(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7242561号
(P7242561)

(45)発行日　令和5年3月20日(2023.3.20)

(24)登録日　令和5年3月10日(2023.3.10)

(51)国際特許分類

		FI		
A61K 48/00 (2006.01)		A61K	48/00	ZNA
A61K 35/76 (2015.01)		A61K	35/76	
A61K 39/39 (2006.01)		A61K	39/39	
A61P 37/04 (2006.01)		A61P	37/04	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	D

請求項の数　13　（全54頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-565215(P2019-565215)
(86)(22)出願日　平成30年5月31日(2018.5.31)
(65)公表番号　特表2020-529391(P2020-529391A)
(43)公表日　令和2年10月8日(2020.10.8)
(86)国際出願番号　PCT/GB2018/051475
(87)国際公開番号　WO2018/220371
(87)国際公開日　平成30年12月6日(2018.12.6)
審査請求日　令和3年5月26日(2021.5.26)
(31)優先権主張番号　1708709.9
(32)優先日　平成29年6月1日(2017.6.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者　500435012
ザ ユニバーシティ オブ リーズ
THE UNIVERSITY OF LEEDS
イギリス国 ＬＳ２ ９ＪＴ ウェスト ヨークシャー リーズ
(73)特許権者　502289237
ザ ユニバーシティ オブ ヨーク
イギリス国，ワイオー１０ ５ディーディー ヨークシャー，ヨーク，ヘスリントン，ザ ユニバーシティ オブ ヨーク
The University of York, Heslington, York, Yorkshire YO10 5DD, Great Britain

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ウイルス様粒子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１つ以上のパッケージングシグナルを含むウイルス様粒子の集合に使用するための人工核酸カセットであって、２つ以上のパッケージングシグナルが連続して配置され、核酸によって分離されていて、前記パッケージングシグナルが、同種ウイルスカプシドタンパク質のためのヌクレオチド結合モチーフを含む核酸ループドメイン、及び分子内塩基対合による二本鎖領域を含む核酸ステムドメインを含み、

ａ）核酸パッケージングシグナルがＢ型肝炎ウイルスから単離され、かつ、前記ヌクレオチド結合モチーフがヌクレオチド配列ＲＧＡＧを含み、配列中、ＲがＧまたはＡのいずれかであるか、または

ｂ）核酸パッケージングシグナルがタバコ壊死サテライトウイルスから単離され、かつ、前記ヌクレオチド結合モチーフがヌクレオチド配列ＡＸＸＡまたはＡＸＸＸＡを含み、配列中、Ｘが任意のヌクレオチド塩基であり、かつ

前記人工核酸カセットが、複数の同種ウイルスカプシドタンパク質と接触すると、前記同種ウイルスカプシドタンパク質を集合させてＶＬＰにして、ＶＬＰ内に含有される前記核酸パッケージングシグナルをリボヌクレアーゼ消化から保護する、人工核酸カセット。

【請求項２】

前記人工核酸カセットが、非複製核酸である、及び／または、前記ＶＬＰが、動物対象に投与される場合、天然ウイルス粒子の免疫応答に類似した免疫応答を誘発する、請求項１に記載の人工核酸カセット。

【請求項３】
前記人工核酸カセットが、タンパク質をコードする核酸を含まない、請求項１または２に記載の人工核酸カセット。
【請求項４】
前記人工核酸カセットが、少なくとも２つ、３つ、４つまたは５つの核酸パッケージングシグナルを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の人工核酸カセット。
【請求項５】
前記核酸パッケージングシグナルを分離させる非コードウイルス核酸が、少なくとも５～５０ヌクレオチド長である、または、５０超のヌクレオチド長である、請求項１～４のいずれか１項に記載の人工核酸カセット。
【請求項６】
i）前記カプシド結合モチーフを含む前記ループドメインが、少なくとも４ヌクレオチド長である、
ii）前記ステムドメインが、少なくとも５塩基対（ｂｐ）長である、
iii）前記人工核酸カセットが、少なくとも５０ヌクレオチド長である、または
iv）前記核酸カセットが、５０～１０００ヌクレオチド長である、
請求項１～５のいずれか１項に記載の人工核酸カセット。
【請求項７】
前記人工核酸カセットが、少なくとも２つまたは３つのＢ型肝炎ウイルスパッケージングシグナルを含み、前記核酸パッケージングシグナルのうち１つ以上が、前記ヌクレオチド結合モチーフＲＧＡＧを含む、請求項１に記載の人工核酸カセット。
【請求項８】
前記核酸カセットが、Ｂ型肝炎で同定された前記パッケージングシグナルのうち少なくとも１つを含み、前記核酸パッケージングシグナルの各々が、前記結合モチーフＲＧＡＧを含む、請求項７に記載の人工核酸カセット。
【請求項９】
前記人工核酸カセットが、
i）ポリペプチドをコードする核酸または機能性ＲＮＡを転写するように適合させた核酸分子を含む転写カセット、及び
ii）前記ポリペプチドをコードする前記核酸分子または機能性ＲＮＡの発現を可能にするためのプロモーター配列及び終結配列、
をさらに含み、任意に
ａ）前記ポリペプチドが抗体または抗体断片などの治療用ポリペプチドである、又は
ｂ）前記機能性ＲＮＡが治療用ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡである、
請求項１～８のいずれか１項に記載の人工核酸カセット。
【請求項１０】
請求項１～９のいずれか１項に記載の人工核酸カセットを含む、ウイルス様粒子。
【請求項１１】
請求項１０に記載のウイルス様粒子を含み、任意にアジュバント及び／または担体をさらに含む、ワクチンまたは免疫原性組成物。
【請求項１２】
請求項１０に記載のウイルス様粒子を含み、かつ薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
細胞への薬剤の送達に使用するための、請求項１０に記載のウイルス様粒子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、天然及び人工核酸パッケージングシグナルを使用するウイルス様粒子［ＶＬ

Ｐ］の集合、ワクチン、免疫学的及び医薬組成物におけるそれらの使用、ヒト及び動物のウイルス病原体に対するワクチン接種または免疫化の方法、ならびに医薬用タンパク質、ｓｉＲＮＡもしくは遺伝子治療ベクターなどの治療剤または診断剤の送達ビヒクルとしてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

ウイルスは、多くの場合に有害作用または死さえも伴うヒト及び動物の様々な衰弱性疾患を引き起こす。ウイルス感染は、世界中の医療制度に多大な経済的負担をもたらし、精肉または酪農産業などの動物関連製品に莫大な損失をもたらす。

【０００３】

感染の開始後に抗生剤で処置され得る細菌感染とは対照的に、多くの場合に利用可能である効果的な抗ウイルス薬の選択肢がないため、ウイルス感染の予防は、通常は好ましいルートである。ワクチン接種は、疾患予防の最も効果的な形態であり、いくつかのウイルス性疾患、例えば、インフルエンザ、ポリオ、麻疹及びヒトパピローマウイルス［ＨＰＶ］などのための開発に成功している。ワクチン接種は抗原物質の投与であり、病原体に対して適応免疫を発現するために個体の免疫系を刺激することである。ワクチンの活性剤は、例えば、病原体の不活化形態、病原体の高い免疫原性成分または弱められたウイルス、いわゆる弱毒化ウイルスの形態である場合がある。しかしながら、これらの異なる種類のワクチンは全て、それらの有効性及び安全性の記録の点で異なっており、さらに多くの場合に免疫不全の対象、妊婦または子供への投与には不適当であり得る。

【０００４】

不活化ワクチンは、物理的または化学的処理によって死滅させたウイルスから作製される。これらの種類のワクチンは非常に安全であり、理由としてはそれらが感染性の遺伝物質を欠いているために疾患を引き起こすことができず、それゆえ免疫不全の対象に好適である。しかしながら、そのような不活化ワクチンは、多くの場合に適切な、または長期にわたる免疫応答の誘導に効果的ではなく、それゆえしばしば複数回の投与ステップが必要になる。病原体の高い免疫原性成分を含有するワクチン、いわゆるサブユニットワクチンは、それらが疾患を引き起こし得るウイルスの生成分を含有しないため、高い安全性の記録などの不活化ワクチンと同様の利益を提供する。しかしながら、効果的な免疫応答が保証されていなく、たとえ応答が誘発されても、所望の病原体に対して長期間の保護を提供する免疫記憶が達成されない場合がある。

【０００５】

あるいは、弱毒化生ワクチンが使用され得る。弱毒化生ワクチンは、宿主生物中で依然として複製可能であるが、疾患を全く引き起こさない、または非常に軽度の疾患を引き起こす弱められた病原体を含む。弱毒化ウイルスを使用するワクチン接種は優れた保護をもたらすが、それらは、それらの本来のより毒性が強い形態に戻って疾患を引き起こし得るので、不活化またはサブユニットワクチンと比較した場合、本質的に安全性が低い。したがって、弱毒化ワクチンは免疫不全の対象には不適当であり、妊娠中に投与された場合、胎児を害する可能性があり、医療従事者による免疫化エラー、例えば、高用量で投与された場合、より強力である凍結乾燥弱毒化病原体の再構成エラーなどの可能性を増加させる。さらに、弱毒化ワクチンは不活化ワクチンよりも不安定であり、弱められてはいるが、活性を維持するための冷蔵及び輸送を維持するために高度な物流が必要となる。このことは、医療制度が十分に確立されていない第三世界諸国で特に懸念されている。

【０００６】

弱毒化ワクチンは一般的であり、様々な疾患、例えば、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、水痘、天然痘及びポリオなどに利用可能である。現在使用されている弱毒化生ワクチンの多くは、例えば、線維芽細胞または及びニワトリ胚などの培養細胞での連続継代から得られ、毒性を徐々に失っていく。本方法は、非病原性を付与する点変異のランダム蓄積に依拠していて、これは時間がかかって非効率的である。弱毒化ウイルス株を作製する他の方法は遺伝子工学に基づき、出願ＷＯ２００５／０１２５３５に開示されている。

【０００７】
ウイルス様粒子（ＶＬＰ）は、天然ウイルスのコンフォメーションを模倣しているが、ウイルスＤＮＡまたはＲＮＡを欠き、それゆえ宿主細胞中で複製することができない複数のカプシドタンパク質を含む。安全かつ効率的なワクチンの作製を目的としたツールとしてのＶＬＰの使用が認識されていて、ヒトパピローマウイルスに対していくつかのＶＰＬベースのワクチンが開発されてきた。ＵＳ８０６２６４２は、天然の感染性ウイルスの抗原特性に類似した特性を有するパピローマウイルスカプシドタンパク質及びＶＬＰの作製を開示している。同様に、ＷＯ９９１３０５６は、パピローマＶＬＰの分解方法について開示している。
【０００８】
上に列挙された種類のワクチンが大きな成功を収めたにもかかわらず、それらは一般に、所望の特性を備えたままの調製／製剤化が非常に困難であり、多くのウイルスでは、循環集団にわたるそれらの天然の抗原変異は、これらの戦略がこうした場合に実行不可能であることを意味する。
【０００９】
本開示は、ウイルスに由来する核酸パッケージングシグナルを使用するＶＬＰの形成ならびに人工ＶＬＰ集合のための基質を提供する、天然及び／または人工パッケージングシグナルを含む核酸カセットの設計ならびにワクチンとしての、及び細胞への薬剤、例えば、治療剤または診断剤の送達における人工ＶＬＰの使用に関する。プラス鎖一本鎖（ｓｓ）ＲＮＡウイルスのＲＮＡパッケージングシグナル媒介集合機構の知見によって、集合基質となることに関して、それらのゲノムＲＮＡ分子の重要な特性の同定が可能となり、効率的なＶＬＰ集合のための効率的な人工ＲＮＡ基質の作製を可能にしている。後者は、ウイルスによって形成される天然ビリオンに類似した特性を有する。特に、人工ＶＬＰカプシドは、それらのウイルスに関する天然の免疫学的特性に加えてそれらの細胞指向性を保持する。人工ＶＬＰカプシドは、本来のウイルス粒子の安定性及び機械的特性の多くも保持する。ＶＬＰは、薬剤の細胞特異的送達に関連して、ならびに薬物の標的送達のための、及び遺伝子治療における安全な弱毒化ワクチン及びベクターとして、幅広い用途に有用である。
【発明の概要】
【００１０】
本発明の態様によれば、１つ以上のパッケージングシグナルを含むウイルス様粒子の集合に使用するための人工核酸カセットが提供され、２つ以上のパッケージングシグナルが連続して配置され、核酸によって分離されていて、このパッケージングシグナルは、同種ウイルスカプシドタンパク質（複数可）のためのヌクレオチド結合モチーフを含む核酸ループドメイン、及び分子内塩基対合による二本鎖領域からなる核酸ステムドメインで構成され、この人工核酸カセットは、複数の同種ウイルスカプシドタンパク質と接触させた場合、同種ウイルスカプシドタンパク質を集合させて、ＶＬＰ内に含有される核酸パッケージングシグナルをリボヌクレアーゼ消化から保護するＶＬＰを生成する。
【００１１】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、非複製核酸である。
【００１２】
本発明の好ましい実施形態では、ＶＬＰは、動物対象に投与される場合、天然ウイルス粒子の免疫応答に類似した免疫応答を誘発する。
【００１３】
本発明のさらに好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、天然ウイルス粒子ではない。
【００１４】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、タンパク質をコードする核酸を含まない。
【００１５】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも２つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００１６】

好ましくは、人工核酸カセットは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９または少なくとも１０の核酸パッケージングシグナルを含む。

【００１７】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも１つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００１８】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも２つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００１９】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも３つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００２０】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも４つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００２１】

本発明の代替的な好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも５つの核酸パッケージングシグナルを含む。

【００２２】

本発明の好ましい実施形態では、核酸パッケージングシグナルを分離させる非コードウイルス核酸は、少なくとも５ヌクレオチド長である。

【００２３】

本発明の好ましい実施形態では、核酸パッケージングシグナルを分離させる非コードウイルス核酸は、少なくとも５～５０ヌクレオチド長である。好ましくは、５０超のヌクレオチドである。

【００２４】

本発明の好ましい実施形態では、カプシド結合モチーフを含むループドメインは、少なくとも４ヌクレオチド長である。好ましくは、ループドメインは、少なくとも５、６、７または８ヌクレオチド長である。

【００２５】

本発明の好ましい実施形態では、ステムドメインは、少なくとも４塩基対（ｂｐ）長である。好ましくは、ステムドメインは、少なくとも５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、または少なくとも７０ｂｐ長である。

【００２６】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも５０ヌクレオチド長である。好ましくは、核酸カセットは、５０～１０００ヌクレオチド長である。

【００２７】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０または少なくとも１０００ヌクレオチド長である。

【００２８】

本発明の好ましい実施形態では、核酸パッケージングシグナルはＲＮＡウイルスから単離され、好ましくは、ＲＮＡウイルスはヒト病原体である。

【００２９】
好ましくは、パッケージングシグナルは、特徴的なヌクレオチド認識モチーフ及びパッケージングシグナル間の間隔を保持するが、個々のパッケージングシグナルの安定性を変化させる／安定させる修飾パッケージングシグナルである。
【００３０】
ヒト、動物及び植物におけるいくつかの疾患は、いわゆるＲＮＡウイルスによって引き起こされる。一本鎖ＲＮＡウイルスは、３つの群に分類される：一本鎖プラス鎖ＲＮＡウイルス（群ＩＶ）、一本鎖マイナス鎖ＲＮＡウイルス（群Ｖ）及びレトロウイルス（群ＶＩ）。感染時、ウイルスＲＮＡは宿主細胞に侵入し、ウイルスの種類に応じて、ＲＮＡは複製に必要なウイルスタンパク質へと直接翻訳される（群ＩＶ）、または翻訳前に、ＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼによってＲＮＡのより好適な形態に転写される（群Ｖ）。群ＶＩのＲＮＡウイルスは、ウイルスによってコードされる逆転写酵素を利用してＲＮＡゲノムからＤＮＡを生成し、これは多くの場合に宿主ゲノム中に組み込まれて、宿主によって複製かつ転写される。プラス鎖ＲＮＡｓｓウイルスの非限定的な例としては、Ｃ型肝炎、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、ＳＡＲＳ及びＭＥＲＳコロナウイルスならびにライノウイルスが挙げられる。マイナス鎖ｓｓＲＮＡウイルスには、例として、エボラウイルス、麻疹、流行性耳下腺炎、インフルエンザ及びＤ型肝炎ウイルスが含まれる。Ｌｅｎｔｉｖｉｒｕｓ属のレトロウイルスとして、ヒト免疫不全ウイルスＩ及びＩＩならびにＢ型肝炎ウイルスが含まれ。人畜共通ウイルス病原体の例として、エボラウイルス、狂犬病ウイルス及びインフルエンザＡウイルスが含まれ。植物ｓｓＲＮＡウイルスの非限定的な例としては、カブクリンクルウイルス、ササゲクロロティックモトルウイルス１、２及び３、ブロムモザイクウイルス１、２及び３、ならびにタバコ壊死サテライトウイルスが含まれる。出願人らの同時係属出願ＵＳ１４／９１６，９４５では、その内容全体が参照によって組み込まれ、特にその明細書で開示されるパッケージングシグナル及び模倣アプタマーについて、様々な一本鎖ＲＮＡウイルスのパッケージングシグナルが開示されている。
【００３１】
本発明の好ましい実施形態では、ＲＮＡウイルスは、プラス鎖一本鎖ＲＮＡウイルスである。
【００３２】
本発明の好ましい実施形態では、核酸パッケージングシグナルＲＮＡウイルスは、Ｂ型肝炎ウイルスから単離される。
【００３３】
本発明の好ましい実施形態では、Ｂ型肝炎ウイルスパッケージングシグナルはヌクレオチド結合モチーフを含み、ヌクレオチド結合モチーフはヌクレオチド配列ＲＧＡＧを含み、そこで、ＲはＧまたはＡのいずれかである。
【００３４】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、少なくとも１、２または３つのＢ型肝炎ウイルスパッケージングシグナルを含み、核酸パッケージングシグナルのうち１つ以上が、ヌクレオチド結合モチーフＲＧＡＧを含む。
【００３５】
本発明の好ましい実施形態では、核酸カセットは、Ｂ型肝炎で同定されたＰＳのうち少なくとも１つを含み、核酸パッケージングシグナルの各々が、結合モチーフＲＧＡＧを含む。
【００３６】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、
ｉ）ヌクレオチド配列ＧＵＵＵＧＵＵＵＡＡＡＧＡＣＵＧＧＧＡＧＧＡＧＵＵＧＧＧＧＧＡＧＧＡＧ［配列番号：１］を含む核酸分子、
ｉｉ）配列番号：１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＧＧＧＡＧＧを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００３７】
本発明のさらに好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）ヌクレオチド配列ＧＧＧＣＣＣＵＣＵＧＡＣＡＧＵＵＡＡＵＧＡＡＡＡＡＡＧＧＡＧＡＵＵＡＡＡＡＵＵＡＡＵＵＡＵＧＣＣＵ［配列番号：２］を含む核酸分子、
ｉｉ）配列番号：２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＧＡＡＡＡＡＡＧＧＡＧ（配列番号９）を含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００３８】
本発明のさらに好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）ヌクレオチド配列ＧＧＣＵＧＧＣＡＵＵＣＵＡＵＡＵＡＡＧＡＧＡＧＡＡＡＣＵＡＣＡＣＧＣ［配列番号：３］を含む核酸分子、
ｉｉ）配列番号：３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＡＵＡＵＡＡＧＡＧを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。
【００３９】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、配列番号：１及び／または配列番号：２及び／または配列番号：３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるヌクレオチド配列を含む。
【００４０】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、配列番号：１及び／または配列番号：２及び／または配列番号：３を含むヌクレオチド配列を含む。
【００４１】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、配列番号４：ＣＵＧＧＧＡＧＧＡＧＵＵＧＧＧＧＡＧＧＡＧＡＵＵＡＧＧＵＵＡＡＡＧＧＵＣＵＵＵＧＵＡＣＵＡＧＧＡＧＧＣＵＧＵＡＧＧＣを含むヌクレオチド配列を含む。
【００４２】
本発明の代替的な実施形態では、ＲＮＡウイルスは、ヒト対象に感染する人畜共通種である。
【００４３】
本発明のさらに代替的な実施形態では、ＲＮＡウイルスは、獣医学的動物対象に感染する種である。
【００４４】
本発明のさらに代替的な実施形態では、ＲＮＡウイルスは、植物細胞または植物に感染する種である。
【００４５】
本発明の好ましい実施形態では、ＲＮＡウイルスは、タバコ壊死サテライトウイルスである。
【００４６】
本発明の好ましい実施形態では、核酸カセットは、タバコ壊死サテライトウイルスから単離される少なくとも１つの核酸パッケージングシグナルを含む。
【００４７】
本発明の好ましい実施形態では、核酸カセットは、少なくとも１つの核酸パッケージングシグナルを含み、核酸パッケージングシグナルはヌクレオチド結合モチーフＡＸＸＡまたはＡＸＸＸＡを含み、モチーフ中、Ｘは任意のヌクレオチド塩基である。
【００４８】
本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）配列番号：５に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子、

ｉｉ）配列番号：５［ＧＧＧＣＵＧＣＣＣＵＣＡＡＧＧＡＣＣＡＧＧＧＣＡＧＡＡＡＡＧＡＧＧＡＡＡＡＧＡＡＡＡＧＵＧＡＣＡＧＡＡＣＡＣＵＵＡＵＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＣＧＵＡＣＡＡＡＣＧＵＵＵＵＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＧＧＡＡＧＣＵＧＣＡＡＵＡＧＣＧＣＡＡＧＧＡＡＵＣＣＧＡＡＡＡＵＵＣＧＧＡＡＡＧＧＡＡ］に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＡＸＸＡを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００４９】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）配列番号：６［ＧＧＧＣＵＧＣＣＣＵＣＡＡＧＧＡＣＣＡＧＧＧＣＡＧＡＡＡＡＧＡＧＧＡＡＡＡＧＡＡＡＡＧＵＧＡＣＡＧＡＡＣＡＣＵＵＡＵＡＡＧＧＡＡＣＣＡＣＡＣＡＡＧＵＧＧＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＧＧＡＡＧＣＵＧＣＡＡＵＡＧＣＧＣＡＡＧＧＡＡＵＣＣＧＡＡＡＡＵＵＣＧＧＡＡＡＧＧＡＡ］に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子
ｉｉ）配列番号：６に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＡＸＸＡを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００５０】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）配列番号：７［ＧＧＧＣＵＧＣＣＣＵＣＡＡＧＧＡＣＣＡＧＧＧＣＡＧＡＡＡＡＧＡＧＧＡＡＡＡＧＡＡＡＡＧＵＧＡＣＡＧＡＡＣＡＣＵＵＡＵＡＡＧＧＡＡＣＣＡＣＡＣＡＡＧＵＡＵＡＡＧＧＡＡＡＡＡＡＧＧＡＡＧＣＵＧＣＡＡＵＡＧＣＧＣＡＡＧＧＡＡＵＣＣＧＡＡＡＡＵＵＣＧＧＡＡＡＧＧＡＡ］に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子
ｉｉ）配列番号：７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＡＸＸＡを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００５１】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、群：
ｉ）配列番号：８［ＧＧＧＣＣＣＣＧＣＡＡＣＡＡＵＧＣＧＧＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＡＡＡＡＣＧＵＡＣＡＡＡＣＧＵＵＵＵＡＡＧＧＡＡＣＡＡＣＧＣＡＡＣＡＡＵＧＣＧＵＵＧＡＡＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＡＡＧＧＧＧＣＧＵＡＣＡＡＡＣＧＣＣＣＣＡＡＧＧＡＡＵＵＵＵＧＣＡＡＣＡＡＵＧＣＡＡＡＡＡＡＧＧＡＡ］に示されるヌクレオチド配列を含む核酸分子
ｉｉ）配列番号：８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも２５％同一であり、ヌクレオチド結合モチーフＡＸＸＡを含むヌクレオチド配列を含む核酸分子
から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【００５２】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７または配列番号：８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも３０％、３５％、４０％、４５％、５５％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であるヌクレオチド配列を含む。

【００５３】

本発明の好ましい実施形態では、人工核酸カセットは、ポリペプチドまたは機能性ＲＮＡをコードする核酸を転写するように適合させた核酸分子を含む転写カセットをさらに含む。

【００５４】

本発明の好ましい実施形態では、適合は、ポリペプチドまたは機能性ＲＮＡをコードする核酸分子の発現を可能にするためのプロモーター配列及び終結配列の提供である。

【００５５】

本発明の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、治療用ポリペプチド、例えば、抗体または抗体断片である。

【００５６】
抗体断片は、一本鎖抗体断片をコードする核酸を含む。抗体は、従来の手法に従って調製される、ヒト化及びキメラ抗体をコードする核酸分子を含む。キメラ抗体は、マウスまたはラット抗体のＶ領域全てが、ヒト抗体Ｃ領域と組み合わされる組換え抗体である。ヒト化抗体は、げっ歯類抗体Ｖ領域の相補性決定領域を、ヒト抗体Ｖ領域のフレームワーク領域と融合させる組換えハイブリッド抗体である。ヒト抗体のＣ領域も使用される。相補性決定領域（ＣＤＲ）は、抗体の重鎖及び軽鎖の両方のＮ末端ドメイン内における領域であり、Ｖ領域の変動の大多数がここに限局される。これらの領域は、抗体分子の表面にループを形成する。これらのループは、抗体と抗原との間の結合表面を提供する。
【００５７】
本発明の代替的な実施形態では、機能性核酸は、治療用ポリペプチドをコードするｍＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはｓｉＲＮＡである。
【００５８】
幅広く受け入れられている、遺伝子機能を特異的に除去する技術は、低分子阻害または干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）とも称される二本鎖ＲＮＡの細胞中への導入によって、ｓｉＲＮＡ分子に含まれる配列に相補的なｍＲＮＡの破壊を引き起こす。ｓｉＲＮＡ分子は、ＲＮＡの２本の相補鎖（センス鎖及びアンチセンス鎖）を含み、互いにアニーリングされて二本鎖ＲＮＡ分子を形成する。ｓｉＲＮＡ分子は通常、除去されることになる遺伝子のエクソンに由来する。多くの生物は、ｓｉＲＮＡの形成をもたらすカスケードを活性化させることによって、二本鎖ＲＮＡの存在に応答する。二本鎖ＲＮＡの存在は、ＲＮａｓｅＩＩＩを含むタンパク質複合体を活性化させ、この酵素が二本鎖ＲＮＡをリボ核タンパク質複合体の一部となるより低分子の断片（ｓｉＲＮＡ、およそ２１～２９ヌクレオチド長）へとプロセシングする。ｓｉＲＮＡは、ＲＮａｓｅ複合体がｓｉＲＮＡのアンチセンス鎖に相補的なｍＲＮＡを切断し、それによってｍＲＮＡの破壊をもたらすためのガイドとして作用する。
【００５９】
本発明のさらなる態様によれば、本発明による人工核酸カセットを含むウイルス様粒子が提供される。
【００６０】
本発明の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、対象に投与される場合に免疫原性がある。好ましくは、ウイルス様粒子は、同種天然ウイルスに対する免疫応答に類似した免疫応答を誘発する。
【００６１】
本発明の好ましい実施形態では、免疫応答は抗体応答の誘導であり、抗体応答は天然ウイルス粒子と特異的に結合する抗体を誘導する。
【００６２】
本発明の好ましい実施形態では、ウイルス様粒子は、天然ウイルス粒子と比較した場合に細胞指向性を保持する、またはそれを増強させる。
【００６３】
本発明のさらなる態様によれば、本発明によるウイルス様粒子を含むワクチンまたは免疫原性組成物が提供される。
【００６４】
本発明の好ましい実施形態では、ワクチンまたは免疫原性組成物は、アジュバント及び／または担体をさらに含む。
【００６５】
アジュバント（免疫増強剤または免疫調節剤）は、ワクチン抗原に対する免疫応答を改善するためにこの数十年間使用されてきた。ワクチン製剤中へのアジュバントの組込みは、ワクチン抗原に対する特異的な免疫応答を増強させる、加速させる、及び延長することを目的としている。アジュバントの利点は、より弱い抗原の免疫原性の増強、免疫化の成功に必要な抗原量の減少、必要な追加免疫の頻度の減少ならびに高齢者及び免疫不全のワ

クチン接種者における免疫応答の改善を含む。選択的に、アジュバントは、例えば、免疫グロブリンクラス及び細胞傷害性またはヘルパーＴリンパ球応答の誘導に関して、所望の免疫応答を最適化するためにも用いられ得る。加えて、特定のアジュバントは、粘膜表面での抗体応答を促進するために使用され得る。水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムまたはリン酸カルシウムは、ヒトワクチンで日常的に使用されている。より最近では、ＩＲＩＶ（免疫刺激性再構成インフルエンザビロソーム）中に組み込まれる抗原及びエマルジョンベースのアジュバントＭＦ５９を含有するワクチンが、各国で認可されている。アジュバントは、それらの供給源、作用機序及び物理的または化学的特性に従って分類され得る。最も一般的に記載されるアジュバント類は、ゲルタイプ、微生物、油エマルジョン及び乳化剤ベース、粒子状、合成ならびにサイトカインである。２つ以上のアジュバントが、最終ワクチン生成物中に存在してよい。それらは、ワクチン中に存在する単一抗原または全ての抗原と組み合わされるか、若しくは各アジュバントが、ある特定の抗原と組み合わされてもよい。現在使用されている、または開発中のアジュバントの起源及び性質は、非常に多岐にわたっている。例えば、アルミニウムベースのアジュバントは単純な無機化合物からなり、ＰＬＧは重合炭水化物であり、ビロソームは異種ウイルス粒子に由来し得るものであり、ＭＤＰは細菌の細胞壁に由来するものであり、サポニンは植物起源のものであり、スクアレンはサメ肝臓に由来するものであり、組換え内因性免疫調節剤は組換え細菌、酵母または哺乳動物細胞に由来するものである。動物用ワクチンには、ヒトへの使用では反応が強すぎる鉱油エマルジョンなどのいくつかのアジュバントが認可されている。同様に、完全フロイントアジュバントは、最も強力なアジュバントの１つとして知られているが、ヒトへの使用には適さない。

【００６６】

担体という用語は、以下のように解釈される。担体は、第２分子に結合した場合に後者に対する免疫応答を増強させる免疫原性分子である。いくつかの抗原は、本来免疫原性ではないが、キーホールリンペットヘモシアニンまたは破傷風トキソイドなどの異種タンパク質分子と結合させた際に、抗体反応を起こすことができる場合がある。そのような抗原は、Ｂ細胞エピトープを含有するが、Ｔ細胞エピトープは一切含有しない。そのようなコンジュゲートのタンパク質部分（「担体」タンパク質）は、ヘルパーＴ細胞を刺激するＴ細胞エピトープを提供し、次にこのＴ細胞が抗原特異的Ｂ細胞を刺激して形質細胞に分化させ、抗原に対して抗体を産生する。

【００６７】

本発明のさらなる態様によれば、本発明によるウイルス様粒子を含み、かつ薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

【００６８】

投与される場合、本発明の組成物は、薬学的に許容される調製物で投与される。そのような調製物は、薬学的に許容される濃度の塩、緩衝剤、防腐剤、適合性担体及び補助的治療剤を日常的に含有する場合がある。本発明の組成物は、注射または経時的な段階的注入によるものを含む、任意の従来の経路によって投与され得る。投与は、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、経皮的または経上皮的な場合がある。

【００６９】

本発明の組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独で、またはさらなる用量と共に、所望の応答をもたらす剤の量である。疾患を処置する場合、所望の応答は疾患の進行を阻害することである。これは、単に疾患の進行を一時的に遅らせることを含む場合もあるが、より好ましくは、疾患の進行を永続的に停止させることを含む。これは、日常的な方法によってモニターされ得る。そのような量は、当然のことながら、処置されている特定の状態、状態の重症度、年齢、身体状態、サイズ及び体重を含む個々の患者パラメータ、処置期間、併用療法の性質（もしあれば）、特定の投与経路ならびに医療従事者の知識及び専門性の範囲内の同様の要因に依存することになる。これらの要因は当業者には周知であり、日常的な実験を超えない範囲で対処され得る。個々の成分またはそれらの組合せの最大用量、すなわち、健全な医学的判断による最も安全性の高い用量が使用される

ことが一般的には好ましい。しかしながら、患者が、医学的理由、心理的理由または実質的に任意の他の理由から低用量または耐用量を主張する場合もあることが当業者には理解されることになる。

【００７０】

前述の方法で使用される組成物は、好ましくは滅菌されていて、患者への投与に好適な重量または体積の単位で所望の応答をもたらすために有効量の本発明による薬剤を含有する。対象に投与される薬剤の用量は、異なるパラメータに従って、特に使用される投与方法及び対象の状態に従って選択され得る。他の要因としては、所望の処置期間が挙げられる。対象の応答が適用された初期用量では不十分な場合には、より高用量（または異なるより局所的な送達経路による効果的な高用量）が、患者の忍容範囲内で用いられてよい。

【００７１】

一般に、ｓｉＲＮＡ及びアンチセンスＲＮＡなどの核酸治療薬の用量は、１ｎＭ～１ｍＭである。好ましくは、用量は、１ｎＭ～５００ｎＭ、５ｎＭ～２００ｎＭ、及び１０ｎＭ～１００ｎＭの範囲であり得る。

【００７２】

組成物投与のための他のプロトコールが当業者には既知であることになり、その場合、用量、注射スケジュール、注射部位、投与方法などが前述のものとは異なる。ヒト以外の哺乳動物への組成物投与（例えば、試験目的または獣医学的治療目的のため）は、上に記載されるような実質的に同じ条件下で実施される。対象は、本明細書で使用される場合に哺乳動物であり、好ましくはヒトであり、非ヒト霊長類、雌ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたはげっ歯類を含む。

【００７３】

投与される場合、本発明の組成物は、薬学的に許容される量で、かつ薬学的に許容される組成で適用される。「薬学的に許容される」という用語は、活性成分の生物活性の有効性に干渉しない非毒性物質を意味する。そのような調製物は日常的に、塩、緩衝剤、防腐剤、適合性担体、及び場合により他の治療剤（例えば、特定の疾患適応症の処置に通常使用されるもの）を含有する場合がある。医薬品で使用される場合、塩は薬学的に許容されるべきであるが、薬学的に許容されない塩が、それらの薬学的に許容される塩を調製するために便利に使用される場合もあり、本発明の範囲から除外されることはない。そのような薬理学的かつ薬学的に許容される塩としては、以下の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸などから調製されるものが挙げられるが、これらに限定されない。また、薬学的に許容される塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩などとして調製され得る。

【００７４】

本発明による薬剤を含有する医薬組成物は、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸、及び塩中のリン酸を含む、好適な緩衝剤を含有してよい。医薬組成物はまた、必要に応じて、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン及びチメロサールなどの好適な防腐剤を含有してもよい。

【００７５】

組成物は単位剤形で便利に提示されてよく、薬学の技術分野における周知の方法のいずれかによって調製されてよい。方法は全て、１つ以上の副成分を構成する担体と活性剤を結合させるステップを含む。本発明による薬剤を含有する組成物は、エアロゾル剤及び吸入剤として投与されてもよい。非経口投与に好適な組成物は、滅菌水性薬剤または薬剤の非水性調製物を扱いやすいように含み、これは好ましくはレシピエントの血液と等張である。この調製物は、好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を使用する既知の方法に従って製剤化されてよい。滅菌注射用調製物はまた、非毒性で非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液、例えば、１，３－ブタンジオール中の溶液としてであってもよい。用いられてよい許容される溶媒の中には、水、リンゲル液、及び等張食塩水がある。加えて、滅菌固定油が、溶媒または懸濁媒として慣例的に用いられる。

この目的のために、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性固定油が用いられてよい。加えて、オレイン酸などの脂肪酸が、注射剤の調製に使用されてよい。経口、皮下、静脈内、筋肉内などの投与に好適な担体製剤は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡに見出され得る。

【００７６】

本発明のさらなる態様によれば、細胞への薬剤の送達に使用するための、本発明によるウイルス様粒子が提供される。

【００７７】

本発明の態様によれば、ウイルス感染を予防または処置するために、対象に予防接種する、または対象を免疫する方法が提供され、有効量の本発明によるウイルス様粒子を投与することを含む。

【００７８】

本明細書の記載及び特許請求の範囲全体を通して、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」及び「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」という単語ならびにこれらの単語の変化形、例えば、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」は、「含むがこれらに限定されない」ことを意味し、他の部分、添加物、成分、整数またはステップを除外することを意図しない（かつ除外しない）。「本質的になる」とは、本質的な整数を有するが、本質的な整数の機能には実質的に影響を及ぼさない整数を含むことを意味する。

【００７９】

本明細書の記載及び特許請求の範囲全体を通して、文脈上別段の解釈が必要でない限り、単数形は複数形を包含する。特に、不定冠詞が使用される場合、本明細書は、文脈上別段の解釈が必要でない限り、単数形だけでなく複数形も意図していると理解されるべきである。

【００８０】

本発明の特定の態様、実施形態または実施例に関連して記載される特徴、整数、特性、化合物、化学的部分または基は、本明細書に記載されている任意の他の態様、実施形態または実施例と矛盾しない限り、それらに適用可能であると理解されるべきである。

【００８１】

本発明の実施形態は、例示としてのみ、かつ以下の図面に関連して本明細書に記載されることになる：

【図面の簡単な説明】

【００８２】

【図１．１－１．２】Ｂ型肝炎ウイルス （ａ）不完全ｄｓＤＮＡゲノム及びウイルスによってコードされるタンパク質の４つのオープンリーディングフレーム：プレコア／コア（Ｃｐ）（これはヌクレオカプシド（ＮＣ）殻を形成する）、プレＳ１／プレＳ２／Ｓ（エンベロープ埋込みＨＢＶ抗原（ＨｂｓＡｇ））、Ｘ（これは細胞内におけるＨＢＶ生活環の多数の側面で役割を果たす）、ポリメラーゼ（Ｐ）及びｐｇＲＮＡ（これは５’ε、重複３’ε（灰色の円）、φ及び本明細書で研究される好ましい部位（ＰＳ）（円で囲って強調）の位置を有する）を示すＨＢＶの遺伝子地図。（ｂ）ＨＢＶ ＮＣ（左）は、９０（Ｔ＝３）または１２０Ｃｐ二量体（Ｔ＝４を示す）のいずれかを含む。Ｃｐ二量体は、各単量体から２本ずつの、特徴的な４ヘリックスバンドルを形成し、これは表面上にスパイクとして現れる（右下）。Ｔ＝４粒子を生成するために必要なＨＢＶ Ｃｐ二量体の２つの配座異性体（Ａ／Ｂ及びＣ／Ｄ）も示す（右上）。ＨＢＶカプシド及びタンパク質二量体をＰＤＢから得た（３Ｊ２Ｖ）（１）。（ｃ）本明細書で使用する分離株のＣｐは、１８５アミノ酸長であり（下線を引いたＲＤジペプチド挿入）、アルファヘリックスリッチ領域（１４９アミノ酸長）、及びＣ末端ＡＲＤを含む。１４９番目のアミノ酸のＶを、明確にするために薄い灰色で標識する。ＡＲＤは、両方の塩基性アミノ酸においてリッチであり、セリン（Ｓ）はリン酸化の部位として知られ、これらはＮＣ集合において役割を担うと考えられている。

【図２．１－２．２】ｐｇＲＮＡ中の保存されたＰＳモチーフの同定　（ａ）参照株（ＮＣ＿００３９７７．１）に対する選択した（灰色の実線）及びナイーブ（灰色の破線）ライブラリーからのアプタマーの一致頻度（ベルヌーイスコア≧１２）。大多数の試験株で生じているピークを、同じ位置にピークを有する株のパーセンテージと共にＸで印を付けている。株間で最も高い保存の頻度及びレベルを有するピークを、ＰＳ１、ＰＳ２及びＰＳ３という名称にする。（ｂ）Ｍｆｏｌｄを使用して得られた、（ａ）からの保存された９つのベルヌーイピーク周囲の配列中におけるステムループのループ配列のアラインメント。配列の全てが、一本鎖ループ中にＲＧＡＧモチーフを示す。（ｃ）５つの試験株（方法中においてアスタリスクで印を付けた株を参照のこと）の１０，０００のランダム化した型にわたるステムループのループ部分中における、モチーフＲＧＡＧの発生数の確率。灰色のバーが参照株でのこの確率を示す一方で、黒線は５つ全ての株にわたって同値である。黒色の矢印は、参照株のランダム化した型中におけるＲＧＡＧのループの発生平均数を示す（＝６．８５）。＋４．７σと標識した矢印は参照株中の発生数を示し（＝２５）、これは平均値からの４．６８の標準偏差であり、他方の試験株は類似した発生レベルを有する。

【図３．１－３．２】ＰＳは、配列特異的ＶＬＰ集合を誘導する　（ａ）ＰＳ１（黒色）、ＰＳ２（濃い灰色）またはＰＳ３（薄い灰色）を包含する色素末端標識ＲＮＡオリゴを、Ｃｐと結合するそれらの能力及びナノモル濃度でＶＬＰを形成するそれらの能力について、ｓｍＦＣＳを使用して各々評価した。全ての反応物は、方法に記載されるとおりに色素標識した１５ｎＭのＲＮＡを含有していた。垂直の点線は、ＣｐをｎＭで示した最終濃度で添加した場合の点を示す。試料を、添加の合間に平衡化させた。薄い線がリアルタイムの生シグナルを表す一方で、太線は平滑化データを表す。ＲＮａｓｅＡの添加前に試料のＥＭ画像を記録した（右）。スケールバーは１００ｎｍを表す。（ｂ）（ａ）における反応物の流体力学的半径分布であり、Ｃｐの最終添加後に取得した（ここで及び全体を通して）。ＲＮＡ（非標識）の不存在下及び存在下で二量体を超えて集合しているＣｐ量を比較した。これらの反応の最後に、ＣｐをＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ－４８８で標識し（方法）、得られたR_h分布をＣｐのみ及びＣｐと非標識ＰＳ１設定について定量した。Ｃｐ二量体の色素標識は、二量体が集合するのを妨害してしまうため、これは終点測定でなければならないことに留意する。各々の試料を、ＴＥＭによる分析のために取得した。ｓｍＦＣＳ及びＴＥＭを、３回反復して繰り返した。

【図４】Ｔ＝３及びＴ＝４　ＨＢＶ　ＶＬＰの構造は、それらの準コンフォメーションの詳細に関する機構を示唆する　（ａ）Ｔ＝３及び（ｂ）Ｔ＝４　ＨＢＶ　ＶＬＰの、それぞれ５．６Å及び４．７Å分解能での二十面体平均化クライオＥＭ構造。赤色の二十面体は、２つの再構成像の解釈を助けるために含まれ、これらは同じ方向で示される。（ｃ及びｄ）は、各粒子構造による約３０Å厚の板状構造を示し、各々にＣｐ二量体がフィットしている。Ｔ＝３殻はより厚く、このことはＡＲＤに相当する密集が、Ｔ＝４ではなく、Ｔ＝３構造で解像されることを示している。両方の構造を同等の分解能にしても、この解釈を変化させない（図１１）。

【図５】Ｔ＝４　ＨＢＶ　ＶＬＰの非対称ＲＮＡの特徴　（ａ及びｂ）４２，４１１個のＴ＝４粒子の２Ｄ表示を、ＲＥＬＩＯＮで最尤法分類によって算出した。非対称ＲＮＡの特徴は、これらの粒子のサブセット（ｂ）で目視できる。（ｃ）非対称的特徴を含有する１０，８５１個の粒子の、１１．５Å分解能での非対称３Ｄ再構成像。タンパク質殻の非対称密集は、あらゆる対称性平均化の欠如にもかかわらず、二十面体である。（ｄ）非対称ＨＢＶ　ＶＬＰ再構成像によるおよそ４０Å厚の板状構造は、Ｃｐ殻のある領域に結合した非対称的特徴を示し、タンパク質殻内でのＲＮＡ及びＡＲＤに起因する密集を明らかにする（鮮紅色、マゼンタ色及び紫色）。図面を、ＵＣＳＦ　Ｃｈｉｍｅｒａを使用して放射状カラースキームで表現した（青＝１６５Å、シアン＝１５２Å、緑＝１３９Å、黄色＝１２６Å、ピンク＝１１３Å）。（ｅ）非対称ＲＮＡ密集は、Ｔ＝４粒子の５回転軸の１つを取り囲むＣｐ二量体下に集中している（円で示す）。単一のＣｐ二量体を、ＵＣＳＦ　Ｃｈｉｍｅｒａの『Ｆｉｔ　ｉｎ　ｍａｐ』機能を使用し、リボン図として適切な位置

にフィッティングする。（ｆ）地図前面の板状構造を除くと、内側の密集が明らかになる。ＰＳ１の単一コピーをリボン図として示し、手作業でフィッティングする（ＲＮＡ　Ｃｏｍｐｏｓｅｒでモデル化）。（ｇ）地図の同じ位置の側面図であり、投影される青色の円が正面からの向きである。密集の個々の指が、Ｃｐ層とＲＮＡ密集との間で目視でき、これは２～４つのＲＮＡオリゴヌクレオチドを収容するのに十分なほど大きい。（ｈ）ＰＳ１　ＨＢＶ　ＶＬＰを含有する格子上における、６３０の個々の蛍光スポットからの光退色ステップヒストグラム。＞１０のステップを含むスポットが、指数関数的減衰を示す記録から得られたため、これらは凝集体であると想定され、その場合、複数の退色ステップが同時に発生している。光退色を２回反復して実施した。

【図６】ＨＢＶ　ＮＣ集合の提案モデル　Ｃｐ二量体内のＡＲＤは、複数となる二量体のうちの１つ、すなわち、ＮＣ集合への経路における最初の中間体の形成を阻害する。リン酸化またはＰＳ　ＲＮＡ結合によってＡＲＤ上の正味電荷を減少させることにより、この構造がより容易に形成されて、ＮＣ形成を誘導することが可能になる。本明細書で使用するようなインビボ条件を模倣するものよりも高い濃度で、複数となる二量体のうち非修飾二量体が形成され、粒子がＲＮＡ無しで自己集合する、またはＲＮＡと非特異的に結合し、同じ結果をもたらすことになる。

【図７】Ｅ．ｃｏｌｉからのＨＢＶ　ＶＬＰの特徴付け及びＳＥＬＥＸプロトコール　（ａ）Ｅ．ｃｏｌｉから精製したＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ－４８８標識ＨＢＶ　ＶＬＰの流体力学的半径分布及びネガティブ染色ＥＭ画像。ピーク収率の積分は、おおよそ２：１比のＴ＝４（円、６３％）とＴ＝３（円、３７％）ＶＬＰを示唆する。スケールバーは１００ｎｍを表す。（ｂ）ＨＢＶ１８５Ｃｐに対して高い親和性を有するアプタマーの選択を示すＳＥＬＥＸプロトコール。ＨＢＶ　ＶＬＰをカルボキシル磁気ビーズ（円）上に固定化し、塩化グアニジニウムを使用してＣｐ二量体（灰色の長方形）に分解した。ランダム領域（４０Ｎ）を包含するＲＮＡプールを、これらのビーズへの結合、分割及び増幅のサイクルを反復することによって、Ｃｐに対して親和性を有する配列について富化した。各ラウンドでのネガティブセレクションには、ＮＨＳ－ＥＤＣで処理し、Ｔｒｉｓで不活性化しておいたカルボン酸ビーズを使用した。ストリンジェンシーは、ラウンド５の後、ポジティブビーズ数を半分に低減し、洗浄回数を８～１０回に増加させることによって高くした。各ラウンドの最後に逆転写酵素ＰＣＲ産物をネイティブＰＡＧＥで分析し、セレクションの次のラウンドのために産物単離を確認した。１０回目のラウンド産物をＤＮＡに変換し、シーケンシングした。

【図８．１－８．２】ＰＳオリゴ構造、例示的なｓｍＦＣＳ記録及びＰＳ含有ＶＬＰのＥＭ　（ａ）ＶＡＲＮＡソフトウェア（２）を使用して作成した、ＰＳ１～３及びε二次構造をＭｆｏｌｄで予測した。好ましい部位をＨＢＶゲノムＮＣ＿００３９７７．１から、位置：ＰＳ１（１７１７～１７５１）、ＰＳ２（２６０２～２６３３）及びＰＳ３（２７６５～２７９８）で取得した。電荷差の影響を避けるため、それらを全て同じ長さ（４７ヌクレオチド）にするために、以下のものを付加した：ＰＳ１に５’－ＧＧＧＵＵＵＵＧＧ及びＣＣＣ－３’、ＰＳ２に５’－ＧＧＧＵＵＵＵＧＧＧＧ及びＣＣＣＣ－３’、ＰＳ３に５’－ＧＧＧＵＵＵＵＧＧ及びＣＣＣＣ－３’。コンセンサスモチーフＲＧＡＧを、ループの各々において赤で強調している。Ｍｆｏｌｄで予測したような各ＲＮＡ折り畳みの安定性を、以下の各構造で示す。（ｂ）例示的なｓｍＦＣＳアッセイ。蛍光標識ＲＮＡのR_h値を、Ｃｐ滴定前後の固定の時点（垂直の破線）で決定し、各ステップ後にR_h値を平衡化させる。薄い赤線がリアルタイムの生シグナルを表す一方で、太い赤線は平滑化データを表す。ＰＳ１のR_hは、閾値Ｃｐ濃度まで最初ゆっくりと上昇し、この濃度が、Ｅ．ｃｏｌｉからのＡｌｅｘａ－Ｆｌｏｕｒ４８８標識ＨＢＶ粒子の測定（図７ａ）によって決定されるようなＴ＝３またはＴ＝４ＶＬＰ（R_h～２４－３２ｎｍ、オレンジ色の破線）への急速な集合を誘導する。各滴定の最後に、形成した複合体をＲＮａｓｅＡの添加によって負荷する。未変化R_hは、試験ＲＮＡが密閉ＶＬＰ中にカプシド封入されていることを意味すると想定される。これが発生する時の時間スケールを右下に示す。（ｃ）ＰＳ１、２、３及びＣｐのみ、ならびに図３の非標識ＰＳ１に関する集合反応のＴＥＭ。Ｃｐのみ及び非標識Ｐ

ＳＴＥＭの大きな白色粒子は、ラテックスビーズである。表２に記載した中空粒子集合のＴＥＭも提示する。これらの中空ＨＢＶ粒子を、かなり高いＣｐ濃度（１．５μＭ）で、かつＲＮＡの不存在下において集合させた。スケールバーは１００ｎｍを表す。

【図９．１－９．４】ＰＳ１バリアントのｓｍＦＣＳアッセイ　（ａ）ＰＳ１バリアント（左上の構造）のｓｍＦＣＳアッセイ及び次のように色分けされる通り、２ｎｍビンにプロットし、以下のガウスピークでフィッティングした付随する流体力学的半径分布。１５ｎＭ　ＰＳ１（黒色）、ＰＳ１ループ変異体（灰色）バルジ変異体（濃い灰色）及びイプシロン（薄い灰色）ＲＮＡを、単一分子条件下でＶＬＰを形成するそれらの能力について試験した。垂直の点線は、ｎＭで示した最終濃度でのＣｐ添加の点を示す。試料を、添加の合間に平衡化させた。ＲＮａｓｅＡを添加し、正確に形成された粒子について確認した。試料を、ＲＮａｓｅＡの添加前に、ここで及び本図面全体を通しての両方で右側に示したＴＥＭによって分析のために取得した。（ｂ）－（ａ）と同様に、ＲＮＡオリゴＰＳ１（黒色破線）、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３。（ｃ）－（ａ）と同様に、ＲＮＡオリゴＰＳ１（黒色破線）、Ｌ４（濃い灰色）、Ｌ５及びＢ１。（ｄ）（ａ）と同様に、ＲＮＡオリゴＰＳ１（黒色破線）及びＤＮＡオリゴＰＳ１（灰色）。スケールバーは１００ｎｍを表す。各パネルのＰＳ１対照物（黒色破線）を精製Ｃｐの個々のバッチで反復し、このことが確認される集合効率の変動の原因となった。ｓｍＦＣＳ及びＴＥＭを、３回反復して繰り返した。

【図１０．１－１０．２】ＡＲＤの役割及びその集合時の電荷　（ａ）Ｃｐ（薄い灰色）及びCp_{149}（灰色）を含む１５ｎＭ　ＰＳ１のｓｍＦＣＳアッセイならびに２ｎｍビンにプロットし、以下のガウスピークでフィッティングした付随する流体力学的半径分布。粒子のＥＭ画像を示す（右）。（ｂ）（ａ）と同様に、ＰＳ１及びＣｐ（黒色）、予め平衡化してＰＳ１に添加したキナーゼ及びＣｐ（薄い灰色）ならびに同時に添加したキナーゼを含むＰＳ１及びＣｐ（濃い灰色）。ＴＥＭを右に示す。スケールバーは１００ｎｍを表す。各パネルのＰＳ１対照物（黒色）を精製Ｃｐの個々のバッチで反復し、このことが確認される集合効率の変動の原因となった。ｓｍＦＣＳ及びＴＥＭを、３回反復して繰り返した。

【図１１】Ｔ＝４及びＴ＝３ＶＬＰのＡＲＤ構造。　４．７Åでの二十面体平均化Ｔ＝４粒子（左）、７Åまでローパスフィルターに通した同じＴ＝４構造（中央）、及び５．６ÅでのＴ＝３粒子（右）の構造による板状構造（約３０Å厚）。Ｃｐ二量体を各々にフィッティングする。Ｔ＝３ＶＬＰよりもわずかに低い分解能であっても、Ｔ＝４ＶＬＰのＡＲＤは同等の密集ではなく、これは各粒子において異なるコンフォメーションを有することを裏付ける。

【図１２．１－１２．２】ＳＴＮＶ系。（Ａ）強調した三量体カプソメアを有する５回転軸（濃い灰色）に沿って示したＳＴＮＶ　Ｔ＝１カプシド（左、ＰＤＢ　３Ｓ４Ｇ）及び右のＣＰ単量体（濃い灰色、ＰＤＢ　３Ｓ４Ｇ）のリボン図。ここでは変異した側鎖を示し、標識している。障害Ｎ末端アミノ酸配列を破線として示し、先頭の２５アミノ酸の配列に隣接している。（Ｂ）５’～３’までをそれぞれＰＳ１～５という名称でＰＳ　ＳＬの位置を示す、１２７ｎｔ　５’ＳＴＮＶ－１ゲノム断片の配列及び推定二次構造。各々は、ＣＰ認識モチーフの－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－をそれらのループ中に含有する（白色円、黒色輪郭）。Ｂ３アプタマーを同様に上に示す。ヌクレオチドを示した通りにここで及び全体を通して色分けする（図２２も参照のこと）。（Ｃ）例示的なｓｍＦＣＳアッセイ。ＣＰを含まない蛍光標識ＲＮＡのＲｈ値（ＰＳ１～５が黒線、Ｂ３が赤色）を、ＳＴＮＶ　ＣＰ滴定前及び最中に固定の時点（垂直の破線）で決定し、各ステップ後にＲｈ値を平衡化させる。ＰＳ１～５のＲｈは、ＣＰ濃度が閾値に到達するまで最初に最大３０％まで急落し、Ｔ＝１ＶＬＰ（Ｒｈ約１１ｎｍ）への協同的集合を誘導する。各滴定の最後に、形成した複合体をＲＮａｓｅＡの添加によって負荷する。未変化Ｒｈ値は、ＲＮＡが密閉ＶＬＰ中にあることを示すと想定される。

【図１３．１－１３．２】ＣＰ認識モチーフを定義する。（Ａ）沈降速度によって決定した、バリアントＢ３　ＲＮＡの全体的な再集合効率（バリアントＲＮＡを挿入図通りに色

分けする）。予想したＴ＝１ＶＬＰは約４２Ｓで沈降する。（Ｂ）代表的な集合産物のＥＭ画像、スケールバーはここで及び全体を通して＝５０ｎｍであり、図１７Ｂも参照のこと。（Ｃ）（Ｄ）にプロットした結果についてのバリアントＲＮＡ　ｓｍＦＣＳ競合アッセイの図。（Ｄ）１００倍モル過剰の競合物バリアントＲＮＡの添加後の、１ｎＭ　ＡＦ４８８標識Ｂ３で形成されるカプソメア（約５ｎｍ）のＲｈ（％で）の変化（上から下へのループ配列は、グラフ中で左から右へのバーを表す）。

【図１４】集合の静電相互作用及び協同性。野生型またはＲ８Ａ　ＣＰをＢ３（１ｎＭ）またはＰＳ１～５（１０ｎＭ）中に滴定し、Ｒｈ変化をモニターした。滴定点を、それぞれ上（灰色がＢ３）及び下（ＰＳ１～５）に示す。（Ｂ）野生型ＳＴＮＶ　ＣＰを１０ｎＭのＰＳ１～５、ＰＳ１～３、ＰＳ３～５またはＰＳ２～４の各々中に滴定した。

【図１５．１－１５．２】合成カセットの集合。（Ａ）ＰＳ１～５、合成安定ＰＳ１～５及び全てＰＳ３のカセットの配列、推定二次構造及び折り畳み自由エネルギー（図２２）。正の折り畳み自由エネルギーを有するＳＬは、Ｍｆｏｌｄでは折り畳みできない。（Ｂ）全てのバリアントＰＳ１～５構築物のＳＴＮＶ　ＣＰ滴定、条件は図１４と同様。ＰＳ１～５（黒色）、合成安定ＰＳ３（薄い灰色）ＲＮＡを含む産物の挿入ＥＭ画像。

【図１６．１－１６．２】ゲノムキメラを有する集合アッセイ：（Ａ）ＳＴＮＶ－１ゲノム（黒色）ならびに修飾バリアント、合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（下）及び不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（中央）の概略図。（Ｂ）ＳＴＮＶ　ＣＰを１ｎＭのＳＴＮＶ－１（黒色）、合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（薄い灰色）または不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（濃い灰色）中に滴定し、得られたＲｈを、ｓｍＦＣＳを使用してモニターした。組換えＴ＝１粒子のＲｈをオレンジ色で示す。（Ｃ）４０００～６５００秒間の滴定プロット（Ｂ）上の、データからの流体力学的半径を分布としてプロットする。（Ｄ）（Ｂ）からの産物のＥＭ画像。

【図１７．１－１７．３】（Ａ～Ｃ）：Ｂ３バリアントの集合挙動。（Ａ）全てのＢ３バリアントのＭｆｏｌｄ構造、ループ配列を各構造の下に示す。（Ｂ）４．３μＭ濃度でのＢ３バリアント集合体のＥＭ画像。示したスケールバーは１００ｎｍである。Ｂのパネル位置は、Ａの同じ位置のＳＬと一致する。（Ｃ）ｓｖＡＵＣによるＢ３内側バリアントＲＮＡを使用するＳＴＮＶ　ＣＰ再集合効率の比較。再集合反応を、１：３のＲＮＡ：ＣＰ比で４．５μＭの最終ＣＰ濃度を用いて実施した。（Ｄ～Ｆ）：Ｂ３バリアントカプソメア競合アッセイ。（Ｄ）１５ｎＭ　ＳＴＮＶ　ＣＰ及び５ｎＭ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８標識Ｂ３を使用して約５ｎｍ　R_hのカプソメアを形成した。これを、ｓｍＦＣＳによって１２００秒間測定した。この時点で、１００倍モル過剰のＢ３バリアントＧＵＵＧ（薄い灰色）、ＧＵＵＵ（黒色）またはＵＵＵＧ（濃い灰色）を添加し、得られたR_h変化を１８００秒間記録した。次いで、生データを使用してR_hのパーセンテージ変化を計算する（図１３Ｃ及びＤ）。（Ｅ）（Ｄ）におけるような、Ｂ３バリアント ＡＵＵＡ（濃い灰色）、ＡＵＵＵ（灰色）またはＵＵＵＡ（薄い灰色）。（Ｆ）（Ｄ）におけるような、Ｂ３バリアントＡＵＵＧ（濃い灰色）、ＧＵＵＡ（薄い灰色）または非標識Ｂ３（黒色）。

【図１８】ＳＴＮＶ　ＣＰ電荷変化変異体の特徴付け：（Ａ）Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現させた電荷変化変異体のＳＤＳ　ＰＡＧＥ、赤色矢印はＳＴＮＶ　ＣＰバンドを示す。（Ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉから精製した電荷変化変異体のｓｖＡＵＣ。十分なＶＬＰを産生する変異体のみ（野生型、Ｒ８Ａ及びＲ８Ｄ（破線［Ｒ８Ｄ’と称する］））を分析した。

【図１９．１－１９．２】単一または複数のパッケージングシグナルを有するＳＴＮＶ　ＣＰ電荷変化変異体の集合挙動。（Ａ）上：野生型、Ｒ８Ａ、Ｒ８Ｄ　Ｒ１４Ｋ１７ＡまたはＲ１４Ｋ１７Ｄを１ｎＭ　Ｂ３中に滴定し、得られた流体力学的半径を図１４に記載したようにモニターした。中央：０．５ｎｍのビンサイズで分布として示した上部チャートのR_h値を、ガウスピークを用いてフィッティングし、反応全体を通して溶液中に存在する不均一性を強調した。Ｔ＝１粒子のR_hをオレンジ色の破線で示す。下：上記反応物のＥＭ画像（左上から右下へ、野生型、Ｒ８Ａ、Ｒ８Ｄ　Ｒ１４Ｋ１７Ｄ、Ｒ１４Ｋ１７

Ａ）。（Ｂ）（Ａ）と同様であるが、１０ｎＭ　ＰＳ１～５中に滴定したＣＰを含む（左上から右下へ、野生型、Ｒ８Ａ、Ｒ８Ｄ　Ｒ１４Ｋ１７Ａ、Ｒ１４Ｋ１７Ｄ）。

【図２０】３つのＰＳ断片の集合挙動。上：２ｎｍビンサイズで分布としてプロットし、ガウスピークでフィッティングした、図１４ＢからのＳＴＮＶ　ＣＰとＰＳ１～５（黒色）、ＰＳ１～３（濃い灰色、左）、ＰＳ３～５（黒色、左）及びＰＳ２～４（薄い灰色）との間の３０００～４０００秒の反応に対応するR_h値。下：図１４からの反応物のＥＭ画像。

【図２１】３つのＰＳ断片の安定構造。Ｍｆｏｌｄによって予測したようなＰＳ１～３、ＰＳ２～４及びＰＳ３～５の最も安定した構造。色分けは、図１２に、及び全体を通して見られる通りである。２つの主なＰＳ１～３の折り畳みは、２つの－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－ＳＬを主に提示するが、これらは協同的集合のためには離れすぎていると考えられる。ＰＳ２～４は２つのＳＬを提示し、１つは－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－モチーフを有し、もう１つは他方と４ｎｔ離れている。ＰＳ３～５の２つの主な折り畳みも、２つのＳＬを提示するが、これらのＳＬは近接していて（１０～１２ｎｔ）、一方のみが全体のうち６％の－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－モチーフを提示する。

【図２２．１－２２．３】１２７－ｍｅｒのカセット構造。上：ＳＴＮＶ野生型ＰＳ１～５遺伝子断片及びその合成対応物の、Ｍｆｏｌｄによって決定されるような配列、推定二次構造及び折り畳み自由エネルギー。下：Ｍｆｏｌｄによって決定されるような各ＳＬの相対的折り畳み自由エネルギーの比較表。オリゴを図１２におけるように色分けする。

【図２３】１２７－ｍｅｒ集合カセットの構造及び安定性の問題。（Ａ）２６０ｎｍでCa^{2+}濃度を増加させながらの、ＲＮＡオリゴヌクレオチドＷＴ　ＰＳ１～５（正方形）、安定ＰＳ１～５（円）、不安定ＰＳ１～５（三角形）、全てＰＳ３（逆三角形）及び合成安定ＰＳ１～５（菱形）のモル楕円率。（Ｂ）（Ａ）におけるように色分けした、ＲＮＡオリゴヌクレオチドの熱融解中における２６０ｎｍでのモル楕円率。

【図２４】合成１２７ｍｅｒカセットの集合挙動。（Ａ）図１９におけるようにプロットした、図１５ＡからのＳＴＮＶ　ＣＰ及びＰＳ１～５（黒色）、安定ＰＳ１～５（濃い灰色）、不安定ＰＳ１～５（灰色）、全てＰＳ３（赤色）または合成安定ＰＳ１～５（薄い灰色）を含有する反応物の３０００～４０００秒間のR_h値。（Ｂ）図１５Ａにおけるように色分けした、上記反応物のＥＭ画像。

【図２５】ゲノムキメラの集合挙動。（Ａ）ＳＴＮＶ－１ゲノムＲＮＡを使用するｓｍＦＣＳ再集合。R_h値をＳＴＮＶ　ＣＰ滴定前及び最中に測定し（垂直の破線）、各ステップ後にR_h値を平衡化させた。ＳＴＮＶ－１ゲノムは、最初に最大３０％まで急落し、次いでR_hは、Ｔ＝１ＶＬＰ（R_h約１１ｎｍ）に相当する値まで回復する。（Ｂ）ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ６０００ＰＷｘｌ　ＳＥＣカラム（Ｔｏｓｏｈ）から溶出したＳＴＮＶ　ＣＰを用いた、ＳＴＮＶ－１（黒色）、合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（薄い灰色）及び不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１（灰色）間の再集合のＱＥＬＳ測定光散乱データ。ピーク面積及び測定したR_h値を表６に記載する。（Ｃ）メインピーク（約２０分）でのＶＬＰのＥＭ画像。

【００８３】

表１：ＥＳＩ－ＭＳ質量分析法によって決定されるような、使用したＣｐ及びキナーゼ（ＳＲＰＫΔ）の異なる型の質量

	予想質量（Ｄａ）	観察質量（Ｄａ）
SRPKΔ	45615.4	45614.7 ± 1.37
リン酸化 Cp_{185}	21995.4	21995 ± 0.71
Cp_{185}	21395.3	21395.6 ± 0.86
Cp_{149}	16852.3	16851.7 ± 0.06

【００８４】

表２：Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ－４８８標識ＰＳ１とＣｐとの会合。

異方性を使用して、１５ｎＭのＡｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ－４８８標識ＲＮＡ　ＰＳオリゴが、１２５ｎＭの予め形成されていたＣｐ殻に結合し得る、またはそれに侵入し得る場合を決定した。後者は、ＲＮＡの不存在下における高濃度での再集合によって形成された（３）（図８ｃ）。蛍光偏光値は、色素標識種の質量に影響される（４）。ＰＳ１オリゴの偏光値は、予想通り、ＲＮａｓｅの添加後に下降するが、オリゴの存在下で集合したＶＬＰ中に組み込まれる場合は変化しないままである。標識ＰＳ１を中空Ｃｐ　ＶＬＰ中に添加する場合、その蛍光発光は影響を受けず、これはクエンチされずにＲＮａｓｅの感度を維持することを示唆し、ＰＳ１がタンパク質殻の外側と結合しない、すなわち内在化されることを裏付けている。

	蛍光偏光		全蛍光	
試料	-RNase	+RNase	-RNase	+RNase
ＰＳ１オリゴ	72	43.5	73637	74102
PS1 VLP	130	128	30187	33564
ＰＳ１＋中空ＶＬＰ	52.8	15.5	69336	70672

【００８５】

表３：ＰＳ１バリアントオリゴヌクレオチドのＬ１～５及びＢ１の配列変化及び対応する集合挙動。集合挙動を以下の通りに示す。最初の「＋」はＲＮＡ－Ｃｐ結合を示し、２番目はＴ＝３／Ｔ＝４サイズの種の形成を示し、３番目はＲＮａｓｅ保護を示す。「－」は、本アッセイの失敗を示す。

ＲＮＡオリゴ	ループ	バルジ	集合挙動	注釈
PS1	GGGAGG	GGG	+++	
L1	UUUAUU	GGG	+ － －	ループＧは重要である
L2	GUUAGG	GGG	+ － －	ループＧは重要である
L3	UGGAUU	GGG	+ + －	ループＧは重要である
L4	GGGUGG	GGG	+ + －	ループＡは重要である
L5	GGGGGG	GGG	+ + －	ループＡは重要である
B1	GGGAGG	AAC	+ + －	バルジ配列／構造は重要である

【００８６】

表４：Ｂ３配列バリアント。Ｂ３配列バリアントのループモチーフ（左）、全配列（中央）及び折り畳み自由エネルギー値（右）。

ループモチーフ	配列	折り畳みのΔＧ（ｋｃａｌｍｏｌ$^{-1}$）
ACAA	ＡＣＡＵＧＣＡＡＣＡＡＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１０）	-2.6
AUUU	ＡＣＡＵＧＣＡＡＵＵＵＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１１）	-2.6
UUUA	ＡＣＡＵＧＣＡＵＵＵＡＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１２）	-2.6
GUUU	ＡＣＡＵＧＣＡＧＵＵＵＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１３）	-2.1
UUUG	ＡＣＡＵＧＣＡＵＵＵＧＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１４）	-2.9
AUUG	ＡＣＡＵＧＣＡＡＵＵＧＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１５）	-2.6
GUUA	ＡＣＡＵＧＣＡＧＵＵＡＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１６）	-3.4
GUUG	ＡＣＡＵＧＣＡＧＵＵＧＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１７）	-2.5
AUUA	ＡＣＡＵＧＣＡＡＵＵＡＵＧＣＡＣＡＣ（配列番号１８）	-2.6

【００８７】

表５：ＲＮＡ集合カセットの準最適構造の分析。Ｍｆｏｌｄを使用し、５００の準最適性設定を用いて各カセットを折り畳んだ。次いで、これらの折り畳みを以下の基準によって評価した：ＰＳ１～５の正確な－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－ループの存在を検証し、パーセンテージとして示した（表全体を通して緑色＝６０＋、オレンジ色＝４０＋、赤色０－３９）。各ステムループ間のヌクレオチド間隔を、期待値と比較して測定し（図２２）、またパーセンテージとしても示した。これらの間隔が異なっていた場合、最大のヌクレオチド差を示す。

	正確に提示した－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－モチーフの％					『正確な』間隔の％				最大間隔分散
カセット	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5	1-2	2-3	3-4	4-5	
WT PS1-5	72	0	8	0	10	8	0	0	0	+7
合成安定ＰＳ１～５	100	87	100	75	73	9	69	76	72	+7
安定ＰＳ１～５	100	87	99	68	31	5	72	55	66	+7
不安定ＰＳ１～５	98	97	0	73	27	73	0	0	67	+7
全てＰＳ３	100	99	100	100	100	92	90	100	90	+4
PS1-3	78	2	9	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	N/A
PS2-4	N/A	0	2	0	N/A	N/A	0	0	N/A	+3
PS3-5	N/A	N/A	34	4	6	N/A	N/A	0	0	N/A

【００８８】

表６：ＱＥＬＳ実験からの収率及びＲｈ値。ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ６０００ＰＷｘｌカラムから溶出したメインピーク（２０分、図２５）の中点から取得した測定Ｒｈ値。ゲノムキメラ再集合体の収率を、Ｏｒｉｇｉｎ　Ｐｒｏ９のピークアナライザー機能を使用し、メインピーク（２０分、図２５）下面積を積分することによって算出した。次いで収率を、最高値を基準として正規化し、パーセンテージとして示した。

試料	Ｒｈ値／ｎｍ	相対的収率／％
STNV-1	9.1	80
不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１	8.9	40
合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１	9.3	100

【００８９】

表７：ＲＮＡオリゴヌクレオチドプライマー

プライマー名	配列５’～３’	配列番号	Tm ℃
フォワード	GACATTAATACGACTCACTATAGGGACATGCA	19	65.5
AUUArev	GTGTGCATAATTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	20	68.2
GUUGrev	GTGTGCACAACTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	21	70.0
AUUGrev	GTGTGCACAATTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	22	69.5
GUUArev	GTGTGCATAACTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	23	69.5
UUUArev	GTGTGCATAAATGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	24	68.2
AUUUrev	GTGTGCAAAATTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	25	68.2
GUUUrev	GTGTGCAAAACTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	26	69.5
UUUGrev	GTGTGCACAAATGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	27	69.5
ACCArev	GTGTGCATGGTTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	28	64.3
AAAArev	GTGTGCATTTTTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	29	62.0

プライマー名	配列５’～３’	配列番号	Tm ℃
AGGArev	GTGTGCATCCTTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	30	64.0
AUGArev	GTGTGCATCATTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	31	62.9
AGUArev	GTGTGCATACTTGCATGTCCCTATAGTGAGTCG	32	62.5
不安定１～５フォワード	AGTAATACGACTCACTATAGGGGGGCTGCCCTCAAGGACCAGGGCAGAAAAGAGGAAAAGAA	33	62
不安定１～５鋳型	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGTGACAGAACACTTATAAGGAAATACACAAGTATAAGGAAAAAAGGAAGCTGCAATAGCGCAAGGAA	34	62
不安定１～５リバース	TTCCTTTCCGAATTTTCGGATTCCTTGCGCTATTGCAGCTT	35	62
全てＰＳ３フォワード	GGGCCCCGCAACAATGCGGGGAAGGAAGGAAGGAAGAAAACGTACAAACGTTTT	36	65
全てＰＳ３鋳型	AGAAAACGTACAAACGTTTTAAGGAACAACGCAACAATGCGTTGAAGGAAGGAAGGAAGGGGCGTACAAACGCCCCAAGGAATTTT	37	65
全てＰＳ３リバース	TTCCTTTTTTGCATTGTTGCAAAATTCCTTGGGGCGTTTGTACGC	38	65
安定１～５鋳型	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGTGACAGAACACTTATAAGGAACCACACAAGTGGAAGGAAAAAAGGAAGCTGCAATAGCGCAAGGAA	39	62
合成安定１～５鋳型	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGTGACAGAACACTTATAAGGAAAAAACGUACAAACGUUUUAAGGAAAAAAGGAAGCTGCAATAGCGCAAGGAA	40	62
ＰＳ１～５フォワード	AGTAATACGACTCACTATAGGGAGTAAAGACAGGAAACTTTACTGACTAACATGGCAAAAC	41	62
ＰＳ１～５鋳型	ACTGACTAACATGGCAAAACAACAGAACAACAGGCGAAAATCCGCAACAATGCGTGCAGTGAAGCGCATGATAAATACAC	42	62
ＰＳ１～５リバース	TCAGTGCAAACCTTTTATGCTCCAAGTGTGTATTTATCATGCGCT	43	62
ＰＳ１～３フォワード	AGTAATACGACTCACTATAGGGAGTAAAGACAGGAAACTTTACTGACTAACATGGCAAAAC	44	61
ＰＳ１～３鋳型	ACTGACTAACATGGCAAAACAACAGAACAACAGGCGAAAAT	45	61
ＰＳ１～３リバース	CGCATTGTTGCGGATTTTCGCCTGTTGT	46	61
ＰＳ２～４フォワード	AGTAATACGACTCACTATAGGGTGGCAAAACAACAGAACAACAGGCGAAAAT	47	58
ＰＳ２～４鋳型	AACAGAACAACAGGCGAAAATCCGCAACAATGCGTGCAGTGAAGCGCATGATAAATA	48	58

プライマー名	配列５’～３’	配列番号	Tm ℃
ＰＳ２～４リバース	CCAAGTGTGTATTTATCATGCGCTTCACTGCACGCATTGTTGCGG	49	58
ＰＳ３～５フォワード	AGTAATACGACTCACTATAGGGCCGCAACAATGCG	50	61
ＰＳ３～５鋳型	CCGCAACAATGCGTGCAGTGAAGCGCATGATAAATACAC	51	61
ＰＳ３～５リバース	TCAGTGCAAACCTTTTATGCTCCAAGTGTGTATTTATCATGCGCT	52	61

【００９０】

材料及び方法

使用したタンパク質のクローニング、発現及び精製。

発明者らは、宿主ＲＮＡを含有する集合ＨＢＶ　ＶＬＰを産生すると知られている（５）、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｃｐ発現プラスミドを得た（Ｐｒｏｆ．Ｎｉｃｏｌａ　Ｓｔｏｎｅｈｏｕｓｅから寄贈）。コードされるＣｐは、現ＧｅｎＢａｎｋ参照株（ＮＣ＿００３９７７．２）と比較して以下のアミノ酸配列差を有する：Ａ６１、Ｅ７７－ＦＡＧＡＳ（１文字アミノ酸コード）－Ｄ７８挿入、Ｓ９２Ｎ、Ｆ１０２Ｉ、Ｉ１２１Ｌ、Ｒ１５６－ＲＤ－Ｒ１５７挿入。野生型Ｃ６１は集合に関与しているため（６）、これを、ＢＬ２１（ＤＥ３）Ｅ．ｃｏｌｉ細胞のＰＥＴ２８ｂプラスミド中での発現前に遺伝子に復元した。挿入ＦＡＧＡＳエピトープも除去した。１ｍＭ　ＩＰＴＧを用いた０．６ＯＤでの誘導に続いて、２０時間、２１℃で増殖させた。Ｓｏｎｉｐｒｅｐ　１５０を使用し、氷上で５×３０秒破裂させて細胞を溶解した。次いで、溶解物を１１，０００ｇで１時間スピンすることによって浄化した。次いで、ＶＬＰを１２０，０００ｇで１４時間遠心分離することによってペレットにし、２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．５）、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、及び５ｍＭ　ＤＴＴ中に再懸濁し、２５ｍｌのＣａｐｔｏ（商標）ｃｏｒｅ　７００樹脂（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を充填したＸＫ５０カラムに流した。ＶＬＰを含有する画分をプールし、４０％（ｗ／ｖ）硫酸アンモニウムで沈殿させた。ＣｐがＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で純粋であることが分かり、その特性、及びバリアントの特性を質量分析法によって確認した（表１）。ＡＲＤが欠如しているＣｐ、すなわち、Cp_{149}を変異誘発（Ｑ５ｓｉｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｋｉｔ、ＮＥＢ）によって産生し、同様に調製した。Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現したCp_{149}ＶＬＰは、カプシド封入細胞ＲＮＡを大幅に欠いていることに留意する。ＶＬＰを、ネガティブ染色透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）によって可視化した。全長Ｃｐ　ＶＬＰをショ糖密度勾配によってさらに精製し、次にＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ－４８８　ＳＤＰエステル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用し、４時間にわたって室温で２００ｍＭ炭酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ８．３）中において色素標識し、続いてＮＡＰ５カラム上で脱塩した。勾配上に２つの重複するＶＬＰピークが存在し、それらを分離することは不可能であった。ＴＥＭ及びｓｍＦＣＳは、それらが予想したＴ＝３及びＴ＝４殻であることを裏付け、後者が優位型である（図７ａ）。Ｃｐ領域１４０～１４８が形態学の決定因子であることが示され、より短い型がより多くのＴ＝３殻を産生した（７）。１５７位のリンカー領域に隣接するジペプチド挿入が、Ｃｐの特性を変化させる可能性がある。しかしながら、発明者らがＲＤ挿入を除去してCp_{183}を得た場合に、発明者らは、ＲＮＡ結合、ＰＳ　ＲＮＡを有するＶＬＰを形成する能力または形成される優位な準配座異性体殻の選好のいずれにおいても、Cp_{185}と全く差がないことを見出した。より長いＣｐをＳＥＬＥＸ及び高分解能ＥＭ研究に使用したので、これらが全体を通して示すデータである。

【００９１】

集合アッセイに使用した全てのＨＢＶバリアントを、ｐＨ７．５とは対照的にｐＨ９．５で分解を行ったという点を除いて、ＶＬＰから分解させて先に記載されているようにタンパク質二量体にした（３）。これは、Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｔａｂｌｅｔｓ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）の存在下で行った。ＨＢＶコア二量体濃度をＵＶ吸光度によって決定した。A_{260}：A_{280}比がおよそ０．６以下の画分を集合アッセイに使用した。ＳＲＰＫΔキナーゼを、先に記載されているように（８）、ｐＲＳＥＴｂプラスミドから発現させて精製した。

【００９２】

ＳＥＬＥＸプロトコール

精製したＨＢＶカプシド（約３６０μｇ）を、製造業者のプロトコールに従って６ｍｇのＭ２７０カルボン酸Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）上に固定化した。ビーズをセレクション緩衝液（２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ７．５、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＤＴＴ、ＥＤＴＡフリー完全プロテアーゼ阻害剤）で２回洗浄し、未反応のＮ－ヒドロキシスクシンアミドを１５ｍの５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４で洗浄してブロックした。ビーズをセレクション緩衝液でさらに３回洗浄した。固定化カプシドを、０．５Ｍ　$LiCl_2$中の２Ｍ塩化グアニジニウムによる３０分のインキュベーションで分解した。次いで、ビーズをＢ＆Ｗ緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、２Ｍ　ＮａＣｌ）で３回洗浄し、次いでセレクション緩衝液で３回洗浄した。ビーズを、ビーズの濃度が１０ｍｇ／ｍＬとなるようにセレクション緩衝液中に再懸濁させた。ネガティブセレクションビーズも、カプシドを含まないことを除いて同様に調製した。１０ラウンドのＳＥＬＥＸを、先に記載されているように（９）、合成コンビナトリアルＮ４０　２’ＯＨ　ＲＮＡライブラリー（約10^{24}の可能な配列）を使用してインビトロで実施した。次いで、ラウンド１０の増幅ＤＮＡを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑプラットフォーム上で次世代シーケンシングに供した。これは約１．６Ｍの配列リードを生成し、その場合、１つの配列が６５，８０２回発生し、１００以上の多様性で１１４９個のアプタマーが存在する。このアプタマープール中における４つのヌクレオチドの総頻度は、Ａ３４．３０％、Ｃ９．０９％、Ｇ４０．９７％及びＵ１５．６４％であり、Ａ２６．１０％、Ｃ２２．０３％、Ｇ２４．６４％及びＵ２７．２２％の非選択ナイーブライブラリーに関する同じデータと比較する。後者プール中における配列の最大多様性は４である。これらのデータは、ナイーブプールから選択を行ったこと、及び選択したアプタマーの塩基組成がＨＢＶゲノム内で同定したＲＧＡＧモチーフと一致することを裏付ける。

【００９３】

ＰＳ同定

ＰＳ同定を、実験室ＨＢＶ株（＊ＮＣ＿００３９７７．１）を使用して実施した。アプタマーライブラリーは、１，６６４，８９０の特有の配列を含有していて、それらは以下の通りにゲノムに対してアラインメントされた各４０ｎｔ長である：各アプタマー配列を、１ｎｔ単位でゲノムに沿ってスライドさせた。参照フレームのそのような各々の位置について、ゲノムに対して最適なアラインメントを有するアプタマー配列のサブセットを、ベルヌーイスコアＢに従って同定し、これは不連続アラインメントの確率をＢヌクレオチドの連続アラインメントの確率と比較して評価する。ライブラリー中における所与のアプタマー配列の参照フレーム全てに関するベルヌーイスコアを、最大スコアから開始して順位付けし、最大１２のベルヌーイスコアまでゲノムと一致するもの全てを計数した。次いで、他方のアプタマー配列について手順を反復し、対応する一致を追加して、図２ａのピークを得た。

【００９４】

コンセンサスモチーフの識別

以下のアクセッション番号を有するＨＢＶゲノム配列を、ＧｅｎＢａｎｋで見出せる７５０の完全ＨＢＶゲノムからランダムに抽出した：ＫＣＳ１０６４８．１、＊ＡＦ２２３９５５．１、ＡＹ７８１１８１．１、＊ＡＢ１１６２６６．１、ＡＢ１９５９４３．１、

ＫＲ０１４０８６．１、＊ＫＲ０１４０７２．１、ＫＲ０１４０５５．１、ＫＲ０１３９３９．１、ＫＲ０１３９２１．１、ＫＲ０１３８１６．１、ＫＲ０１３８００．１、ＥＵ７９６０６９．１、ＡＢ５４０５８２．１、ならびにＮＣＢＩ　ＨＢＶ参照株（ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓｅｑ　ＩＤ＊ＮＣ＿００３９７７．２）及び実験室株（ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓｅｑ　ＩＤ　ＮＣ＿００３９７７．１）を全体に追加した。図２ｃの統計分析に使用した配列をアスタリスクで印を付ける。ベルヌーイピークは、これらの１６のＨＢＶ株バリアントの少なくとも８０％において互いに多くとも１０ｎｔ以内に発生し、これらに図２ａ中において緑色のＸで印を付けて、それらの保存を示した。推定ＰＳ認識モチーフを同定するために、発明者らは、３つの代表的な株（ＡＦ２２３９５５．１、ＮＣ＿００３９７７．１、及びＮＣ＿００３９７７．２）から、各ベルヌーイピークのピークヌクレオチド周囲に集中している、６０ｎｔの配列を抽出し、Ｍｆｏｌｄによって負の自由エネルギーを持つ全ての可能なステムループを決定した（１０）。発明者らは、配列及び構造要素の両方を比較して、これらのステムループの類似性分析を実施し、発明者らは、他方の株中の同じピーク面積に対応する同じゲノム及びステムループ中において、他方のピーク面積における二次構造要素と両方とも最高の類似度を有する代表的な各ピーク面積について同定した。これにより、各ピークに対するステムループを選択した。対応するループ配列のアラインメントを図２ｂに示す。

【００９５】

ＲＮＡ色素標識

ＰＳ１、ＰＳ２及びＰＳ３（４７ヌクレオチド長）を、５’Ｃ６－アミノ基と共にＩｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから購入した。ＲＮＡを標識するために、６μＬのＲＮＡ（２００μＭ）を、１μＬの１Ｍホウ酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ８及び３μＬの１０ｍＭ　Ａｌｅｘａ－４８８－ＳＤＰ（Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と混合し、室温で４時間回転させた。次いで、１０μＬの２×変性ローディング色素をＲＮＡに添加し、５分間煮沸して、予熱した変性ＰＡＧＥ上に負荷した。ＲＮＡをゲル抽出してイソプロパノール沈殿し、最後にＤＥＰＣ－$Ｈ_2Ｏ$中に再懸濁させて、必要になるまで－８０℃で凍結した。

【００９６】

集合アッセイ

集合反応を、分解緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ９．５）、１．５Ｍ　ＧｕＨＣｌ、５００ｍＭ　ＬｉＣｌ及び５ｍＭ　ＤＴＴ）中のＨＢＶ　Ｃｐを、２０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ７．５）、２５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＤＴＴ及び０．０５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０を含有する再集合緩衝液中の１５ｎＭ　Ａｌｅｘａ－４８８標識ＲＮＡに２５℃で添加することによって実施した。プラトーに達するが、総反応体積の１０％を決して超えない測定$Ｒ_ｈ$値によって集合が完了したと考えられるまで、二量体の連続添加を実施した。Ｃｐの各添加を、滴定プロット中において垂直の灰色破線で印を付け、Ｔ＝３及びＴ＝４粒子の予想した流体力学的半径（Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現される色素標識粒子について決定した場合）を、図面内においてオレンジ色の水平破線で印を付ける。

【００９７】

反応全体を通して手作業で混合したため、ＦＣＳデータ収集の開始時におよそ１分の遅延を招いた。自己相関関数（ＣＦ）ごとに３０秒のデータ蓄積を伴う特注のＦＣＳ設定を使用して、ＦＣＳ測定を行った。個々のＣＦを、三重項状態の緩和及び拡散（拡散時間、ＴＤを特徴とする）成分に分解し、後者を見かけの流体力学的半径$Ｒ_ｈ$に変換した（１１）。ＴＥＭの試料を、各測定の終了時に取得した。経時的な$Ｒ_ｈ$のプロット（薄い破線）を、Ｏｒｉｇｉｎ　Ｐｒｏ－８のＦＦＴフィルターを使用し、３５％のカットオフパーセンテージを用いて平滑化した（太い実線）。$Ｒ_ｈ$分布のプロットも、Ｏｒｉｇｉｎ　Ｐｒｏ－８ソフトウェアを使用して正規の単一または複数のピークガウス関数にフィッティングした。ネガティブ染色ＴＥＭ分析のために取得した試料を、グロー放電炭素コーティングホルムバール３００メッシュ銅グリッド上に置いた。グリッドを２％酢酸ウラニルで染色して乾燥させた。

【００９８】
集合粒子の標識
集合をｓｍＦＣＳ実験におけるように実施した。特に、Ｃｐを、１５ｎＭの非標識ＰＳ１を含む場合と含まない場合で、２５０ｎＭの最終濃度まで再集合緩衝液中に滴定した。これを室温で１時間放置してインキュベートし、次いで、緩衝液交換を透析により実施し、存在するグアニジニウム塩酸塩を除去した。次いで、タンパク質の標識を、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ－４８８ ＳＤＰエステル（１：５０比の色素対Ｃｐ二量体）を添加し、一晩４℃でインキュベートすることによって実施した。次いで、得られた試料を、ｓｍＦＣＳによって３０ｓビンで１００分間測定し、R_hデータを流体力学的半径分布プロットで上記の通りにプロットした。次いで、試料をＴＥＭによる分析のために取り出した。標識後、Ｃｐ二量体は機能不全な集合となり、それゆえＣｐをリアルタイム集合中に記録できなかった。
【００９９】
光退色
Ａｌｅｘａ－４８８標識ＰＳ１を含有するＨＢＶ ＶＬＰを、ｓｍＦＣＳ集合アッセイに記載したように集合させた。それらの条件下で、全てのＲＮＡをタンパク質に結合させ、これをＦＣＳ実験の蛍光消光及び光子計数から判断した。次いで、ＶＬＰを２つのグロー放電照射炭素／ホルムバール３００－メッシュグリッド（Ａｇａｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に添加し、１つのグリッドを２％（ｗ／ｖ）酢酸ウラニルで染色して、Ｊｅｏｌ１４００顕微鏡を用いて４０，０００×倍率で目視した。残った非染色グリッドを、ホルムバール面を下にして清浄な顕微鏡カバーガラス上に配置し、倒立ＴＩＲＦ顕微鏡上に搭載した。レーザー（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ Ｓａｐｐｈｉｒｅ、４８８ｎｍ、２５ｍＷ）出力を、数分の時間枠内で標識ＲＮＡを励起して光退色するように調整した。連続画像を、ｅｍＣＣＤカメラ（Ａｎｄｏｒ ｉＸｏｎ）を用いて０．２秒の露光及び２００のｅｍゲインで取得した。未露光の視野範囲を各系列に使用した。
【０１００】
蛍光スポットを、前述した手順を使用して収集したフレーム中で同定し、時間経過に変換した（１２）。次いで、これらを検査し、光退色ステップ数に従って分類した。規定数のステップを有する記録の頻度をヒストグラム中で照合した。視野範囲ごとにいくつかの明るいスポットが連続的な強度減衰を示したため、より大きな凝集体を表していると推定された。これらを使用して全体的な光退色速度を推定し（フレーム当たり０．００３）、１０ステップを表す場合、正式にヒストグラム中に含んだ。連続事象を表すビンを含まないヒストグラムを、ＵＶ－Ｖｉｓスペクトルから推定した最大で４倍の占有率及び０．５６の標識確率について二項分布の加重和としてモデル化した。
【０１０１】
電子顕微鏡再構成
大規模ＶＬＰ調製
ｓｍＦＣＳ実験を、９６ウェルプレートにスケールアップした。２つの９６ウェルプレート（Ｎｏｎ－Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｕｒｆａｃｅ、Ｃｏｒｎｉｎｇ）を使用した。ＰＳ１ＲＮＡを以前の通りに標識してゲル精製し、ＨＢＶ二量体を上に記載した通りに精製した。各ウェルは、再集合緩衝液中に２００μＬの１５ｎＭ ＰＳ１を含有した。ｓｍＦＣＳにおけるように、分離緩衝液中の２．５μＭ二量体の２μＬ注入を１０回実施した。Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダーを使用して注入を実施し、ＰＳ１ ＲＮＡの異方性を記録した（ＦＩＴＣ励起及び発光フィルター）。ＶＬＰを、遊離ＲＮＡ及びカプシドを避けて１．３３ｇ／ｍＬの塩化セシウム勾配を使用して精製し、ＳＷ４０Ｔｉローターを使用して１１３，６５２×ｇで９０時間回転させた。単一のバンドを観察して分画した。バンドを再集合緩衝液中に透析し、塩化セシウムを除去した。ＶＬＰの2ｍＬ画分を、Ａｍｉｃｏｎ １００ｋＤａ ＭＷＣＯスピン濃縮器を使用して２００μＬに濃縮した。
【０１０２】

クライオＥＭ材料調製

ＰＳ１含有ＶＬＰの回収及び透析による塩化セシウムの除去後、それらの構造を、単粒子クライオＥＭを使用して分析した。ＶＬＰをガラス状にした。Ｑｕａｎｔｉｆｏｉｌ Ｒ２／１支持フィルム及びさらに約５ｎｍの連続炭素フィルムを備えた２００メッシュＥＭグリッドを、アセトンを使用して洗浄し、使用前に４０秒間グロー放電した。クライオＥＭグリッドを、グリッド上に３μｌ約の３．２ｍｇ／ｍｌ ＨｅｐＢ ＶＬＰを置いてからブロッティングし、Ｌｅｉｃａ ＥＭ ＧＰ凍結デバイスを使用して浸漬凍結することによって調製した。チャンバー条件を８℃及び９５％相対湿度に設定し、液体エタン温度を－１７５℃にした。データを、ＦＥＩ Ｔｉｔａｎ Ｋｒｉｏｓ（ｅＢＩＣ、Ｄｉａｍｏｎｄ Ｌｉｇｈｔ Ｓｏｕｒｃｅ、ＵＫ）透過型電子顕微鏡上において３００ＫｅＶで収集し、２７e^{-}／$Å^{2}$／ｓの電子線量、２．５ｓ露光を使用し、生じた総電子線量は６７．５e^{-}／$Å^{2}$であった。データを、１７Ｈｚ ＦＥＩ Ｆａｌｃｏｎ ＩＩ直接電子検出器上で記録した。線量を３３フレームにわたって分割した。最終対象抽出は、１画素当たり１．３４Åであった。合計で２３９７枚の顕微鏡写真を、ＥＰＵ（ＦＥＩ）自動データ収集ソフトウェアを使用して記録した。

【０１０３】

単粒子画像処理

２３９７枚の顕微鏡写真に動き補正を行い、各動画の平均を、ＭｏｔｉｏｎＣｏｒｒ（１３）を使用して生成し、各々についてコントラスト伝達関数（ＣＴＦ）パラメータを、ＣＴＦＦＩＮＤ４（１４）を使用して決定した。ＣＴＦＦＩＮＤ４の出力検査によって決定されるような、許容できない非点収差または荷電を含む顕微鏡写真を廃棄し、１７１０枚の顕微鏡写真の全データセットを残した。粒子全ての採集、分類及びアラインメントを、ＲＥＬＩＯＮ １．３（１５）で実施した。

【０１０４】

およそ５７，０００粒子を手作業で選定し、ＲＥＬＩＯＮ １．３で参照像なしの２Ｄ分類を使用して分類した。この分類によって、ＶＬＰをセシウム勾配上で単一のバンドとして精製したが、２つのサイズのＶＬＰが存在していたことを最初の視覚的印象で確認した。得られた２Ｄクラス平均のセレクションを、自動粒子採集のテンプレートとして使用した。自動採集を使用して生成した粒子スタックで２Ｄ分類を行ってＴ＝３及びＴ＝４粒子に分離し、ＶＬＰに相当しない粒子を除去した。その後の粒子スタック（Ｔ＝３は５５８９個、Ｔ＝４は４２，４１１個）で、開始モデルとしてＶＬＰの概算の直径を有する球体を使用し、３Ｄ分類を行った。データのサブセットはナイキスト周波数までのデータを含み、これをＲＥＬＩＯＮの３Ｄオートリファインオプションを使用し、課されたＩ３対称性を有するように再構成して本研究で提示される全ての構造を生成した。Ｔ＝４の４２，４１１個の粒子データセット内では、データのさらなるサブセット（１０，８５１個の粒子）が、Ｃｐ殻内部に、ＲＮＡ結合が生じると予想されるだろう重要な非対称的特徴を含有していたことが明らかとなった。非対称（Ｃ１）再構成を、１０，８５１個のそのような粒子の相対的に均一なセットで実施し、１１．５Å分解能で再構成像を得た。

【０１０５】

ＰＳ１ ＲＮＡの３Ｄモデルを、ＲＮＡ Ｃｏｍｐｏｓｅｒ（１６）を使用して作成した。クライオＥＭ図を、ＵＣＳＦ Ｃｈｉｍｅｒａ（１７）を使用して表現した。

【０１０６】

組換えＳＴＮＶ ＣＰの精製

組換えＳＴＮＶ ＶＬＰをＥ．ｃｏｌｉから精製した（１８）。ＳＴＮＶ電荷変化変異体プラスミドを、Ａｇｉｌｅｎｔ、及びＱｕｉｋｃｈａｎｇｅ部位特異的変異誘発キット（Ａｇｉｌｅｎｔ）を使用して設計したプライマーを使用して作製した。ＣＰ単量体を、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．５）、１０ｍＭ ＥＤＴＡ中で、Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｐｒｏｔｅａｓｅ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ Ｃｏｃｋｔａｉｌ（Ｒｏｃｈｅ、Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ）の存在下における分解によって精製した。ＳＴＮＶ ＣＰを、連続Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、及びＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｓ

ｗｅｄｅｎ）によってｍＲＮＡから分離した。ＳＴＮＶ　ＣＰを、２０カラム体積の５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）及び２５ｍＭ　ＮａＣｌで洗浄して残留ＥＤＴＡを除去し、続いて緩衝液中で０．０２５～２Ｍ　ＮａＣｌ勾配を使用して溶出した。ＣＰは０．８ＭＮａＣｌで溶出する。ＳＴＮＶ　ＣＰをＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、その濃度をＵＶ吸光度によって決定した。Ａ２６０：Ａ２８０比が０．６以下の画分を集合アッセイに使用した。過剰発現中にＶＬＰを形成しなかった変異体ＣＰを、同じ連続Ｑ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ及びＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム法を使用して精製した。

【０１０７】

ＲＮＡオリゴヌクレオチドの調製

本試験で使用したＲＮＡオリゴヌクレオチドをコードするｄｓＤＮＡ転写物を、プライマー及びＫＡＰＡ２Ｇ系（ＫＡＰＡ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を製造業者のプロトコールに従って使用して産生した。転写を、Ｈｉｇｈｓｃｒｉｂｅ　Ｔ７　Ｈｉｇｈ　ｙｉｅｌｄ　ＲＮＡ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｋｉｔ（ＮＥＢ）を使用して実施した。産物を変性ＲＮＡゲル上に流した。全体を通して使用したＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８標識Ｂ３オリゴヌクレオチドを合成し、ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ａ／Ｓ（Ｄｅｎｍａｒｋ）によってＨＰＬＣ精製した。５’フルオロフォアを要する他のＲＮＡオリゴヌクレオチドを転写中にアミノＧＭＰで標識し、先に記載されているように（１９）、ゲル精製前にＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８　ＳＤＰエステル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に架橋させた。

【０１０８】

ゲノムキメラを、５’Ｔ７プロモーターを有する合成安定化及び不安定＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１構築物の遺伝子ブロックを購入し（ＩＤＴ　ＤＮＡ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、Ａｎｔａｒｃｔｉｃ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（ＮＥＢ）を使用した制限消化及び脱リン酸化後、ＢａｍＨＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ切断部位をいずれかの末端に保持して付着末端を作製することによって作製した。次いで、この遺伝子ブロックを、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ（ＮＥＢ）を使用してＰＡＣＹＣ１８４プラスミドにライゲートさせた。転写を、ＢａｍＨＩを使用した線形化後に上記のように実施した。

【０１０９】

ＲＮＡを各実験前に、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び１ｍＭ　ＤＴＴをｐＨ７で含有する緩衝液中で８０℃まで９０秒間加熱し、ゆっくりと４℃まで冷却することによってアニーリングした。ゲノムは６５℃まで加熱しただけであった。

【０１１０】

Ｂ３バリアントの存在下におけるＳＴＮＶ再集合及び超遠心分析沈降速度法（ｓｖＡＵＣ）再集合反応を、Ｂ３バリアントの存在下及び不存在下で１：３のＲＮＡ：ＣＰ比中において４．５μＭの最終ＣＰ濃度で、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）及び２ｍＭ　Ｃａ２＋を含有する緩衝液中への透析によって実施した。全ての試料をＴＥＭ及びＡＵＣによって分析した。ＡＵＶについて、０．３２ｍＬの各試料を、サファイアウィンドウと構築した１．２ｃｍ経路長の２セクターメニスカスマッチングエポンセンターピースセル中に置いた。試料を、１５，０００ｒｐｍでＯｐｔｉｍａ　ＸＬ－１分析用超遠心機中において２０℃でＡｎ５０－Ｔｉローター中において遠心分離した。２６０ｎｍでの吸光度変化を、およそ１１時間３０分で取得した１００回走査の吸光光学により検出した。データを、プログラムＳｅｄｆｉｔを使用してフィッティングかつ分析した。

【０１１１】

ｓｍＦＣＳデータ収集及び分析

ＦＣＳ測定を、特注のｓｍＦＣＳ設備上で実施した。励起レーザー（Ｓａｐｐｈｉｒｅ　ＣＷブルーレーザー、４８８ｎｍ、Ｃｏｈｅｒｅｎｔ、ＵＳＡ）出力を６５μＷに設定した。焦点位置を、カバーガラス内側表面から２０μｍに調整した（圧電フィードバックループによって維持、Ｐｉｅｚｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｊｅｎａ、Ｇｅｒｍａｎｙ）。浸漬油（屈折率１．５１５、タイプＤＦ、Ｃａｒｇｉｌｌｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ＵＳＡ）を、浸漬油対物レンズ（６３×倍率、開口数１．４）と共に使用した。光子計数を、単一チャネルモードのＡＬＶＬ５０００マルチプルタウデジタルコリレーター（ＡＬＶ－Ｇ

ｍｂＨ）によって記録して分析した。ＦＣＳデータを、Ｍａｔｌａｂで三重項状態について補正した単一成分拡散モデル自己相関関数との非線形最小二乗フィッティングを使用して分析した。拡散時間を見かけの流体力学的半径（Ｒｈ）の算出に使用し、集合時間の関数としてプロットした。Ｒｈ算出は、色素の推定Ｒｈ（＝集合緩衝液中で約０．７ｎｍ）を用いたＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８色素の測定した拡散時間に基づいた。

【０１１２】

ｓｍＦＣＳ集合及び競合アッセイ

Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８標識ＲＮＡオリゴヌクレオチドの初期測定を、３０秒を少なくとも１０回（５分）で取得した。精製ＳＴＮＶ　ＣＰを標識ＲＮＡ中に滴定した。各滴定を、最低でも３０秒を１０回測定した。集合アッセイでは、これをカプシド集合が完全に生じるまで反復した。この時点で、ＲＮａｓｅＡを添加してＲＮＡ保護を確認した。競合アッセイでは、試料がカプソメア構造（Ｒｈ＝約５ｎｍ）を形成したら、試料をさらに１０秒１２０回（安定性を確保するまで２０分）の間モニターした。この時点で、非標識Ｂ３低分子／Ｂ３バリアント競合物を１００倍モル過剰で添加し、１０秒１２０回で測定した。

【０１１３】

ＣＤ分析

転写したオリゴヌクレオチドを、１０ｍＭ　ＭＥＳ、５０ｍＭ　ＮａＣｌ及び１ｍＭ　ＤＴＴをｐＨ６で含有する緩衝液中において、３００μｌ中で１．５μＭまで希釈した。測定を、Ｊａｓｃｏ　Ｊ７１５分光偏光計上において２００～３５０ｎｍで２ｎｍの帯域幅を用いて実施した。各Ｃａ２＋及びＳＴＮＶ滴定を５回反転し、次の測定前に２分間平衡に達するまで置いた。熱変性を、１０～９５℃まで５℃ステップでペルチェ温度制御を使用して実施し、最終走査を１０℃で切断を確認するために実施した。各測定を３回反復して実施し、平均化した。データを、式：Δε（ｃｍ２　ｍＭ－１）＝θ／（３２９８０Ｃ（ｍＭ）Ｌ（ｃｍ）Ｎ（ｎｔの数））を使用してモル楕円率に変換した。

【０１１４】

ゲノムＲＮＡバリアントとの再集合の光散乱アッセイ

再集合を、ｓｍＦＣＳアッセイにおけるように、ゲノムキメラを用いて９６ウェルプレート中で実施し、１ｎＭゲノム及びＣＰを、最終濃度が４００ｎＭ　ＳＴＮＶ　ＣＰに到達するまで滴定した。これを、１００ｋＤａセントリコン（ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）によって１０ｋ×ｇで５分間濃縮し、ＱＥＬＳ及び屈折率測定のためにＤＡＷＮ　ＨＥＬＥＯＳ及びＯｐｔｉｌａｂ　ＴｒＥＸに接続したＡＫＴＡ　ｐｕｒｅシステム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて、ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ６０００ＰＷｘｌ　ＳＥＣカラム（Ｔｏｓｏｈ）上に流した。カラム流量は、５０分間で０．４ｍｌ　ｍｉｎ－１であった。ピークを分割し、Ａ２６０／２８０比を測定してＥＭ画像を得た（図２５）。光散乱シグナルの積分によって算出した場合の不安定ＰＳ３試料の収率は、野生型ＳＴＮＶ　ＲＮＡの収率よりも劇的に低いが、安定化合成カセットは、天然配列と比較してＶＬＰ中で有意に高い（＞２０％）収率をもたらす。ＱＥＬＳによってｓｍＦＣＳからの値に類似したＲｈ値を推定し、合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１、野生型ＳＴＮＶ－１及び不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１について、それぞれ９．３±０．１ｎｍ、９．１±０．３ｎｍ及び８．９±０．２ｎｍであった（表６）。ゲル濾過カラムから溶出した集合ＶＬＰのＡ２６０／２８０比も参考になる。ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１及び野生型ＳＴＮＶ－１ゲノム試料の両方とも同一値（１．６２）を有するが、不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１試料は、より高い値（１．８９）を有する。このことは、最初の２つの試料中には一定量のＲＮＡが、同じ数のＣＰを含有する殻内に完全に密閉されているが、最後の試料は不完全な殻中に同じＲＮＡ含有量を有していることと一致する。

【０１１５】

実施例１

ＨＢＶ　ｐｇＲＮＡは、好ましいＣｐ結合部位を含有する

Ｅ．ｃｏｌｉ中で発現した（全長）Ｃｐサブユニットから集合させたＨＢＶ　ＶＬＰを

、記載されている通りに（３）精製した（図７ａ及び表１）。それらは、Ｔ＝３及び多数のＴ＝４殻の混合物を形成する。これらを磁気ビーズ上に固定化し、塩化グアニジニウムでの処理によって分解させ、次いで洗浄して宿主ＲＮＡを除去し、固定化Ｃｐ二量体（２０）を得て、それらは接近可能なそれらのＡＲＤを有した。ＲＮＡ　ＳＥＬＥＸを、発明者らの標準的なプロトコール（図７ｂ）を使用して実施し、１０回目のラウンドのアプタマープールを次世代ＤＮＡシーケンシング（方法）によって分析した。

【０１１６】

選択ライブラリー中でＣｐと結合するＲＮＡ配列を、ＳＥＬＥＸ実験に使用したタンパク質と最も密接に関連するＨＢＶプレゲノムにアラインメントした（実験室株、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓｅｑ　ｉｄ　ＮＣ＿００３９７７．１（２１））。この株のｐｇＲＮＡ（図２ａの青色ピーク）との統計的に有意な一致（１２以上のベルヌーイスコア、方法）を、非選択ライブラリー（図２ａの灰色曲線）のアラインメントに対して評価し、有意な頻度で発生するピークを同定した。これによって、Ｃｐ結合アプタマーに類似した配列／構造を有するｐｇＲＮＡにわたって分散している複数の部位が同定され、これはゲノムにわたるＰＳ様部位に対する発明者らの予想と一致している。発明者らは、ＧｅｎＢａｎｋからランダムに選択した１４のＨＢＶ株バリアント、現ＮＣＢＩ　ＨＢＶ参照株（ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓｅｑ　ＩＤ　ＮＣ＿００３９７７．２）に加えて実験室株（ＧｅｎＢａｎｋ　Ｓｅｑ　ＩＤ　ＮＣ＿００３９７７．１）に同じ手順を適用し、これらの株の少なくとも８０％において保存されているそれらのピーク全てを同定した（図２ａ中に緑色のＸで印を付けた）。したがって、これらのゲノム領域はＰＳを包含する可能性がある。最も高い保存（１００％）及びピーク高さを有する３つのピークでは、後者が、何個のアプタマーがこれらの部位と一致したかを示し、これらを図２ａ中でＰＳ１、ＰＳ２及びＰＳ３という名称にする。株間で高い保存を有する９つの部位について、発明者らは、実験室株及び参照ゲノムを含む、３つの代表的な株バリアントのゲノム配列中で５’及び３’からピークヌクレオチドまで３０ｎｔを抽出し、Ｍｆｏｌｄによって負の自由エネルギーを有するそれらの全ての可能な二次構造折り畳みを検討した（方法）。一次及び二次構造の類似性分析によって、プリンリッチループ認識モチーフのＲＧＡＧ（図２ｂ）を共有するステムループの予測した存在が明らかとなった。

【０１１７】

発明者らは、分析した１６のＨＢＶ株にわたってステムループ中におけるこのモチーフの頻度を計算した。全ての株にわたって、ＲＧＡＧモチーフは、ステムループ中に平均で約２５．４回発生する（実験室株中では正確には２５回）。ｐｇＲＮＡの１０，０００のランダム化した型と比較して、実際のゲノム中におけるＲＧＡＧの発生頻度は、平均値を超える４．６８の標準偏差であり（図２ｃ）、機能的役割（複数可）を強く示唆している。

【０１１８】

実施例２

ｐｇＲＮＡオリゴヌクレオチドは、インビトロでＶＬＰ形成を誘導する

ＰＳ１、２及び３オリゴヌクレオチド（図８ａ）を、単一分子蛍光相関分光法（ｓｍＦＣＳ）を使用してＣｐ二量体と結合するそれらの能力について試験した（図３及び図８ｂ）。この技術は、色素標識種の流体力学的半径（R_h）のリアルタイムな推定を行う。重要なことには、反応が低ナノモル濃度で進むことを可能にし、発明者らは、結合特異性が多くのインビトロでの反応と比較してインビボでの状況をより詳細に反映していることを示した。後者は通常、より高い（例えば、０．１～０．８μＭ）濃度で実施され（２０）、その場合、ＰＳ媒介集合の特異性は減少する、または失われる。オリゴ長が異なることに起因する静電効果を回避するために、各ＰＳを４７ｎｔ長断片の一部として作製し、各々をその５’末端で色素標識した（方法（１９））。次いで、標識オリゴ（約１５ｎＭ）を、Ｃｐ量を増加させながら（５～２５０ｎＭ　Ｃｐ二量体）滴定し、R_h値を経時的に記録した（図３ａ）。各添加後、約１０分の一時停止をして反応を平衡化させた。滴定は、データ収集及び平均化において歪みを招き、これはノイズの多いシグナルとしてプロット中で目視できる。２５０ｎＭ　Ｃｐでの平衡化後、ＲＮａｓｅを各反応物に添加し、R_h

値を約１０分間モニターした。これらが急激に低下した場合、生成されたＶＬＰが不完全であったと想定された。試料のネガティブ染色ＥＭ画像をＲＮａｓｅ添加前に取得し、その時点で存在する複合体のサイズも、R_h分布プロットの算出によって評価した（それぞれ図３ｂ及び図８ｃ）。

【０１１９】

ＰＳ断片の各々は、これらの条件下においておおよそ同等な効率でＴ＝３及びＴ＝４の完全なＶＬＰの両方の集合を刺激し（図３ａ及び図３ｂ）、後者は予想通り、優位な産物である（２２）。Ｃｐ＞２５０ｎＭの添加は、得られたR_h値を増加させず、この段階では全てのＲＮＡがＶＬＰ中に組み込まれていることを示唆している。これらの効果が、Ｃｐ－ＰＳ相互作用の直接の結果であるかどうかを評価するために、発明者らは多数の対照法を実施した。色素標識ＰＳ断片は予め形成したＶＬＰに結合せず、それらの存在中でＲＮａｓｅの感度を維持するため（表２）、ＰＳがＶＬＰの集合中に内在化されているだけであることを示唆している。ＲＮＡが集合を誘導するかどうかを決定するために、発明者らは、Ｃｐのみのインキュベーションまたは非標識ＰＳ１の滴定完了後にタンパク質修飾色素を添加することによって、ＰＳ　ＲＮＡが存在する場合と存在しない場合でのＣｐの集合効率を比較した。R_h分布プロットを図３ｂに示す。ＲＮＡの不存在下では、ＲＮＡの存在下におけるＣｐの集合が＞８０％であることとは対照的に、＜５％のＣｐがこれらの条件下で集合する。Ｃｐ－ＰＳ相互作用が、集合効率の増加を誘導すると考えられる。この効果はＣｐの時期で変動し、これは二量体界面での集合阻害ジスルフィドの酸化と一致する（６）。本明細書における比較の記載は、Ｃｐの各バッチによる陽性及び陰性対照実験の両方の結果に基づいている。

【０１２０】

次いで、発明者らは、これらの反応物のＲＮＡ配列特異性を調査した（図９ａ）。試験オリゴは、ＰＳ１のイプシロンステムループに加えてループ及びバルジバリアントを含んでいた。これは、バルジ領域が十分に塩基対合したバリアントを含んでいた。ＰＳ１～３反応と類似したアッセイでは、３つ全てのＲＮＡのR_h値が、ヌクレアーゼ作用に対して感度が高いままであり、これは密閉した殻の集合に特定のＲＮＡ配列／構造が必要となることを示唆している。ＥＭ画像及び分布プロットによって、この解釈が裏付けられる。集合反応の配列感度を、追加のＰＳ１バリアントによってさらに強調する（図９ｂ及び図９ｃ、表３）。それらの集合に対する効果によって、バリアント内のバルジ及び／または配列、ならびにループＲＧＡＧ（ここではＧＧＡＧ）モチーフの重要性が裏付けられる。ＰＳ１配列を包含するＤＮＡオリゴヌクレオチド（図９ｄ）は凝集を誘発し、これは正確な集合が、そのＲＮＡ型におけるＰＳの特異的特性であることを示し、すなわち、Ａヘリックス二本鎖ステムに加えて、ループ中にＣｐ認識モチーフを有することである。

【０１２１】

ＨＢＶ　ＣｐのＣ末端ＡＲＤは、ｐｇＲＮＡとの相互作用を媒介すると考えられ、ＡＲＤを欠いている１～１４９のＣｐ断片は、核酸の不存在下で容易に集合する（２３）。したがって、発明者らは、ｓｍＦＣＳアッセイにおいてCp_{149}がＰＳに応答する能力を評価した。ＲＮＡ依存性集合、またはCp_{149}によるＰＳ結合は、これらの条件下では一切発生しないが（図１０ａ）、ＥＭ画像は切断型Ｃｐが単独で容易に集合することを示し、これはＡＲＤがＲＮＡとの相互作用に不可欠であることを裏付けている。ＡＲＤはインビボで広範囲にリン酸化されるが、原因となる細胞キナーゼは未知のままである（２４）。ＣｐのＣ末端上における正電荷の低下は、ＰＳ　ＲＮＡと結合するその能力を減少させるはずである。発明者らは、Ｃｐをインビトロでリン酸化し（８）（表１）、その特性を試験した。Ｅｍ画像は、ｓｍＦＣＳアッセイにおいて修飾Ｃｐが容易に集合するが、ＰＳ１とは結合しないことを示している（図１０ｂ）。

【０１２２】

実施例３

ＨＢＶ　ＮＣ集合は、配列特異的ＲＮＡコアタンパク質複合体の形成によって誘導される。

ＰＳ１の周囲に集合したＶＬＰを大規模に精製し、それらの構造をクライオＥＭによって決定して、Ｔ＝３及びＴ＝４粒子の二十面体平均化再構成像を得た（図４）。かなりの画分（約２５％）のＴ＝４粒子が、タンパク質殻の直下に位置する非対称的特徴も含有していた。これらの粒子の非対称再構成も算出した（図５）。結果は、非対称的特徴が、ＰＳ１オリゴヌクレオチドと上を覆うＣｐサブユニットのＡＲＤドメインとの複合体を表すことを示唆している。

【０１２３】

この分解能でのＥＭ地図から、複合体中に存在するＰＳオリゴヌクレオチドの数を決定することは不可能である。精製ＶＬＰのＡ$_{２６０／２８０}$比は、Ｔ＝４形態と想定されるＲＮＡ含有量が約５オリゴ／粒子であることを示唆している（２５）。この化学量論に関する追加の推定値を、ＰＳ１　ＶＬＰの光退色実験によって得た（図４、方法）。ＶＬＰは複数の退色ステップを示し、これは各殻内に複数のオリゴが存在することを裏付けている。オリゴの標識効率を考慮すると、データは２～４オリゴ／ＶＬＰと一致する。発明者らはＰＳ１の３Ｄモデルを構築し、ＥＭ地図内に手作業でそれを配置した（図４ｆ、方法）。非対称密集の相対体積及びＰＳ１オリゴのサイズから、少なくとも２つのＰＳコピーが密集内に存在すると考えられる。発明者らは、他のＲＮＡ分子が他の箇所のタンパク質殻に結合するが、整然としたＲＮＡ密集に対する移動性または不規則な位置ゆえに不可視である可能性を除外できない。生化学的及び構造的データは、集合開始複合体である非対称構造と一致し、その場合、ＲＮＡの好ましい部位（複数可）がＴ＝４ＮＣの形成中に最高に達する集合を開始した。

【０１２４】

クライオＥＭデータは、ＨＢＶ生物学に対してさらなる洞察を示唆する。集合反応または野生型ウイルス感染のいずれかからの、少数のＨＢＶ粒子はＴ＝３準対称性で集合し、両方の種類の粒子が発明者らのクライオＥＭデータ中で目視できる。２Ｄ及び３Ｄ分類を使用すると、Ｔ＝３（約１１％）及びＴ＝４（８９％）粒子が容易に分離可能である。図４は、課された二十面体対称性を有する、それぞれ５．６Å及び４．７Åでの、２つの粒子の３Ｄ再構成像を示す。２つのＶＬＰ構造が含有するＣｐ二量体のサイズ及び数の明らかな差に加えて、Ｔ＝４及びＴ＝３地図は、それらの内部表面上で目視できる特徴、ＡＲＤが位置する箇所及びＲＮＡ結合が生じる箇所が異なっている。準化学量論的占有ＶＬＰの二十面体平均化地図について予想していた通り、両方の構造は、ＲＮＡに起因する密集を本質的に欠いている。しかしながら、Ｔ＝４構造のカプシド殻は、Ｔ＝３等価物よりも目に見えて薄く、Ｔ＝３地図のさらに詳しい検査によって、ＡＲＤの整然としたセグメントに対応する追加の密集が目視でき（図４）、これはＴ＝４構造中には存在しない（図４ｃ及び図４ｄ）ことを示唆している。この差は、Ｔ＝４地図にＴ＝３と同様の分解能にするためにフーリエフィルター処理を行う場合も持続する（図１１）。このことは、ＡＲＤを含むＣｐのＣ末端領域が、カプシド形状の決定に役割（複数可）を果たすことを示した先行研究（２２、２６）と一致する。

【０１２５】

実施例４

個々のＰＳ部位の配列特異的認識

ＳＴＮＶ系中に配列特異的ＲＮＡ－ＣＰ認識の複数の結果が存在する（図１２）。ＰＳ３（またはＢ３）のみを包含するオリゴヌクレオチド中へのＣＰの滴定は、最初に三量体カプソメア（Ｒｈ約５ｎｍ）の形成をもたらし、続いてＣＰ濃度が徐々に上昇するにつれてＴ＝１ＶＬＰ（Ｒｈ約１１．３ｎｍ）の形成をもたらす。滴定の最後におけるｓｍＦＣＳデータのＲｈ分布プロットは、形成したＶＬＰが均一であることを示唆しているが、電子顕微鏡画像（ＥＭ）及びＲＮａｓｅ負荷アッセイは、それらが完全タンパク質殻で構成されていることを示唆している。－Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ｕ－のループ配列を有するＰＳ３／Ｂ３バリアントを用いた同様の滴定は、ＣＰがそのようなＳＬと結合するが、形成した複合体は集合してＶＬＰとなることができないことを示した（１９）。ＰＳ１～５を包含する天然１２７－ｍｅｒは、より複雑な挙動を示す。低ＣＰ濃度の添加は、そのＲｈの約２０～

３０％の急落を誘導し、これは全長ゲノムに見られる挙動を模倣している（２７）。それに続くＣＰ添加は、ＰＳ３単独の周囲で形成したＶＬＰと同じ特性を有するＴ＝１ＶＬＰへの協同的変換をもたらす。この断片内のＰＳ配列バリアントは、－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－がＣＰ認識モチーフであり、その存在がＰＳ３中でのみ絶対的に必要であることを裏付けているが、バリアントは、もはや野生型の協同性で集合することはない（１９）。ＳＴＮＶ－１　ＣＰ単独では、これらの条件下において１５μＭ未満で凝集する傾向は一切ないことを示し、それゆえここで示す滴定における全てがＲＮＡ－ＣＰ結合の結果である。

【０１２６】

これらの結果は、集合に対するＣＰによるＰＳ３認識の重要性を強調する。その認識の重要な特徴を同定するために、発明者らは、ＰＳ３ステムを有するバリアントループ配列を包含する一連のＳＬを作製した（図１７及び表４）。バリアントは、ＰＳ３の野生型－Ｃ．Ａ－と比較して「内側」の２つの位置（－Ｃ．Ｃ－、－Ａ．Ａ－、－Ｇ．Ｇ－、－Ｇ．Ｕ－及び－Ｕ．Ｇ－）のヌクレオチドを変化させた。「外側」バリアント（－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ａ－、－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ｇ－、－Ｇ．Ｕ．Ｕ．Ａ－、－Ｇ．Ｕ．Ｕ．Ｇ－、－Ｇ．Ｕ．Ｕ．Ｕ－、－Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ｇ－、－Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ａ－及び－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ｕ－）は、両方の内側ヌクレオチドがウリジンに変化していて、これらも試験した。発明者らの予想では、中央の位置には塩基特異性が一切存在しない場合がある一方で、アデニンがテトラループの最初及び最後の位置に好ましい場合があった。発明者らは、Ｔ＝１殻及び三量体カプソメアの両方の集合を支持するそれらの能力を検査した。試験ＲＮＡ及びＣＰを、約５μＭ濃度で再集合緩衝液中において混合し、その結果を速度沈降法によって、かつＥＭ画像中でアッセイした。これらの条件下で、内側ヌクレオチドバリアントは、ＰＳ３とほぼ同様の効率を有するＴ＝１カプシドを形成し、これはそれらの識別がＣＰ認識モチーフの一部ではないことを裏付けている（図１３Ａ／Ｂ及び図１７）。外側ヌクレオチドバリアントは異なる挙動を示し、－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ｕ－、－Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ａ－及び－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ａ－バリアントのみが、ＰＳ３と同様の位置にピークを有していて、これは外側アデニンがＣＰ認識モチーフの一部であることを裏付けた。

【０１２７】

ＣＰ親和性についてそれらの相対的重要性を検査するために、発明者らは、ｓｍＦＣＳアッセイを適合させた（図１３Ｂ）。標識Ｂ３をＣＰと滴定し、三量体を形成させてＲｈ値によって判断し、次いで１００倍モル過剰の各配列バリアントを添加してＢ３と競合した。Ｂ３と同様の親和性で結合しないバリアントは、標識ＲＮＡの置き換えができず、これに対してＢ３及び他のバリアントは、ＣＰを含まないＲＮＡのＲｈを回復させる標識種に勝る。結果（図１３Ｄ）は、この負荷後のＲｈ変化パーセンテージを示し、バリアントＲＮＡが競合する能力に幅広い変動があることを明らかにしている。グアニン置換を有するそれらの全て、及び－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ｕ－バリアントは競合できない。－Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ａ－バリアントの優れた性能は、３’ＡがＣＰ認識に最も重要であること、または隣接するステムの最上部のＡ－Ｕ塩基対が壊れることのいずれかを示唆し、Ｂ３モチーフの－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ｕ．Ａ．Ｕ－バリアントがＣＰによって依然として認識されることを提示している。いずれにしても、－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－は全てのバリアントよりも優れていて、－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－のテトラループモチーフを持つＳＬが、ＶＬＰへの集合に最適なＣＰ認識モチーフを包含することを示唆している。

【０１２８】

実施例５：ＶＬＰ集合における静電気学及びＰＳ協同性の役割

ＰＳ媒介集合は、純粋には静電的誘導反応を行わないウイルスゲノムパッケージングの特徴を説明するが、カプシド封入を誘導するための自由エネルギーの一部供給において電荷中和の有益な効果が明らかに存在する。したがって、発明者らは、一連の電荷変化ＣＰバリアントを使用して、ＳＴＮＶ集合に対するこれらの効果の重要性を検査した。ＣＰのＮ末端アームにおける３つの正荷電残基Ｒ８、Ｒ１４及びＫ１７（図１２）の変異を、ＫまたはＲの代わりにＡまたはＤを用いて作製した。Ｒ１４及びＫ１７は三次元中で隣接しているため、それらのバリアントを二重変異体、すなわち、Ｒ１４Ａ／Ｋ１７Ａ及びＲ１

４Ｄ／Ｋ１７Ｄとして作製した。変異型ＣＰは正常に発現する（図１８）が、両方の二重変異体は、これらの条件下においてＥ．ｃｏｌｉ中で有意に集合できない。Ｅ．ｃｏｌｉから得られたＶＬＰは、宿主細胞ＲＮＡに加えてウイルスＣＰをコードする組換えｍＲＮＡを含有するため、この結果は、Ｒ１４及びＫ１７が集合において重要な役割を果たすことを示唆している。

【０１２９】

全てのバリアントタンパク質を、単一ＰＳ（Ｂ３）または１２７－ｍｅｒ断片のいずれかを包含するＲＮＡオリゴと結合するそれらの能力について検査した（図１４及び図１９）。二重変異体のいずれも、これらの条件下ではどちらのＲＮＡとも結合しなかった。Ｒ８ＡはＢ３周囲に集合するが、そうなるにはかなり高い（＞１０倍）ＣＰ濃度が必要であり、このことはＲＮＡに対して低下した親和性を有するＲ８Ａと一致する。１μＭ　ＣＰでは、Ｒ８ＡはＲＮａｓｅ負荷に抵抗性があるＴ＝１殻を形成する。Ｒ８Ｄバリアントは正電荷の重要性を裏付け、より高濃度であっても任意の安定した高次種を形成できず、ＲＮＡはＲＮａｓｅ消化に到達可能なままである。この有利な静電相互作用への依存は、Ｒ８Ｄを１２７－ｍｅｒに対して滴定する場合も維持する（図１４Ａ）。しかしながら、このＲＮＡを有するＲ８Ａ及び野生型ＣＰの両方とも、初期のＲｈ低下を含む非常に類似した結合曲線を示す。複数のＰＳ部位でＣＰ結合から生じる協同性は、減少した静電引力の固有のＲＮＡ－ＣＰ親和性に対する有害効果を克服すると考えられる。発明者らが、Ｎ末端アーム上で変化した電荷（複数可）は、リガンド非結合ＣＰコンフォメーションを大幅に変化させることはないと想定する場合、これらの効果によって、集合のＲＮＡ配列特異的誘導中における静電相互作用の役割（複数可）が調査される。その効果は、電荷中和が、より長い天然ＲＮＡ断片上での集合の絶対条件ではないことを示唆し、これはＰＳ媒介集合機構と一致するが、静電集合機構とは一致しない。

【０１３０】

ＰＳが集合的に作用するプロセスについて予想した通り、複数のＲＮＡ　ＰＳの協同性が静電引力の減少を克服し得ることを考慮し、次いで発明者らは、何個のＰＳが協同的集合の生成に必要となるかを検査した。ＰＳ３での認識の重要性及び５つのＰＳを含有する断片に見られる効果を考慮して、各々がＰＳ３を含有する１２７－ｍｅｒの３つの小断片を試験した（図１４Ｂ及び図２０）。これらは、ＰＳ１～ＰＳ３（ｎｔ１～７６）、ＰＳ２～ＰＳ４（ｎｔ３８～１０４）及びＰＳ３～ＰＳ５（ｎｔ６６～１２７）であり、各々はＰＳ３でＣＰと結合できるが、ＰＳ３の２つの５’または３’から、各隣の丁度１つまでの隣接部位数が異なる可能性がある。中央に位置するＰＳ３を有する断片だけが、ＲＮａｓｅ抵抗性のＴ＝１殻を集合させるが、それは急落を示さず、全体的な収率は１２７－ｍｅｒよりも低い。他方の断片は、最終的に自然に分解する非特異的凝集体を形成すると考えられる。

【０１３１】

これらの結果の解釈は、重要である。ＰＳ２～４断片（６６ｎｔ）が、ＰＳ１～３（７６ｎｔ）よりも短く、かつＰＳ３～５よりも１ｎｔだけ短いため、効果は明らかに純粋に静電気によるものでは一切ない。反応の特異性を理解するために、発明者らは、ＰＳ包含部位の各々の折り畳み傾向について検討する必要がある。示した１２７－ｍｅｒの二次構造（図１５）は、その折り畳みに、存在する－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－ループモチーフを有する最大数のＳＬを取り込ませることによって到達した。この断片では、ＰＳ１及びＰＳ３のみが、単離時に有利な折り畳み自由エネルギーを有すると予想される（Ｍｆｏｌｄ、（１０））。これは発明者らの先のｓｍＦＣＳアッセイと一致していて、その場合、各ＰＳ内のＣＰ認識モチーフの変化及びその近隣を含むＰＳ３の相対的間隔の変動が、著しく異なる集合挙動をもたらした（２８）。発明者らは、これらのＲＮＡ分子が、異なるコンフォメーションの集合として溶液中に存在すると予想する。ＳＴＮＶ　ＣＰとの相互作用は、ＰＳが存在する単一またはいくつかの集合能力のあるコンフォメーションを優先的に選択し、この平衡を排除することになる。したがって、発明者らが確認する集合効率は、集合中におけるそのような配座異性体の集団に直接関連し、それゆえ、このコンフォメーショ

ンを課す自由エネルギーコストに関連する可能性がある。構造アンサンブルの程度を評価することは困難であるが、別構造の可能性の感覚を、通常のデフォルトパラメータを変更することによってＭｆｏｌｄから得て、最小自由エネルギーの折り畳みから５００パーセント以内の準最適折り畳みの全体（準最適性＝５００）を調査することができる。

【０１３２】

そのような構造を３つのＰＳ含有断片について検査する場合、それらの集合能力についての可能な説明が現れる。ＰＳ１～３について、優位な折り畳みはＰＳ１を包含し、少数がＰＳ３も含有している（表５）。原則として、その少数の配座異性体が集合を促進し得るが、ＰＳ１とＰＳ３との間の重要な間隔は、複数のＰＳの協同的効果を促進するには大きすぎる。ＰＳ２～４の同様の分析は、優位な二次構造が、１２７－ｍｅｒについて予想したＰＳ折り畳みのいずれも含有しないことを示唆している。しかしながら、その予想した二次構造は、ほぼ必ず存在する２つの別のＳＬを含有し、そのうち１つは－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－配列を提示する（図２２）。それらの相対的間隔（４ｎｔ）は、協同的効果を確認するのに十分なほど短い。ＰＳ３～５断片は、互いに１０～１２ｎｔ以内で２つのＳＬを形成し、１つはＰＳ５として－Ａ．Ｘ．Ｘ．Ａ－モチーフを提示する。これは、集合能力のある構造を示唆することになる。しかしながら、可能な構造の全体において、このＳＬは可能性のある折り畳みの６％にしか存在せず（表５）、これが集合挙動の原因となる可能性がある（図１４Ｂ）。

【０１３３】

３つのＰＳを包含する断片について上に記載したコンフォメーションスクランブリング挙動は、１２７－ｍｅｒ以内の配列が、３’ＵＴＲの配列を有する翻訳エンハンサーの形成に関与することが知られている（２９）というインビボでの事象を恐らく反映する。その複合体は、集合能力のある配座異性体中には存在することができない。そのような二次構造折り畳み傾向の効果をさらに調査するために、発明者らは、人工ＰＳ含有配列の設計を始めた。

【０１３４】

実施例６：非ウイルス基質の集合

効率的な集合基質の必要条件を調べるために、発明者らは、野生型１２７ｍｅｒ（ＰＳ１～５）の外観を模倣する合成カセットを作製し、その場合、天然ウイルス配列の大部分が置換されている（～７７％）。単純な塩基置換スキーム、例えば、ＣＰ認識モチーフ以外の領域において全てのＡをＵに、ＣをＧに、ＧをＣに及びＵをＡに交換するスキームを使用して、これらの配列を作製する試みは全て、不安定な二次構造をもたらした。したがって、発明者らは、Ｇ－Ｃへの塩基対の変換、既存のＧ－Ｃ対の反転、または追加の塩基対を付加することによって既存のＳＬを修飾することを選択し、次いで、それらが野生型１２７－ｍｅｒ中のそれらと類似した二次構造に折り畳まれる可能性があるかを確認する。次いで、これらのＳＬに結合する天然ウイルス配列を、折り畳みが１つだけ最も可能性が高くなるまでＡ及びＧのストリングで置き換えた（図１８及び図２３）。塩基対合ステムの相対的分離を、野生型１２７－ｍｅｒのそれらと同一であるように維持した。これらの変化の結果として、ＰＳ１、２、４、及び５は、野生型１２７ｍｅｒと比較して安定化されていて、全てのＳＬが有利な折り畳み傾向を有した（図２３）。

【０１３５】

優位なＰＳ３部位の折り畳み傾向の重要性を評価するために、発明者らは、以下の合成型も作製した：１）不安定ＰＳ１～５、これは中央ＰＳであるＰＳ３の折り畳み自由エネルギーが正である（０．３対－２．６ｋｃａｌ／ｍｏｌ）、すなわち、ＰＳ３が自然に折り畳まれる可能性がないという設定、２）安定ＰＳ１～５、これは中央ＰＳの折り畳み自由エネルギーがより負である（－３．５対１２７－ｍｅｒの－２．６ｋｃａｌ／ｍｏｌ）、すなわち、ＰＳ３がより安定している場合、３）全てＰＳ３、これは５つ全てのＰＳがＰＳ３を模倣し、ＰＳ全てのステムが同じ長さ（７ｂｐ）まで伸長し、全てのＣＰ認識モチーフが野生型ＰＳ３のモチーフと同一である、ならびに４）合成安定化ＰＳ１～５、これは安定ＰＳ１～５の人工ＰＳ１、２、４及び５、ならびに全てＰＳ３構築物からのＰＳ

３の人工伸長ステムループを含有する。後者は、野生型１２７－ｍｅｒ及び安定ＰＳ１～５の両方のＰＳ３に対して超安定化されている（それぞれ－７．６対－２．６または－３．５ｋｃａｌ／ｍｏｌ）。

【０１３６】

実施例７

これらの試験バリアントオリゴヌクレオチドの挙動を比較するために、発明者らは、それらの可能な二次構造を調べた。表５は、Ｍｆｏｌｄの準最適性の特徴を使用して作成したアンサンブルにおける各ＰＳの発生頻度と共に、それらの相対的間隔を一覧にしている。加えて、発明者らは、それらの円偏光二色性（ＣＤ）スペクトルを比較した。ＣＤは、塩基対合残基及び／または三次構造のパーセンテージに比例する物理的シグナル（３０）、すなわち、２６０ｎｍでのモル楕円率を提供する。カルシウムイオンを含有する緩衝液中で測定を行ったが、その理由とはそれらが再集合緩衝液中に必要であり、ＳＴＮＶカプシド内にいくつかのＣａ２＋結合部位が存在するからである（３８、３９）。再集合緩衝液中の濃度を最大２ｍＭカルシウムまでとした試験ＲＮＡの滴定は、予想した通り、２６０ｎｍ楕円率の緩やかな増加（９～１７％）をもたらす（図２４Ａ）。唯一の例外は不安定ＰＳ１～５であり、これはカチオンの存在に応答しない。この緩衝液中における試験ＲＮＡ全てのモル楕円率値が、温度を用いて予想した通り低下している（図２４Ｂ）。ＲＮＡ全てが２６０ｎｍで異なるＣＤ楕円率を有し、これはＲＮＡ構造アンサンブル比較の複雑さを例示している。不安定ＰＳ１～５試料は、温度範囲全体にわたってほとんど構築されていない。おそらく驚くべきことに、見かけのＭｆｏｌｄ構造を考慮すると、より低温では野生型１２７－ｍｅｒが最も多くの構造量を有する。試験した最高温度では、不安定ＰＳ１～５を除く全てのＲＮＡがおおよそ同様の楕円率値を有していて、それらが同様の変性レベルに到達していたことを示唆している。

【０１３７】

これらの合成バリアントの全ては、Ｔ＝１カプシドの集合を誘導し、ヌクレアーゼによる負荷からカプシド封入ＲＮＡを保護できるが、非常に異なるＣＰ濃度に依存している。不安定ＰＳ１～５を除く全てが、１２７－ｍｅｒと同様のＲｈの初期低下を示す（図１５Ｂ）。不安定ＰＳ１～５の集合挙動はＰＳ３単独の挙動に類似し、これは協同性を喪失していることを示唆していて、その分布プロット及びＥＭ画像の様子（図２４）は、それが効率的なカプシド形成を調節する能力も喪失していることを示唆している。対照的に、中央ＰＳの折り畳み傾向の重要性を、安定ＰＳ１～５の挙動によって例示する。折り畳み全体の潜在的な問題にもかかわらず、安定ＰＳ１～５は１２７－ｍｅｒと類似した急落及び野生型断片と類似したＲｈ分布を有するＴ＝１粒子への協同的集合を示す。安定ＰＳ１～５は、野生型１２７－ｍｅｒよりも低いＣＰ濃度でＶＬＰへと集合する、すなわち、これらの条件下においてそれは良好な集合基質である。驚いたことに、全てＰＳ３も、それが１２７－ｍｅｒに見られるものよりも長いＰＳを包含するにもかかわらず、野生型よりも効率的に集合し、これは認識モチーフが提示されているＰＳ二次構造の状況に若干の余地があることを示唆している。これは、以前に観察された（１９）ＰＳ３周囲のＰＳ間隔の重要な依存度を考慮すると少し驚くべきことである。全てＰＳ３バリアントの集合効率及び折り畳み傾向にもかかわらず、合成安定化ＰＳ１～５が圧倒的に最適な集合基質であり、最も効率的にＶＬＰへと集合する（すなわち、それは１００ｎＭ　ＣＰ滴定点後により迅速に集合する）（図１５Ｂ）。

【０１３８】

実施例８

これらの結果は、ウイルスゲノムＲＮＡ断片から重要な集合の特徴を抽出することが可能であることを示唆している。合成断片中におけるステム長さ及びループサイズの変更を考慮すると、改善したＰＳ折り畳み傾向を有する鋳型の操作には多大な余地があるとも考えられることになる。

【０１３９】

ゲノム規模のＲＮＡに対する重要な集合の特徴の導入

これらの実験が、不可欠な集合の特徴を同定するのに成功しているかどうかの試験として、発明者らは、この改善したＲＮＡ「カセット」を含むことで、天然ＲＮＡの集合効率がどの程度変化するのかを検査した。そのＲＮＡは、本来的には少量のＳＴＮＶビリオン中へと集合できなければならない。１２８～１２３９ｎｔのＳＴＮＶ－１　ＲＮＡからのゲノム断片は、明らかに試験断片である。したがって、発明者らは２つのゲノムキメラ：１２４２ｎｔ長の［不安定ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１］及び１２４８ｎｔ長の［合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１］を構築し、野生型ＳＴＮＶ－１ＲＮＡに対するそれらのインビトロでの集合効率を比較した（図１６Ａ）。これらのアッセイでは３つ全ての挙動が異なり、これは５’１２７－ｍｅｒの配列及び構造が、その１０倍を超えるサイズの断片の集合経路を調節することを示唆している。野生型ゲノムは、予想したＲｈの初期急落（約７．５ｎｍまで）を示し、続いてＲｈのわずかな上昇を示して、これはＴ＝１粒子の形成と一致している（図１６Ｂ）。図１６Ａのデータをｃｐ滴定のために、先に記載されている（１２）ＣＰ全体の単一ステップ添加と比較することに留意する。対照的に、不安定ＰＳ１～５リーダー配列は、Ｒｈの大きな初期急落（約５ｎｍまで、６５％）をもたらし、続いてほんのわずかに上昇し、これはＶＬＰが効率的に形成されていないことを示唆している。実際に、この種のＲＮＡは、ＲＮａｓｅ分解の影響を受けやすいままであり、ＲＮＡが完全にカプシド封入されていないことを示唆している。合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１は、おおよそ同じ初期のＣＰを含まないＲｈを有するが、急落及び回復ではなく、ＶＬＰ形成と一致する値まで単純に縮小すると考えられる。集合産物のＲｈ分布及びＥＭ画像は、この解釈と一致する。合成安定化ＰＳ１～５＋Δ１～１２７ＳＴＮＶ－１　ＶＬＰの記録は他方の試料よりもノイズが少なく、Ｅ．ｃｏｌｉから単離した本物のＶＬＰのＲｈサイズとより密接に一致するＲｈサイズの分布を有することは、注目に値する。これらの結果に関する解釈の確認を、ゲル濾過カラムからの溶出後、産物の準弾性光散乱（ＱＥＬＳ）によって提供する（図２５）。

【０１４０】

実施例９

発明者らは、ＲＮＡ　ＰＳ媒介ウイルス集合に固有の２種類のコード、すなわち、ゲノムＲＮＡが遺伝情報に加えて効率的カプシド集合の指示を同時にコードすることであり、それらが分離可能であることを示した。重要な疑問とは、なぜコードはウイルス進化の過程において、特にｓｓＲＮＡウイルスの複製がゲノムバリアントの準種の生成を招くエラーを起こしやすいプロセスによって発生する場合に、分離しないのかということである。現在、ＲＮＡ　ＰＳ媒介ウイルス集合を使用する３つのウイルス例が存在し、発明者らは、この疑問に対して部分的に答える構造情報を有する。バクテリオファージＭＳ２（３１）、ヒトパレコウイルス－１（３２）及びＳＴＮＶ（１９）では、ゲノム中のＰＳ部位のうち少なくとも１つが、ＰＳ結合部位の一部を形成するアミノ酸残基もコードする。両コードのこの密接な埋込みによって、ＰＳ媒介集合が持続する子孫ＲＮＡの集合のみを有利にするという結果がもたらされる。同様に、そのようなＲＮＡ内でコードされる機能の密集が周知である。ＳＴＮＶゲノムの天然５’１２７－ｍｅｒも、３’末端配列と接触する不可欠な転写／翻訳エンハンサーを形成する。その構造及び集合が相互に機能を排除するため、天然配列は、ウイルスの生活環が効率的に進行し得るようにそれらが形成される傾向を調整するように進化している。

【０１４１】

ここで注目するのは、野生型ウイルスＲＮＡ配列から放出される集合コードの特性である。実際に、その天然状況におけるＳＴＮＶ集合配列の各側面を続けて調べることによって、発明者らは、合成非ウイルスＲＮＡを使用してＳＴＮＶ　ＣＰのインビトロ集合の誘導におけるその効果を再現することができた。さらなる精度向上によって、発明者らは、野生型ＳＴＮＶ１２７－ｍｅｒよりも効率が悪いまたは効率の良い、いずれかの配列を作製することが可能になる。これらの結果は、ＳＴＮＶのＰＳ媒介集合の性質を裏付ける。インビトロでの集合は、ＰＳ３ステムループのＣＰサブユニットによる認識によって１２７－ｍｅｒ内で開始される。高次ＣＰ結合は、隣接するＰＳ（ＰＳ２及び４）の正確な配

置及び折り畳みに依存し、各々がループ中にコンセンサスＣＰ認識モチーフを提示している。１２７－ｍｅｒは、ＲＮＡの流体力学的半径に急落をもたらすが、カプシド封入に必要な前駆体であるタンパク質の濃度に対して、初期の結合を協同的にさせる５つのＰＳを包含する可能性がある。静電相互作用は、これらのタンパク質－ＲＮＡ接触に寄与するが、主な駆動力ではなく、これはむしろＰＳのステム及びループ領域と、タンパク質カプシドの内表面との高親和性配列特異的相互作用である。その最小配列の含有量にもかかわらず、－Ａ．Ｕ．Ｕ．Ａ－配列がＣＰによって低ナノモル濃度親和性で結合する。驚いたことに、合成バリアント１２７－ｍｅｒを天然ＳＴＮＶ－１ゲノムの残部上に移植することで、その集合特性が、先頭の約１０％のＲＮＡによって支配されるキメラがもたらされる。

【０１４２】

以前に、Ｗｉｌｓｏｎ及び同僚らは、彼らが、タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）集合開始部位を包含するＲＮＡキメラを作製することによって、ＴＭＶ ＣＰのロッドに向けて非ウイルスＲＮＡを集合させ得ることを示した（３３、３４）。これは成功し、既知の集合機構から予想した通り（３５）、形成したタンパク質コーティングロッドの長さを、パッケージングされたＲＮＡの長さによって決定した。このアプローチは、球状のｓｓＲＮＡウイルスに適用した場合はあまり成功せず（３６）、最も親和性の高いＭＳ２ ＰＳは、短鎖ＲＮＡのインビトロカプシド封入に対してプラスの効果を有するが、長鎖ＲＮＡにはあまり重要ではなかった（３７）。これらの実験全てをマイクロモル濃度で実施したが、その場合、ＰＳ媒介集合の効果を失うことに留意する（３１、３７）。上に記載した結果は、ウイルスＣＰの殻中における特注の非ウイルスＲＮＡのカプシド封入に関する効率的な経路を示唆している。インビトロ集合は、多数のＣＰ－ＲＮＡの組合せにとって可能な場合もあるが、それはインビボ集合とは異なり、多くのウイルスでは、ウイルスポリメラーゼ複合体から生じる新生ゲノム転写物のみが、子孫ビリオン中にパッケージングされることを示唆する適切な証拠が存在する。そのような反応では、ＲＮＡは動力学的に折り畳まれる可能性が大いにあり、本明細書に記載したものなどのインビトロ反応におけるＲＮＡ構造アンサンブルを含む問題のいくつかを回避する。

【０１４３】

ウイルス及びウイルス様粒子は、遺伝子治療または薬物送達ベクターとしての、それに加えて非複製合成ワクチンとして作用する潜在的な医療用途の増加を見出している。ウイルスタンパク質殻も、ナノテクノロジー用途の関心対象である。本明細書に記載した結果は、高い効率を有し、かつ有利な特性を有する非ウイルスＲＮＡを持つ可能性のあるそのような構造を作製する方法に重要な洞察を提供する。このことは、デザイナー合成ビリオンの作製に不可欠なことになる。

【０１４４】

参考文献

１．Ｙｕ Ｘ，Ｊｉｎ Ｌ，Ｊｉｈ Ｊ，Ｓｈｉｈ Ｃ，Ｚｈｏｕ ＺＨ（２０１３）３．５Å ｃｒｙｏＥＭ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒｕｓ ｃｏｒｅ ａｓｓｅｍｂｌｅｄ ｆｒｏｍ ｆｕｌｌ－ｌｅｎｇｔｈ ｃｏｒｅ ｐｒｏｔｅｉｎ．ＰＬＯＳ ＯＮＥ ８（９）：ｅ６９７２９．

２．Ｄａｒｔｙ Ｋ，Ｄｅｎｉｓｅ Ａ，Ｐｏｎｔｙ Ｙ（２００９）ＶＡＲＮＡ：Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｖｅ ｄｒａｗｉｎｇ ａｎｄ ｅｄｉｔｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ＲＮＡ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ．Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ２５（１５）：１９７４－１９７５．

３．Ｐｏｒｔｅｒｆｉｅｌｄ ＪＺ，ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｆｕｌｌ－ｌｅｎｇｔｈ ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒｕｓ ｃｏｒｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｐａｃｋａｇｅｓ ｖｉｒａｌ ａｎｄ ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ＲＮＡ ｗｉｔｈ ｓｉｍｉｌａｒｌｙ ｈｉｇｈ ｌｅｖｅｌｓ ｏｆ ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｉｔｙ．Ｊ Ｖｉｒｏｌ ８４（１４）：７１７４－７１８４．

４．Ｌａｋｏｗｉｃｚ ＪＲ ｅｄ．（２００６）Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ Ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ ＵＳ，Ｂｏｓｔｏｎ

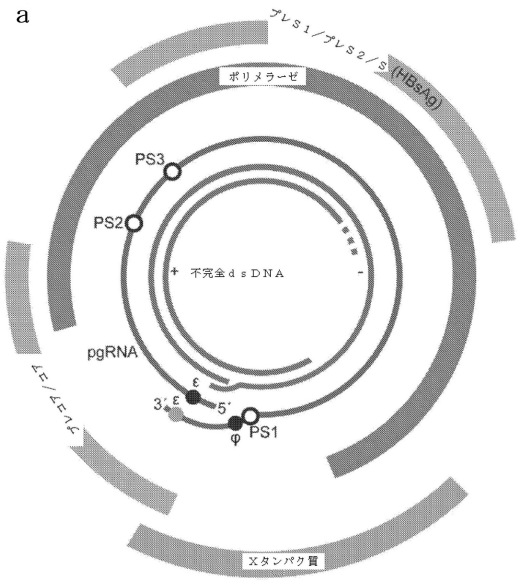
, MA).
5. Holmes K, et al. (2015) Assembly Pathway of Hepatitis B Core Virus-like Particles from Genetically Fused Dimers. Journal of Biological Chemistry 290(26):16238-16245.
6. Selzer L, Katen SP, Zlotnick A (2014) The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. Biochemistry 53(34):5496-5504.
7. A Zlotnick, et al. (1996) Dimorphism of Hepatitis B Virus Capsids Is Strongly Influenced by the C-Terminus of the Capsid Protein. Biochemistry 35(23):7412-7421.
8. Aubol BE, et al. (2003) Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(22):12601-12606.
9. Bunka DHJ, et al. (2011) Degenerate RNA packaging signals in the genome of Satellite Tobacco Necrosis Virus: implications for the assembly of a T=1 capsid. J Mol Biol 413(1):51-65.
10. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 31(13):3406-3415.
11. Podjarny A, Dejaegere AP, Kieffer B eds. (2011) Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling (Royal Society of Chemistry, Cambridge) Available at: http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781849732666.
12. Sharma A, et al. (2014) Domain movements of the enhancer-dependent sigma factor drive DNA delivery into the RNA polymerase active site: insights from single molecule studies. Nucleic Acids Res 42(8):5177-5190.
13. Li X, et al. (2013) Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. Nature Methods 10(6):584-590.
14. Rohou A, Grigorieff N (2015) CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. Journal of structural biology 192(2):216-221.
15. Scheres SHW (2015) Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. Journal of structural biology 189(2):114-122.

16. Popenda M, et al. (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs. Nucleic Acids Res 40 (14) : e112-e112.
17. Pettersen EF, et al. (2004) UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry 25 (13) : 1605-1612.
18. Lane SW, et al. (2011) Construction and crystal structure of recombinant STNV capsids. J Mol Biol 413 (1) : 41-50.
19. Patel N, et al. (2015) Revealing the density of encoded functions in a viral RNA. Proc Natl Acad Sci USA 112 (7) : 2227-2232.
20. Porterfield JZ, et al. (2010) Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. J Virol 84 (14) : 7174-7184.
21. Wang JC-Y, Nickens DG, Lentz TB, Loeb DD, Zlotnick A (2014) Encapsidated hepatitis B virus reverse transcriptase is poised on an ordered RNA lattice. Proc Natl Acad Sci USA 111 (31) : 11329-11334.
22. A Zlotnick, et al. (1996) Dimorphism of Hepatitis B Virus Capsids Is Strongly Influenced by the C-Terminus of the Capsid Protein. Biochemistry 35 (23) : 7412-7421.
23. Birnbaum F, Nassal M (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly : primary structure requirements in the core protein. J Virol 64 (7) : 3319-3330.
24. Ludgate L, et al. (2012) Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates s/t-p sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. J Virol 86 (22) : 12237-12250.
25. Porterfield JZ, Zlotnick A (2010) A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. Virology 407 (2) : 281-288.
26. Watts NR, et al. (2002) The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. EMBO Journal 21 (5) : 876-884.
27. Borodavka A, Tuma R, Stockley PG (2012) Evidence that viral RNAs have evolved for efficient, two-stage packaging. Proc Natl Acad Sci USA 109 (39) : 15769-15774.
28. Dykeman EC, Stockley PG, Twarock R (2014) Solving a Levinthal's paradox for virus a

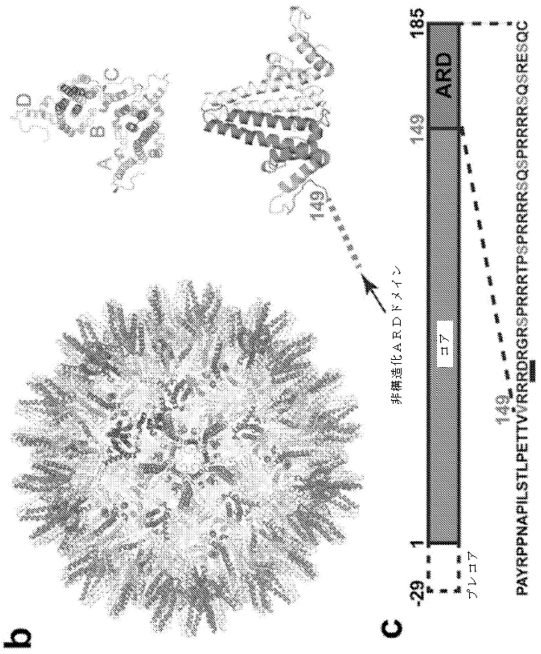
ssembly identifies a unique antiviral strategy. Proc Natl Acad Sci USA 111(14):5361-5366.
29. Kaempfer R, van Emmelo J, Fiers W (1981) Specific binding of eukaryotic initiation factor 2 to satellite tobacco necrosis virus RNA at a 5'-terminal sequence comprising the ribosome binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences 78(3):1542-1546.
30. Sosnick TR, Fang X, Shelton VM (2000) Application of circular dichroism to study RNA folding transitions. Meth Enzymol 317:393-409.
31. Beckett D, Uhlenbeck OC (1988) Ribonucleoprotein complexes of R17 coat protein and a translational operator analog. J Mol Biol 204(4):927-938.
32. Shakeel S, et al. (2017) Genomic RNA folding mediates assembly of human parechovirus. Nat Commun 8(1):5.
33. Sleat DE, Turner PC, Finch JT, Butler PJ, Wilson TM (1986) Packaging of recombinant RNA molecules into pseudovirus particles directed by the origin-of-assembly sequence from tobacco mosaic virus RNA. Virology 155(2):299-308.
34. Gallie DR, Plaskitt KA, Wilson TM (1987) The effect of multiple dispersed copies of the origin-of-assembly sequence from TMV RNA on the morphology of pseudovirus particles assembled in vitro. Virology 158(2):473-476.
35. Caspar DL, Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 27:1-24.
36. Qu F, Morris TJ (1997) Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. J Virol 71(2):1428-1435.
37. Beckett D, Wu HN, Uhlenbeck OC (1988) Roles of operator and non-operator RNA sequences in bacteriophage R17 capsid assembly. J Mol Biol 204(4):939-947.

【図面】

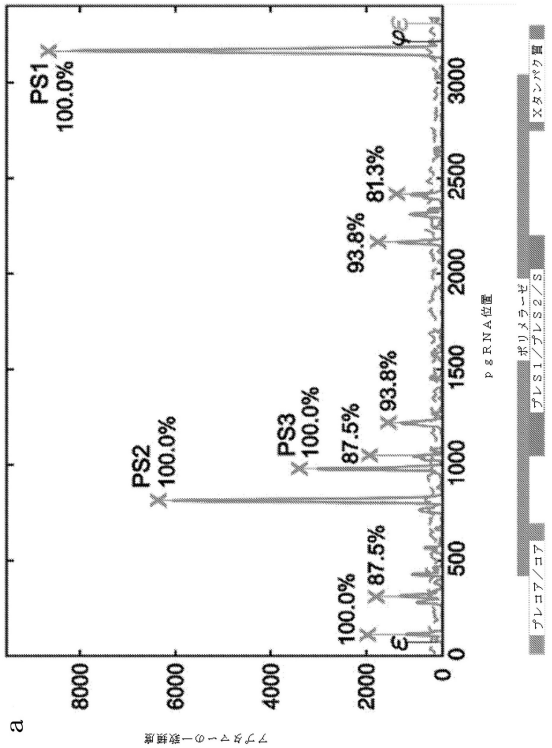
【図１．１】



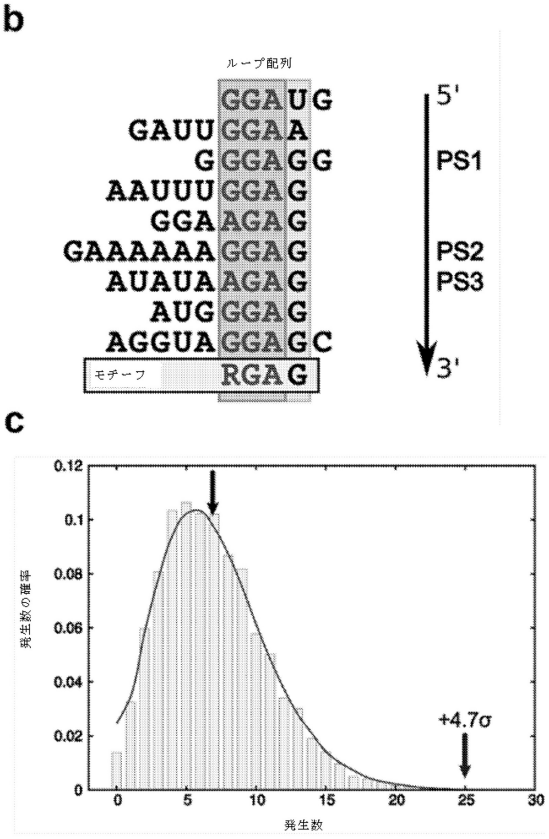
【図１．２】



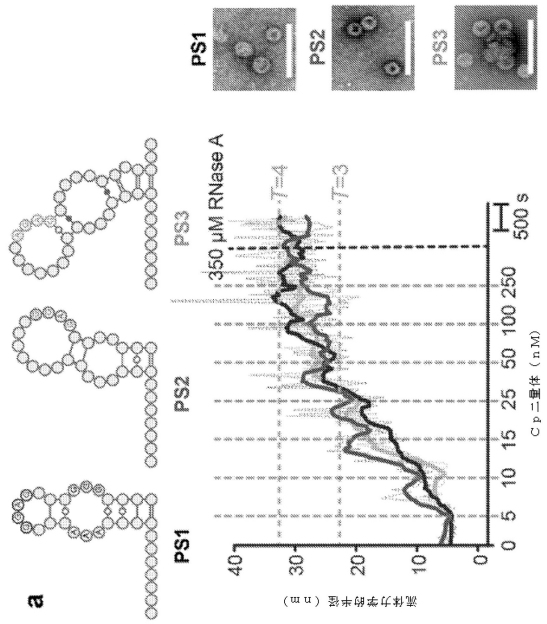
【図２．１】



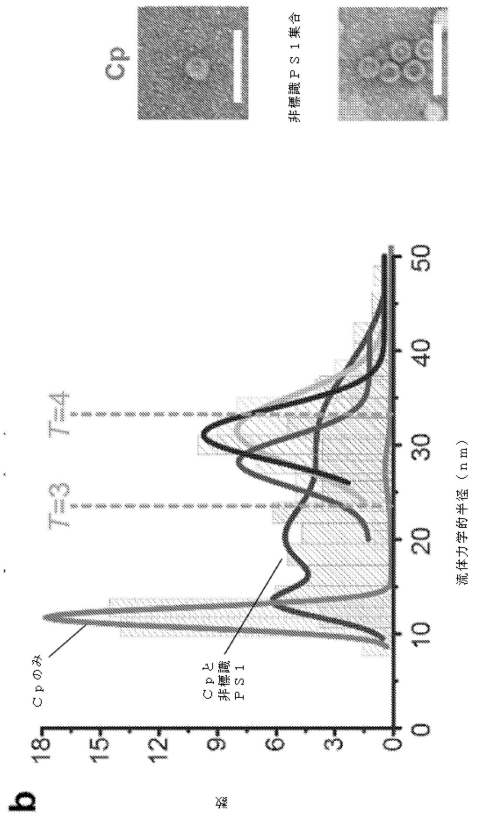
【図２．２】



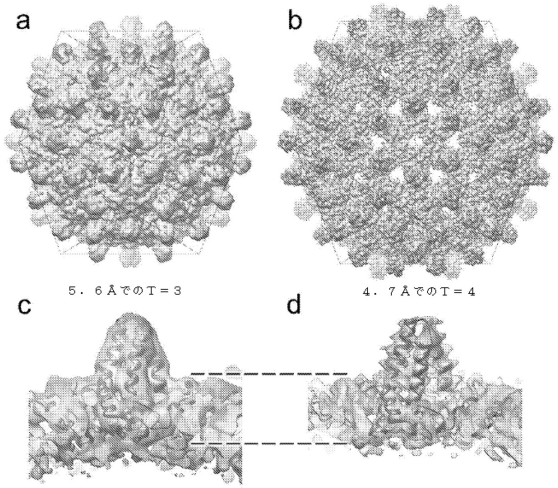
【図３．１】


PS1
PS2
PS3
350 μM RNase A
T=4
T=3
500 s
PS3
PS2
PS1
a
0 5 10 15 25 50 100 250
Cp二量体（nM）
40 30 20 10 0
流体力学的半径（nm）

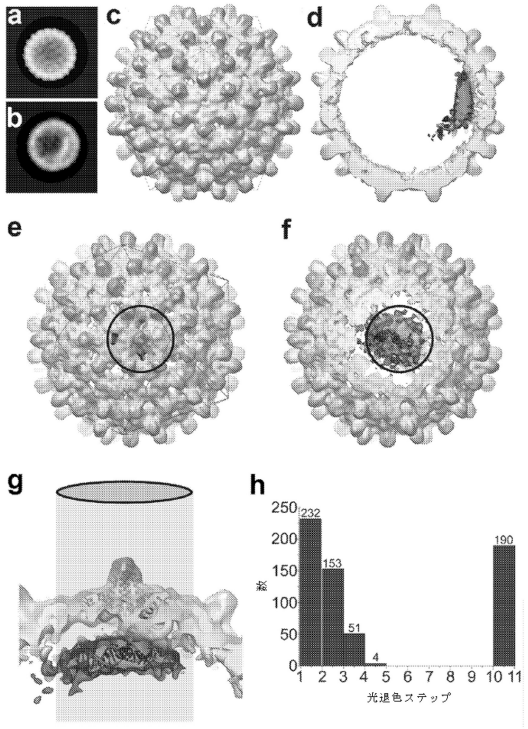
【図３．２】


Cp
非標識ＰＳ１集合
T=4
T=3
Cpのみ
Cpと
非標識
PS1
b
0 3 6 9 12 15 18
0 10 20 30 40 50
流体力学的半径（nm）

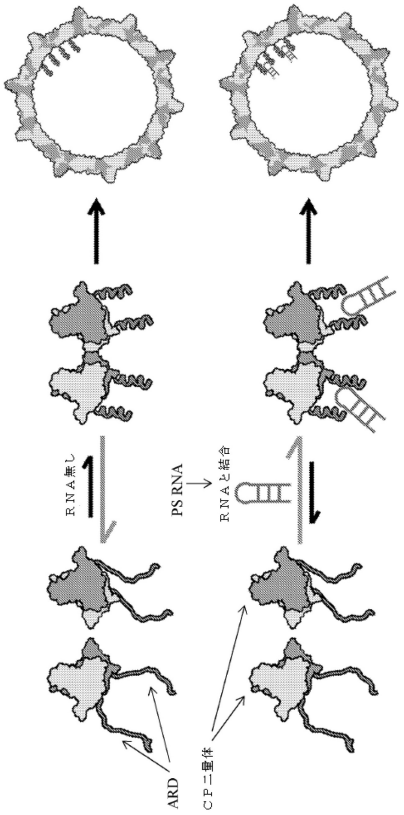
【図４】


a
b
5．6ÅでのT＝3
4．7ÅでのT＝4
c
d

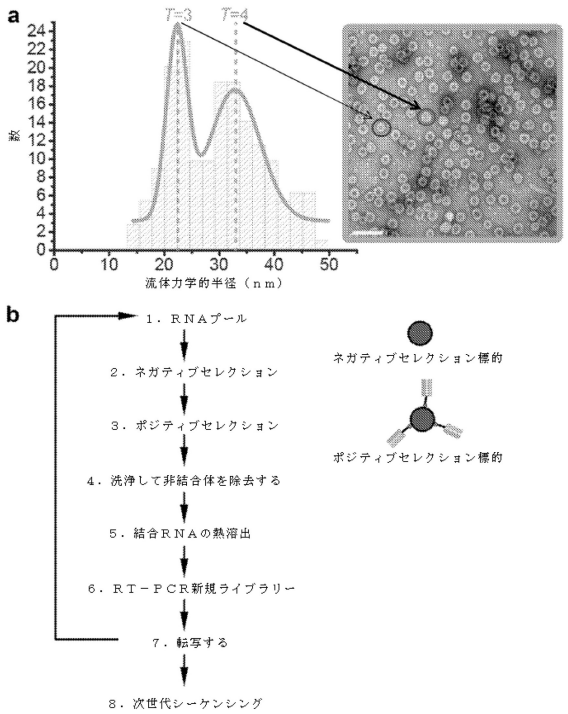
【図５】


a
b
c
d
e
f
g
h
250
200
150
100
50
0
232
153
51
4
190
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
光退色ステップ

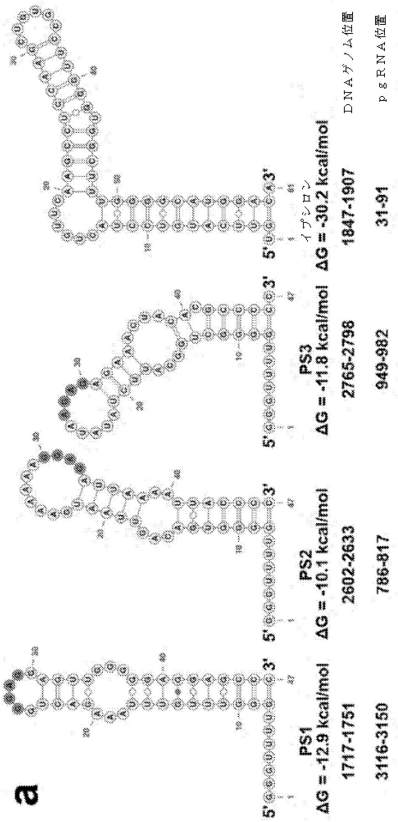
【図６】


RNA無し
PS RNA
RNAと結合
ARD
CP二量体

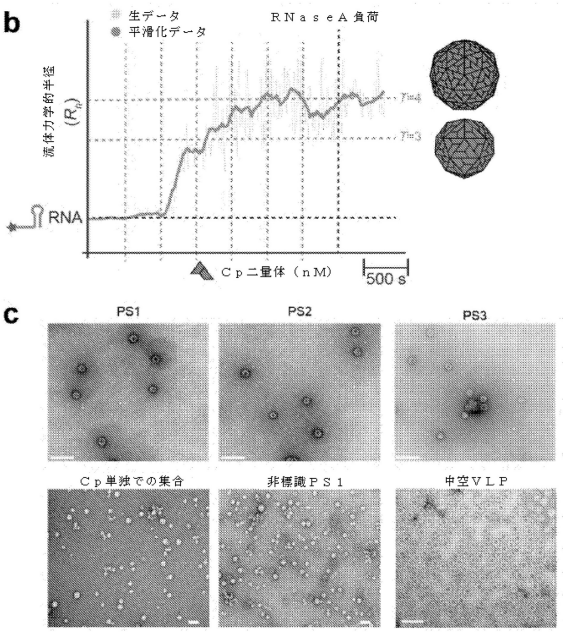
【図７】


a
T=3
T=4
数
流体力学的半径（ｎｍ）
b
１．ＲＮＡプール
２．ネガティブセレクション
３．ポジティブセレクション
４．洗浄して非結合体を除去する
５．結合ＲＮＡの熱溶出
６．ＲＴ－ＰＣＲ新規ライブラリー
７．転写する
８．次世代シーケンシング
ネガティブセレクション標的
ポジティブセレクション標的

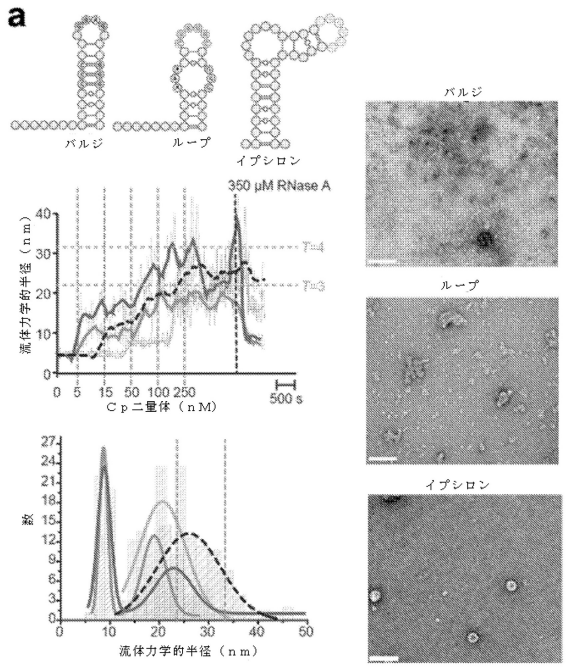
【図８．１】


a
PS1
ΔG = -12.9 kcal/mol
1717-1751
3116-3150
PS2
ΔG = -10.1 kcal/mol
2602-2633
786-817
PS3
ΔG = -11.8 kcal/mol
2765-2798
949-982
イプシロン
ΔG = -30.2 kcal/mol
1847-1907
31-91
DNAゲノム位置
pgRNA位置

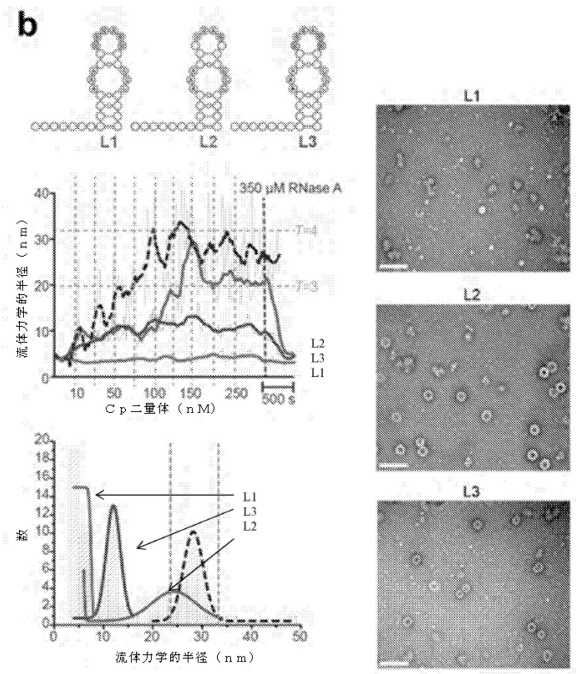
【図８．２】


b
生データ
平滑化データ
ＲＮａｓｅＡ負荷
流体力学的半径
RNA
Ｃｐ二量体（ｎＭ）
500 s
c
PS1
PS2
PS3
Ｃｐ単独での集合
非標識ＰＳ１
中空ＶＬＰ

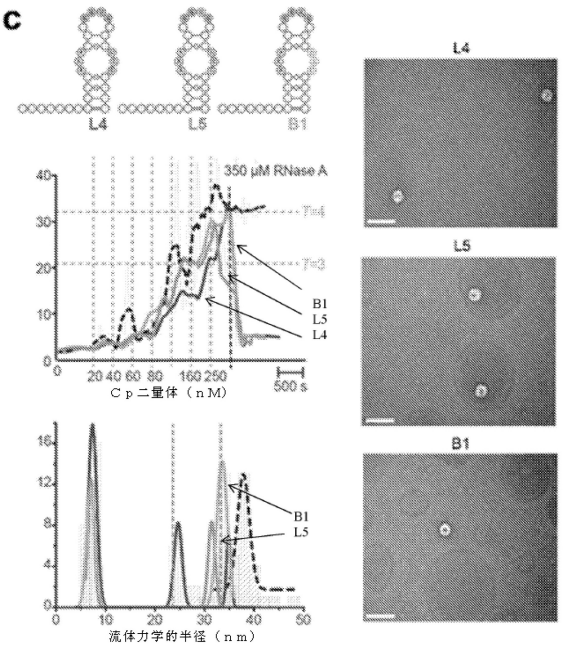
【図９．１】



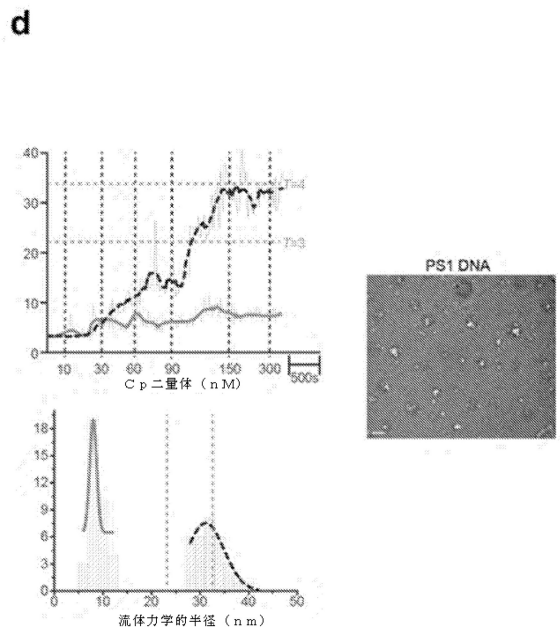
【図９．２】



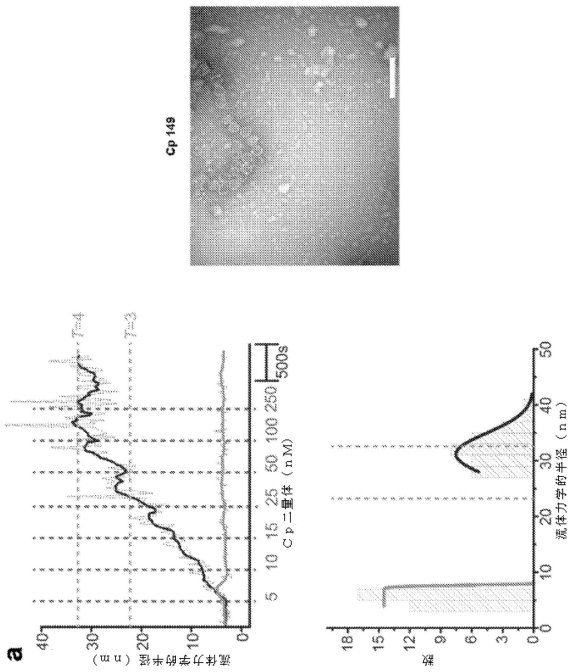
【図９．３】



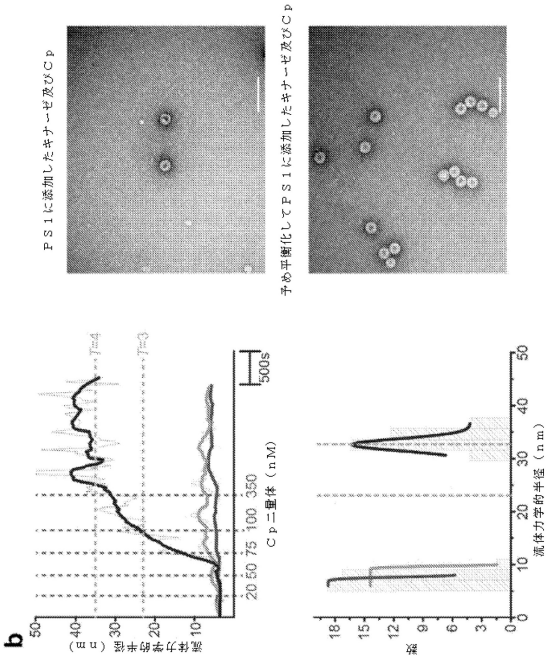
【図９．４】



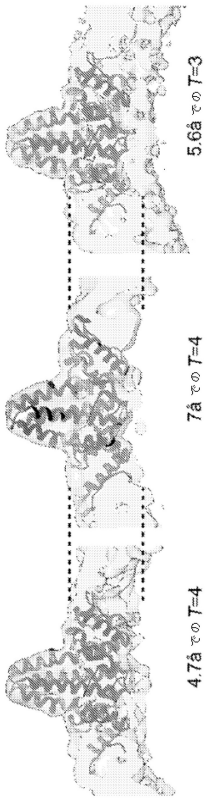
【図１０．１】



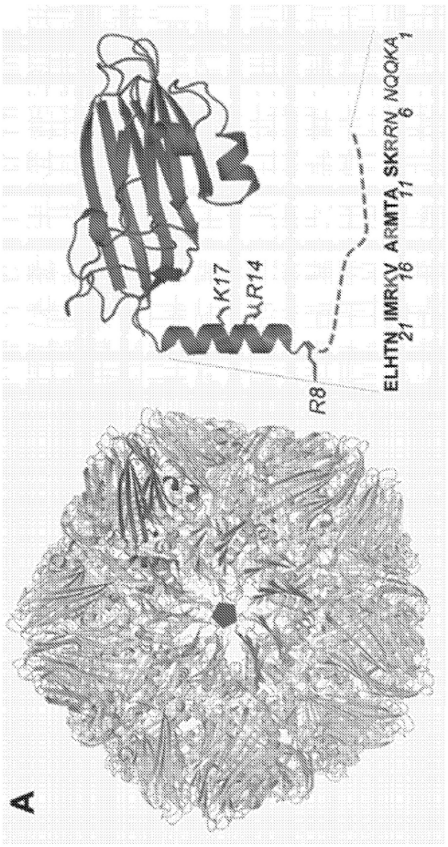
【図１０．２】



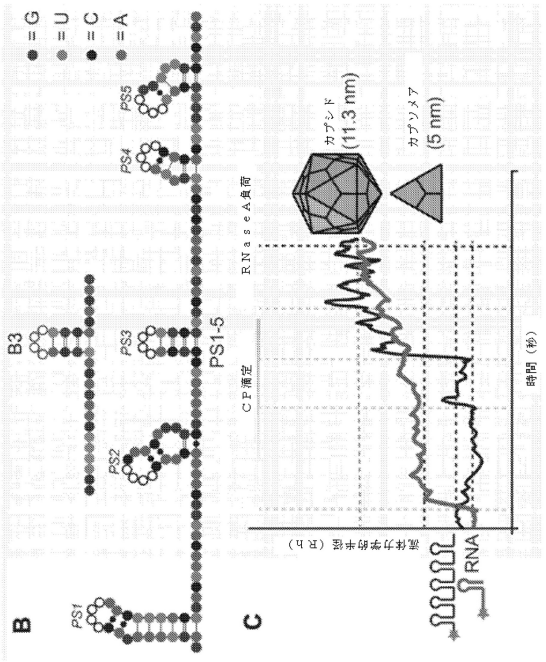
【図１１】



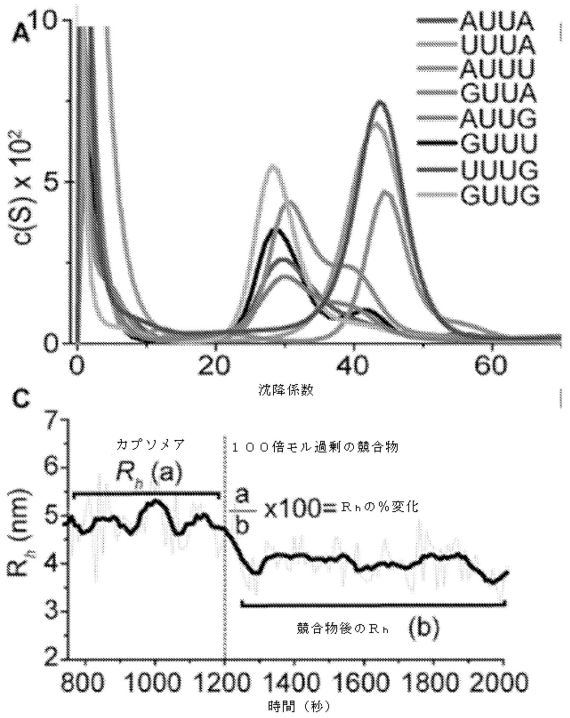
【図１２．１】



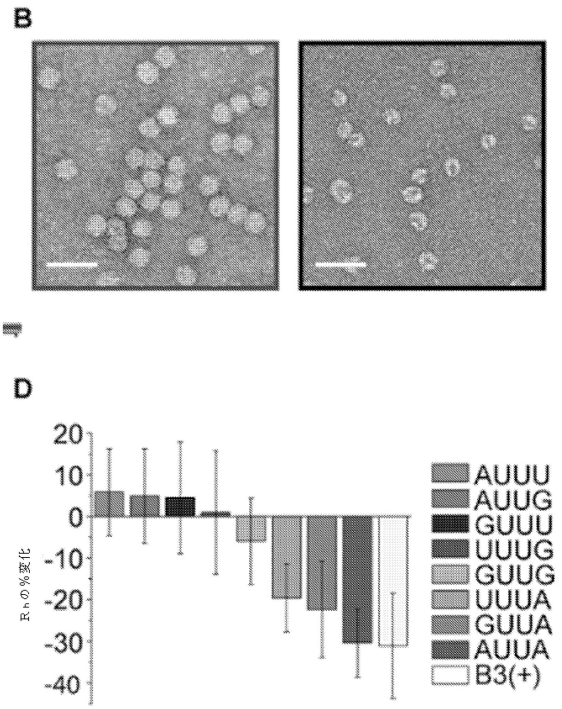
【図１２．２】



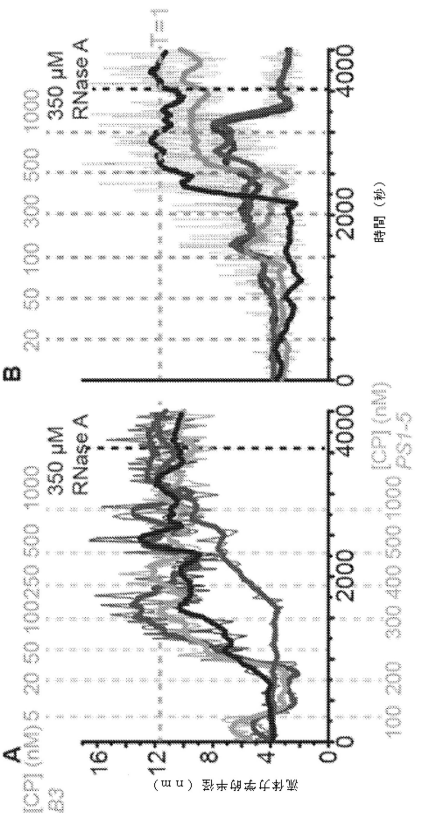
【図１３．１】



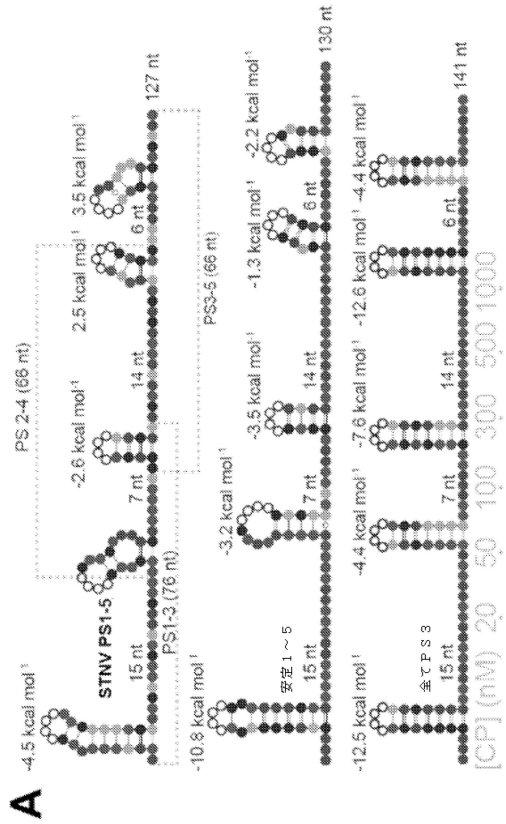
【図１３．２】



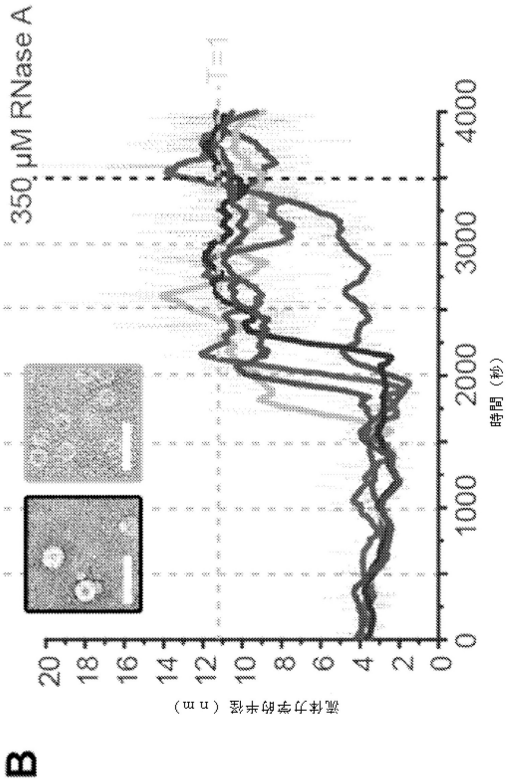
【図１４】



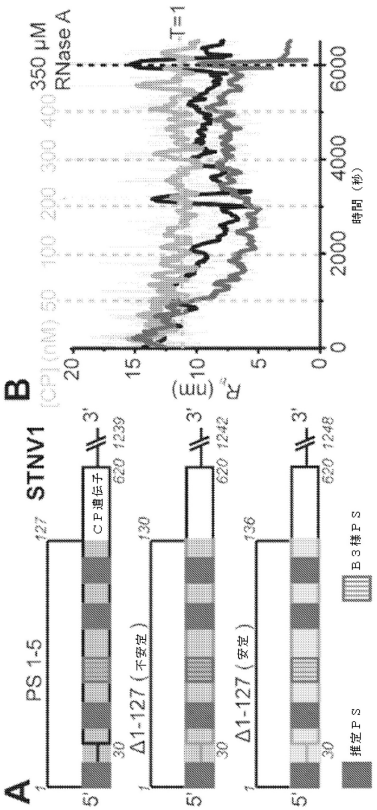
【図１５．１】



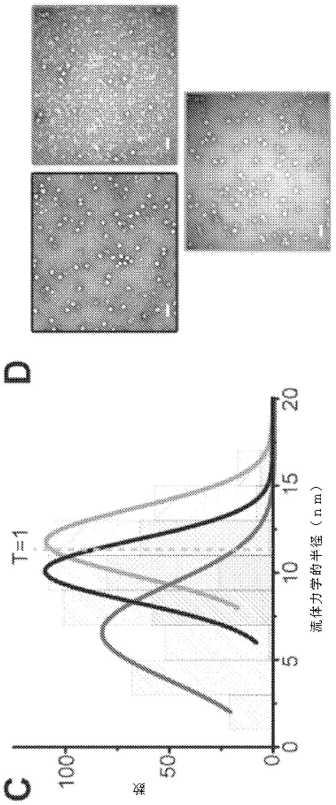
【図１５．２】



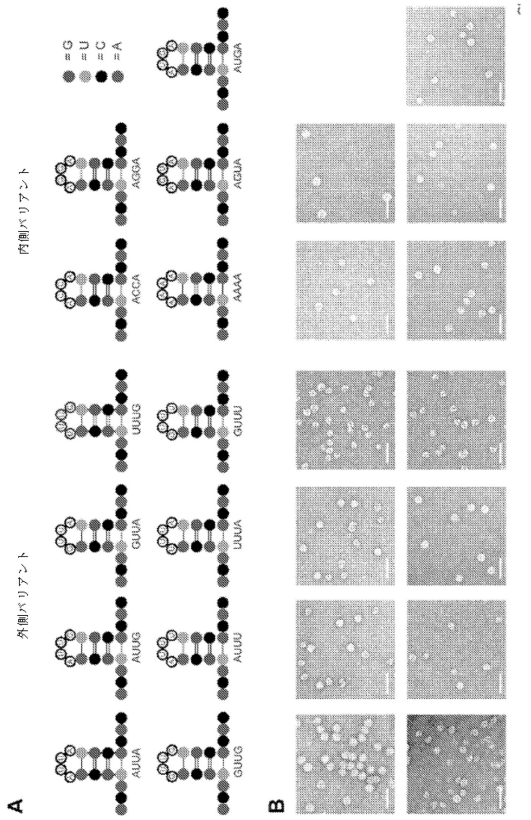
【図１６．１】



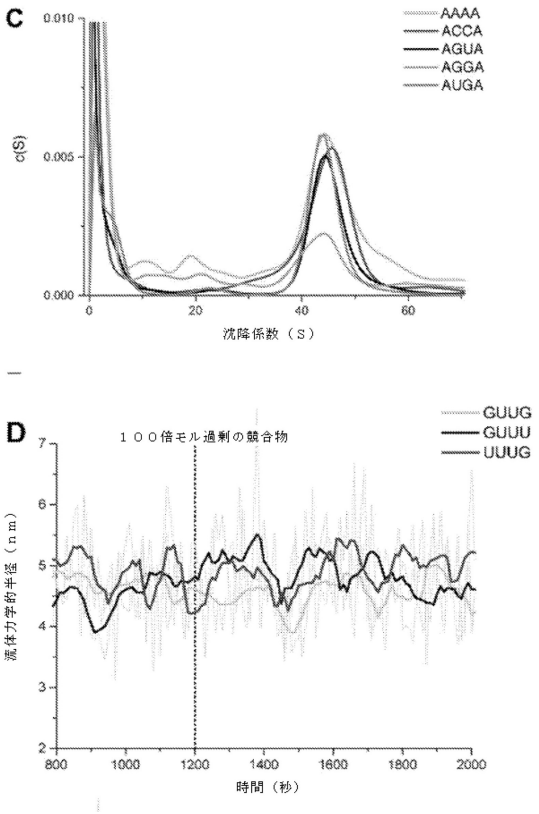
【図１６．２】



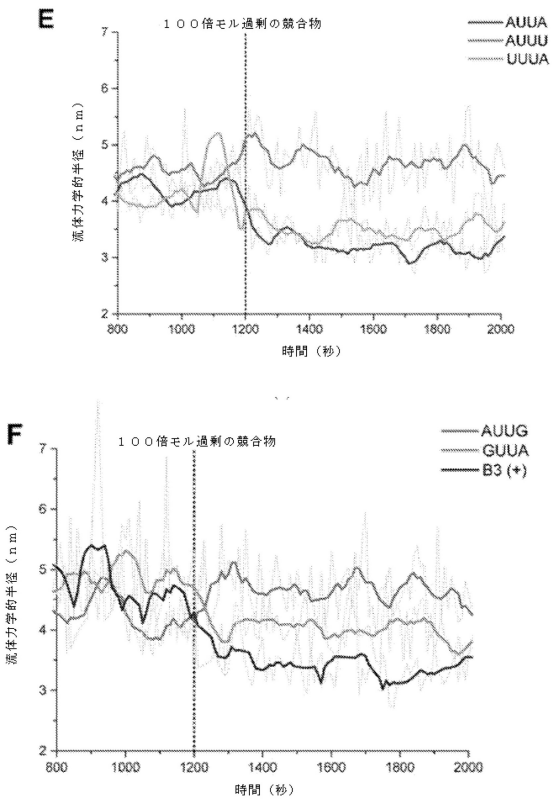
【図１７．１】



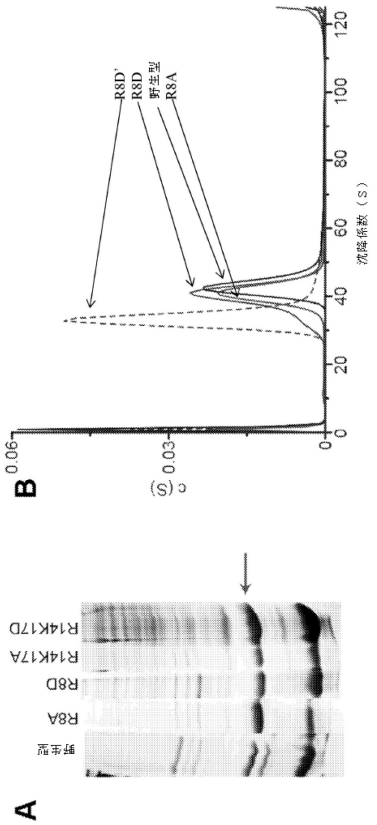
【図１７．２】



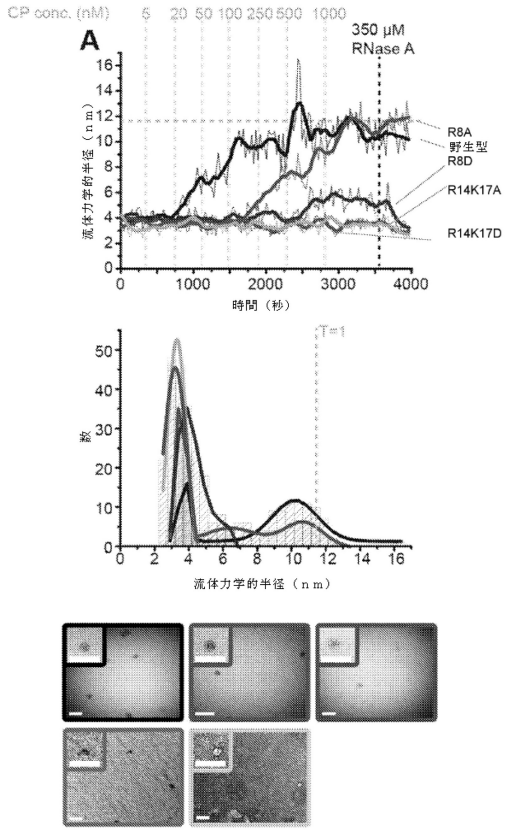
【図１７．３】



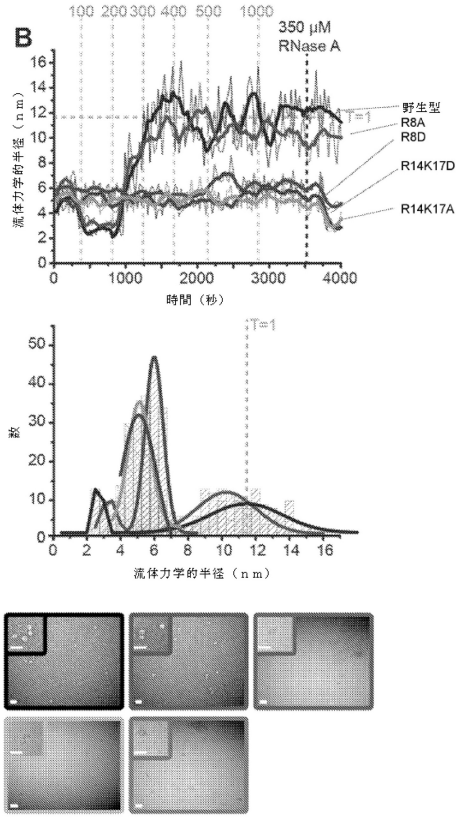
【図１８】



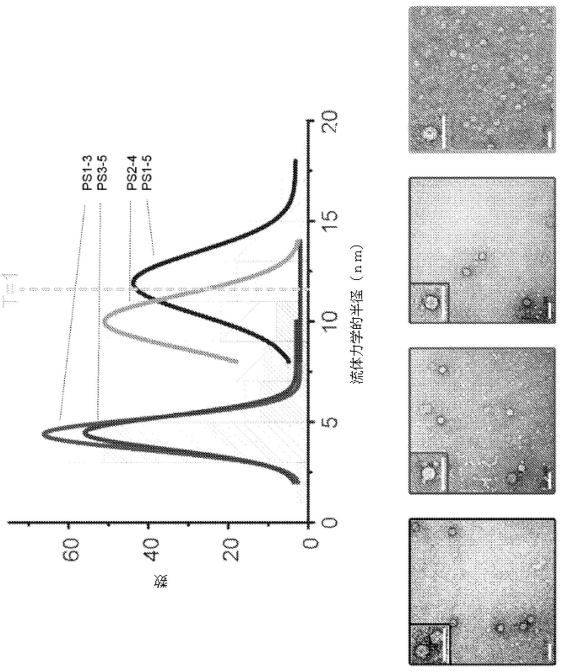
【図１９．１】



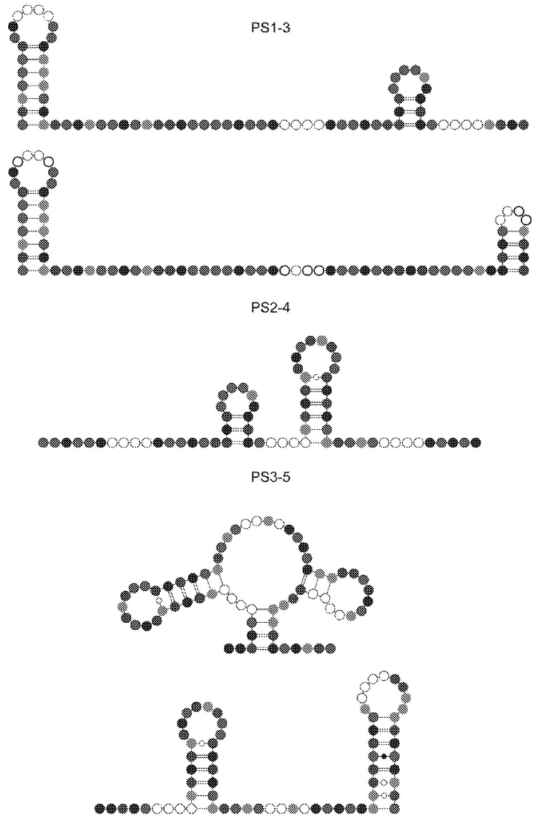
【図１９．２】



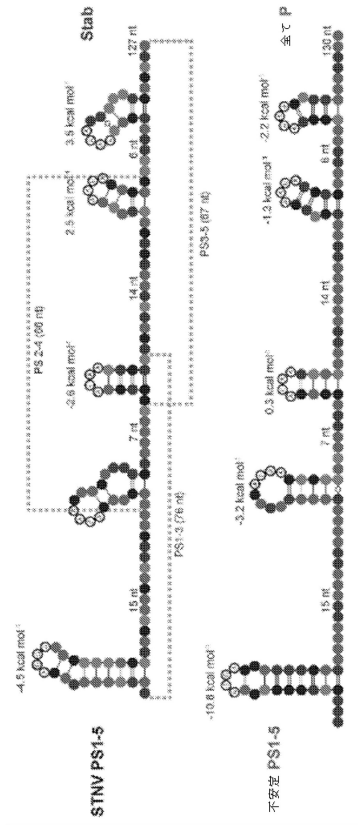
【図２０】



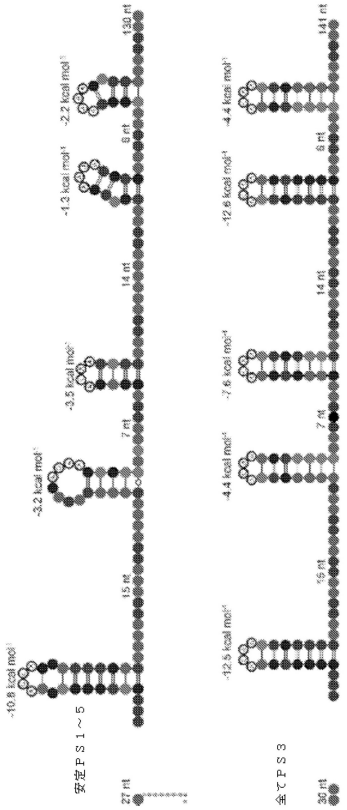
【図２１】



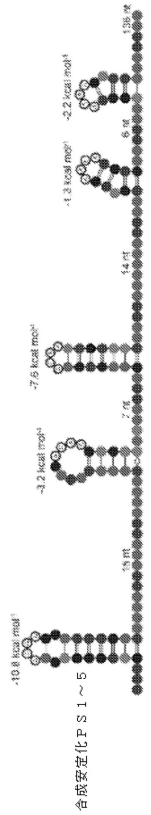
【図２２．１】



【図２２．２】

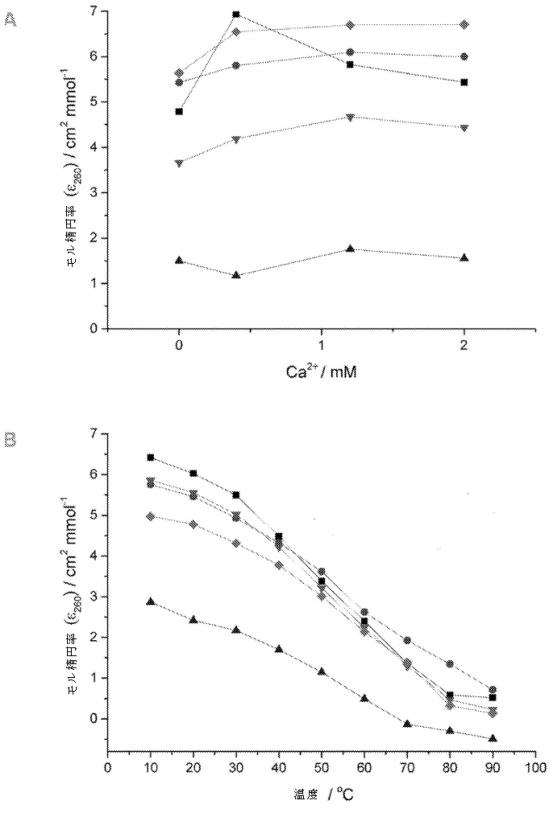


【図２２．３】

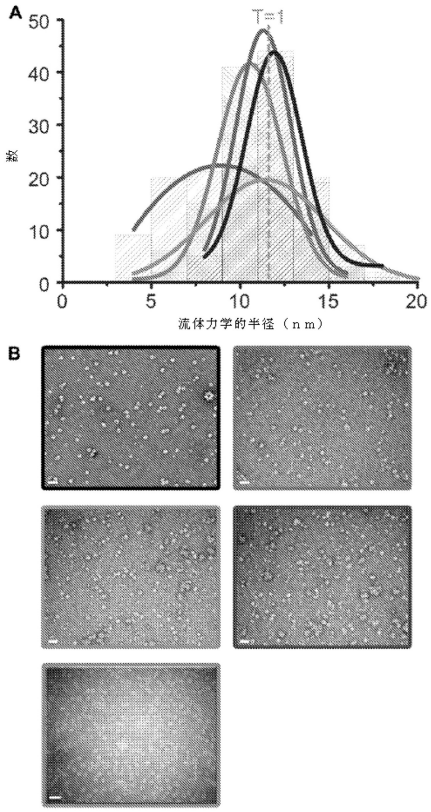


オリゴヌクレオチド	折り畳みの自由エネルギー (kcal mol^{-1})				
	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5
PS1-5	-4.5	N/A	-0.3	2.5	3.5
不安定ＰＳ１～５	-10.8	-3.2	0.3	-1.3	-2.2
安定ＰＳ１～５	-10.8	-3.2	-3.5	-1.3	-2.2
全てＰＳ３	-12.5	-4.4	-7.6	-12.6	-4.4
合成安定化ＰＳ１～５	-10.8	-3.2	-7.6	-1.3	-2.2

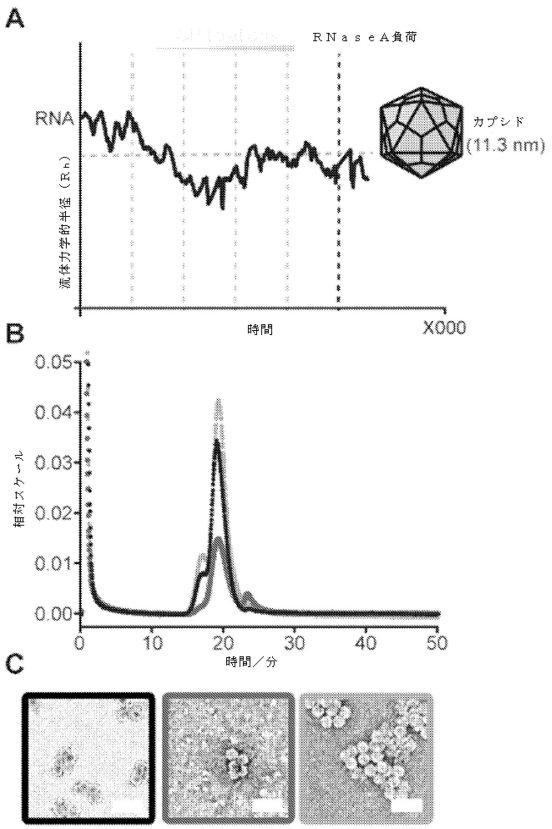
【図２３】



【図２４】



【図２５】



【配列表】

0007242561000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
A61K 39/00 (2006.01)		A61K	39/00	H
A61K 31/713 (2006.01)		A61K	31/713	
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12	
C12N 15/113 (2010.01)		C12N	15/113	Z
C12N 7/01 (2006.01)		C12N	7/01	

(74)代理人 100149294
弁理士 内田 直人
(72)発明者 レオノフ，ジャーマン
イギリス国，ロンドン グレーターロンドン エヌダブリュー５１エルピー，ゴードン ハウス ロード ハイゲート ３２－３４，スペクトラム ハウス，シャープ キャピタル リミテッド
(72)発明者 ホワイト，シモン
アメリカ合衆国，コネチカット州 ０６２６９，ストーズ，デパートメント オブ モレキュラー アンド セル バイオロジー ノース イーグルビル ロード，ユニバーシティ オブ コネチカット
(72)発明者 ストックリー，ピーター
イギリス国，エルエス２ ９ジェイティ リーズ ヨークシャー，アストバリー センター フォー ストラクチュラル モレキュラー バイオロジー，ユニバーシテイ オブ リーズ
(72)発明者 パテル，ニケシュ
イギリス国，エルエス２ ９ジェイティ リーズ ヨークシャー，アストバリー センター フォー ストラクチュラル モレルキュラー バイオロジー，ユニバーシテイ オブ リーズ
(72)発明者 ロブレウスキー，エマ
イギリス国，エルエス２ ９ジェイティ リーズ ヨークシャー，アストバリー センター フォー ストラクチュラル モレルキュラー バイオロジー，ユニバーシテイ オブ リーズ
(72)発明者 マスケル，ダン
イギリス国，エルエス２ ９ジェイティ リーズ ヨークシャー，アストバリー センター フォー ストラクチュラル モレルキュラー バイオロジー，ユニバーシテイ オブ リーズ
(72)発明者 スワロック，レイダン
イギリス国，ワイオー１０ ５ディーディー ヨーク ヨークシャー，ヘスリントン，ユニバーシティ オブ ヨーク
(72)発明者 ビンガム，リチャード
イギリス国，ワイオー１０ ５ディーディー ヨーク ヨークシャー，ヘスリントン，ユニバーシティ オブ ヨーク
(72)発明者 ワイス，エヴァ
イギリス国，ワイオー１０ ５ディーディー ヨーク ヨークシャー，ヘスリントン，ユニバーシティ オブ ヨーク
(72)発明者 ダイクマン，エリック
イギリス国，ワイオー１０ ５ディーディー ヨーク ヨークシャー，ヘスリントン，ユニバーシティ オブ ヨーク
審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 PNAS, 2014, Vol.111, No.14, pp.5361-5366
Scientific Reports, 2016, Vol.6, #22952
J. Mol. Biol., 2016, Vol.428, pp.431-448
Nature Microbiology, 2017.6.19, Vol.2, #17098
PNAS, 2017.11, Vol.114, No.46, pp.12255-12260
Journal of Virology, 2019, Vol.93, No.9, #e02106-18

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ４８／００
Ａ６１Ｋ ３９／００ － ３９／４４
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０

JSTPlus／JMEDPlus／JST7580（JDreamIII）
CAplus／MEDLINE／EMBASE／BIOSIS（STN）
Google Scholar