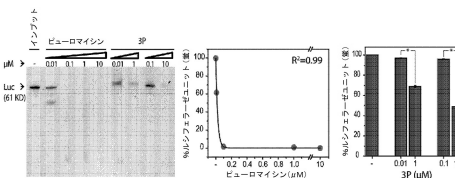


Figure 5

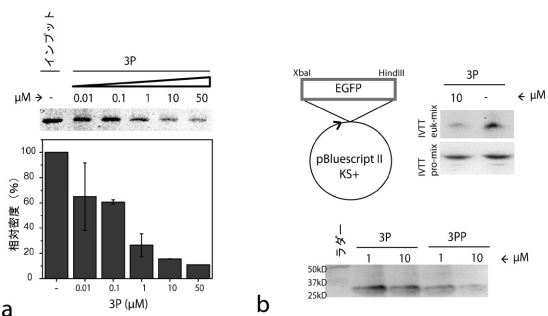
【図 8】



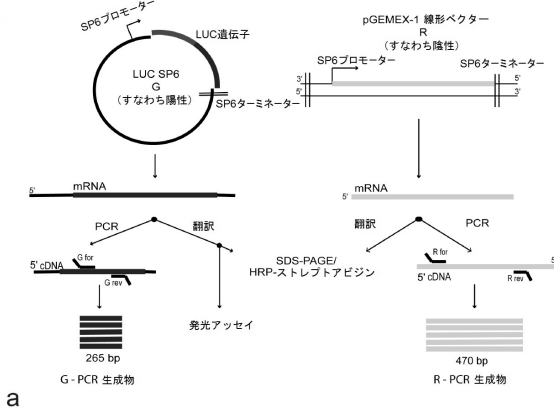
【図 9】



【図 10】

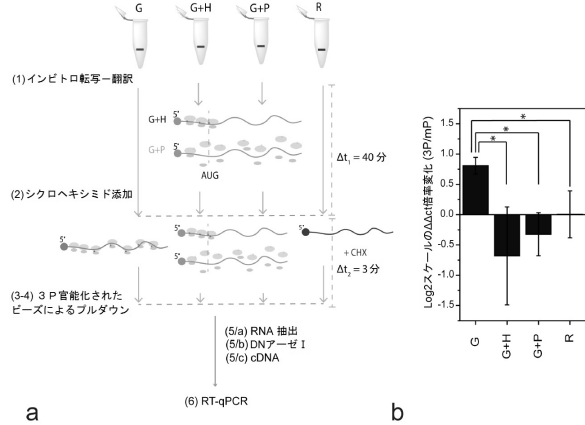


【図 1 1】



a

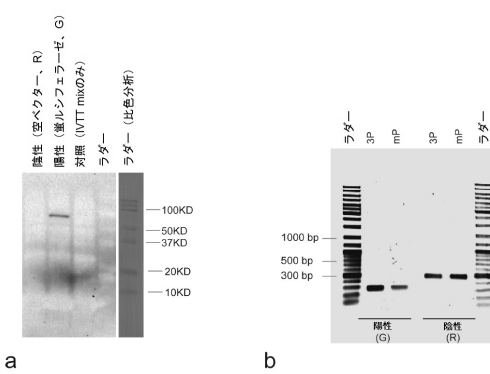
【図 1 2】



a

b

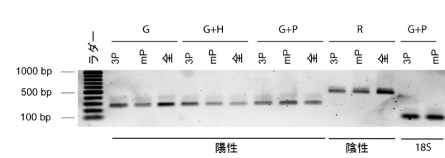
【図 1 3】



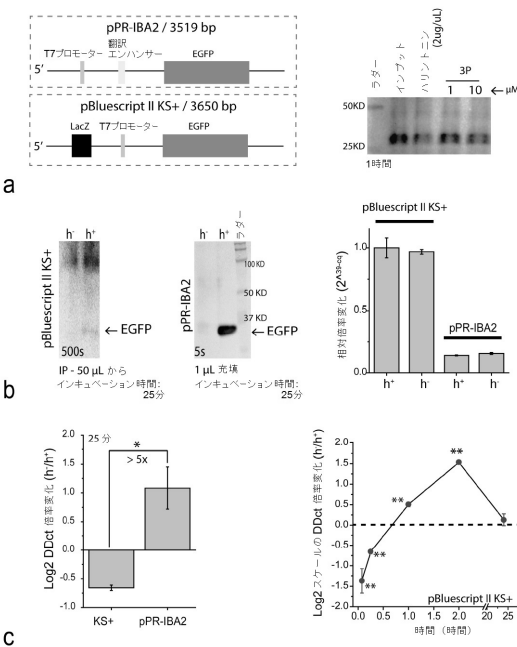
a

b

【図 1 4】

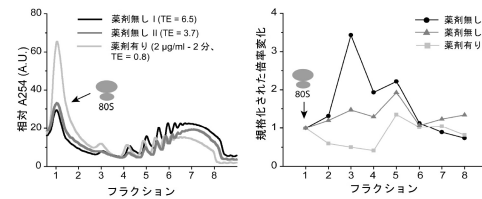


【図 1 5】

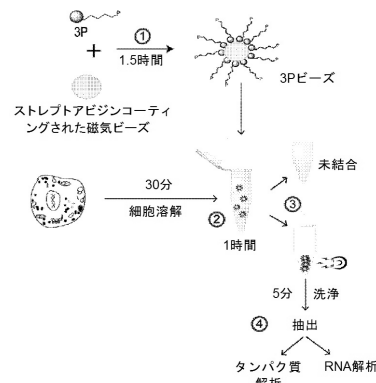


c

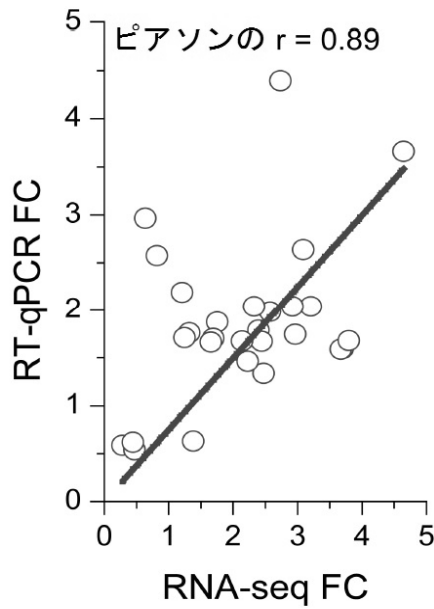
【図 1 6】



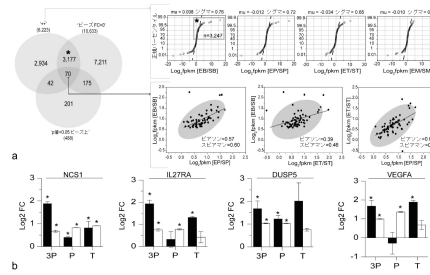
【図 1 7】



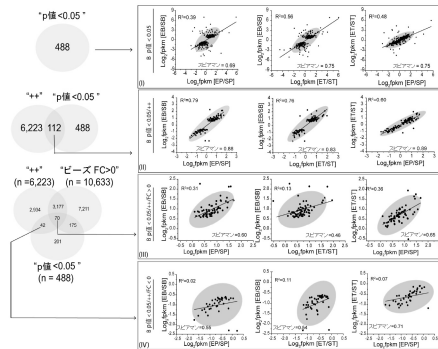
【図 25】



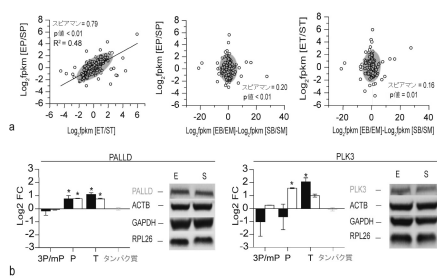
【図 26】



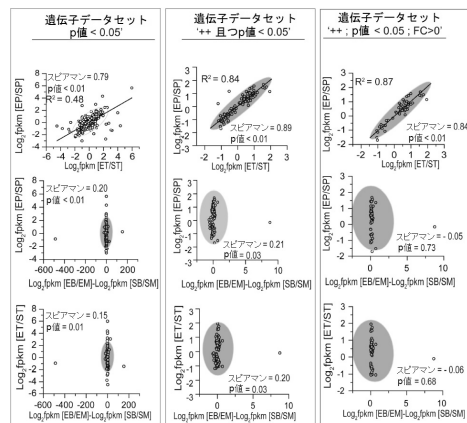
【図 27】



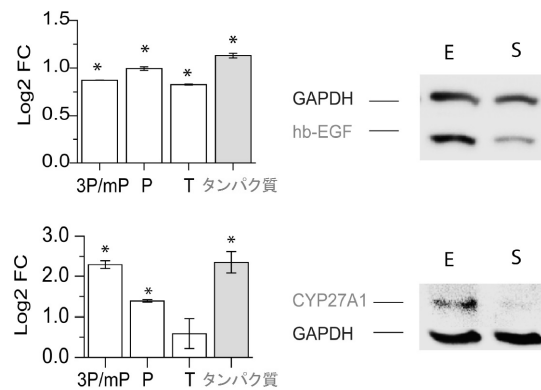
【図 28】



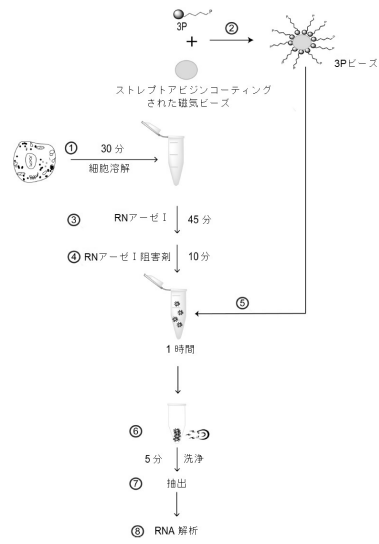
【図 29】



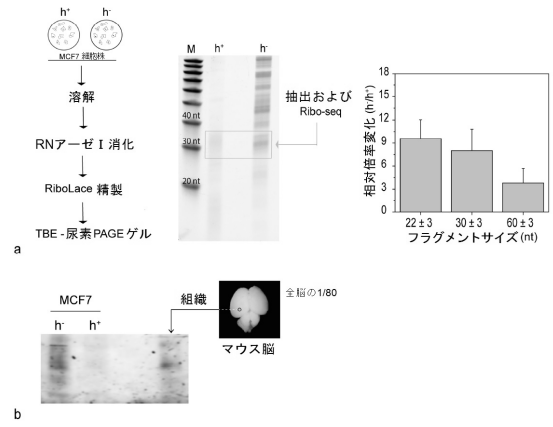
【図 30】



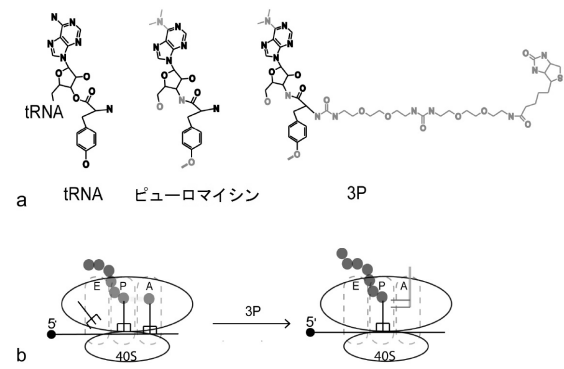
【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



【配列表】

0006687282000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴィエロ、ガブリエラ
イタリア国、トレント 38123 21/12、ヴィア デル カステル インマジーナ ビオ
テクノロジー エス. アール. エル. 内
- (72)発明者 ゲラ、グラジアーノ
イタリア国、トレント 38123 21/12、ヴィア デル カステル インマジーナ ビオ
テクノロジー エス. アール. エル. 内
- (72)発明者 クアットローン、アレッサンドロ
イタリア国、トレント 38123 21/12、ヴィア デル カステル インマジーナ ビオ
テクノロジー エス. アール. エル. 内

審査官 三木 寛

- (56)参考文献 特開2002-265492 (JP, A)
国際公開第2014/047199 (WO, A1)
国際公開第2015/021305 (WO, A1)
特開昭58-043994 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07H 19/167
CAplus/REGISTRY (STN)