

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月14日(14.01.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/006628 A1

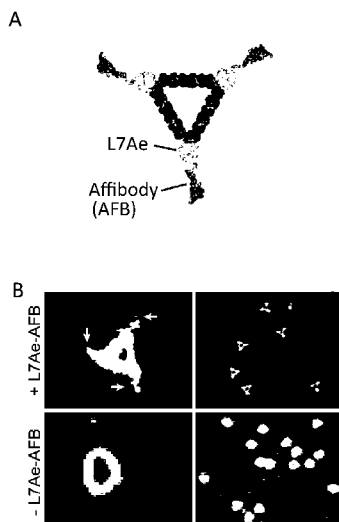
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/069634
- (22) 国際出願日: 2015年7月8日(08.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-141431 2014年7月9日(09.07.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 長田 江里子(OSADA, Eriko); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: RNA-PROTEIN COMPLEX, AND RNA AND PROTEIN DELIVERY SYSTEM USING SAME

(54) 発明の名称: RNA-タンパク質複合体及びこれによるRNAおよびタンパク質のデリバリーシステム

[図9]



(57) Abstract: Provided are an RNA and protein delivery system using an RNA-protein complex having a higher order structure, and an RNA-protein complex having a novel higher order structure.

(57) 要約: 高次構造を有するRNA-タンパク質複合体を利用した、RNAおよびタンパク質のデリバリーシステム、および、新規高次構造を有するRNA-タンパク質複合体。

WO 2016/006628 A1



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

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

RNA-タンパク質複合体及びこれによるRNAおよびタンパク質のデリバリーシステム

技術分野

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

背景技術

[0002] ナノテクノロジーの分野において生体分子を用いたナノスケール構造体の構築が行われており、またタンパク質工学の分野では分子設計による酵素の新規創成が試みられている。それらの試みにおいて使用されている「材料」は核酸あるいはタンパク質である。

[0003] このような核酸およびタンパク質を用いて作製された構造体として、三角形構造体が報告されている（特許文献1および非特許文献1）。

[0004] しかし、このような三角形構造を有する核酸およびタンパク質から成る複合体の機能については知られておらず、その使用方法について具体的な報告はなされていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W02010/010862

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ohno H, et al., Nat Nanotechnol. 2011 6:116-120.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] RNA-タンパク質複合体の特性を利用したRNAまたはタンパク質のデリバリーシステムまたは新規構造を有する機能性RNA-タンパク質複合体

の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、上記課題を解決するためになされたものである。すなわち、本発明は、一実施の形態によれば、細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いて当該細胞の認識能をより高めるため、RNA構造を適宜選択してRNA-タンパク質複合体を用いることを特徴とする。

本発明は、別の実施の形態によれば、機能性RNAおよび機能性タンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を利用して当該機能を発揮させることを特徴とする。

[0009] すなわち、本発明は以下の特徴を有する：

[1] 次の(1)から(3)を含むRNA-タンパク質複合体による、RNAおよびタンパク質のデリバリーシステム。

(1) 次の(i)から(iv)の配列を含むRNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(ii) 15塩基以上の配列を2つ以上、

(iii) 5'末端配列、および

(iv) 3'末端配列であって、

当該(iii)の5'末端配列および(iv)の3'末端配列が合計して15塩基以上の配列であり、

(2) 次の配列を含むRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(b) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ以上、

(c) 前記(1)の(iii)の5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列、

(d) 5'末端配列、および

(e) 3'末端配列であって、

当該 (d) の 5' 末端配列および (e) の 3' 末端配列が、前記 (1) の (ii) の 15 塩基以上の配列に連続して相補的であり、ならびに

(3) 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA と RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも 1 つの融合タンパク質。

[2] 前記 (1) の (i) の RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列が 3 つであり、前記 (2) の (a) の RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列が 3 つであり、前記 (1) の (ii) の 15 塩基以上の配列が 2 つであり、ならびに前記 (2) の (b) の 15 塩基以上の配列に相補的な配列が 1 つである、[1] に記載のシステム。

[3] 前記 (1) の配列、前記 (1) の (iii) の 5' 末端配列および (iv) の 3' 末端配列の合計、前記 (2) の (b) の配列、または (d) に前記 (2) の (d) の 5' 末端配列および (e) の 3' 末端配列の合計が、15 塩基以上 92 塩基以下である、[1] または [2] に記載のシステム。

[4] 前記 (1) の配列、前記 (1) の (iii) の 5' 末端配列および (iv) の 3' 末端配列の合計、前記 (2) の (b) の配列、または (d) に前記 (2) の (d) の 5' 末端配列および (e) の 3' 末端配列の合計を、細胞表面抗原への結合能を高めるように、塩基長が適宜選択されている、[1] から [3] のいずれか 1 項に記載のシステム。

[5] 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA-タンパク質結合モチーフが、K-t u r n モチーフであり、前記 (3) の RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質が、L7Ae である、[1] から [4] のいずれか 1 項に記載のシステム。

[6] 前記 (3) の細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質が、HER2 を認識するタンパク質である、[1] から [5] のいずれか 1 項に記載のシステム。

[7] 前記 HER2 を認識するタンパク質が、Affibody である、[6] に記載のシステム。

[8] 血清存在下でデリバリーが行われる、[1] から [7] のいずれか 1 項に記

載のシステム。

[9] 次の (1) から (4) を含む RNA-タンパク質複合体；

(1) 次の (i) から (iii) の配列を含む RNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、

(ii) 7 塩基以上の配列を 2 つ、および

(iii) siRNA 配列、

(2) 次の (a) から (d) の配列を含む RNA；

(a) 前記 (1) の (i) と共に RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列

(b) 前記 (1) の前記 (ii) の 2 つの 7 塩基以上の配列に連続して相補的な 14 塩基以上の配列を 2 つ以上、

(c) 5' 末端配列、および

(d) 3' 末端配列であって、

当該 (c) の 5' 末端配列および (d) の 3' 末端配列が、前記 (1) の前記 (ii) の 7 塩基以上の配列に連続して相補的であり、

(3) 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA と RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質を少なくとも 1 つ、ならびに

(4) 前記 (1) の (iii) の siRNA 配列に相補的な配列を含む RNA。

[10] 前記 (1) の RNA が 3 つであり、前記 (2) の (b) の 14 塩基以上の配列を 2 つであり、および前記 (4) の RNA が 3 つである、請求項 9 に記載の RNA-タンパク質複合体。

[11] 前記 (1) の (ii) の配列が、7 塩基以上 85 塩基以下であり、前記 (2) の (b) の配列が、14 塩基以上 92 塩基以下である、[9] または [10] に記載の RNA-タンパク質複合体。

[12] 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA-タンパク質結合モチーフが、K-t u r n モチーフであり、前記 (3) のタンパク質が、L7Ae である、[9] から [11] のいずれか 1 項に記載の RNA-タン

パク質複合体。

[13]前記(3)のタンパク質が、細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質または膜透過性ペプチドをさらに含む融合タンパク質である、[9]から[12]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体。

[14]前記膜透過性ペプチドが、AntP、HIV由来のTAT、Penetratin、Buforin II、Transportan、MAP、K-FGF、Ku70、Prion、pVEC、Pep-1、Pep-7、SynB1、HN-IおよびHSV由来のVP22から成る群より選択されるペプチドである、[13]に記載のRNA-タンパク質複合体。

[9]から[14]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体による、RNAおよびタンパク質のデリバリーシステム。

[15][9]から[14]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、RNA阻害剤。

[16][9]から[14]のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体と細胞を接触させる工程を含む、細胞内のmRNAを分解する方法。

[17]前記RNA-タンパク質複合体と細胞を血清存在下で接触させる、[16]に記載の方法。

[18](1) 次の配列を含むRNA；

- (i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、
- (ii) 15塩基以上の配列を2つ以上、ならびに
- (iii) 合わせて15塩基以上の配列から成る5'末端配列および3'末端配列、

(2) 次の配列を含むRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(b) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ以上、

(c) 前記(1)の(iii)の5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列、および

(d) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に連続して相補的な5'末端

配列および3'末端配列、ならびに

(3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質、を含むRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、前記(1)の(iii)の配列、前記(2)の(b)の配列、および前記(2)の(d)の配列の塩基長を選択する方法。

[19] (1) 次の(i)から(iii)の配列を含むRNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、

(ii) 7塩基以上の配列を2つ、および

(iii) siRNA配列、

(2) 次の(a)から(d)の配列を含むRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列

(b) 前記(1)の前記(ii)の2つの7塩基以上の配列に連続して相補的な14塩基以上の配列を2つ以上、

(c) 5'末端配列、および

(d) 3'末端配列であって、

当該(c)の5'末端配列および(d)の3'末端配列が、前記(1)の前記(ii)の7塩基以上の配列に連続して相補的であり、

(3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質、ならびに

(4) 前記(1)の(iii)のsiRNA配列に相補的な配列を含むRNA、を含むRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、および前記(2)の(b)の配列の塩基

長を選択する方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、本発明で提供される細胞表面抗原への結合能を有するタンパク質を含むRNA-タンパク質複合体を用いることで、タンパク質単独によって成し得る認識能よりもより強く対象となる細胞を認識することができるため、有利である。また、機能的RNAを含むRNA-タンパク質複合体を用いても当該RNAの機能が発揮されることから、各機能的タンパク質および機能的RNAの組み合わせを用いることで、所望の機能を保持するRNA-タンパク質複合体を提供できるため、有利である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、各RNA-タンパク質複合体のRNA (LS-15 RNA、LS-26 RNA、LS-48 RNA、LS-70 RNA、およびLS-92 RNA) の構造を示す。

[図2]図2Aは、LS-15 RNAへ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図2Bは、LS-26 RNAへ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図2Cは、LS-48 RNAへ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図2Dは、LS-70 RNAへ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図2Eは、LS-92 RNAへ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図2Fは、LS-26、LS-26_{mut1}、LS-26_{mut2}、LS-26_{mut3}へ各濃度のL7Aeを添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。

[図3]図3は、各RNA-タンパク質複合体のRNA (LS-15 RNA、LS-26 RNA、LS-48 RNA、LS-70 RNA、およびLS-92 RNA) へL7Aeを添加した場合 (+ L7Ae

）またはL7Aeを添加しなかった場合（- L7Ae）にける高速AFM（HS-AFM）像を示す。各上図は下図を拡大した像を示す。

[図4]図4は、LS-26、LS-26_{mut1}、LS-26_{mut2}、LS-26_{mut3}へL7Aeを添加した場合（+ L7Ae）またはL7Aeを添加しなかった場合（- L7Ae）にける高速AFM（HS-AFM）像を示す。

[図5]図5は、LS-26、LS-26_{mut1}、LS-26_{mut2}、LS-26_{mut3}へL7Aeを添加した場合における、RNA-タンパク質複合体中のL7Aeの取り込み量を測定した結果を示す。

[図6]図6は、LS-26へL7Aeを添加した時の高速AFM（HS-AFM）で解析したタイムラプス像（30 sec、35 sec、および85 sec）を示す。上図には、構造の模式図を示す。

[図7]図7は、LS-26またはRNA-タンパク質複合体（Tri-26）へPhenol処理および20% FBSを添加して30分、60分または120分インキュベートした後のゲルシフトアッセイの結果を示す。

[図8]図8は、LS-26またはRNA-タンパク質複合体（Tri-26）へPhenol処理および20% ヒト血清を添加して30分、60分または120分インキュベートした後のゲルシフトアッセイの結果を示す。

[図9]図9Aは、Affibodyを有するRNA-タンパク質複合体の模式図を示す。図9Bは、L7Ae-Affibody融合体を添加（+L7Ae-Affibody）または非添加（- L7Ae-Affibody）のLS-26の高速AFM（HS-AFM）像を示す。左図は右図の拡大像を示す。

[図10]図10Aは、LS-15 RNAへ各濃度のL7Ae-Affibody融合体を添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図10Bは、LS-26 RNAへ各濃度のL7Ae-Affibody融合体を添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図10Cは、LS-48 RNAへ各濃度のL7Ae-Affibody融合体を添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タ

ンパク質複合体の構造を示す。図1 ODは、LS-70 RNAへ各濃度のL7Ae-Affibody融合体を添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。図1 OEは、LS-92 RNAへ各濃度のL7Ae-Affibody融合体を添加した際のゲルシフトアッセイの結果を示す。図右に、各バンドにおける想定されるRNA-タンパク質複合体の構造を示す。

[図11]図1 1は、乳癌細胞株（SKBR3）へ各Affibodyを有するRNA-タンパク質複合体（Tri-15-AFB、Tri-26-AFB、Tri-48-AFB、Tri-70-AFB、およびTri-92-AFB）を添加した際に、当該細胞へ結合したRNA-タンパク質複合体量を意味する蛍光強度を示す。

[図12]図1 2 Aは、各乳癌細胞株（SKBR3、MCF-7およびMDA-MB-231）へAffibodyを有するRNA-タンパク質複合体（Tri-26-AFB）を添加した際に、当該細胞へ結合したRNA-タンパク質複合体量を意味する蛍光強度を示す。図1 2 Bは、各乳癌細胞株（SKBR3、MCF-7およびMDA-MB-231）へAffibodyを有するRNA-タンパク質複合体（Tri-26-AFB）を添加した後の染色像（Alexa 647（RNAを呈す）、Hoechst（細胞核を呈す））を示す。

[図13]図1 3は、乳癌細胞株（SKBR3）へ各変異モチーフおよびAffibodyを有するRNA-タンパク質複合体（Tri-26-AFB、Tri-26_{mut1}-AFB、Tri-26_{mut2}-AFB、およびTri-26_{mut3}-AFB）を添加した際に、当該細胞へ結合したRNA-タンパク質複合体量を意味する蛍光強度を示す。

[図14]図1 4は、RNA-タンパク質複合体のRNA（LS-26-siGFP RNA）の構造を示す。

[図15]図1 5は、L7Aeを添加（+L7Ae）または非添加（-L7Ae）のLS-26-siGFP RNAの高速AFM（HS-AFM）像を示す。左図は右図の拡大像を示す。

[図16]図1 6は、LS-26-siGFP RNAの構成要素であるL1、L2、L3、SおよびASを各組み合わせで含むRNAにL7Aeを添加または非添加の場合もしくは陽性対照としてsh-GFPをDicerの存在下または非存在下で基質であるsh-GFPに接触させた際のゲルシフトアッセイの結果を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は本発明を限定するものではない。

[0013] 本発明の一実施形態によれば、RNA-タンパク質複合体による、RNAおよびタンパク質のデリバリーシステムを提供する。デリバリーシステムとは、標的物へ所望の物質を送達させるシステムであり、本発明においては、RNAおよび／またはタンパク質を細胞へ送達するためのRNA-タンパク質複合体と言い換えることもできる。

[0014] 本発明のRNA-タンパク質複合体の一実施形態は、次の(1)から(3)を含む第一のRNA-タンパク質複合体である；

(1) 次の(i)から(iv)の配列を含む第一のRNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(ii) 15塩基以上の配列を2つ以上、

(iii) 5'末端配列、および

(iv) 3'末端配列であって、

当該(iii)の5'末端配列および(iv)の3'末端配列が合計して15塩基以上の配列であり、

(2) 次の(a)から(e)の配列を含む第二のRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(b) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ以上、

(c) 前記(1)の(iii)の5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列、

(d) 5'末端配列、および

(e) 3'末端配列であって、

当該(d)の5'末端配列および(e)の3'末端配列が、前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に連続して相補的であり、ならびに

(3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとR

N A－タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質。

[0015] 本発明において、(1)の(i)RNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、天然または既知のRNA－タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフに含まれるRNA側、または試験管内進化法(in vitro selection法)により得られた人工的なRNA－タンパク質結合モチーフに含まれるRNA側である。

[0016] 天然のRNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列は、通常、約5～30塩基で構成されており、特定のアミノ酸配列を保有するタンパク質と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成することが知られている。このような天然のRNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列は、以下の表1及び表2、及びウェブサイト上で利用できるデータベース：<http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/image/dna-protein/RNA/RNA.html>から、所望の構造変化を生ずるモチーフを適宜選択して入手することができる。本実施形態において好ましく用いられるRNA－タンパク質結合モチーフは、X線結晶構造解析またはNMRによる構造解析が既に行われているモチーフ、あるいは構造解析がなされている相同タンパク質の立体構造から立体構造を推定可能なモチーフである。さらに、タンパク質がRNAの二次構造及び塩基配列を特異的に認識するモチーフであることが好ましい。

[0017]

[表1]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
5S RNA (Xenopus laevis oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
5S RNA (Xenopus laevis oocyte)	5R2	0.35 ± 0.03 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
dsRNA	B2	1.4 ± 0.13 nM	Nat Struct Mol Biol. 2005 Nov;12(11):952-7
RNA splicing motif with UGCAUGU element	Fox-1	0.49 nM at 150mM salt	EMBO J. 2006 Jan 11;25(1):163-73.
TGE	GLD-1	9.2 ± 2 nM	J Mol Biol. 2005 Feb 11;346(1):91-104.
sodB mRNA	Hfq	1.8 nM	EMBO J. 2004 Jan 28;23(2):396-405.
RyhB (siRNA)	Hfq	1500 nM	Annu Rev Microbiol. 2004;58:303-28
mRNA	HuD	0.7 ± 0.02 nM	Nat Struct Biol. 2001 Feb;8(2):141-5
S domain of 7S RNA	human SRP19		RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50. Epub 2005 May 31
Large subunit of SRP RNA	human SRP19	2 nM	Nat Struct Biol. 2001 Jun;8(6):515-20
23S rRNA	L1		Nat Struct Biol. 2003 Feb;10(2):104-8
23S rRNA	L11		Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
5S rRNA	L18		Biochem J. 2002 May 1;363(Pt 3):553-61
23S rRNA	L20	13 ± 2 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site1	L20	88 ± 23 nM	J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):36522-30.
Own mRNA site2	L20	63 ± 23 nM	Mol Microbiol. 2005 Jun;56(6):1441-56
23S rRNA	L23		J Biomol NMR. 2003 Jun;26(2):131-7
5S rRNA	L25		EMBO J. 1999 Nov 15;18(22):6508-21
Own mRNA	L30		Nat Struct Biol. 1999 Dec;6(12):1081-3.
mRNA	LicT		EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1987-97
Own mRNA	MS2 coat	39 ± 5 nM	FEBS J. 2006 Apr;273(7):1463-75
Stem-loop RNA motif	Nova-2		Cell. 2000 Feb 4;100(3):323-32
SL2	Nucleocapsid	110 ± 50 nM	J Mol Biol. 2000 Aug 11;301(2):491-511
Pre-rRNA	Nucleolin		EMBO J. 2000 Dec 15;19(24):6870-81
	p19	0.17 ± 0.02 nM	Cell. 2003 Dec 26;115(7):799-811
Box C/D	L7Ae	0.9 ± 0.2 nM	RNA. 2005 Aug;11(8):1192-200.

[0018] [表2]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
siRNA with the characteristic two-base 3' overhangs	PAZ(PiWi Argonaut and Zwiile)		Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.
dsRNA	Rnase III		Cell. 2006 Jan 27;124(2):355-66
HIV-1 RRE (IIB)	RR1-38	3-8 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
Own mRNA	S15	5 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S15	6 nM	Nat Struct Biol. 2000 Apr;7(4):273-277.
Own mRNA	S15	43 nM	EMBO J. 2003 Apr 15;22(8):1898-908
16S rRNA	S4	6.5 μ M in 4°C, 1.7 nM in 42°C	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S4	18 μ M	J Biol Chem. 1979 Mar 25;254(6):1775-7
16S rRNA	S8	26 $\pm$ 7 nM	J Mol Biol. 2001 Aug 10;311(2):311-24
mRNA	S8	200 nM	RNA. 2004 Jun;10(6):954-64
mRNA	SacY	1400 nM	EMBO J. 1997 Aug 15;16(16):5019-29
SnRNA	Sm		Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:313-20.
tmRNA	SmpB	21 $\pm$ 7 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
TD3 of tmRNA	SmpB	650 nM	J Biochem (Tokyo). 2005 Dec;138(6):729-39
U1 snRNA	snRNP U1A	0.032 $\pm$ 0.007 nM (salt dependence)	Nat Struct Biol. 2000 Oct;7(10):834-7
S domain of 7S RNA	SRP54	500 nM	RNA. 2005 Jul;11(7):1043-50.
TAR	Tat	200-800 nM	Nucleic Acids Res. 1996 Oct 15;24(20):3974-81
BIV TAR	Tat	1.3 nM or 8 nM or 60 nM (Mg の違いで変わる)	Mol Cell. 2000 Nov;6(5):1067-76
tRNA ^{Thr}	ThrRS	500 nM	Nat Struct Biol. 2002 May;9(5):343-7
thrS mRNA operator	ThrRS	10 nM	Trends Genet. 2003 Mar;19(3):155-61
Single stranded mRNA	TIS11d		Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):257-64.
PSTVd	Virp1	500 nM	Nucleic Acids Res. 2003 Oct 1;31(19):5534-43
RNA hairpin; Smaug recognition element (SRE)	Vts1p	30 nM	Nat Struct Mol Biol. 2006 Feb;13(2):177-8.
λ BoxB	λ N	90 nM	Cell. 1998 Apr 17;93(2):289-99

[0019] 人工のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとは、人工的に設計したRNA-タンパク質複合体における、RNAとタンパク質との結合モチーフ中のRNA側である。このようなRNAの塩基配列は、通常、約10～80塩基で構成されており、特定のタンパク質の特定のアミノ酸配列と、非共有結合的に、すなわち水素結合により、特異的な結合を形成するように設計する。このような人工的なRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を含むRNAとしては、特定のタンパク質に特異的に結合するRNAアプタマーが例示される。標的となる所望のタンパク質に対し特異的に結合するRNAアプタマーは、例えば、in vitro selection法またはSELEX法として知られている進化工学的手法より得ることができる。このときのトリガータンパク質は、当該RNAアプタマーが結合するタンパク質となる。例えば、以下の表3に挙げるRNA配列が知られており、これらもまた本発明のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列として用いることができる。

[0020]

[表3]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
Rev aptamer 5	Rev	190 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
Aptamer	p50	5.4 ± 2.2 nM	Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9268-73.
BMV Gag aptamer	BMV Gag	20 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
BMV Gag aptamer	CCMV Gag	260 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	CCMV Gag	280 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57
CCMV Gag aptamer	BMV Gag	480 nM	RNA. 2005 Dec;11(12):1848-57

[0021] 本実施形態において、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列は、対応するタンパク質との解離定数 K_d が、約 0.1 nM ～約 $1\text{ }\mu\text{M}$ 程度であるものが好ましい。

[0022] また、これらのRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列自体に加え、このような配列の変異体も本発明による当該配列に包含される。本発明で述べる変異体とは、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間の解離定数 K_d が 10% 、 20% 、 30% 、 40% または 50% 以上高い変異体もしくは 10% 、 20% 、 30% 、 40% または 50% 以下の変異体である。このような変異体は、RNA-タンパク質複合体が形成できる限り、適宜選択して用いることができる。また、このような変異体の塩基配列は、当該RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列（正鎖）に対する相補的な配列を有する核酸（相補鎖）とストリンジントな条件でハイブリダイズすることができる程度の塩基配列でもよい。ここでストリンジントな条件は、Berger and Kimmel(1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152, Academic Press, San Diego CA) に教示されるように、結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「 $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 37°C 」程度の条件を挙げることができる。相補鎖は、かかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、より厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.5\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 42°C 」程度の洗浄条件、さらに厳しくは「 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ 、 65°C 」程度の洗浄条件で洗浄しても正鎖と相補鎖とがハイブリダイズ状態を維持する条件を挙げることができる。具体的には、上述のRNA-タンパク質結合モチーフに含まれるRNAの配列と少なくとも 90% 、好ましくは少なくとも 95% 、 96% 、 97% 、 98% または 99% の配列同一性を有する塩基配列からなる。かかる変異体は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列に特異的に結合するタンパク質との間で、一定

の結合を保持し、RNA-タンパク質複合体の形成に寄与することができる。

- [0023] 本実施形態によるRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列の具体的な例としては、L7Ae (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) が結合する配列である、boxC motif (5' -GGCGUGAUGAGC-3') (配列番号1)、kink-loop (配列番号2)、kink-loop 2 (配列番号3) が挙げられる。
- [0024] 別の具体例としては、MS2 コートタンパク質が特異的に結合する配列であるMS2 ステムループモチーフ (22: Keryer-Bibens C, Barreau C, Osborne HB (2008) Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. Biol Cell 100:125-138)、バチルスのリボソームタンパク質S15 が結合する配列であるFr15 (24: Batey RT, Williamson JR (1996) Interaction of the Bacillus stearothermophilus ribosomal protein S15 with 16S rRNA: I. Defining the minimal RNA site. J Mol Biol 261:536-549) が挙げられる。
- [0025] さらに具体例には、アミノアシル化を行う酵素であって、自身のmRNA に結合し、翻訳を阻害するフィードバック阻害を持つことが知られているThreonyl-tRNA synthetase (Cell (Cambridge, Mass.) v97, pp. 371-381 (1999)) が結合する配列である、5' -GGCGUAUGUGAUCUUUCGUGUGGGUCACCACUGCGCC-3' (配列番号4)、およびその変異体がある。また、癌細胞特異的な内在性タンパク質であるBcl-2 ファミリーCED-9 由来のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する塩基配列である、R9-2; 5' -GGGUGCUUCGAGCGUAGGAAGAAAGCCGGGGGCUGCAGAUAAUGUAUAGC-3' (配列番号5)、およびその変異体、NF- κ B に結合するRNA 配列のアプタマー由来の塩基配列およびその変異体が挙げられる。

[0026] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第一のRNAに含まれる、(ii) 15塩基以上の配列、(iii) 5'末端配列、および(iv) 3'末端配列は任意の配列であって良いが、好ましくは互いに相補的な配列を含まず、第一のRNA単独で3次構造を取らない配列が例示される。

[0027] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第一のRNAに含まれる、(iii) の5'末端配列および(iv) の3'末端配列が合計して15塩基以上とは、当該5'末端配列と3'末端配列とが連結した場合において、15塩基以上であることを意味し、例えば、5'末端配列が、1塩基であった場合、3'末端配列は14塩基以上であることを意味する。

[0028] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第一のRNAは、例えば、(5'末端配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列) - [(15塩基以上の配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列)]_n - (3'末端配列) の順に構成され、ここで「-」は連結を意味し、[(15塩基以上の配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列)]_nは連結した配列がn回繰り返されることを意味する。当該繰り返しは、例えば、2回から10回が例示されるが、好ましくは、[(15塩基以上の配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列)] は2回の繰り返しであり、すなわち第一のRNAは、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ、15塩基以上の配列を2つ有する1つのRNAである。

[0029] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第二のRNAに含まれる、第一のRNAに含まれる配列と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列とは、上述したRNA-タンパク質結合モチーフを形成する場合において、当該モチーフの形成を補助する配列であり、選択するRNA-タンパク質結合モチーフによっては、当該配列は省略することもでき、例えば、RNA-タンパク質結合モチーフの一部に相補的な配列を含む配列である。例えば、第一のRNAに含まれるRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列が、boxC motif (配列番号1) である場合、当該配列は、boxD

motif（配列番号6）であり、この場合のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する二本鎖RNAをK-turnと称することもある。

[0030] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第二のRNAに含まれる、第一のRNAに含まれる5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列とは、当該5'末端配列と3'末端配列とが連結して3'末端配列－5'末端配列の順で成るRNAの配列に対して相補的な配列を意味する。第一のRNAに含まれる5'末端配列および3'末端配列は、合わせて15塩基以上であることが望ましいことから、第二のRNAに含まれる相補的な配列も15塩基以上であることが望ましい。

[0031] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第二のRNAに含まれる、5'末端配列および3'末端配列が、第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に連続して相補的であるとは、当該5'末端配列と3'末端配列とが連結して3'末端配列－5'末端配列の順で成るRNAの配列が、第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に対して相補的であることを意味する。従って、第二のRNAに含まれる5'末端配列および3'末端配列は、合わせて15塩基以上であることが望ましい。

[0032] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる第二のRNAは、例えば、（5'末端配列）－（第一のRNAと共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列）－〔（第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に相補的な配列）－（第一のRNAと共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列）〕_n－（3'末端配列）の順に構成され、いずれか、一つの（第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に相補的な配列）を、（第一のRNAに含まれる5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列）に置き換えることによって得られる。第二のRNAにおける“〔”および“〕”で囲まれる部分の繰り返しの数nは、第一のRNAの繰り返しの数nと同一であり、2回の繰り返しの場合、第二のRNAは、第一のRNAと共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ、第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ有する1つのRNAである

。

[0033] 第一のRNA-タンパク質複合体に含まれるタンパク質は、少なくとも1つが、(3)の融合タンパク質であれば、残りの2つ以上は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質であればよく、融合タンパク質でなくてもよい。本発明において融合タンパク質とは、2種類以上のタンパク質が機能的に連結しているタンパク質を意味する。機能的に連結しているとは、当該タンパク質が機能するように連結されていることを意味し、例えば、スペーサー配列を介しての連結が挙げられる。スペーサー配列は、任意の2～200アミノ酸の配列とすることが好ましい。スペーサー配列のアミノ酸配列は、融合タンパク質に含まれるタンパク質の機能に悪影響を与えない配列であれば特に制限されないが、配列番号28に記載のアミノ酸配列である。(3)の融合タンパク質は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質を少なくとも含んでなる。当該タンパク質は、RNA-タンパク質結合モチーフのRNAに合わせて適宜選択することができる。特に限定されないが、例えば、表1、表2、表3に記載のタンパク質(蛋白質)である。本発明の一実施態様において、RNA-タンパク質結合モチーフがK-turnである場合、L7Ae (Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)) が例示される。

[0034] 本発明の第一のRNA-タンパク質複合体に含まれる(3)の少なくとも一つの融合タンパク質は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する機能に加え、細胞表面抗原を特異的に認識する機能を有する融合タンパク質であり、例えば、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質と細胞表面抗原を特異的に認識する機能を有するタンパク質との融合タンパク質である。

[0035] 本発明において、細胞表面抗原を特異的に認識する機能を有するタンパク質とは、細胞表面抗原と特異的に結合するタンパク質であり、例えば、抗体、リガンドタンパク質、およびAffibodyが挙げられる。Affibodyは、Protein A のIgG 結合ドメインの一部を改変して作製したタンパク質であり、スクリ

ーニングによって所望の細胞表面抗原と結合するAffibodyを適宜選択することができる。細胞表面タンパク質が、HER2であるとき、Affibodyとして、(ZHER2:342)2 (Lina E., et al., PLOS ONE 2012, 7, 11, e49579)、Anti-ErbB 2 Affibody Molecule (ab31889) (アブカム社)などが例示される。

[0036] 本発明において、RNA-タンパク質複合体に含まれるタンパク質の数は、第一のRNAに含まれるRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列の数に依存するため、3つ以上を含有させることが可能である。3つ以上のタンパク質のうち、少なくとも1つが、(3)の融合タンパク質であればよく、2つ以上の(3)の融合タンパク質を含んでいてもよい。2つ以上の(3)の融合タンパク質を含む場合、これらは、同種の(3)の融合タンパク質であってもよく、異なる(3)の融合タンパク質であってもよい。RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列に依存し結合する、特異的なタンパク質を用いることが可能であるため、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を適宜変更し、かつ、これに所望のタンパク質を融合させることで、所望のタンパク質をRNA-タンパク質複合体に含ませることが可能となる。RNA-タンパク質複合体に含まれるタンパク質は、任意選択的に、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および他の機能的タンパク質を含む融合タンパク質を1種または2種以上含んでも良い。

[0037] 本発明において、他の機能的なタンパク質とは、膜透過性ペプチド、シグナルペプチド、エンドソームリリースペプチドまたは細胞障害性タンパク質などが例示される。

[0038] 本発明において、融合タンパク質は、互いに機能の異なる他の機能的なタンパク質を2種以上含んで成るタンパク質でもよく、例えば、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質、細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質および膜透過性ペプチドの融合タンパク質でも良い。あるいは、これらと、エンドソームリリースペプチド含むタンパク質の融合タンパク質であっても良い。

[0039] 本発明において、膜透過性ペプチドとは、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT (Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988))又はGreen, M. & Loewenstein, P. M. Cell 55, 1179-88 (1988))、Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994))、Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000))、Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998))、MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998))、K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995))、Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003))、Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002))、pVEC (Elmqvist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001))、Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001))、Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002))、SynB1 (Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000))、及びHSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインなどが例示される。膜透過性ペプチドを、RNA-タンパク質複合体に含ませることにより、RNA-タンパク質複合体を、細胞膜を透過させることにより細胞内部に輸送することが可能である。

[0040] 本発明において、シグナルペプチドとは、タンパク質の細胞内の特定のオルガネラに輸送または局在化に係わるアミノ酸配列であり、オルガネラとしては、核、細胞質、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、またはペルオキシソームなどが例示され、機能を発揮させたい所望のオルガネラに輸送および局在化するシグナルペプチドを適宜選択することができる。例えば、後述する第二のRNA-タンパク質複合体に含まれるsiRNAの機能を発揮させたい場合、細胞質輸送を成し得るシグナルペプチドが好ましく、そのようなシグナルペプチドとして核外輸送シグナル (NES) が例示される (WO 2012/008361)。NESの具体例としては、下記の配アミノ酸配列を有するペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

LPPLERLTL	[配列番号 7] (HIV-1 Revタンパク由来NES配列)
ALQKKLEELDE	[配列番号 8] (MAPKK由来NES配列)
LALKLAGLDI	[配列番号 9] (PKI- α 由来NES配列)
SLEGAVSEISLRD	[配列番号 10] (Dsk-1由来NES配列)
LPVLENLTL	[配列番号 11] (TFIIIA由来NES配列)
LASLMNLGMS	[配列番号 12] (Matrin3由来NES配列)

[0041] 本発明において、細胞障害性タンパク質とは、免疫細胞を誘因するタンパク質、細胞死を誘発するタンパク質、細胞膜に孔を生じさせるタンパク質などが例示される。免疫細胞を誘因するタンパク質として、抗体のFc部位、補体などが例示され、細胞死を誘発するタンパク質として、 β -ガラクトシダーゼ、ジフテリア毒素、シュードモナス毒素、リシン、コレラ毒素、網膜芽細胞腫遺伝子、p 53、単純ヘルペスチミジンキナーゼ、水痘-帯状疱疹チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、シトクロムp-4502 B1、チミジンホスホリラーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、カルボキシペプチダーゼAおよびG2、リナマラーゼ(linamarase)、 β -ラクタマーゼおよびキサンチンオキシダーゼが例示され、細胞膜に孔を生じさせるタンパク質として、パーフォリン、*Bacillus thuringiensis* A1470 株が産生するパラスポリンなどが例示される。細胞障害性タンパク質を、RNA-タンパク質複合体に含ませることにより、RNA-タンパク質複合体がデリバリーされた細胞において、免疫細胞の誘因、細胞死、細胞膜に孔を生じさせるなどの機能を発揮させることができる。

[0042] 本発明において、エンドソームリリースペプチドとは、エンドサイトーシスにより取り込まれた構造体が、このペプチドの効果によりエンドソームから脱出し、構造体を細胞質へ移行させることで、リソソームによる分解を回避する効果などを有するペプチドが例示される。例えば、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンおよびGALAなどが例示される。エンドソームリリースペプチドをRNA-タンパク質複合体に含ませることにより、当該複合体を細胞質へ移行させることができる。例えば、標的細胞にデリバリーされる

R N A－タンパク質複合体が細胞表面より内部に輸送され、エンドソームにトラップされた場合、細胞質に移行することで標的遺伝子の発現をノックダウンする機能を発揮させることができる。

[0043] 本発明の第一のR N A－タンパク質複合体に含まれる15塩基以上の配列とは、特に上限はなくとも良いが、例えば、150塩基以下、100塩基以下、92塩基以下、90塩基以下、80塩基以下、70塩基以下、60塩基以下、50塩基以下、48塩基以下の配列であり、より好ましくは、26塩基の配列である。

[0044] 本発明の第一のR N A－タンパク質複合体は、これを構成する第一のR N A、第二のR N A、融合タンパク質もしくはタンパク質のそれぞれを、上記の分子的特徴を備えるように設計する工程と、第一のR N A、第二のR N A、融合タンパク質もしくはタンパク質のそれぞれを通常の遺伝子工学的手法によって得る工程と、当業者に公知の条件下において第一のR N A、第二のR N A、融合タンパク質を混合し、複合体を形成させる工程とにより得ることができる。遺伝子工学的手法によって得る工程は、第一のR N A、第二のR N A、融合タンパク質もしくはタンパク質のそれぞれは、プロモーター配列を含むテンプレートDNAを鋳型として用いたin vitro合成法により、得ることができる。複合体を形成させる工程は、自体公知のR N A鎖をハイブリダイズする条件によりR N A二重鎖を作製後、タンパク質と接触させることによって行い得る。このように形成された第一のR N A－タンパク質複合体は、水溶液系でR N A及び蛋白質のデリバリーシステムを実施するために用いられる。

[0045] 本発明の第一のR N A－タンパク質複合体を利用したデリバリーシステムを用いる場合、タンパク質のみを用いるデリバリーシステムよりも細胞認識効率が上がることが確認されている。従って、より効率的なデリバリーを成し得るため、適宜R N A－タンパク質複合体に含まれるR N Aまたはタンパク質を選択することができる。好ましくは、R N Aの配列の長さを適宜選択することによって、細胞認識効率を上げることができる。R N Aの配列は、

当該RNAに含まれる15塩基以上の配列、5'末端配列、および3'末端配列を適宜変更することで行い得る。特には、当該RNAに含まれる15塩基以上の配列の塩基数、及び、5'末端配列、および3'末端配列の合計の塩基数を適宜変更することで行い得る。変更は、特には、細胞表面抗原の結合能を高める観点から実施することができる。したがって、塩基数を適宜変更した第一のRNA-タンパク質複合体を用いて、所望の細胞表面抗原に対する結合能を測定することで、細胞認識能が高くなる塩基数を決定することができる。この点で、本発明は、一実施形態によれば、第一のRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、前記(1)の(iii)の配列、前記(2)の(b)の配列、および前記(2)の(d)の配列の塩基長を選択する方法ということもできる。

[0046] 第一のRNA-タンパク質複合体を含むデリバリーシステムにおいて、RNAは通常血清の存在下では分解されやすいが、当該複合体を形成させることにより本発明は、血清存在下で実施することができ。血清としては、特に限定されないが、デリバリーシステムにおいて、対象となる細胞と同種起源の血清が例示され、例えば、ウシ胎児血清、ヒト血清等が挙げられる。血清存在下での実施の一つの態様として、第一のRNA-タンパク質複合体を対象となる生体に、静脈内投与することが例示される。

[0047] 本発明のRNA-タンパク質複合体の他の実施形態は、次の(1)から(4)を含む第二のRNA-タンパク質複合体である；

(1) 次の(i)から(iii)の配列を含む第一のRNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、

(ii) 7塩基以上の配列を2つ、および

(iii) siRNA配列、

(2) 次の(a)から(d)の配列を含む第二のRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列

- (b) 前記 (1) の前記 (ii) の 2 つの 7 塩基以上の配列に連続して相補的な 14 塩基以上の配列を 2 つ以上、
 - (c) 5' 末端配列、および
 - (d) 3' 末端配列であって、
- 当該 (c) の 5' 末端配列および (d) の 3' 末端配列が、前記 (1) の前記 (ii) の 7 塩基以上の配列に連続して相補的であり、
- (3) 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA と RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質を少なくとも 1 つ、ならびに
- (4) 前記 (1) の (iii) の siRNA 配列に相補的な配列を含む第三の RNA。

[0048] 本発明の第二の RNA-タンパク質複合体において用いられる第一の RNA に含まれる RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、および第一の RNA と共に RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列は、上述の第一の RNA-タンパク質複合体と同一のものが用いられ得る。

[0049] 本発明の第二の RNA-タンパク質複合体の第一の RNA に含まれる 7 塩基以上の配列は、任意の配列であって良いが、好ましくは他の 7 塩基以上の配列に相補的な配列を含まず、第一の RNA 単独で 3 次構造を取らない配列が例示される。

[0050] 本発明の第二の RNA-タンパク質複合体の第一の RNA に含まれる siRNA 配列とは、siRNA を構成する二本鎖 RNA の一方の RNA 配列であって、RNA 干渉の標的となる任意の mRNA の一部であり、好ましくは、18 塩基から 35 塩基の配列である。このような配列は、種々の web サイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、いずれも Ambion が提供する siRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) 及び pSilencer™ Expression Vector 用 インサート デザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html)、RNAi Codex が提供する Gene

Seer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) が挙げられるがこれらに限定されず、QIAGEN、タカラバイオ、SiSearch、Dharmacon、Whitehead Institute、Invitrogen、Promega等のwebサイト上でも同様に検索が可能である。

[0051] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体の第一のRNAは、例えば、5' (siRNA配列) - (7塩基以上の配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列) - (7塩基以上の配列) 3' の順または、5' (7塩基以上の配列) - (RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列) - (7塩基以上の配列) - (siRNA配列) 3' の順に構成される。

[0052] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体において、第一のRNAは、少なくとも3つ以上含まれることが好ましく、例えば、10、9、8、7、6、5、4などが挙げられる。最も好ましくは、3である。RNA-タンパク質複合体の第一のRNAは、互いに異なる配列を有しても良く、また、同じ配列で構成されても良い。ただし、当該第一のRNA同士で結合することを避けるため、互いに相補的な配列を含まないことが望ましい。

[0053] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体の第二のRNAに含まれる、第一のRNAに含まれる2つの7塩基以上の配列に連続して相補的な14塩基以上の配列とは、第一のRNAに含まれる7塩基以上の配列のうち3'末端側にある配列と他の第一のRNAに含まれる7塩基以上の配列のうち5'末端側にある配列とが連結して生じる配列に相補的な配列を意味する。第一のRNAに含まれる2つの7塩基以上の配列に連続して相補的な14塩基以上の第二のRNAに含まれる配列の数は、第二のRNA-タンパク質複合体に含まれる第一のRNAの数に依存しており、当該第一のRNAが3つの場合、当該第二のRNAに含まれる14塩基以上の配列は、2つである。

[0054] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体の第二のRNAに含まれる、5'末端配列、および3'末端配列が、第一のRNAに含まれる7塩基以上の配列に連続して相補的であるとは、当該5'末端配列と3'末端配列とが連結して3'末端配列-5'末端配列の順で成るRNAの配列の一部であって

、5'末端配列および3'末端配列のいずれの配列も含む配列が第一のRNAに含まれる7塩基以上の配列に相補的であることを意味し、より好ましくは、3'末端配列－5'末端配列の順で成るRNAの配列が、第一のRNAに含まれる7塩基以上のうち3'末端側にある配列と他の第一のRNAに含まれる7塩基以上のうち5'末端側にある配列とが連結して生じる配列に相補的な配列である。従って、第二のRNAに含まる3'末端配列および5'末端配列は、合わせて14塩基以上となり、例えば、第二のRNAに含まれる3'末端配列が、13塩基である場合、第二のRNAに含まれる5'末端配列は1塩基以上である。

[0055] 本発明の第二のRNA－タンパク質複合体の第二のRNAは、例えば、（5'末端配列）－（第一のRNAと共にRNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列）－〔（第一のRNA 2つの7塩基以上の配列に連続して相補的な14塩基以上の配列）－（第一のRNAと共にRNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列）〕_m－（3'末端配列）の順に構成され、いずれか、一つの（第一のRNAに含まれる15塩基以上の配列に相補的な配列）を、（第一のRNAに含まれる5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列）に置き換えることによって得られる。第二のRNAにおける“[”および“]”で囲まれる部分の繰り返しの数mは、第一のRNAの数よりも1だけ少なく、2回の繰り返しの場合、第一のRNAと共にRNA－タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ有するRNAである。

[0056] 本発明の第二のRNA－タンパク質複合体に含まれるタンパク質は、上述の第一のRNA－タンパク質複合体において説明した、（3）のタンパク質もしくはタンパク質融合体と同一のものが用いられ得る。したがって、本発明の一実施態様におけるRNA－タンパク質複合体に含まれるタンパク質は、RNA－タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質に加え、他の機能的なタンパク質を含むタンパク質融合体を含み得る。

[0057] 本発明の第二のRNA－タンパク質複合体に含まれるタンパク質は、第一のRNAの数に依存するため、3種以上である。RNA－タンパク質結合モ

チーフを形成するタンパク質は、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列に依存して特異的なタンパク質を用いることが可能であるため、RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を適宜変更することで、所望のタンパク質をRNA-タンパク質複合体に含ませることが可能となる。例えば、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む融合タンパク質を1種含み、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および他の機能的タンパク質を含む融合タンパク質を2種以上含むRNA-タンパク質複合体を形成することができる。

[0058] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体のRNAに含まれる、siRNA配列に相補的な配列を含む第三のRNAは、前述した(1)(iii)のsiRNA配列に相補的な配列であり、当該siRNA配列と二重鎖を形成することでsiRNAを構成し、その効果を発揮することができる配列である。したがって、第三のRNAは、その3'末端側に位置する2塩基が、(1)(iii)のsiRNA配列とは相補鎖を形成しない配列となっていることが好ましい。第三のRNAは、第一のRNAと同数が、RNA-タンパク質複合体に含まれることが望ましい。

[0059] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体に含まれる第一のRNAの5'末端または第三のRNAの3'末端には、さらに、当該複合体の細胞質への輸送を促進する配列を付加してもよく、このような細胞質への輸送を促進する配列には、tRNAの配列がある。tRNAは、RNAポリメラーゼを認識するプロモーターの一つであるとともに、細胞質輸送シグナルとしての機能も果たすため、本発明の第二のRNA-タンパク質複合体のsiRNA機能の発揮を補助する可能性がある(日本特許第3831785号)。

[0060] 本発明の第二のRNA-タンパク質複合体は、複合体に含まれるsiRNAによる機能を有することから、RNA阻害剤として用いることができる。さらに、第二のRNA-タンパク質複合体を細胞内に導入することで当該細胞におけるsiRNA配列に対応するmRNAを抑制する方法に用いること

ができる。第二のRNA-タンパク質複合体を細胞内に導入する方法としては、第一のRNA-タンパク質複合体を細胞内に導入する方法と同様にして実施することができる。かかる方法は、RNA-タンパク質複合体と細胞を接触させる工程を含む、細胞内のmRNAを分解する方法ともいうことができる。このとき、細胞との接触は、in vivoで行うこともできるし、in vitroで行うこともできる。

[0061] 本発明の一実施態様において、第二のRNA-タンパク質複合体に含まれる、RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質と細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質の融合タンパク質を含む場合、デリバリーシステムに用いることができる。デリバリーの実施は、第一のRNA-タンパク質複合体と同様の態様で行うことができる。そこで、より効率的なデリバリーを成し得るため、適宜RNA-タンパク質複合体に含まれるRNAまたはタンパク質を選択することができる。好ましくは、RNAの配列の長さを適宜選択することによって、細胞認識能を上げることができる。RNAの配列の変更は、当該RNAに含まれる2つの7塩基以上の配列、5'末端配列、および3'末端配列を適宜変更することで行い得る。

[0062] 特には、当該RNAに含まれる2つの7塩基以上の配列の塩基数、及び、5'末端配列、および3'末端配列の合計の塩基数を適宜変更することで行い得る。変更は、特には、細胞表面抗原の結合能を高める観点から実施することができる。したがって、塩基数を適宜変更した第二のRNA-タンパク質複合体を用いて、所望の細胞表面抗原に対する結合能を測定することで、細胞認識能が高くなる塩基数を決定することができる。この点で、本発明は、一実施形態によれば、第二のRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、前記(1)の(iii)の配列、前記(2)の(b)の配列、および前記(2)の(d)の配列の塩基長を選択する方法ということもできる。

実施例

[0063] 以下に、本発明を、実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は

本発明を限定するものではない。

実施例 1

[0064] R N A－タンパク質複合体の作製

三角形構造 R N A－タンパク質複合体 (Tri-RNP、図 1) を、Ohno, H. et al., Nat. Nanotechnol. 2011, 6, 116. の記載に従い作製した。詳細には、K-turn R N A モチーフを頂点に有し、一辺が、それぞれ、15塩基、26塩基、48塩基、70塩基および92塩基の長鎖 (L-RNA) および短鎖 (S-RNA) からなる dsRNAs を設計した。それぞれ、LS-15 (L-15 : 配列番号 1 3 および S-15 : 配列番号 1 4) 、LS-26 (L-26 : 配列番号 1 5 および S-26 : 配列番号 1 6) 、LS-48 (L-48 : 配列番号 1 7 および S-48 : 配列番号 1 8) 、LS-70 (L-70 配列番号 1 9 および S-70 配列番号 2 0) および LS-92 (L-92 配列番号 2 1 および S-92 配列番号 2 2) と称す (図 1) 。R N A は、前述の DNA テンプレートを元に MEGA shortscript T7 kit (Ambion) を用いて作製した。得られた L-RNA と S-RNA を RNP 結合溶媒 (150ml KCl、1.5mM MgCl₂ および 20mM HEPES-KOH (pH 7.5) から成る溶液) にて、80℃ で 3 分間処理した後、室温にて 10 分間冷却することで、R N A どうしをハイブリダイズさせ、ループ構造を有する二重鎖 R N A (LS-RNA) を作製した。

[0065] さらに、Ohno, H. の記載に従い、LS-RNA へ L7Ae を添加することで、相互作用により 5 つの異なる大きさの三角形構造を形成させた。L7Ae は、プラスミド (L7Ae 配列を導入した pET-28(+) vector (Novagen)) を大腸菌 (Rosetta (DE3) /pLysSpRARE2) にトランスフェクションすることで作製した。

[0066] 得られた 5 種の Tri-RNP を、Tri-15、Tri-26、Tri-48、Tri-70 および Tri-92 と称し、1 辺は、およそ 13.7、16.7、22.6、28.5 および 34.4 nm の長さと考えられる。

[0067] 続いて、電気泳動移動度シフト解析 (EMSA) より、L7Ae と当該 LS-RNA の相互作用を分析した。ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルを、SYBR Green I および II (Lonza) で染色し、RNA-タンパク質複合体の形成を観察した。その結果、期待通り、全ての LS-RNA において L7A

eとの相互作用により三角形構造体を形成していることが確認された（図2）。

[0068] 続いて、Tri-RNPを視覚的に観察した。Tri-RNP（Tri-26およびTri-48）を、高速AFM（HS-AFM）（Nano Live Vision, Research Institute of Biomolecules & Metrology）および $10 \times 2 \times 0.1 \mu\text{M}$ のカンチレバー（BL-AC10EGS, Olympus）を用いて液相で観察した。400-1000 kHz共鳴周波数で0.1-0.2 N/mのバネ定数にてカンチレバーを設定した。プローブは、電子ビームでカンチレバーに沈着させた。0.1% APTESでマイカ表面をコーティングし、RNP結合溶媒とAFM観察溶媒（20mM Tris-HCl（pH7.6）および10 mM MgCl_2 ）に溶解させた50 nMのサンプルをマイカ上に静置した。画像は、ImageJおよびWSxMなどのソフトウェアを用いて解析した。

[0069] その結果、L7Aeと接触させない場合、5つの異なる大きさのLS-RNAは二重鎖RNAの構造でループ構造を呈した。一方、L7Aeと接触させた場合、三角形構造を呈することが確認された。RNAがK-turnモチーフと結合している様子が、Tri-RNPの頂点のドットとして確認され、3辺で囲まれた三角形内部は空洞で確認され、L7Aeと接触させた場合は、単一構造を呈することが確認された（図3）。ただし、Tri-92では、三角形構造が、少し変形することが確認された。

[0070] 続いて、変異K-turnモチーフ（mut box C：配列番号23、mut box D：配列番号24）を1つ、2つまたは3つ有するLS-RNA（Tri-26_{mut1}、Tri-26_{mut2}およびTri-26_{mut3}）をEMSAより確認した。その結果、それぞれの変異K-turnモチーフの数に応じた構造変化が確認された（図4）。このとき、それぞれ $n=114, 135, 93, 188$ 個の構造体を計測し、構造形成の割合を算出した結果、L7AeとK-turnモチーフの含有比率と、確認された実際の構造の比率は、統計的に一致していた（図5）。これらの結果より、3つのL7AeとK-turnモチーフの相互作用が、三角形の頂点で行われていることが確認された。

[0071] タイムラプス画像によるRNA-タンパク質複合体（RNP）の構造変化の検出

上述したHS-AFMを用いて、L7Ae添加後のRNA構造における変化をタイムラプス撮像より観察した（図6）。タイムラプス画像により、L7Aeが直接3つのLS-26のK-turnモチーフに結合すると、K-turnモチーフが60度の角度に折り曲げられ、この構造変化より、三角形構造へ移行することを確認した。一方、RNAからタンパク質が解離することで、三角形構造からループ構造へと移行することも確認された。

実施例 2

[0072] タンパク質との相互作用によるRNAの安定性の改良

血清の存在下におけるRNA-タンパク質複合体（RNP）の構造安定性について確認した。詳細には、50 nM LS-26または50 nM LS-26と300nM L7Aeとの混合物に20% FBSを添加し、37℃で0分、30分、60分および120分インキュベート後、10 mM EDTA (pH8.0)およびフェノールを添加し、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、RNAの安定性を観察した。その結果、LS-26においてL7Aeの存在下でRNPを形成させることで、血清含有緩衝液における、その安定性が亢進することが確認された（図7）。一方、L7Aeの非存在下では、LS-26は、30分間の血清処理で分解することが確認された。また、Tri-26_{mut3}を用いた場合、分解は抑制されなかった。同じ結果が、ヒト血清（20%）においても観察された（図8）。これらの結果より、三角形構造を形成することで、血清存在下などの生理的条件下においても、RNAの安定性が高まることが確認された。

実施例 3

[0073] 細胞認識能を有する機能的RNP

Tri-RNPに特定の癌細胞を認識する機能を付加した。詳細には、affibody_{ZHER2}³⁴²ペプチド（配列番号25および26）のN末端でSSSGSSSGSSSG（配列番号27および28）を介しL7AeのC末端と融合したタンパク質（L7Ae-AFB）を、上述のとおり、Ohno, Hらの記載に従い、プラスミドを大腸菌にトランスフェクションすることで用意した。このL7Ae-AFBをLS-RNAに添加し、RNPを構築した（Tri-AFB、図9A）。LS-26をRNAとして用いた場合（Tri-26-AFB）の三

角形構造をHS-AFMにて確認し、各頂点にAFBと推定される物質が付加されていることも確認できた（図9B）。さらに、EMSAを用いてTri-26と同様にL7Ae-AFBが、K-turnモチーフに結合することが確認された（図10）。

[0074] 続いて、当該Tri-AFBが、乳癌細胞に結合するか否かについて確認した。詳細には、乳癌細胞株（SKBR3）（ATCC）の培養液を除去し、Opti-MEMを加えた後、Alexa-647でラベルした10 nM LS-RNA、または10 nM Tri-AFBを添加し、37℃、5%CO₂下で1時間培養した。インキュベート後の細胞へのTri-AFBの結合は、フローサイトメーターで分析した。その結果、Tri-26-AFBが、最も認識能が高かった（図11）。Tri-26-AFBの選択的認識能を調べるため、3つの異なる乳癌細胞株（SKBR3（HER2強陽性株）、MCF-7（HER2弱陽性株）およびMDA-MB-231（HER2陰性株））を用いて同様に調べたところ、Tri-26-AFBは予想通りSKBR3を選択的に認識することが確認された（図12）。

[0075] さらに、変異K-turmモチーフを有するTri-26変異体（Tri-26_{mut1}、Tri-26_{mut2}およびTri-26_{mut3}）を用いて同様に調べたところ、変異K-turmモチーフの数に応じて、SKBR3との結合能が弱くなることが確認された（図13）。このことは、AFBとHER2との結合数の増加が認識能に影響したためと示唆される。

[0076] これらの結果より、Tri-AFBを用いることで、RNAを対象細胞表面へと輸送することが可能であることが示唆された。ただし、細胞への結合能を有するRNPは最適な大きさがあることも確認された。

実施例 4

[0077] siRNA機能を有する機能的RNP

三角形構造を有するRNPが、siRNAとしての機能を有するかについて検討を行うため、図14に示すRNPを構築した。詳細には、LS-26の3辺にGFPに対するsiRNAを有するように、S-26、L-26-1（配列番号29）、L-26-2（配列番号30）、L-26-3（配列番号31）およびantisense-GFP（配列番号32）との5つのRNAを上述と同様にハイブリダイズしてLS-26-siGFPを作製した。続いて、LS-26-siGFPとL7Aeとを混合することで三角形構造を有するTri-26-siGFPを作製し、HS-AFMを用いて構造を確認したところ、三角形の各

辺に、GFPに対する s i R N A と思われる構造物が確認され、予想された形状を取ることが確認された（図 1 5 上段）。一方、L7Aeの非存在下では、不均一な R N A 構造を取ることが確認された（図 1 5 下段）。以上より、s i R N A 機能を有する3つの二重鎖を含有する構造を持つ三角形構造（Tri-26-siGFP）を構築することができた。

[0078] このTri-26-siGFPが、Dicerによる基質認識に関与するかについて検討した。詳細には、500 nM LS-26-siGFP類（L-26-1、S-26およびantisense-GFPのハイブリダイズしたR N A、L-26-2、S-26およびantisense-GFPのハイブリダイズしたR N A、L-26-3、S-26およびantisense-GFPのハイブリダイズしたR N AならびにLS-26-siGFP）または500 nM LS-26-siGFPと3 μ M L7Aeの混合物を1 μ L の10 mM ATP、0.5 μ L の50 mM MgCl_2 、4 μ L のDicer Reaction buffer、1 μ L のリコンビナントDicer（Genlantis）に水を加え、10 μ Lとし、37℃で16時間インキュベートした。インキュベート後、Dicer Stop Solutionを加え、Dicerにより切断されたRNAと切断されずに残存したRNAを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて、確認した。Tri-26-siGFPは、対照として用いたsh-GFP（配列番号33）と同様にDicerによるR N A切断に寄与することが確認された（図 1 6）。従って、L7AeとK-turnモチーフの相互作用により三角形構造をとるTri-26-siGFPであっても、立体障害なく s i R N A の効果を有することが示唆された。

[0079] 以上より、三角形構造を有するRNPは、R N A を安定化し、細胞認識能と s i R N A によるm R N A の分解、並びに阻害の機能を保有させることができることが示唆された。

[0080] 次いで、Tri-26-siGFPによる細胞内でのノックダウン活性を調べた。GFPを安定的に発現するHela細胞（Hela-GFP）に、1 nM及び5 nMのTri-26-siGFP、1 nM及び5 nMのLS-26-siGFP、及び3 nM及び15 nMの陽性対照としてのsh-GFPをそれぞれトランスフェクトした。GFPのノックダウン活性は、GFPの発現レベルにより、フローサイトメトリーを用いて測定した。その結果、Tri-26-siGFP、LS-26-siGFPともに、sh-GFPの3倍程度の活性にて、GFPをノックダウンで

きることが示された。

請求の範囲

[請求項1] 次の(1)から(3)を含むRNA-タンパク質複合体による、RNAおよびタンパク質のデリバリーシステム。

(1) 次の(i)から(iv)の配列を含むRNA；

(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(ii) 15塩基以上の配列を2つ以上、

(iii) 5'末端配列、および

(iv) 3'末端配列であって、

当該(iii)の5'末端配列および(iv)の3'末端配列が合計して15塩基以上の配列であり、

(2) 次の配列を含むRNA；

(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、

(b) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ以上、

(c) 前記(1)の(iii)の5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列、

(d) 5'末端配列、および

(e) 3'末端配列であって、

当該(d)の5'末端配列および(e)の3'末端配列が、前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に連続して相補的であり、ならびに

(3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質。

[請求項2] 前記(1)の(i)のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列が3つであり、前記(2)の(a)のRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列が3つであり、前記(1)の(ii)の15塩基

以上の配列が2つであり、ならびに前記(2)の(b)の15塩基以上の配列に相補的な配列が1つである、請求項1に記載のシステム。

[請求項3] 前記(1)の配列、前記(1)の(iii)の5'末端配列および(iv)の3'末端配列の合計、前記(2)の(b)の配列、または(d)に前記(2)の(d)の5'末端配列および(e)の3'末端配列の合計が、15塩基以上92塩基以下である、請求項1または2に記載のシステム。

[請求項4] 前記(1)の配列、前記(1)の(iii)の5'末端配列および(iv)の3'末端配列の合計、前記(2)の(b)の配列、または(d)に前記(2)の(d)の5'末端配列および(e)の3'末端配列の合計を、細胞表面抗原への結合能を高めるように、塩基長が適宜選択されている、請求項1から3のいずれか1項に記載のシステム。

[請求項5] 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNA-タンパク質結合モチーフが、K-t u r nモチーフであり、前記(3)のRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質が、L7Aeである、請求項1から4のいずれか1項に記載のシステム。

[請求項6] 前記(3)の細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質が、HER2を認識するタンパク質である、請求項1から5のいずれか1項に記載のシステム。

[請求項7] 前記HER2を認識するタンパク質が、Affibodyである、請求項6に記載のシステム。

[請求項8] 血清存在下でデリバリーが行われる、請求項1から7のいずれか1項に記載のシステム。

[請求項9] 次の(1)から(4)を含むRNA-タンパク質複合体；
(1) 次の(i)から(iii)の配列を含むRNA；
(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、
(ii) 7塩基以上の配列を2つ、および
(iii) s i RNA配列、

(2) 次の (a) から (d) の配列を含む RNA ;

(a) 前記 (1) の (i) と共に RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列

(b) 前記 (1) の前記 (ii) の 2 つの 7 塩基以上の配列に連続して相補的な 14 塩基以上の配列を 2 つ以上、

(c) 5' 末端配列、および

(d) 3' 末端配列であって、

当該 (c) の 5' 末端配列および (d) の 3' 末端配列が、前記 (1) の前記 (ii) の 7 塩基以上の配列に連続して相補的であり、

(3) 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA と RNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質を少なくとも 1 つ、ならびに

(4) 前記 (1) の (iii) の siRNA 配列に相補的な配列を含む RNA。

[請求項10] 前記 (1) の RNA が 3 つであり、前記 (2) の (b) の 14 塩基以上の配列を 2 つであり、および前記 (4) の RNA が 3 つである、請求項 9 に記載の RNA-タンパク質複合体。

[請求項11] 前記 (1) の (ii) の配列が、7 塩基以上 85 塩基以下であり、前記 (2) の (b) の配列が、14 塩基以上 92 塩基以下である、請求項 9 または 10 に記載の RNA-タンパク質複合体。

[請求項12] 前記 (1) の (i) および前記 (2) の (a) で形成される RNA-タンパク質結合モチーフが、K-t u r n モチーフであり、前記 (3) のタンパク質が、L7Ae である、請求項 9 から 11 のいずれか 1 項に記載の RNA-タンパク質複合体。

[請求項13] 前記 (3) のタンパク質が、細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質または膜透過性ペプチドをさらに含む融合タンパク質である、請求項 9 から 12 のいずれか 1 項に記載の RNA-タンパク質複合体。

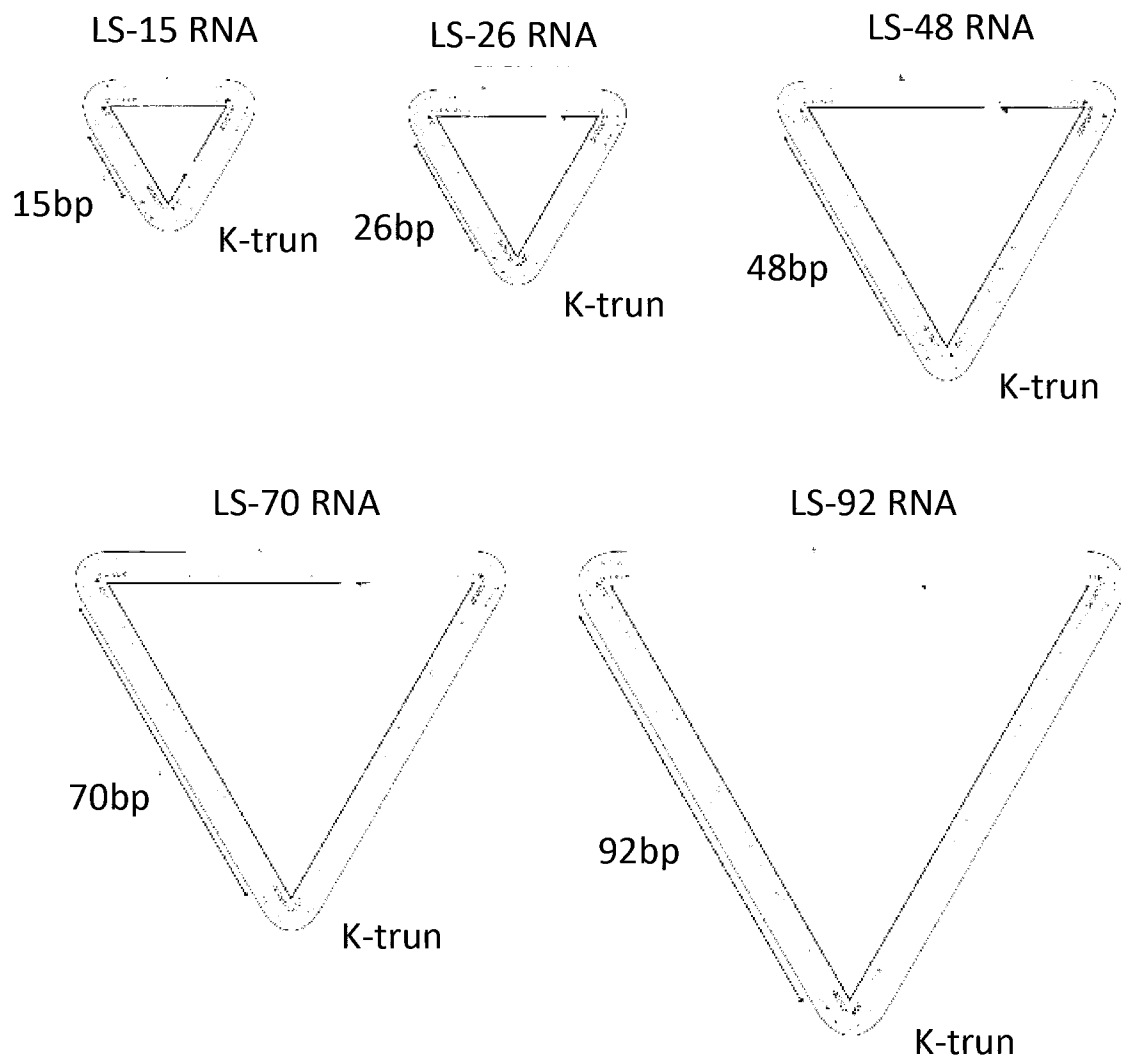
- [請求項14] 前記膜透過性ペプチドが、AntP、HIV由来のTAT、Penetratin、Bufo rin II、Transportan、MAP、K-FGF、Ku70、Prion、pVEC、Pep-1、Pep-7、SynB1、HN-IおよびHSV由来のVP22から成る群より選択されるペプチドである、請求項13に記載のRNA-タンパク質複合体。
- [請求項15] 請求項9から14のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体を含む、RNA阻害剤。
- [請求項16] 請求項9から14のいずれか1項に記載のRNA-タンパク質複合体と細胞を接触させる工程を含む、細胞内のmRNAを分解する方法。
- [請求項17] 前記RNA-タンパク質複合体と細胞を血清存在下で接触させる、請求項16に記載の方法。
- [請求項18] (1) 次の配列を含むRNA；
(i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、
(ii) 15塩基以上の配列を2つ以上、ならびに
(iii) 合わせて15塩基以上の配列から成る5'末端配列および3'末端配列、
(2) 次の配列を含むRNA；
(a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列を3つ以上、
(b) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に相補的な配列を1つ以上、
(c) 前記(1)の(iii)の5'末端配列および3'末端配列に連続して相補的な配列、
および
(d) 前記(1)の(ii)の15塩基以上の配列に連続して相補的な5'末端配列および3'末端配列、ならびに
(3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および

細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質、
を含むRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、前記(1)の(iii)の配列、前記(2)の(b)の配列、および
前記(2)の(d)の配列の塩基長を選択する方法。

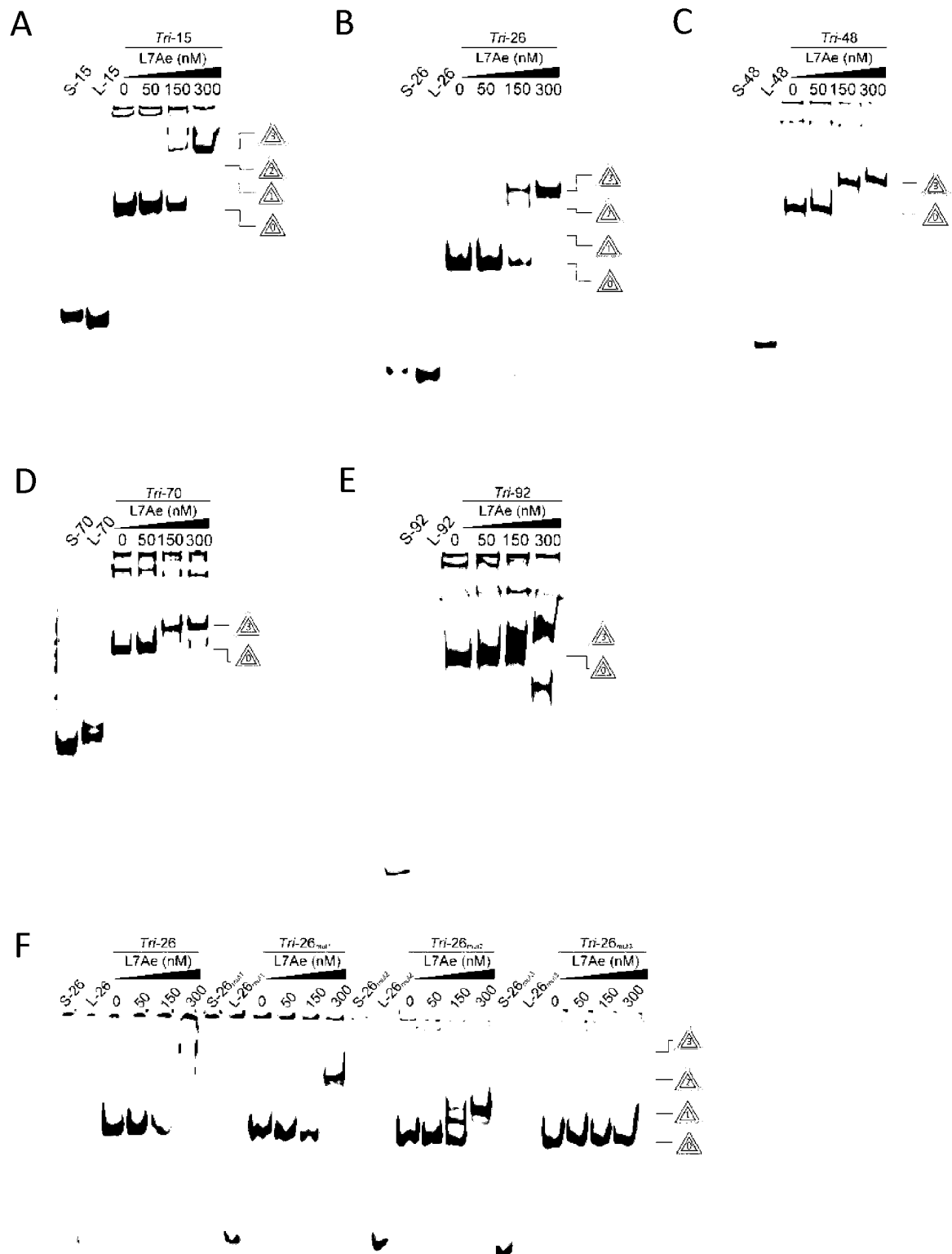
[請求項19]

- (1) 次の(i)から(iii)の配列を含むRNA ;
 - (i) RNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列、
 - (ii) 7塩基以上の配列を2つ、および
 - (iii) siRNA配列、
- (2) 次の(a)から(d)の配列を含むRNA ;
 - (a) 前記(1)の(i)と共にRNA-タンパク質結合モチーフを形成する配列
 - (b) 前記(1)の前記(ii)の2つの7塩基以上の配列に連続して相補的な14塩基以上の配列を2つ以上、
 - (c) 5'末端配列、および
 - (d) 3'末端配列であって、
当該(c)の5'末端配列および(d)の3'末端配列が、前記(1)の前記(ii)の7塩基以上の配列に連続して相補的であり、
- (3) 前記(1)の(i)および前記(2)の(a)で形成されるRNAとRNA-タンパク質結合モチーフを形成するタンパク質および細胞表面抗原を特異的に認識するタンパク質を含む、少なくとも1つの融合タンパク質、ならびに
- (4) 前記(1)の(iii)のsiRNA配列に相補的な配列を含むRNA、
を含むRNA-タンパク質複合体において、細胞表面抗原への結合能を指標として、前記(1)の(ii)の配列、および前記(2)の(b)の配列の塩基長を選択する方法。

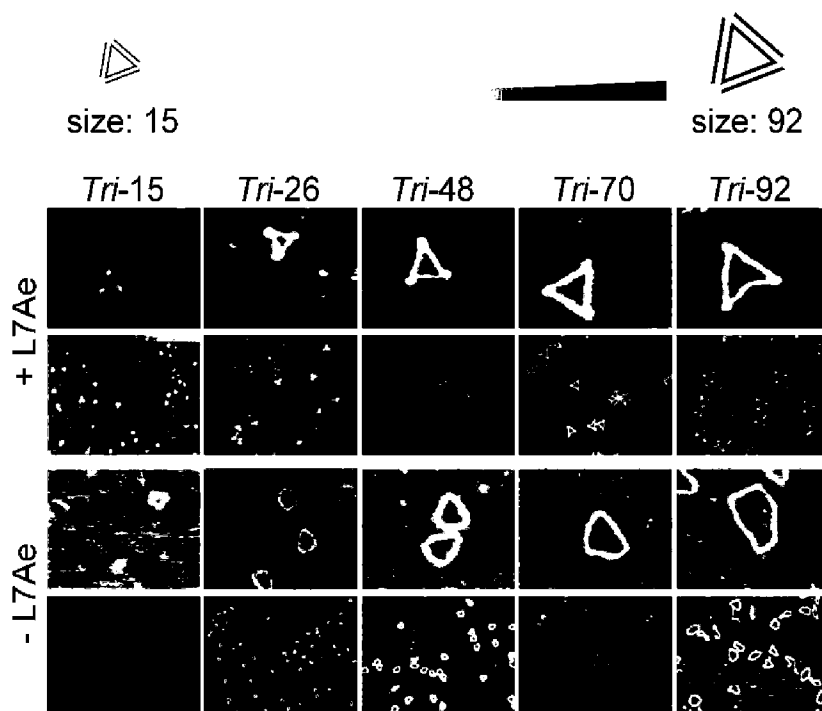
[図1]



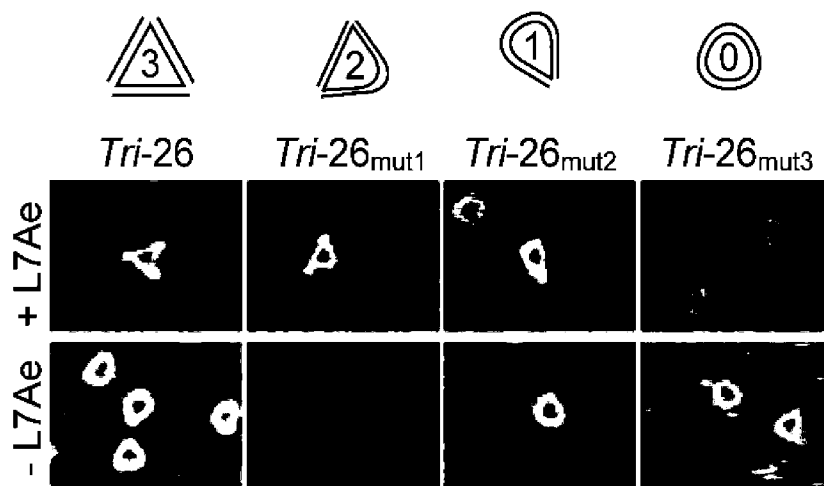
[図2]



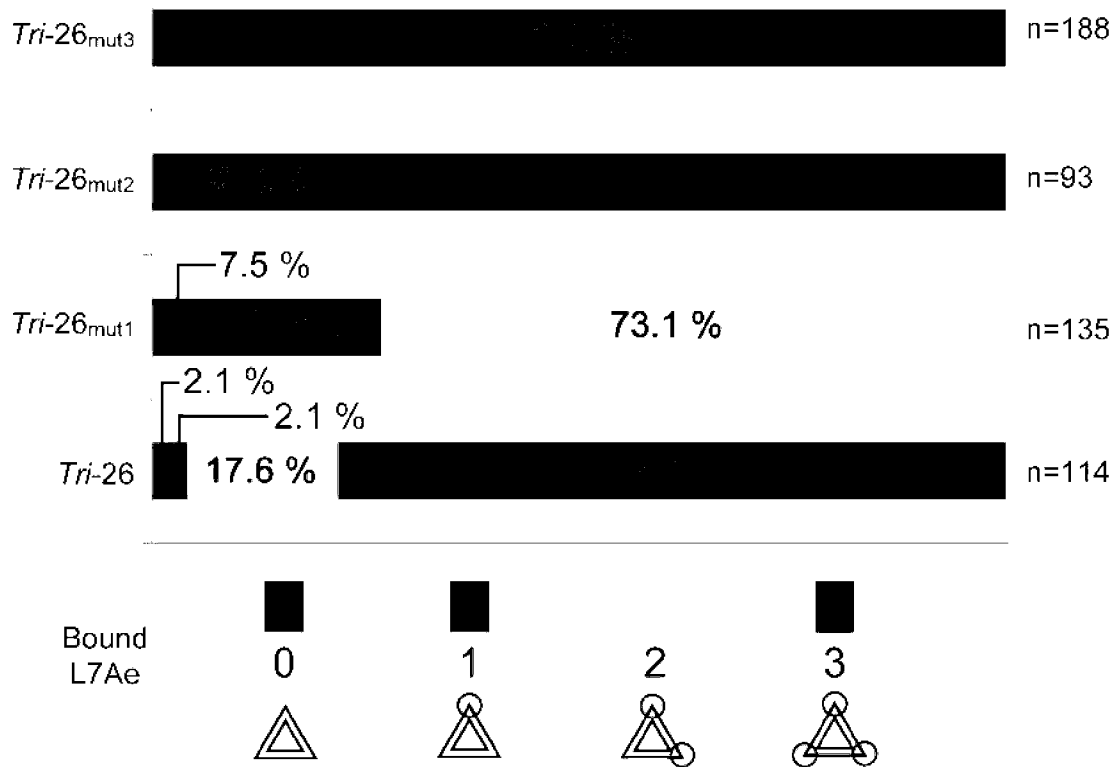
[図3]



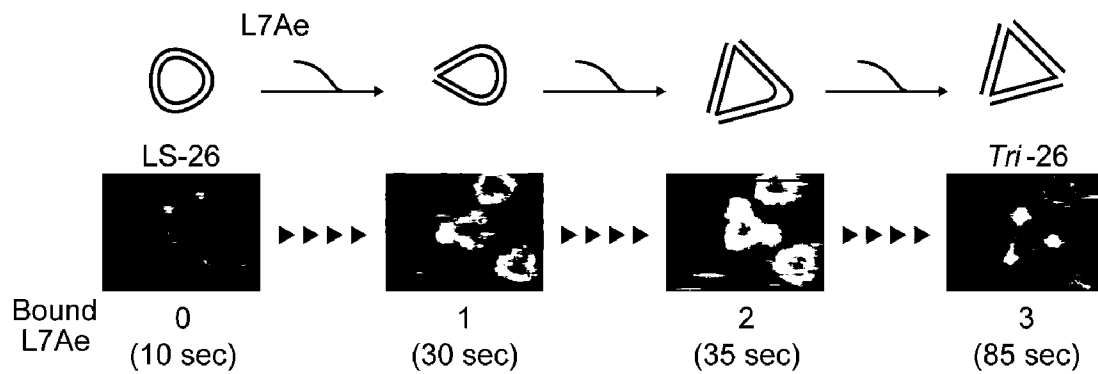
[図4]



[図5]



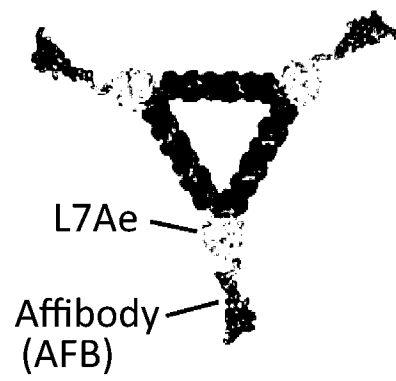
[図6]



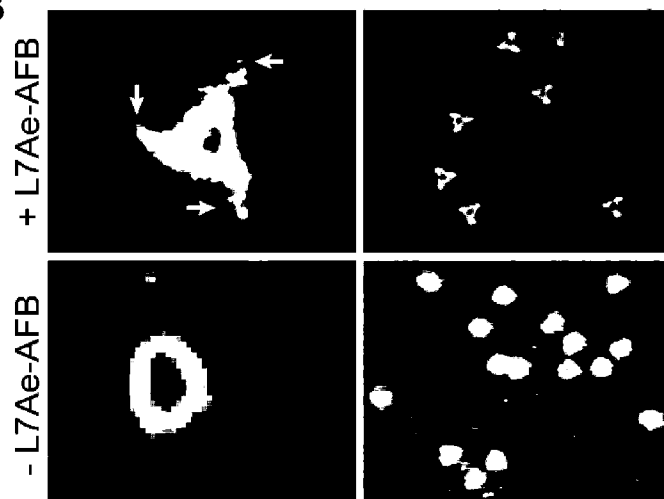
[illegible]

[図9]

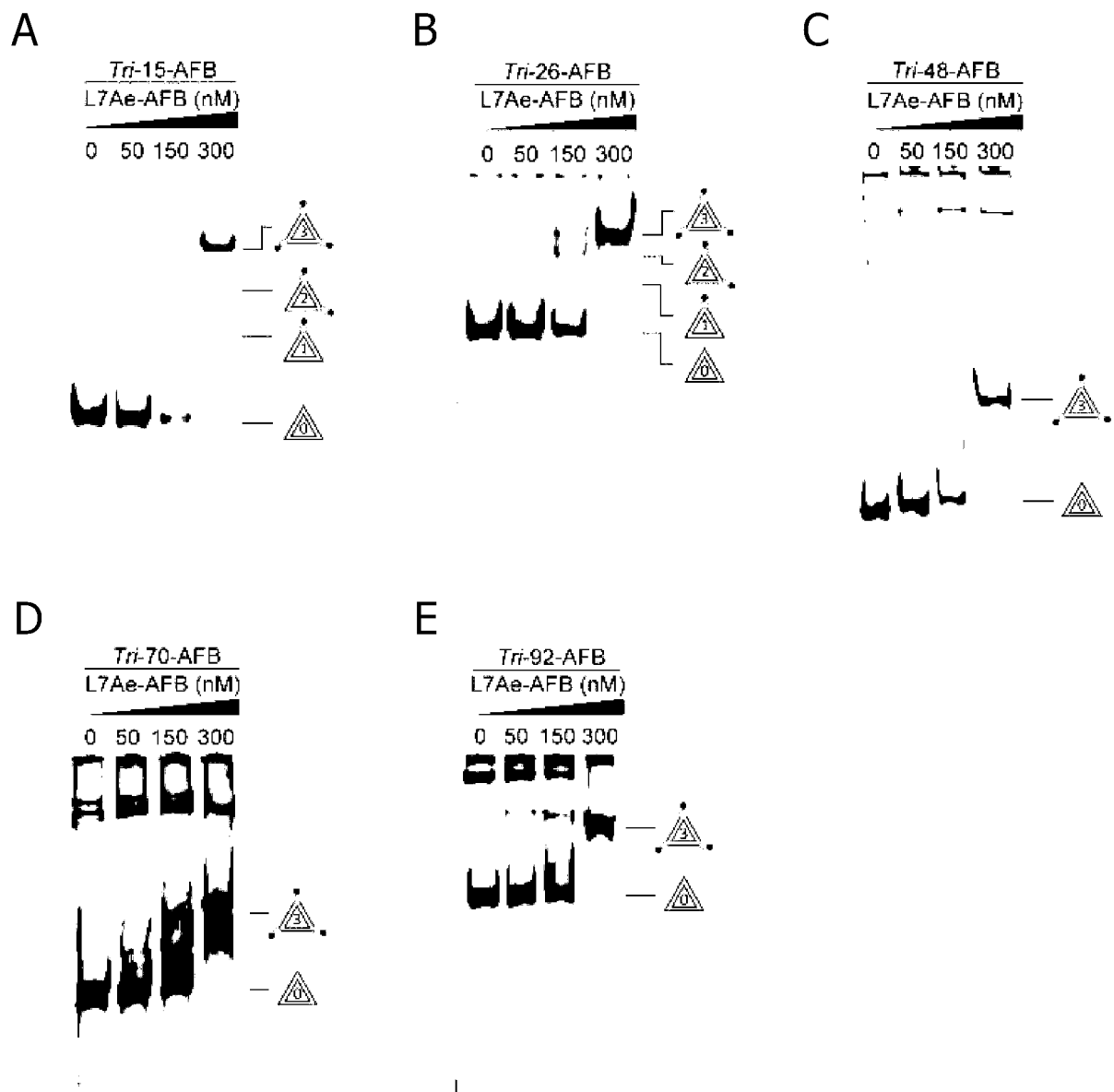
A



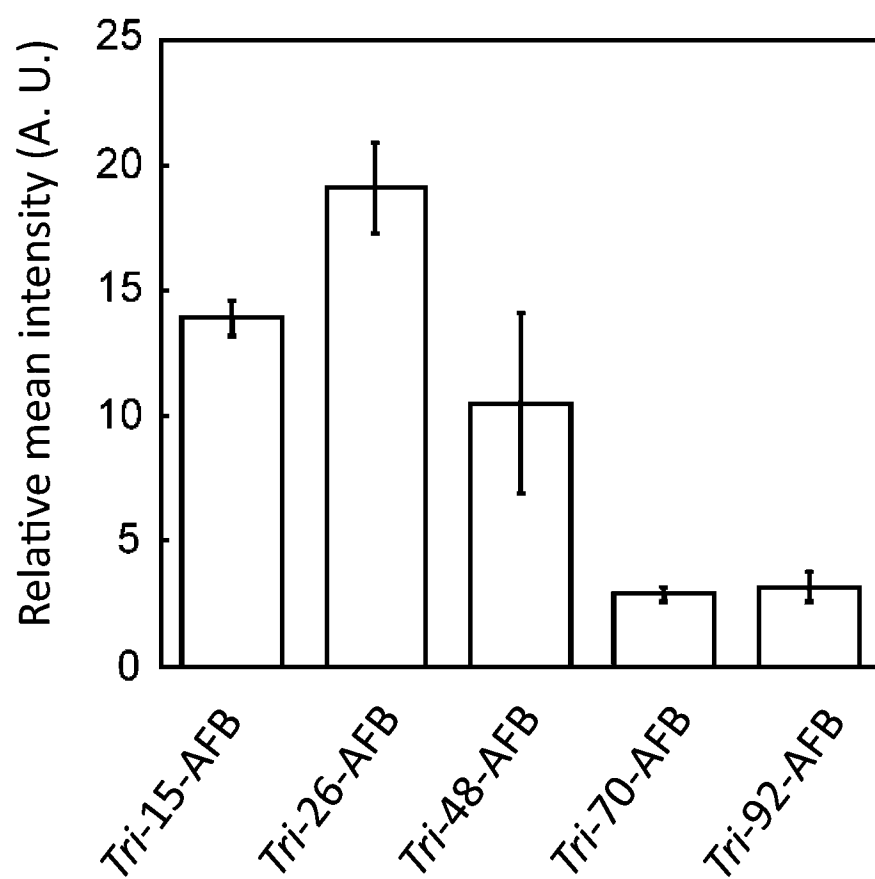
B



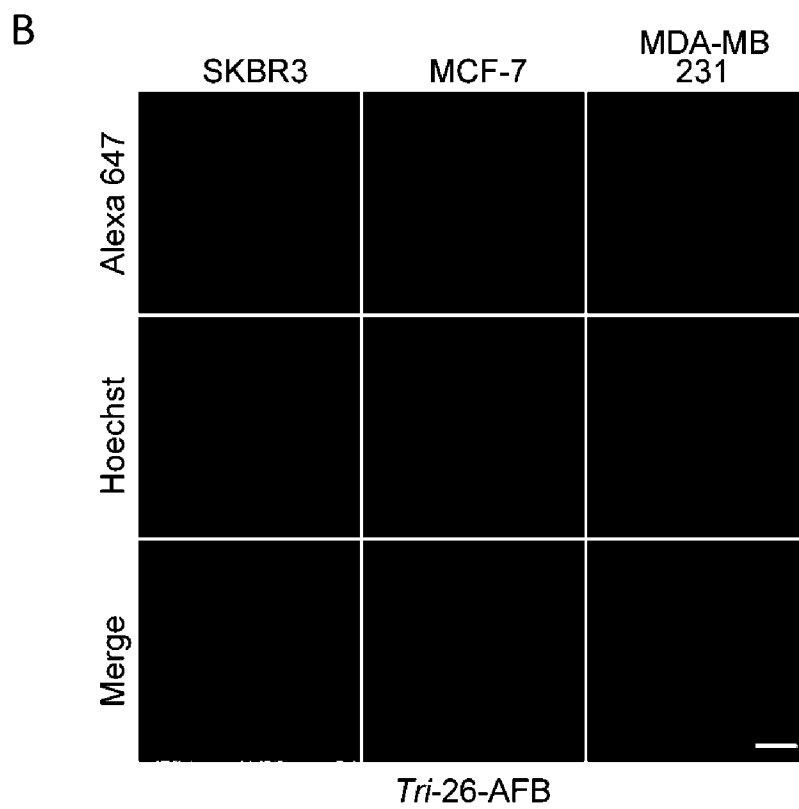
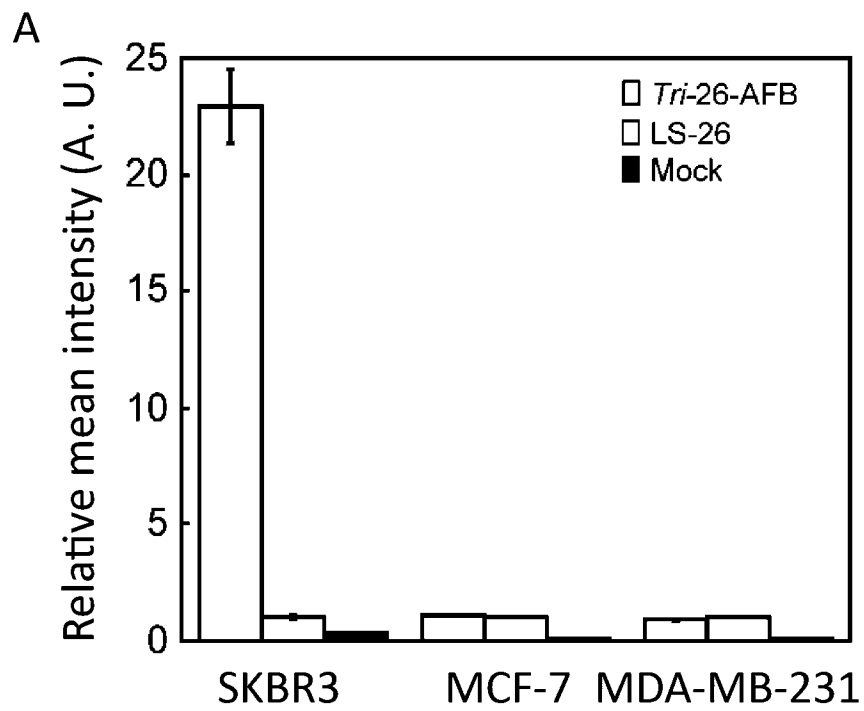
[図10]



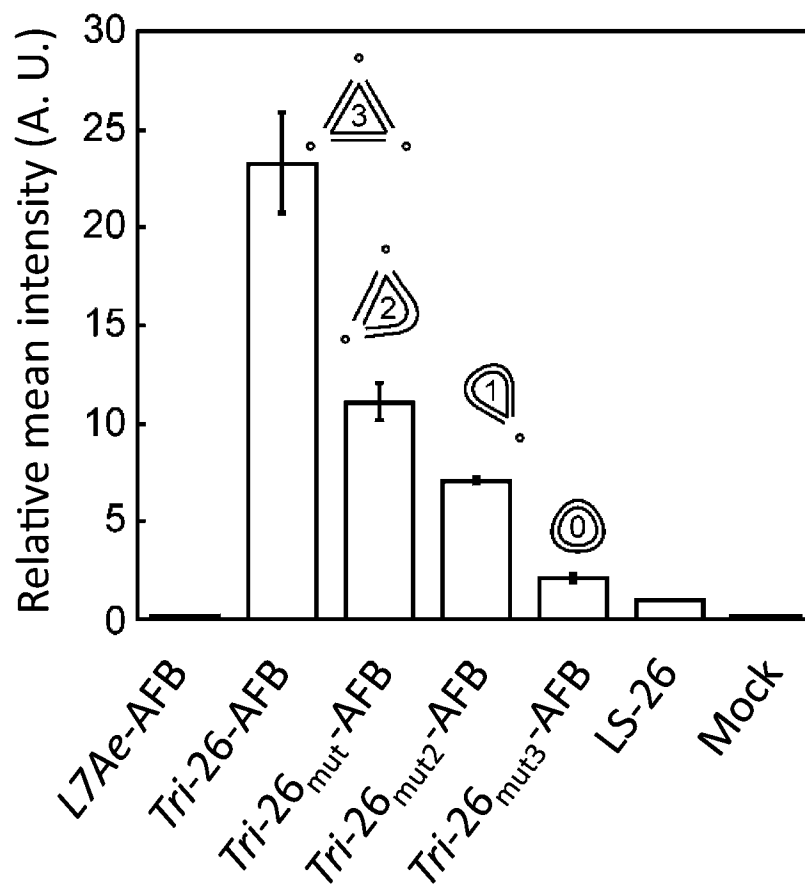
[図11]



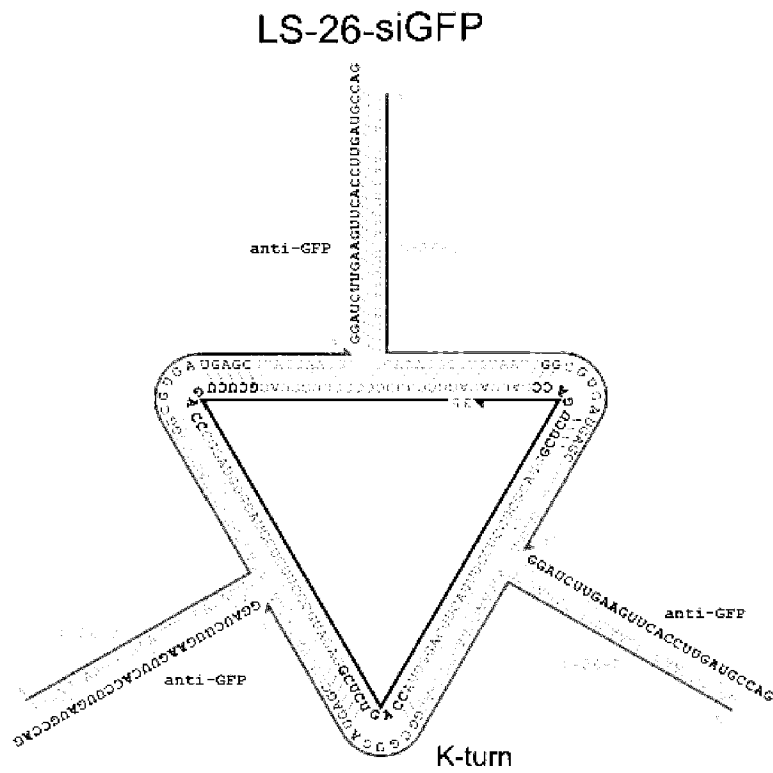
[図12]



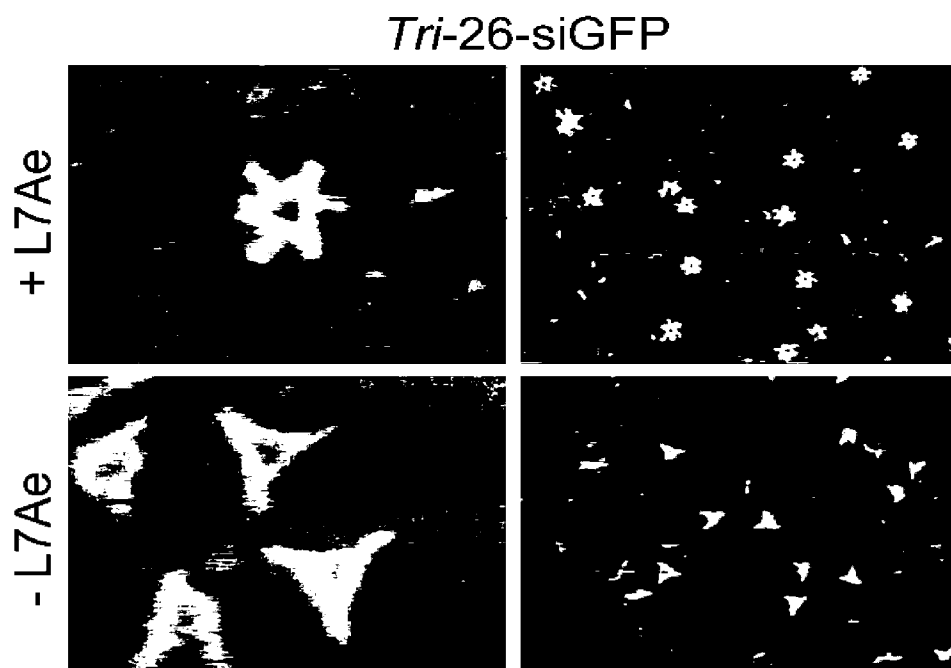
[図13]



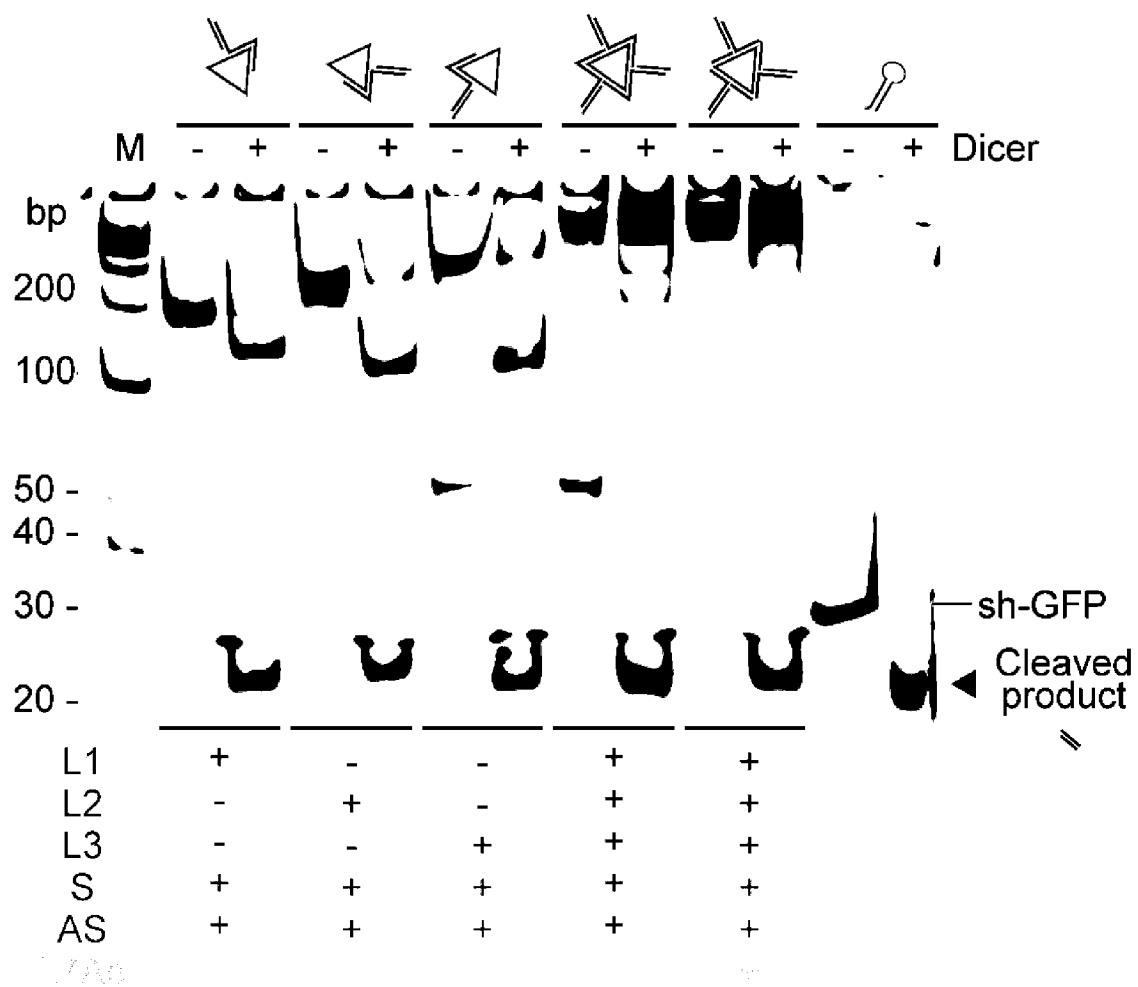
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K19/00, C12N15/113

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/010862 A1 (Japan Science and Technology Agency), 28 January 2010 (28.01.2010), paragraphs [0047], [0064], [0065], [0068]; examples (Family: none)	1-5, 8-19 6, 7
Y	WO 2005/079843 A1 (TTC Co., Ltd.), 01 September 2005 (01.09.2005), paragraph [0010] (Family: none)	6
Y	JP 2007-537700 A (Affibody AB.), 27 December 2007 (27.12.2007), claims; paragraphs [0002] to [0005] & US 2010/0048868 A1 & WO 2005/003156 A1 & EP 1641818 A1	6, 7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 August 2015 (05.08.15)

Date of mailing of the international search report

18 August 2015 (18.08.15)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069634

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/067811 A1 (Japan Science and Technology Agency), 17 June 2010 (17.06.2010), entire text & JP 5405489 B2 & US 2011/0263026 A1 & EP 2390324 A1	1-19
A	OHNO, H., et al., Synthetic RNA-protein complexshaped like an equilateral triangle., Nat. Nanotechnol., 2011, Vol.6, pp.116-120	1-19
A	Hirohide SAITO, "RNA-Protein nanotechnology & synthetic biology", Journal of Japanese Biochemical Society, Issued date 25 February 2014 (25.02.2014), vol.86, no.1, pages 81 to 85	1-19

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, C07K19/00(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, C07K19/00, C12N15/113			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 5 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 5 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 5 年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	W0 2010/010862 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2010.01.28, [0047]、[0064]、[0065]、[0068]、実施例（ファミリーなし）	1-5, 8-19 6, 7	
Y	W0 2005/079843 A1 (株式会社TTC) 2005.09.01, [0010]（ファミリーなし）	6	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 0 5 . 0 8 . 2 0 1 5		国際調査報告の発送日 1 8 . 0 8 . 2 0 1 5	
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100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 川合 理恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 0 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2007-537700 A (アフィボディ・アーベ) 2007.12.27, 特許請求の範囲、[0002] – [0005] & US 2010/0048868 A1 & WO 2005/003156 A1 & EP 1641818 A1	6, 7
A	WO 2010/067811 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2010.06.17, 全文 & JP 5405489 B2 & US 2011/0263026 A1 & EP 2390324 A1	1-19
A	OHNO, H., et al., Synthetic RNA-protein complexshaped like an equilateral triangle., Nat. Nanotechnol., 2011, Vol. 6, pp. 116-120	1-19
A	齊藤博英, RNA-タンパク質ナノテクノロジー&シンセティックバイオロジー, 生化学, 2014年2月25日発行, 第86巻, 第1号, 81-85頁	1-19