

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年2月1日 (01.02.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/013264 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 19/34 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/313271
- (22) 国際出願日: 2006年7月4日 (04.07.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-215678 2005年7月26日 (26.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 畠田 雅光 (SHIMADA, Masamitsu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 高山 正範 (TAKAYAMA, Masanori) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 浅田 起代蔵 (ASADA, Kiyozo) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL ENDORIBONUCLEASE

(54) 発明の名称: 新規なエンドリボヌクレアーゼ

(57) Abstract: A polypeptide having a novel endoribonuclease activity; a nucleic acid encoding the polypeptide; recombinant DNA having the nucleic acid therein; a transformant transformed with the recombinant DNA; a process for producing the polypeptide comprising the steps of cultivating the transformant and collecting the polypeptide from the culture; a process for producing a digest of single-stranded RNA comprising the step of reacting the polypeptide with the single-stranded RNA; and a method for the digestion of single-stranded RNA.

(57) 要約: 新規なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする核酸、当該核酸を含んでなる組換えDNA、当該組換えDNAにより形質転換されてなる形質転換体、当該形質転換体を培養する工程および培養物中より上記ポリペプチドを採取する工程を包含することを特徴とする上記ポリペプチドの製造方法、一本鎖RNAに上記ポリペプチドを作用させる工程を包含することを特徴とする一本鎖RNA分解物の製造方法および一本鎖RNAの分解方法。

WO 2007/013264 A1

明 細 書

新規なエンドリボヌクレアーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子工学分野において有用な、新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼに関する。

背景技術

[0002] いくつかの原核生物のプラスミドは、宿主でのプラスミドを維持するためにプラスミドが脱落した宿主を殺すpost-segregation killing (PSK)の機能を有することが報告されている。これらのプラスミドにはトキシン-アンチトキシン遺伝子が存在している。アンチトキシンは細胞内でトキシンと結合しトキシンを不活性化しているが、アンチトキシンはプロテアーゼに対して分解されやすく、アンチトキシンがプロテアーゼにより分解されると安定なトキシンが活性化される(非特許文献1)。このようなトキシン-アンチトキシン遺伝子はほとんどの原核生物のクロモソームにも存在し、さまざまなストレスに対応し、Programmed Cell Deathの機能を担っている。これらのトキシンの機能はまだすべて明らかになっていないが、CcdBおよびParEはDNA gyraseをターゲットとして複製を制御し、RelEおよびDocは転写を制御している可能性が示唆されている(非特許文献1、2)。

[0003] 大腸菌においては、RelE、ChpAK (MazF)、ChpBK、YoeB、YafQの少なくとも5つのトキシンが存在する(非特許文献2)。Christensenらは、RelEがリボソーム依存的に3塩基の特定のコードンを認識してmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼであることを報告している(非特許文献3、4)。またChristensenらは、ChpAK、ChpBKおよびYoeBも同様にリボソームおよびコードン依存的にmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼであることを報告している(非特許文献5、6)。

[0004] 一方、井上らは、MazF (ChpAK)は、リボソーム非依存的にACAの特定の塩基を認識してmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼであることを証明している(非特許文献7、8)。また、Munoz-Gomezらは、mazFのRNA切断の特異性はNACであると報告している(非特許文献9)。さらに、井上らは、プラスミドR100に存在するPe

mKがUAH(HはC, AまたはU)の特定の塩基を認識してmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼであることを証明している(特許文献1、非特許文献10)。以上のように、RelEやPemKファミリーのトキシンは塩基特異的にmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼである可能性が示唆されてきた。特にPemKファミリーのトキシンは、リボソーム非依存的に特定の塩基を認識してmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼである可能性がある。PemKファミリーのトキシンは、原核生物に多く存在し、その配列の比較はよく研究されている(非特許文献1、11)。

[0005] また、Anantharamanらは、トキシンの遺伝子情報およびゲノム解析が終了した生物の遺伝子情報をもとにGene neighborhood analysisを行い、トキシンを系統的に分類し、さらに未知の機能のタンパクについてもトキシン様プロテインを予測した(非特許文献12)。さらに解析を通して、RelEやPemKのみならず、DocファミリーおよびPINドメインを有するタンパクがリボヌクレアーゼ活性を有する可能性を示唆している。Nitrosomonas europaeaには5種のPemKファミリーのトキシンが見出されている(非特許文献13)。

[0006] 核酸を配列特異的に切断する酵素としては、二本鎖DNAを切断する制限酵素は数多く見出されており、遺伝子工学分野で広く利用されている。一本鎖RNAを配列特異的に切断する酵素は、G塩基を特異的に切断するリボヌクレアーゼT1が見出されており、遺伝子工学で利用されているが(非特許文献14)、一本鎖RNA内の複数の塩基を認識して特異的に切断する酵素は未だ数少なく、遺伝子工学分野ではそのようなエンドリボヌクレアーゼの開発が望まれている。MazFのような3塩基配列あるいはそれ以上の塩基数を特異的に認識して切断するエンドリボヌクレアーゼが発見されれば、遺伝子工学分野で有用な酵素となると考えられる。

[0007] 特許文献1:国際公開第2004/113498号パンフレット

非特許文献1:ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 第182巻、p561-572(2000)

非特許文献2:サイエンス(Science)、第301巻、p1496-1499(2003)

非特許文献3:モレキュラー・マイクロバイオロジー(Molecular Microbiol.), 第48巻、p1389-1400(2003)

非特許文献4:セル(Cell)、第122, 131–140(2003)

非特許文献5:ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)、第332巻、p809–819(2003)

非特許文献6:モレキュラー・マイクロバイオロジー、第51巻、p1705–1717(2004)

非特許文献7:モレキュラー・セル(Molecular Cell)、第12巻、p913–920, 2003)

非特許文献8:ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、第280巻、p3143–3150(2005)

非特許文献9:フェブス・レターズ(FEBS Letters)、第567巻、p316–320(2004)

非特許文献10:ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、第279巻、p20678–20684(2004)

非特許文献11:ジャーナル・オブ・モレキュラー・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー(J. Mol. Microbiol. Biotechnol.)、第1巻、p295–302(1999)

非特許文献12:ゲノム・バイオロジー(Genome Biology)、第4巻、R81(2003)

非特許文献13:ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research)、第33巻、p966–976(2005)

非特許文献14:メソッズ・イン・エンザイモロジー(Method in Enzymology)、第341巻、p28–41(2001)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、上記従来技術を鑑みたものであり、新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼを見出すことであり、その新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼの切断配列の特異性を同定し、遺伝子工学への利用を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、配列特異的なエンドリボヌクレアーゼをスクリーニングし、Nitrosomonas europaeaのNE1181遺伝子にコードされるポリペプチドが新規な配列特異

的エンドリボヌクレアーゼであることを見出した。さらに該酵素の切断配列の特異性を同定し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、

- [1] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列、または該配列において1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つを有するアミノ酸配列で示され、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチド、
 - [2] [1]のポリペプチドをコードする核酸、
 - [3] 配列表の配列番号2記載の塩基配列を有することを特徴とする[2]の核酸、
 - [4] [2]または[3]の核酸にストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能であり、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、
 - [5] [2]～[4]いずれか1項に記載の核酸を含んでなる組換えDNA、
 - [6] [5]の組換えDNAにより形質転換されてなる形質転換体、
 - [7] [6]の形質転換体を培養する工程、および該培養物中より配列特異的なRNA切断活性を有するポリペプチドを採取する工程を包含することを特徴とする[1]のポリペプチドの製造方法、
 - [8] 一本鎖RNAに[1]のポリペプチドを作用させる工程を包含することを特徴とする、一本鎖RNA分解物の製造方法、および
 - [9] 一本鎖RNAに[1]のポリペプチドを作用させる工程を包含することを特徴とする、一本鎖RNAの分解方法、
- に関する。

発明の効果

[0011] 本発明により、新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼを見出し、その新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼの切断配列の特異性を同定し、遺伝子工学への利用を提供することが可能となる。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 1. 本発明のポリペプチド

本発明のポリペプチドは、配列番号1記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入若しくは置換の少なくとも1つを有す

るアミノ酸配列で示され、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を示すことを特徴とする。

- [0013] 本発明のポリペプチドが有している活性は、一本鎖RNA特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性であり、構成塩基としてリボヌクレオチドを含有する一本鎖核酸中の、リボヌクレオチドの3'側のリン酸ジエステル結合を加水分解することができる。前記活性により加水分解された核酸は、水酸基を有する3'末端とリン酸基を有する5'末端、リン酸基を有する3'末端と水酸基を有する5'末端、もしくは2', 3'サイクリックホスフェートと水酸基を有する5'末端を生じる。
- [0014] 本発明のポリペプチドの基質としては、少なくとも1分子のリボヌクレオチドを有する核酸であればよく、例えばRNA、デオキシリボヌクレオチドを含有するRNA、リボヌクレオチドを含有するDNA等が例示されるが、これらに限定されるものではない。前記の基質は、本発明のポリペプチドの作用を阻害しない範囲で通常核酸中に含有されているものとは異なるヌクレオチド、例えばデオキシイノシン、デオキシウリジン、ヒドロキシメチルデオキシウリジン等を含有していてもよい。
- [0015] また、本願発明のポリペプチドは一本鎖核酸に特異的に作用する。二本鎖核酸、例えば二本鎖RNA、RNA-DNAハイブリッド等は切断することができない。
- [0016] 本発明のポリペプチドは核酸をその塩基配列特異的に切断する活性を有することを特徴とする。本発明を特に限定するものではないが、例えば配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、一本鎖RNA分子中に5'-GAAU-3'または5'-AAAU-3'の配列が存在した場合、当該配列の2番目のA残基の5'側または3'側のリン酸ジエステル結合を加水分解する。この活性は、例えば配列番号5に示される塩基配列のオリゴリボヌクレオチドであるmazG18__12を基質とし、前記オリゴリボヌクレオチドの19番目と20番目の塩基の間のリン酸ジエステル結合および24番目と25番目の塩基の間のリン酸ジエステル結合を加水分解する活性として確認することができる。本発明のポリペプチドのエンドリボヌクレアーゼ活性はリボソームの共存なしに発現されることから、前記活性はリボソーム非依存性である。
- [0017] 本発明のポリペプチドが有する一本鎖RNA特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性は、例えば一本鎖RNAを基質として測定することができる。具体的には、RNAポリメ

ラーゼによりDNAを鋳型として転写された一本鎖RNAや化学的に合成した一本鎖RNAに活性を測定しようとするポリペプチドを作用させ、RNAの切断が生じるかどうかを調べることで測定することができる。RNAの分解は、例えば電気泳動(アガロースゲル、アクリルアミドゲル等)により確認することができる。基質とするRNAに適当な標識(例えば放射性同位体、蛍光物質等)を付しておけば電気泳動後の分解産物の検出が容易となる。

[0018] 本発明のポリペプチドは、配列特異的に一本鎖RNAを加水分解するエンドリボヌクレアーゼ活性を示す限りにおいて、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列に1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つがなされたアミノ酸配列で示されるポリペプチドを包含する。このような変異を有するポリペプチドとしては、例えば配列番号1記載のポリペプチドに50%以上のホモロジーを有するポリペプチド、好ましくは70%以上のホモロジーを有するポリペプチド、特に好ましくは90%以上のホモロジーを有するポリペプチドが例示される。これらの変異を有するポリペプチドは、配列番号1記載のアミノ酸配列のポリペプチドとは異なる配列を認識、切断するものであっても、本発明に包含される。

[0019] さらに、前記のポリペプチドはその活性には必須でないペプチド領域を有していてもよい、例えば翻訳の効率を向上させるためのペプチドや、前記ポリペプチドの精製を容易とするためのペプチド(例えばヒスチジンータグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質等)、シャペロンなど発現効率を向上させるタンパクが付加されたものであっても、一本鎖RNA特異的なRNA切断活性を示す限り本発明のポリペプチドに包含される。

[0020] 2. 本発明のポリペプチドをコードする核酸

本発明は、配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を提供する。前記核酸としては、本発明を特に限定するものではないが、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列、または該配列において1個以上、例えば1～10個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つを有するアミノ酸配列で示され、かつ前記の配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするものが挙げられる。ここで、配列番号1記載のアミノ酸配列にお

いて1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つを有するアミノ酸配列としては、例えば配列番号1記載のポリペプチドに50%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列、好ましくは70%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列、特に好ましくは90%以上のホモロジーを有するアミノ酸配列が例示される。

[0021] さらに、本発明の核酸は、前記の核酸にストリンジェントな条件でハイブリダイズ可能であり、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を包含する。前記のストリンジェントな条件としては、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行、J. サムブルック(J. Sambrook)ら編集、モレキュラー・クローニング:ア・ラボラトリー・マニュアル第2版(Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed.)等に記載された条件が例示される。具体的には、例えば0.5% SDS、5×デンハルツ溶液、0.01% 変性サケ精子DNAを含む6×SSC中、プローブとともに65℃にて12～20時間インキュベートする条件が挙げられる。プローブにハイブリダイズした核酸は、例えば0.5% SDSを含む0.1×SSC中、37℃で洗浄して非特異的に結合したプローブを除去した後に検出することができる。

[0022] 本発明のポリペプチドをコードする核酸は、例えば下記のような手段により取得することができる。

[0023] 特定の塩基配列を認識してmRNAを切断するエンドリボヌクレアーゼ活性を有するMazFやPemKのようなトキシンにアミノ酸配列上でホモロジーを有する遺伝子は、配列特異的なリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸の候補である。このような候補遺伝子は、例えば細菌のゲノムより見出すことができる。Nitrosomonas europaeaには5種のPemKファミリーのトキシンが見出されている。

[0024] 候補遺伝子は、例えば塩基配列情報を基に設計されたプライマーを用いたPCRにより細菌ゲノムから単離することができる。全塩基配列が既知であればDNA合成機を用いて候補遺伝子の全配列を合成することもできる。

[0025] 候補遺伝子からのタンパク発現は、候補遺伝子を組み込んだ発現ベクターで形質転換した適当な宿主、例えば大腸菌で実施することができる。宿主のRNAを分解する配列特異的なリボヌクレアーゼの発現は宿主には致死性である可能性があり、誘導

前まで候補遺伝子の発現は厳密に抑制される必要がある。例えば、T7ポリメラーゼのプロモーターを利用するpETシステム(ノバジェン社製)、コールドショック発現制御系pColdシステム(タカラバイオ社製)のような発現システムを利用することが好適である。候補遺伝子からの発現産物を簡便に精製するためには、その精製を容易とするために前記のヒスチジン-タグのようなペプチドを発現産物に付加しておくことが有利である。そのためには、発現ベクターとしてこのようなペプチドのコード領域を含むものを使用すればよい。

[0026] エンドリボヌクレアーゼの活性の測定は、前記の、一本鎖RNAを基質とする方法により実施することができる。切断部位は、切断したRNAを鋳型とし、該RNAに相補的なプライマーと逆転写酵素を用いたプライマー・エクステンションにより同定することができる。前記のプライマー・エクステンションでは切断部位で伸長反応が停止するため、伸長鎖の鎖長を電気泳動により決定すれば切断部位を同定することができる。さらに塩基配列特異性を厳密に同定するには、任意の配列を有するオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成し、候補遺伝子の発現産物を作用させた後、変性アクリルアミドゲル電気泳動等によって切断の有無を判定すればよい。

[0027] 3. 本発明のポリペプチドの製造方法

本発明のポリペプチドは、例えば、(1)本発明のポリペプチドを生産する微生物の培養物からの精製、(2)本発明のポリペプチドをコードする核酸を含有する形質転換体の培養物からの精製、等の方法により製造することができる。

[0028] 本発明のポリペプチドを生産する微生物としては、本発明を特に限定するものではないが、*Nitrosomonas*属に属する細菌が例示される。例えば、*N. europaea*、特に好適には*N. europaea* ATCC19718株より本発明のポリペプチドを取得することができる。前記微生物の培養はその微生物の生育に適した条件で行えばよい。菌体あるいは培養液中に生産された目的のポリペプチドは、通常タンパク質の精製に用いられる方法、例えば菌体の破碎、沈殿法(硫酸塩析等)による分画、各種のクロマトグラフィー(イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー)等、あるいはこれらを組み合わせて精製することができる。

[0029] 前記の、本発明のポリペプチドをコードする核酸を含む組換えDNAで形質転換された形質転換体より、本発明のポリペプチドを取得することができる。前記の組換えDNAは、好ましくはポリペプチドをコードする核酸の上流に機能的に接続された適切なプロモーターが配置されている。なお、本発明のポリペプチドは宿主に対して致死的な作用を示すことがあるので、前記のプロモーター、ならびにプロモーターを含めた発現システムは本発明のポリペプチドをコードする核酸からの転写を厳密に制御しうるものであることが好ましい。このようなシステムとして、前記のpETシステム、pColdシステムが例示される。

[0030] 宿主となる細胞へは前記の組換えDNAがそのまま導入されてもよく、適切なベクター、例えばプラスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクターに挿入されて導入されてもよい。さらに、前記の組換えDNAが宿主の染色体に組み込まれていても構わない。形質転換される宿主には特に限定はなく、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物、動物、植物培養細胞、動物培養細胞等、組換えDNAの分野で通常使用されている宿主が挙げられる。

[0031] これらの形質転換体で産生された本発明のポリペプチドは、前記のような精製手法を利用して精製することができる。本発明のポリペプチドをコードする核酸が、前記ポリペプチドの精製を容易とするためのペプチドが付加されたポリペプチドをコードするものであった場合には、精製は非常に容易となる。付加されたペプチドに応じた精製手法、例えば、ヒスチジンータグに対しては金属キレート樹脂を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼに対してはグルタチオン固定化樹脂を、それぞれ使用することにより、高純度のポリペプチドを簡便な操作で得ることができる。

[0032] 4. 本発明のポリペプチドを用いた一本鎖RNAの分解

本発明のポリペプチドを用いることにより、一本鎖RNAを分解し、RNA分解物を製造することができる。本発明のポリペプチドは塩基配列特異的にRNAを切断しうることから、生成するRNA分解物の平均の鎖長は前記ポリペプチドに認識される塩基配列の出現頻度に相関する。すなわち、本発明によりある鎖長分布を有するRNA分解物が提供される。さらに、その配列特異性を利用してRNA中の特定の領域を切り出すことも可能である。

- [0033] さらに、本発明のポリペプチドにより一本鎖RNAを選択的に分解することができる。本発明の一つの態様として、タンパク質合成系、例えば無細胞翻訳系や形質転換体中のmRNAを本発明のポリペプチドで分解し、タンパク質の合成を阻害することができる。この際、本発明のポリペプチドに認識される塩基配列を含有しないように人為的に作製した、所望のタンパク質をコードするmRNAを前記の系に存在させておくことにより、当該mRNAのみが分解を免れ、系内では所望のタンパク質が特異的に生成される。本態様は、特に高純度のタンパク質の製造に有用である。

実施例

- [0034] 以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。
- [0035] また、本明細書に記載の操作のうち、基本的な操作については2001年、コールドスプリング ハーバー ラボラトリー発行、J. サムブルック(J. Sambrook)ら編集、モレキュラー クローニング:ア ラボラトリー マニュアル第3版(Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd ed.)に記載の方法によった。
- [0036] 実施例1 *N. europaea* ATCC19718株由来NE1181の単離と発現プラスミドの構築
- Nitrosomonas europaea* ATCC19718株由来NE1181遺伝子について、そこにコードされているポリペプチドのアミノ酸配列および塩基配列をNCBI データベースより入手した(accession No. NP_841237およびNC_004757)。NE1181の塩基配列情報より、ポリペプチド全長をコードする領域のDNAをPCRで増幅できるように、プライマーNE1181-F(配列番号3)およびプライマーNE1181-R(配列番号4)をそれぞれ合成した。
- [0037] *Nitrosomonas europaea* ATCC19718株のゲノムDNAはATCCより入手した(ATCC No. 19718D)。

50ngの*Nitrosomonas europaea* ATCC19718株ゲノムDNA、プライマーNE1181-F およびNE1181-Rを使用し、Pyrobest DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いたPCRを実施して362bpの増幅DNA断片を得た。この増幅断片を制限酵素NdeIおよびXhoIで消化してアガロース電気泳動に供し、泳動後のゲ

ルより341bpのDNA断片を回収した。制限酵素NdeIおよびXhoIで消化しておいたpET21aベクター(ノバジェン社製)に上記の341bpのDNA断片を接続して得られた組換えプラスミドで大腸菌JM109株をトランスフォーメーションした。こうして得られた形質転換体のコロニーよりプラスミドを調製し、その塩基配列を確認したうえ、発現ベクターpET-NE1181と命名した。

[0038] 発現ベクターpET-NE1181に挿入された*Nitrosomonas europaea* ATCC19718株由来NE1181ポリペプチドをコードする塩基配列を配列番号2に、該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1にそれぞれ示す。なお、前記の発現ベクターpET-NE1181によれば配列番号1のアミノ酸配列のポリペプチドのC末端に6残基のヒスチジンを含む8アミノ酸残基からなるヒスチジンタグが付加されたポリペプチドが発現される。

[0039] 実施例2 *N. europaea* ATCC19718株由来NE1181ポリペプチドの調製

実施例1で得られた発現ベクターpET-NE1181で大腸菌BL21 (DE3)株(ノバジェン社製)をトランスフォーメーションし、発現用大腸菌pET-NE1181/BL21 (DE3)を得た。前記の大腸菌を100 μ g/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地中、37℃で培養し、OD_{600nm}=0.6になったところで、IPTG(タカラバイオ社製)を最終濃度1mMになるように加えてポリペプチドの発現を誘導した。誘導開始後2時間後に培養を終了し、菌体を遠心分離により回収した。菌体を300 μ lのリンスバッファー(50mM NaH_2PO_4 、300mM NaCl、10mM イミダゾール、pH8.0)に懸濁した後、超音波破碎機(Handy sonic、トミー社製)を用いて菌体を破碎した。遠心分離により回収した上清に20 μ lのNi-NTA agarose(キアゲン社製)を加え、4℃、30分間放置した。遠心分離して回収した沈澱を100 μ lの洗浄バッファー(50mM NaH_2PO_4 、300mM NaCl、20mM イミダゾール、pH8.0)で2回洗浄した。洗浄後の沈澱に20 μ lの溶出バッファー(50mM NaH_2PO_4 、300mM NaCl、250mM イミダゾール、pH8.0)を加えて懸濁し、遠心して上清を回収した。同じ溶出操作をさらに2回繰り返し、合計60 μ lのNE1181ポリペプチドを含む試料を得た。この試料の一部をSDS-PAGEに供して予想されるサイズのポリペプチドが含有されていることを確認した。また、試料中のNE1181タンパク濃度は約25ng/ μ lであつ

た。

[0040] 実施例3 オリゴリボヌクレオチドを基質としたNE1181ポリペプチドの塩基配列特異性の同定

実施例2で得られたNE1181ポリペプチドのリボヌクレアーゼ活性の塩基配列特異性を調べるために、オリゴリボヌクレオチドを合成し、切断アッセイを行った。

[0041] 基質として、配列番号5～14に示したオリゴリボヌクレオチド10種を合成した。10 μ M オリゴリボヌクレオチド、5ng/ μ lの実施例2で得たNE1181ポリペプチド、10mM Tris-HCl(pH7.5)からなる5 μ lの反応液を37°C、30分間インキュベートした。反応物を20%変性アクリルアミドゲル(20%アクリルアミド、7M尿素、0.5×TBEバッファー)電気泳動に供し、SYBR GREEN II(タカラバイオ社製)で染色した後、蛍光イメージアナライザーFMBIOII Multiview(タカラバイオ社製)を用いて、蛍光画像を解析した。各オリゴリボヌクレオチドの切断の状況を表1に示す。

切断の状況は完全切断を+++、部分切断を++、ごく弱い切断を+、完全未分解を-で示した。さらに、それぞれのオリゴリボヌクレオチドの切断の有無および切断の強さから、切断部位周辺の塩基配列を比較し、配列の特異性を評価した。この結果を表2に示す。

[0042] 以上の結果から、NE1181ポリペプチドは、5'-GA/AU-3'、5'-G/AAU-3'、5'-AA/AU-3'または5'-A/AAU-3'の配列(/は切断部位を示す)を優先的に認識してRNAを切断することが明らかになった。NE1181ポリペプチドは、MazFとは全く異なる塩基配列特異性を有するエンドリボヌクレアーゼであることが明らかになった。

[0043] [表1]

名称	塩基配列および切断部位 (/ は切断された部位を示す)	切断 NE1181
mazG18_12	AGAAGGAGAUUACAU AUG / AAUGA / AAUCGG	+++
MRI011	AAAGA A / AUCUGA AGUCUGA / AUUCUA	+++
ABC005	CAGGAGUCUCAAUCCAGGUUU	-
MRI020	GGGCUAAUCCAAACUCUUUACCCGUCCUG	-
MRI026	AUGUACAGGGAUGUCCUAUGUACUAUGGGG	-
MRI028	UUCACAUAGGGUAUGCAUAUGGAGACAUAG	-
ABC018	AUACUGCAGCUACGACUCCUU	-
MRI024	AUUUACAGGGAUUUCCUAUUUACUAUGGGG	-
MRI013	GGAAAACUCUCAACUCUUAACUCGG	-
ABC019	GGUUAUGUACAGGAACGCAUU	-

切断の表示：+++は完全切断、++は部分切断、+はごく弱い切断を示す。

[0044] [表2]

名称	塩基配列	切断の強さ NE1181
mazG18_12 (1)	G/A A U	+++
mazG18_12 (2)	A/A A U	+++
MRI011(1)	A A/A U	+++
MRI011(2)	G A/A U	+++
ABC005 (1)	C A A U	-
MRI020	U A A U	-
MRI026	G G A U	-
MRI028 (1)	G U A U	-
MRI028 (2)	G C A U	-
ABC005 (2)	G A G U	-
ABC018	G A C U	-
MRI024	G A U U	-
MRI011 (3)	G A A G	-
MRI013	G A A A	-
ABC019	G A A C	-

切断部位：切断された部位は、/ で示した。

産業上の利用可能性

[0045] 本発明により、新規な配列特異的エンドリボヌクレアーゼが提供される。前記酵素はRNA中の特定の配列を認識して切断することができることから、RNA分子の解析、RNA断片の作成、細胞内でのRNA切断を介した細胞の制御(例えばタンパク質生成の阻害)等に有用である。

配列表フリーテキスト

[0046] SEQ ID NO:3; PCR primer NE1181-F to amplify a DNA fragment encoding NE1181 protein.

SEQ ID NO:4; PCR primer NE1181-R to amplify a DNA fragment encoding NE1181 protein.

SEQ ID NO:5; Oligoribonucleotide mazG18_12.

SEQ ID NO:6; Oligoribonucleotide MRI011.

SEQ ID NO:7; Oligoribonucleotide ABC005.

SEQ ID NO:8; Oligoribonucleotide MRI020.

SEQ ID NO:9; Oligoribonucleotide MRI026.

SEQ ID NO:10; Oligoribonucleotide MRI028.

SEQ ID NO:11; Oligoribonucleotide ABC018.

SEQ ID NO:12; Oligoribonucleotide MRI024.

SEQ ID NO:13; Oligoribonucleotide MRI013.

SEQ ID NO:14; Oligoribonucleotide ABC019.

請求の範囲

- [1] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列、または該配列において1個以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換の少なくとも1つを有するアミノ酸配列で示され、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチド。
- [2] 請求項1記載のポリペプチドをコードする核酸。
- [3] 配列表の配列番号2記載の塩基配列を有することを特徴とする請求項2記載の核酸。
- [4] 請求項2または請求項3記載の核酸にストリンジेंटな条件でハイブリダイズ可能であり、かつ配列特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸。
- [5] 請求項2～4いずれか1項に記載の核酸を含んでなる組換えDNA。
- [6] 請求項5記載の組換えDNAにより形質転換されてなる形質転換体。
- [7] 請求項6記載の形質転換体を培養する工程、および該培養物中より配列特異的なRNA切断活性を有するポリペプチドを採取する工程を包含することを特徴とする請求項1のポリペプチドの製造方法。
- [8] 一本鎖RNAに請求項1記載のポリペプチドを作用させる工程を包含することを特徴とする、一本鎖RNA分解物の製造方法。
- [9] 一本鎖RNAに請求項1記載のポリペプチドを作用させる工程を包含することを特徴とする、一本鎖RNAの分解方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/313271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12P19/34(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12P19/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) CA (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No.NC_004757 [retrieved on 22 July, 2006 (22.07.06)] Retrieved from the Internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?30248031:OLD12:619288> 30 April, 2003 (30.04.03) uploaded	<u>1-7</u> <u>8,9</u>
Y	WO 2004/113498 A2 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY), 29 December, 2004 (29.12.04), & EP 1639086 A2	8,9
P, X	WO 2005/074986 A2 (GENOBIOTIX APS), 18 August, 2005 (18.08.05), (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 August, 2006 (08.08.06)

Date of mailing of the international search report
15 August, 2006 (15.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/313271

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WASHIDA et al., "PemK Family Bacteria Toxin ni Okeru Hairetsu Tokuiteki RNase Kassei no Screening", Dai 28 Kai Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 25 November, 2005 (25.11.05), page 464	1-9
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No.NP_841237 [retrieved on 22 July, 2006 (22.07.06)] Retrieved from the Internet <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?30249167:OLD12:619288 > 30 April, 2003 (30.04.03) uploaded, Chain, P. et al., Definition: PemK-like protein	1-9
A	ZHANG, J. et al., "Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK.", J.Biol.Chem., 14 May, 2004 (14.05.04), Vol.279, No.20, pages 20678 to 20684	1-9
A	MUNOZ-GOMEZ AJ et al., "Insights into the specificity of RNA cleavage by the Escherichia coli MazF toxin", FEBS Lett., 2004, Vol.567, Nos.2 to 3, pages 316 to 320	1-9
A	PEDERSEN K. et al., "The bacterial toxin RelE Displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site", Cell, 2003, Vol.112, No.1, pages 131 to 140	1-9
A	CHRISTENSEN SK et al., "Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA", J.Mol.Biol., 2003, Vol.332, No.4, pages 809 to 819	1-9
A	PANDEY DP et al., "Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes", Nucleic Acids Res., 17 February, 2005 (17.02.05), Vol.33, No.3, pages 966 to 976	1-9
A	HAYES F., "Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest", Science, 12 September, 2003 (12.09.03), Vol.301, No.5639, pages 1496 to 1499	1-9
A	GERDES K., "Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress", J.Bacteriol., 2000 Feb., Vol.182, No.3, pages 561 to 572	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/313271

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG Y. et al., "Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase", J.Biol.Chem., 04 February, 2005 (04.02.05), Vol.280, No.5, pages 3143 to 3150	1-9
A	ZHANG Y. et al., "MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in Escherichia coli", Mol.Cell., 2003, Vol.12, No.4, pages 913 to 923	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12P19/34(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, C12P19/34			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) CA (STN) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. NC_004757 [retrieved on 2006.07.22] Retrieved from the Internet <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?30248031:OLD12:619288> 30-APR-2003 uploaded	1-7 8, 9	
Y	WO 2004/113498 A2 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 2004.12.29 & EP 1639086 A2	8, 9	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 8 . 0 8 . 2 0 0 6		国際調査報告の発送日 1 5 . 0 8 . 2 0 0 6	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官（権限のある職員） 引地 進 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 4 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 2005/074986 A2 (GENOBIOTIX APS) 2005. 08. 18 (ファミリーなし)	1-7
P, X	寫田 外, "PemK ファミリーバクテリアトキシンにおける配列特異的 RNase 活性のスクリーニング", 第 28 回日本分子生物学会年会 講演要旨集, 2005. 11. 25, p. 464	1-9
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accessin No. NP_841237 [retrieved on 2006.07.22] Retrieved from the Internet <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?30249167:OLD12:619288> 30-APR-2003 uploaded, Chain, P. et al., Definition: PemK-like protein	1-9
A	ZHANG, J. et al., "Interference of mRNA function by sequence-specific endoribonuclease PemK.", J. Biol. Chem., 2004 May 14, Vol. 279, No. 20, pp. 20678-20684	1-9
A	MUNOZ-GOMEZ AJ et al., "Insights into the specificity of RNA cleavage by the Escherichia coli MazF toxin", FEBS Lett. , 2004, Vol. 567, No. 2-3, p. 316-320	1-9
A	PEDERSEN K et al., "The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site", Cell , 2003, Vol. 112, No. 1, p. 131-140	1-9
A	CHRISTENSEN SK et al., "Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA", J. Mol. Biol., 2003, Vol. 332, No. 4, p. 809-819	1-9
A	PANDEY DP et al., "Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes", Nucleic Acids Res., 2005 Feb 17, Vol. 33, No. 3, pp. 966-976	1-9
A	HAYES F, "Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest", Science, 2003 Sep 12, Vol. 301, No. 5639, pp. 1496-1499	1-9
A	GERDES K, "Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress", J. Bacteriol., 2000 Feb, Vol. 182, No. 3, pp. 561-572	1-9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ZHANG Y et al., "Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase", J. Biol. Chem., 2005 Feb 4, Vol. 280, No. 5, pp. 3143-3150	1-9
A	ZHANG Y et al., "MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in Escherichia coli", Mol. Cell., 2003, Vol. 12, No. 4, pp. 913-923	1-9