

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007 年 1 月 25 日 (25.01.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/011074 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/315078
- (22) 国際出願日: 2006 年 7 月 24 日 (24.07.2006)
- (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:
60/702,019 2005 年 7 月 22 日 (22.07.2005) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人
日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 俊亮
(KOBAYASHI, Shunsuke) [JP/JP]; 〒1028275 東京都
千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大
学内 Tokyo (JP). 安西 偕二郎 (ANZAI, Kaijiro) [JP/JP];
〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号
学校法人日本大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒
1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビ
ル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 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, 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
- 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: RNA EXPRESSION VECTOR SELECTIVE TO NERVOUS SYSTEM CELL

(54) 発明の名称: 神経系細胞に選択的な RNA 発現ベクター

(57) Abstract: Disclosed are a promoter for the expression of RNA in such a manner that is selective to a nervous system cell; a vector bearing the promoter; and a method for the expression of RNA using the vector. RNA such as shRNA can be expressed in such a manner that is selective to a nervous system cell by using the vector.

(57) 要約: 本発明は、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、前記プロモーターを含有するベクターおよび前記ベクターを用いた RNA の発現方法に関する。本発明のベクターを用いることにより、神経系細胞選択的に shRNA などの RNA を発現させることができる。



WO 2007/011074 A1

明 細 書

神経系細胞に選択的な RNA 発現ベクター

5 技術分野

本発明は、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、神経系細胞に選択的に RNA を発現させるベクターおよび前記ベクターを用いる神経系細胞選択的な RNA の発現方法に関する。また、本発明は、神経系細胞に選択的な RNA 干渉用発現ベクターおよび前記ベクターを用いる神経系細胞に選択的な RNA 干渉方法に関する。

背景技術

RNA 干渉 (RNAi) の技術は、生細胞内でのタンパク質発現を特異的にノックダウンすることが可能な技術であり、ターゲットとするタンパク質の機能的解析や、治療薬の開発にとっての強力なツールの一つである[1]。RNAi で用いられる siRNA (small interfering RNA) は、RNA polymerase III (Pol III) プロモーターを用いた発現ベクターシステムによって、生細胞中に産生されることが知られている[2]。しかし、Pol III プロモーターを用いた発現ベクターシステムは、部位特異的な転写には適していないため、転写部位選択的な RNAi のシステムの構築は、タンパク質の機能解析や、治療薬の開発において重要なテーマとなっている。

ところで、Pol III で転写される遺伝子は数多く知られており、siRNA の他には、例えば、BC1 RNA が挙げられる。BC1 RNA は、Pol III で転写される低分子の非翻訳性の RNA であり、神経系細胞特異的に発現している。BC1 RNA 遺伝子の転写には、色々なタイプのプロモーター配列が関与している。例えば、tRNA 遺伝子に類似した A box、B box 配列と BC1 RNA 特異的な GCAAG/CTTGC モチーフからなる Pol III 系の内部プロモーターに加えて、遺伝子の 5' 側隣接領域

に存在する TATA 様配列と PSE 配列も BC1 RNA の転写に必須である[3、4]。さらに、BC1 RNA 遺伝子は、その上流領域にさらなる転写調節エレメントを有している。例えば、Pur α 結合サイトである(GGN)_n は、転写に必要なエレメントであり[5]、E2-box 配列は転写を活性化するエレメントである[6]。一方、BCRE (BC1 RNA-repressing element) は、転写を抑制的に調節する[7]。興味深いことに、これらの上流にあるエレメントは、RNA polymerase II (Pol II) システムにおいても機能することができる[8]。このように、BC1 RNA は Pol III で転写されるが、その遺伝子のプロモーターは Pol II タイプと Pol III タイプの融合型であるといえる。

10

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、神経系細胞における RNA (例えば、低分子 RNA) 発現用のベクターおよび前記ベクターを用いる神経系細胞選択的な RNA の発現方法などを提供することにある。

15

本発明者は、上記課題を解決するため、以下のように鋭意検討を重ねた結果、BC1 RNA の転写に必要な BC1 RNA 遺伝子上流に位置する転写活性化領域から BC1 RNA 遺伝子の内部プロモーターまでの連続する領域を含むベクターは、神経系細胞選択的に RNA を発現できることを見出した。また、BC1 RNA は、ヒトには発現せず、げっ歯類で発現する RNA であるにも関わらず、前記ベクターは、ヒト由来の神経系細胞においても選択的に RNA を発現できることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

すなわち、本発明は以下の通りである。

- (1) BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において BC1 RNA 遺伝子上流に位置する E2 サイトから BC1 RNA 遺伝子中の内部プロモーター配列までを含むポリヌクレオチドからなるプロモーター。
- (2) BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において少なくとも-324 番目から+78 番目の

25

塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター。

(3) 以下の(a)または(b)のポリヌクレオチドからなるプロモーター。

(a) 配列番号2で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド

(b) 配列番号2で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

(4) (1) ~ (3) のいずれか1項に記載のプロモーターを含むベクター。

(5) (1) ~ (3) のいずれか1項に記載のプロモーターの発現制御下に神経系細胞選択的に RNA を発現させるように外来性ポリヌクレオチドを連結させたベクター。

上記(5)において、RNAは、好ましくは、アプタマー、shRNA、siRNAまたはマイクロRNAなどの低分子RNAである。また、神経系細胞は、例えば、ヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である。

本発明のベクターは、RNA干渉に用いることができる。

(6) (4) または(5)に記載のベクターが導入された形質転換体。

上記(6)において、形質転換体は、例えば、神経系細胞である。神経系細胞は、例えば、ヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である。

(7) (4) または(5)に記載のベクターを神経系細胞に導入することを含む、神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法。

上記(7)において、RNAは、好ましくは、アプタマー、shRNA、siRNAまたはマイクロRNAなどの低分子RNAである。また、神経系細胞は、例えば、ヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である。

(8) (4) または(5)に記載のベクターを神経系細胞に導入し、shRNAまたはsiRNAを神経系細胞選択的に発現させることを含む、RNA干渉方法。

神経系細胞は、例えば、ヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である。

(9) (4) または(5)に記載のベクターが導入されたES細胞。

(10) (4) または (5) に記載のベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

上記 (10) において、例えば、(9) に記載の ES 細胞から発生させたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を挙げることができる。

5

本発明により、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、神経系細胞に選択的に RNA を発現させるベクターおよび神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法が提供される。

本発明により、神経系細胞選択的に RNA を発現させることができる。したがって、例えば、RNAi に用いられる siRNA、shRNA (short hairpin RNA) といった低分子 RNA を神経系細胞に発現させることにより、神経系細胞特異的に RNAi を誘導することができる。また、アプタマーまたはマイクロ RNA などの機能的な RNA を神経系細胞に特異的に発現させることにより、神経系細胞のタンパク質の機能解析を行うことができる。

15 また、本発明はげっ歯類だけでなく、ヒト由来の細胞においても適用できるため、種々の神経系細胞におけるタンパク質の機能的解析や創薬研究に役立てることができる。

図面の簡単な説明

20 図 1 は、本発明のプロモーターが、神経系細胞で特異的に機能することを示す図である。

(A) 神経系細胞で特異的に転写された BC1 RNA のノーザンブロット解析。左のパネルは、NG108-15 細胞あるいは NIH3T3 細胞からの total RNA を、(B) に示したプローブとハイブリダイズさせた結果を示す。右のパネルは、ゲルの臭化エチジウム染色である。(B) BC1 RNA 遺伝子と、構築したレポーター遺伝子 clone K3-tag の略図。BC1 RNA の転写に影響を及ぼす DNA 配列を示す ([3-8] 参照)。BC1 プローブと tag プローブの位置も示す。(C) 上のパネルは、clone

K3-tag を導入した細胞および導入しなかった細胞からの total RNA を、tag プローブとハイブリダイズさせた結果を示す。下のパネルは、ゲルの臭化エチジウム染色である。

図 2 は、本発明のプロモーターによって転写された低分子の RNA を利用した

5 RNAi に関する図である。

(A) pBC1-i ベクターの構造。ターミネーターの配列は 5'-TTTTT-3' である。MCS はマルチクローニングサイトである。(B) 本発明のプロモーターによって転写される β -secretase 1 (BACE1) をターゲットとした siRNA のための鋳型 DNA の配列。(C) pBC1-i/BACE1 を導入した神経系細胞における BACE1 発現の抑

10 制。NG108-15 細胞または NIH3T3 細胞に、pBC1-i/BACE1 あるいはコントロール (CR) として pBC1-i ベクターを導入した。24 時間後、BACE1 の発現レベルをウエスタンブロット解析により調べた。用いたサンプルの確かさは、抗体を用いて β -actin タンパク質のレベルに変化がないことで示した(下パネル)。

図 3 は、pBC1-i/BACE1 を導入した初代培養ニューロンにおける BACE1 の発

15 現に対する抑制効果を示す図である。ラット初代培養海馬ニューロンに、pBC1-i と pEGFP、あるいは pBC1-i/BACE1 と pEGFP を共導入 (co-transfection) した 36 時間後に、GFP を発現している細胞の内在性 BACE1 レベルを抗 BACE1 抗体で免疫染色して調べた。

パネル(a)は pBC1-i と pEGFP を co-transfection したニューロンの GFP シグナルであり、パネル(b)は内在性 BACE1 のシグナルである。パネル(c)は pBC1-i/BACE1 と pEGFP を co-transfection したニューロンの GFP シグナルであり、パネル(d)は内在性の BACE1 のシグナルである。

20

図 4 は、本発明のプロモーターがヒトの神経系細胞 SH-SY5Y でも機能し、pBC1-i/BACE1 が内在性の BACE1 の発現を抑制することを示す図である。

25 (A) BC1 RNA は、げっ歯類の神経系細胞で特異的に転写される RNA である。上パネルはげっ歯類の NG108-15 細胞またはヒトの SH-SY5Y 細胞の total RNA を BC1 プローブとハイブリダイズさせた結果を示す。下パネルは、臭化

エチジウム染色したゲルを示す。(B) 上パネルは、clone K3-tag を導入または未導入の SH-SY5Y 細胞からの total RNA を、tag プローブとハイブリダイズさせた結果を示す。下パネルは、ゲルの臭化エチジウム染色を示す。(C) pBC1-i/BACE1 による SH-SY5Y 細胞中での BACE1 発現の抑制。細胞に pBC1-i/BACE1 またはコントロールとして pBCi ベクターを導入した。24 時間後、抗 BACE1 抗体を用いて BACE1 レベルを調べた（上パネル）。用いたサンプルの確かさは、抗体を用いて β -actin タンパク質のレベルに変化がないことで示した（下パネル）。

10 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

15 なお、本明細書において引用した文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、2005年7月22日に出願し、本願優先権主張の基礎となる米国仮出願 US60/702,019 号の開示内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。

20 1. 概要

ベクターを基にした神経系細胞選択的な RNAi システムの構築は、神経系遺伝子の機能の分子細胞学的研究や神経系疾患の治療法の開発にとって重要である。RNAi のための短い二本鎖 RNA は、U6、H1 または tRNA などの RNA ポリメラーゼ III プロモーターにより、効率良く発現されることが知られている[2、15-17]。

25 しかし、これらの Pol III プロモーターは全ての細胞で機能し、Pol III により転写される遺伝子のほとんどが転写部位特異性を示さないことが知られている。すなわち、一般的に、Pol III プロモーターによる転写システムは、細胞のタイプに

よる選択的な RNAi には適していないといえる。

本発明者は、Pol III により転写される遺伝子の中で、げっ歯類 BC1 RNA 遺伝子は神経系細胞に特異的に転写されることに着目した。そして、BC1 RNA 遺伝子の示す神経系細胞選択性は、BC1 RNA 遺伝子に独特の性質であり、また、BC1 RNA 遺伝子が低分子の非翻訳性の RNA であることから、BC1 RNA 遺伝子のプロモーターを用いれば、どのような小さな RNA でも神経系に選択的に転写できると仮定した。

そこで、本発明者は、BC1 RNA 遺伝子のプロモーターを、RNA 発現システムに応用することを試みた。まず、RNAi に用いられる短いヘアピン構造を有する shRNA の発現に BC1 RNA 遺伝子プロモーターを応用する目的で、神経系細胞選択的に RNA を発現させるのに適切なプロモーター領域を BC1 RNA 遺伝子の塩基配列から選択し、pBC1-i ベクターを構築した。pBC1-i ベクターは、BC1 RNA の効率的な転写に必要な上流の転写活性化領域から内部プロモーターまでの連続的な配列を含むベクターである。また、RNAi のターゲットとして、アミロイド β (A β) ペプチドの生成に必須な酵素である BACE1 を選択した。そして、BACE1 に対する shRNA をコードする DNA 配列を pBC1-i のプロモーター部分にリンクさせ、その構築物 pBC1-i/BACE1 を培養神経系細胞に遺伝子導入した。その結果、このプロモーターをターゲット配列にリンクしたベクターは、げっ歯類の NG108-15 細胞中で機能し、BACE1 タンパク質の発現を抑制したが、非神経系の細胞である NIH3T3 細胞では機能しなかった。また、このベクターは、ラットの初代培養海馬ニューロンにおいても同様の効果を示した。すなわち、本発明者は、pBC1-i に含まれるプロモーターは、げっ歯類の神経系腫瘍細胞 NG108-15 においても、ラットの培養海馬ニューロンにおいても、BACE1 タンパク質の発現を特異的に抑制することを見出した。

さらに、BC1 RNA 遺伝子はげっ歯類に特異的な遺伝子であるが、前記のベクターはヒトの神経系腫瘍細胞の SH-SY5Y でも活性を示し、ターゲットタンパク質の発現を抑えることがわかった。すなわち、本発明者は、選択した BC1 RNA

遺伝子のプロモーター領域が、ヒト由来の神経系腫瘍細胞 SH-SY5Y においても RNA を産生することを見い出し、pBC1-i/BACE1 が、ヒト由来の細胞で機能することを確認した。

5 本発明は以上のように完成されたものであり、本発明は主に、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、当該プロモーターを含むベクターであって、神経系細胞選択的に RNA を発現させるベクター、および当該ベクターを利用する神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法に関する。

10 本発明のベクターを利用した shRNA などの低分子 RNA 発現システムは、将来の神経系細胞選択的な RNAi の開発、遺伝子導入動物の作成、治療方法、治療剤への応用などにおいて重要な構成要素となる。

以下、本発明を詳細に説明する。

2. 本発明のプロモーターおよびベクター

(1) 本発明のプロモーター

15 BC1 RNA は、神経系の細胞に特異的な non-mRNA (タンパク質をコードしない RNA) であり、RNA ポリメラーゼ III (Pol III) で転写される RNA である。BC1 RNA には、例えば、配列番号 1 で表される塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、配列番号 1 で表される塩基配列は、GenBank accession number : M16113 に記載されている。

20 本発明者は、これまでに、BC1 RNA の転写が、Pol III のための内部プロモーターと BC1 RNA 遺伝子の 5' 上流に存在し得る転写活性化配列である隣接領域の両方によって調節されることを報告している。この 5' 上流領域には、Pol II による転写システムの構成因子と思われるいくつかのユニークな遺伝子上の配列が含まれることが知られている (図 1B)。

25 本発明は、神経系細胞選択的に RNA を転写または発現させるプロモーター (以下、「本発明のプロモーター」とも称する) を提供する。本発明のプロモーターは、BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において少なくとも BC1 RNA 遺伝子の 5' 上

流領域（-248 番～-243 番）に位置する E2 サイトから、内部プロモーター配列までを含むポリヌクレオチドを意味する。ここで、E2 サイトは、CAATTG からなる配列で、一般に CANNTG で表わされる E-box 配列の一種である。また、BC1 RNA 遺伝子の内部プロモーターには、塩基番号+1～+78 の間に存在する Pur α 結合配列（GGGGTTGGGG（配列番号 4））、Pol III プロモーターとして知られる A-box 配列（TAGCTCAGTGGT（配列番号 5））および B-box 配列（GGTTCGGTCC（配列番号 6））、並びにそれらに挟まれた領域にある GCAAG/CTTGC モチーフ（AGAGCGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTG（配列番号 7））が含まれる。

- 10 本発明のプロモーターは、少なくとも E2 サイトから内部プロモーター配列までの連続する領域を含む限り、5'末端側にさらに BC1 RNA 遺伝子上流部分に位置する BCRE(-638 番～-685 番)の手前までのポリヌクレオチドを含有させてもよい。すなわち、本発明のプロモーターは、BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において-248 番目から+78 番目の塩基配列を含む限り、-637 番目までの連続する塩基配列の一部または全部を含有するポリヌクレオチドも含まれる。本発明のプロモーターは、例えば、BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において少なくとも-324 番目から+78 番目の塩基配列（配列番号 2）を含むポリヌクレオチドが含まれる（図 2 B 「BC1 promoter」）。

- 20 本明細書では、プロモーターまたはプロモーター領域は、遺伝子の転写に影響を及ぼすヌクレオチドを意味し、プロモーター活性を有する領域に加え、エンハンサーやサイレンサーなどの転写調節配列を含んでいてもよい。なお、プロモーター活性とは、遺伝子から mRNA への転写能力を意味する。

- 25 また、本発明のプロモーターは、配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも含まれる。配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、本発明のプロモーターと実質的に同じ活性を有するポ

リヌクレオチドであることが好ましい。

本発明において、「本発明のプロモーターと実質的に同じ活性を有する」とは、プロモーター活性を有し、その活性の程度が配列番号 2 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドによる活性の 10 % 以上、好ましくは 20 % 以上、より好ましくは 30 % 以上有することを意味する。

本発明のプロモーターのプロモーター活性は、転写で生じた RNA を公知の方法に従って定量することで、測定することができる。例えば、プロモーター配列に連結したレポーター遺伝子を細胞内へ導入し、生じた RNA をノーザンブロットや RT-PCR によって定量する。あるいは、*in vitro* の転写系を用いて生じる RNA をノーザンブロットや RT-PCR によって定量する。または、*in vitro* で放射能標識や蛍光標識したヌクレオチドを基質として用いて転写させることにより、生じた RNA に含まれる放射活性や蛍光を測定し、生じた RNA を定量する。

本明細書において、ストリンジェントな条件は、ハイブリダイゼーション時の条件として、例えば、50%ホルムアミド、5×SSPE (または SSC)、5×Denhardt's solution、1%SDS、0.1mg/ml salmon sperm DNA を含む溶液 (ハイブリダイゼーションバッファー) 中で 42°C という条件を挙げることができる。この場合、stringency は 90~95% で、37°C では 85~90%、32°C では 85~90% と考えられる。ホルムアミドを含まない aqueous solution 中では、68°C でハイブリダイゼーションを行うこともできる。

また、本明細書において、ストリンジェントな条件は、ハイブリダイゼーション後の洗浄条件として、例えば、「2×SSC、0.1%SDS、42°C」、「1×SSC、0.1%SDS、37°C」、よりストリンジェントな条件としては、例えば、「1×SSC、0.1%SDS、65°C」、「0.5×SSC、0.1%SDS、50°C」等の条件を挙げることができる。「2×SSC、0.1%SDS、室温」に続き、「0.2×SSC、0.1%SDS、52°C」の条件で洗浄してもよい。

本明細書において、ハイブリダイゼーションは、公知の方法によって行うことができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、「Molecular Cloning, A

Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、
「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997))
等を参照することができる。

5 本発明において、配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなる
ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレ
オチドは、例えば、配列番号 2 で表される塩基配列と少なくとも 80%以上、好
ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、さらに好ましくは 97%以上
の同一性（相同性）を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドがあげられる。同
一性を示す値は、BLAST などの公知のプログラムを利用することにより算出す
10 ることができる。

また、配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレ
オチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、
例えば、配列番号 2 で表される塩基配列において 1 個または複数個の核酸に欠失、
置換または付加などの変異の生じた塩基配列を含むポリヌクレオチドがあげられ
15 る。

ここで、配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌク
レオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、
例えば、(a)配列番号 2 で表される塩基配列中の 1～10 個（例えば、1～5 個、
好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1～2 個、さらに好ましくは 1 個）の核酸
20 が欠失した塩基配列、(b)配列番号 2 で表される塩基配列に 1～10 個（例えば、
1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1～2 個、さらに好ましくは 1
個）の核酸が付加した塩基配列、(c)配列番号 2 で表される塩基配列中の 1～10
個（例えば、1～5 個、好ましくは 1～3 個、より好ましくは 1～2 個、さらに
好ましくは 1 個）の核酸が他の核酸で置換された塩基配列、(d)上記(a)～(c)の組
25 合せにより変異された塩基配列などがあげられる。

配列番号 2 で表される塩基配列において 1 個または複数個の核酸に欠失、置換
または付加などの変異の生じた塩基配列を含むポリヌクレオチドは、「Molecular

Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))、
「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997))、
特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel
(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method.
5 Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載
の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

また、ポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel 法や Gapped duplex
法等の公知手法により、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、
例えば QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製)、
10 GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、
TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express
Km 等：タカラバイオ社製) 等を用いて行うことができる。

また、本発明のプロモーターは、配列番号 2 で表される塩基配列の遺伝子多型
を含む。遺伝子多型は、公知のデータベース、例えば、GenBank
15 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)を利用することにより、容易に知ることができる。
遺伝子多型には、一塩基多型(SNP)、VNTR(variable number of tandem repeat)、
およびマイクロサテライト多型がある。

本発明のプロモーターは、配列番号 2 で表される塩基配列からなるポリヌクレ
オチド、またはその断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、
20 プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼー
ション法により、cDNA ライブラリーおよびゲノムライブラリーから得ることが
できる。ライブラリーの作製方法については、「Molecular Cloning, A Laboratory
Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。
また、市販の cDNA ライブラリーおよびゲノムライブラリーを用いてもよい。

25 本発明のプロモーターの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定するこ
とにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネ
ーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 等により

行うことができる。また、適当な DNA シークエンサーを利用して配列を解析することも可能である。

(2) 本発明のベクター

- 5 本発明は、本発明のプロモーターを含むベクターを提供する。本発明のベクターは、好ましくは、本発明のプロモーターの発現制御下に神経系細胞選択的に RNA を発現させるように外来性ポリヌクレオチドを連結させることができ、このように外来性ポリヌクレオチドを連結させたベクターも本発明に含まれる。本発明のベクターは神経系細胞選択的に RNA を発現させるのに有用である。
- 10 本発明のベクターは、神経系細胞選択的に RNA を発現させ得る限り、基本となるベクターの由来は特に限定されず、例えば、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスもしくはバキュロウイルスなどの無毒化した
- 15 動物または昆虫ウイルスを使用することができる。また、例えば、pBluescript II SK+ ベクター、pBR322 ベクター、pUC18/19 ベクター、M13 ベクター、pREP4 ベクター、pCEP4 ベクター、pcDNA 系ベクターなどの市販のベクターを利用することもできる。

- 本発明のベクターは、神経系細胞選択的に RNA を発現させ得る限り、ターミ
- 20 ネーター、マルチクロニングサイト (MCS)、選択マーカーなどを含んでもよい。例えば、ターミネーターは、ベクターに組み込まれた外来性のポリヌクレオチドの転写を終結させるのに必要であれば、本発明のベクターに含むことが好ましい。ターミネーターは、例えば、oligo(T)配列などの Pol III 用ターミネーターが挙げられる。また、選択マーカーとしては、例えば、薬剤耐性遺伝子 (ネ
- 25 オマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等)、蛍光タンパク質 (GFP、EGFP 等) などが挙げられる。さらに、必要に応じリンカーの付加を行ってもよい。

ベクターに外来性のポリヌクレオチドを挿入するには、リガーゼ反応を利用することができる。例えば、精製された DNA を適当な制限酵素で切断し、得られた DNA 断片をベクター中の適当な制限酵素部位またはマルチクローニングサイトに挿入することでベクターに連結する方法などが採用される。

- 5 実施例において、BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において BC1 RNA 遺伝子の 5' 側の E2 サイトを含む領域から BC1 RNA の内部プロモーター配列を含む領域まで (-324~+78) を、ターミネーターとして oligo(T)配列を付加した pBluescript II SK+ベクターに挿入したベクター (pBC1-i) は、本発明のベクターに含まれる。

10 (3) 外来性のポリヌクレオチド

本発明において、外来性のポリヌクレオチドは、神経系細胞選択的に発現される RNA をコードするポリヌレオチドであり、本発明のプロモーターの制御下で転写されるように、本発明のベクターに連結されるものである。

- 15 ベクターに本発明のプロモーターまたは外来性のポリヌクレオチドを挿入するには、外来性のポリヌクレオチドが本発明のプロモーターの制御を受けて適切に転写されるように挿入し連結すればよい。より具体的には、本発明のプロモーターの下流に存在する適当な制限酵素切断部位に、外来性のポリヌクレオチドが正しく転写される方向に組み込めばよい。または、外来性のポリヌクレオチドの上流に存在する適切な制限酵素切断部位に、本発明のプロモーターが正しく機能する方向に組み込めばよい。
- 20

- 本発明において、神経系細胞選択的に発現される RNA は、特に限定されないが、好ましくは低分子 RNA である。低分子 RNA には、アプタマー、shRNA、siRNA、マイクロ RNA などをあげることができる。低分子 RNA の塩基長は、例えば、10~300 塩基、好ましくは 15~100 塩基、より好ましくは 15~60 塩基である。
- 25

アプタマーは、抗体のように所定のタンパク質に対して特異的に結合し、タンパク質の機能を阻害し得る 20~60mer のオリゴヌクレオチドである。また、ア

5 プタマーはタンパク質以外にも、化合物、ペプチドなどにも結合することが知られている。このように、アプタマーは結合する対象に制約がないだけでなく、一般の抗体よりも高い親和性と特異性をもって対象に結合することが可能である。さらに、アプタマーは、その合成やラベル化が容易といった利点もあるため、タンパク質の機能解析や創薬研究における強力なツールとしても期待されている分子である。

所定の対象に対するアプタマーは、公知の方法で選択することができ、例えば SELEX (in vitro selection 法) によって選択することができる。

10 本発明において、アプタマーを神経系細胞選択的に発現するベクターは、選択されたアプタマーの塩基配列から DNA を合成し、得られた DNA を外来性のポリヌクレオチドとして本発明のプロモーターの制御下でアプタマーを発現するようにベクターに連結することで、作製することができる。

また、培養神経系細胞における sh (short hairpin) RNA または siRNA の発現に対して、本発明のプロモーターを適用することができる。shRNA および siRNA
15 は、RNAi に用いられる低分子 RNA である。RNAi に用いるベクターは、ヘアピン型とタンデム型の 2 種類に大別できる。まず、ヘアピン型ベクターは、プロモーター配列の下流に shRNA の塩基配列を挿入した発現ベクターである。細胞に導入された発現ベクターから転写された shRNA は、核から細胞質へ輸送され、Dicer によるプロセッシングを受けて siRNA と同様の 2 本鎖 siRNA になる。それ
20 に対して、タンデム型ベクターはそれぞれがプロモーター配列をもつセンス鎖とアンチセンス鎖の鋳型配列が挿入されたベクターである。それぞれ別々に転写されたセンス鎖とアンチセンス鎖がアニーリングして siRNA を形成する。本発明においては、ヘアピン型およびタンデム型のいずれのベクターも採用することができる。

25 shRNA または siRNA の配列は、公知の方法で選択することができる。また、公知の文献から選択することもできる。siRNA (15~25mer) は、ターゲットとなる mRNA の塩基配列に相補的な短い塩基配列、またはこの短い塩基配列に相

補的な塩基配列として設計することができる。また、shRNA は、ターゲットとなる mRNA の塩基配列に相補的な短い塩基配列（センス鎖）と、この短い塩基配列に相補的な塩基配列（アンチセンス鎖）と、これら 2 つの塩基配列の間のスペーサー配列（約 10 塩基程度）とからなる配列となるように設計することができる。例えば、実施例では、BACE に対する効果的な siRNA 配列情報（19mer）から、センス鎖とアンチセンス鎖をスペーサーで分離した逆向きの繰り返し配列（センス鎖－スペーサー－アンチセンス鎖）を設計し、shRNA 配列を作製している（図 2B）。また、例えば、インビトロジェン社の設計サービスを利用して、siRNA から shRNA への設計変更することもできる。

- 10 本発明において、siRNA または shRNA を神経系細胞選択的に発現するベクターは、上記のように設計された siRNA または shRNA の塩基配列から DNA を合成し、得られた DNA を外来性のポリヌクレオチドとして本発明のプロモーターの制御下で siRNA または shRNA を発現するようにベクターに連結することで、作製することができる。このように作製された本発明のプロモーターを含有する
- 15 ベクターは、神経系細胞において shRNA または siRNA の発現用のベクターとして、RNAi に用いることができる。

また、マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしない約 15～25mer の機能的な RNA である。マイクロ RNA は、翻訳調節因子としての役割などを担うことで様々な生命現象に関わると考えられている。

- 20 マイクロ RNA の配列は、公知のデータベースから入手することができる。

本発明において、マイクロ RNA を神経系細胞選択的に発現するベクターは、上記のように入手したマイクロ RNA の塩基配列から DNA を合成し、得られた DNA を外来性のポリヌクレオチドとして本発明のプロモーターの制御下でマイクロ RNA を発現するようにベクターに連結することで、作製することができる。

25

本発明のベクターを宿主に導入することで、形質転換体を作製することができ、当該形質転換体も本発明の範囲に含まれる。本発明のベクターは、例えば、形質転換体

で増幅することで、製造することもできる。

本発明において使用される宿主は、特に限定されるものではないが、例えば大腸菌、枯草菌などの細菌、酵母(*Pichia*、*Saccharomyces*)、カビ (*Aspergillus*)、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等が挙げられる。なお、本発明において神経系細胞を形質転換体

5 の宿主として用いる場合については、後述する。

大腸菌としては、例えば、大腸菌 K12 株や B 株、あるいはそれら野生株由来の派生株である JM109 株、XL1-Blue 株、C600 株などを挙げるができる。これら菌株は、例えば、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション (ATCC) などから容易に入手することができる。枯草菌としては、例えば、バチルス・ズブチリス(*Bacillus*
10 *subtilis*)などが挙げられる。

宿主へのベクターの導入方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE デキストラン法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等の公知の方法があげられる。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法にしたがって行うことができる。培養培地は、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地が望ましく、当業者であれば公知の培地から適宜選択することができる。培養条件は、特に限定されないが、10℃～45℃、好ましくは、10℃～40℃
15 の温度下で、5～120 時間、好ましくは 5～100 時間程度行う。

また、培養中に形質転換体からベクターの脱落を防ぐために、薬剤選択マーカー
20 ーによる選択圧をかけた状態で培養してもよい。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を含むベクターで形質転換した大腸菌を培養する場合、培養中に、必要に応じてアンピシリンを培地に添加してもよい。

本発明のベクターを導入した形質転換体を培養し、得られる培養物から本発明のベクターを採取することができる。ここで、培養物とは、培養上清、培養細胞、
25 培養菌体または細胞もしくは菌体の破碎物のいずれをも意味するものである。

例えば、形質転換体を培養した後、培養物を遠心処理により回収し、得られた培養物からアルカリ法により本発明のベクターを採取することができる。形質転

換体からベクターを採取するには、市販のキット (QIAGEN) を利用してもよい。

3. 神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法

- 本発明において、本発明のベクターを神経系細胞に導入することで、選択的に
- 5 RNA、好ましくは低分子 RNA を発現する神経系細胞を得ることができる。したがって、本発明は、本発明のベクターが導入された神経系細胞を提供し、また、本発明のベクターを神経系細胞に導入することを含む神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法を提供する。さらに、本発明は、本発明のプロモーターを挿入したベクターを導入した ES 細胞、または適当な分化条件により ES 細胞から分
- 10 化誘導された細胞なども提供する。

本発明において、神経系細胞とは、ニューロンおよび神経由来の培養細胞を意味する。ニューロンは、末梢神経系ニューロンを使用してもよいし、中枢神経系ニューロンを使用してもよい。培養細胞は、株化培養細胞を使用してもよいし、初代培養神経系細胞を使用してもよい。

- 15 本発明において、神経系細胞の由来は、特に限定されず、例えば、ヒト、サル、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、ラット、マウスなどのげっ歯類由来の神経系細胞があげられ、好ましくはヒトまたはげっ歯類由来の神経系細胞である。

- 株化培養細胞は、例えば、NG108-15 細胞、SH-SY5Y 細胞をあげることができる。これらの細胞株は、公知の方法で培養することができ、例えば、10% FBS
- 20 (ウシ胎児血清) 含有 DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地) 中で、37°C、5% CO₂ の条件下で培養することができる。

- 初代培養神経系細胞は、例えば、海馬由来の神経系細胞を挙げることができる。海馬神経系細胞の初代培養は、例えば、胎生 18 日のラットの脳から海馬を採取し、採取した海馬から神経系細胞を単離した後、細胞をポリリジンコートしたガ
- 25 ラス上で 0.5 mM L-グルタミン、2% B-27 Supplement (インビトロジェン) 含有 Nuerobasal 培地で 2 日間培養することができる。

本発明において、「選択的に」とは、本発明のプロモーターを介した RNA が

神経系細胞に限定して発現することを意味する。神経系細胞以外の細胞では、当該 RNA の発現が観察されないか、観察されることはあっても神経系細胞での発現量に比較してごく少量（例えば、神経系細胞の発現量の 30 % 以下、好ましくは 20 % 以下、より好ましくは 10 % 以下、さらに好ましくは 5 % 以下）である

5 ことを意味する。

神経系細胞に対するベクターの導入方法は、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAE デキストラン法などの公知の方法で行うことができる。また、ベクターがウイルスベクターの場合は、神経系細胞にウイルスベクターを接触させることで遺伝子導入することができる。例えば、神経系細胞の培養液にウイルスベクターを添加し、さらに培養することで遺

10

伝子導入することができる。このとき、ウイルスベクターは適宜濃縮したものをを用いてもよい。

本発明では、上記のようにして、低分子 RNA などの RNA を、神経系細胞選択的に発現させることができる。したがって、本発明は、本発明のベクターを神経系細胞に導入することを含む、神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法を提供する。また、発現させる RNA が shRNA または siRNA である場合、shRNA または siRNA により標的 mRNA が分解される。したがって、本発明は本発明のベクターを神経系細胞に導入し、神経系細胞選択的に shRNA または siRNA を発現させることを含む、RNA 干渉方法を提供する。さらに、発現させる RNA がア

15

20

プタマーである場合は、アプタマーにより標的タンパク質の機能が阻害される。したがって、本発明は、本発明のベクターを神経系細胞に導入し、神経系細胞選択的にアプタマーを発現させることを含む、タンパク質のノックダウン方法を提供する。

25

神経系細胞における RNA の発現は、公知の方法で確認することができる。例えば、神経系細胞への遺伝子導入の際に、本発明のベクターとともに蛍光タンパク質をコードする DNA を含むベクターを細胞に導入し、蛍光タンパク質の蛍光

を指標に本発明のベクターの導入を確認することができる。

また、標的 mRNA の発現は、ノーザンブロット、*in situ* ハイブリダイゼーション、RT-PCR、定量的 PCR などの公知の方法によって確認することができるが、好ましくは、ノーザンブロットによる方法である。ノーザンブロットは、例えば、

5 実施例に記載の方法にしたがって行うことができる。

また、標的タンパク質の発現は、ウェスタンブロット、免疫細胞化学法、免疫組織化学法、ELISA、RIA などの免疫化学的方法、質量分析法などの公知の方法によって測定することができる。ウェスタンブロットおよび免疫細胞化学法は、例えば、実施例に記載の方法にしたがって行うことができる。

10

4. トランスジェニック非ヒト哺乳動物

本発明のプロモーターを含むベクターを非ヒト哺乳動物に組み込むことにより、神経系細胞に RNA を選択的に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作成することができる。

15

本発明における「哺乳動物」とは、ウシ、ウマ、ブダ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモット等の任意の非ヒト哺乳動物を意味し、好ましくはマウス、ウサギ、ラットまたはハムスターであり、特に好ましくはマウスである。

20

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、全能性細胞に対して、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより、本発明のプロモーターを含むベクターを導入することにより作製することができる。本発明のベクターを導入する全能性細胞として、受精卵、未受精卵、初期胚、ES 細胞などを挙げることができ、ES 細胞が好ましい。

25

細胞への遺伝子の挿入は、受精卵に直接 DNA を注入する方法も採用できるが、ES 細胞は、培養が可能であり、しかも ES 細胞からマウス等を発生させることができるという利点を有しているため、各種 ES 細胞を用いる方法がより効率的で

好ましい。本発明は、本発明のベクターを導入した ES 細胞を提供する。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、本発明のベクターを導入した細胞を初期胚と集合させ、または胚盤胞腔に注入してキメラ胚を得、得られたキメラ胚を偽妊娠させた雌の子宮に移植し、個体まで発生させることによって作製
5 することができる。得られた動物の中から神経系細胞選択的に目的の RNA を発現しているものを選択することにより、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物に由来する神経系細胞も、本発明に含まれる。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、上記動物のほか、その子孫も
10 含む。前記子孫は、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物同士を交配させ、または、本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物と通常の非ヒト哺乳動物とを交配させることにより得ることができる。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、神経系細胞選択的に RNA を発現するため、神経系細胞に発現するタンパク質の研究に用いることができる。
15 また、所定の mRNA またはタンパク質の発現を抑制することができるため、遺伝子またはタンパク質の欠損に由来する疾患のモデル動物として、治療剤や治療方法の開発に用いることもできる。

実施例

20 以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

1. 材料と方法

25 (1) プラスミド DNA の調製

レポータープラスミド clone K3-tag は、既報の方法にしたがって、clone K1-tag から構築した[6-8]。

pBC1-i ベクターを調製するために、BC1 RNA 遺伝子の 5'側の E2 サイトを含む上流領域から BC1 RNA 遺伝子の内部プロモーター配列とを含む領域まで (-324~+78)を、ラットゲノム DNA ライブラリーから BC1 RNA 配列をプローブとしてクローニングした BC1 RNA 遺伝子領域を鋳型とし、ベクターへの挿入のために Xho I サイトを付加した 5'側のプライマーと Hind III サイトを付加した 3'側プライマーとを用いた PCR により得た。

5'側プライマー：TGTGCTCGAGTGTGTTCACTTAGCCCTCC (配列番号 8)

3'側プライマー：TTTTAAGCTTCGGAGCTGAGGACCGAAC (配列番号 9)

そして、得られた DNA 断片を、予め Pol III 用ターミネーターとして 5 塩基長の T 配列をマルチクローニングサイトの Spe I サイトに付加した pBluescript II SK+ ベクターの Xho I サイトと Hind III サイトの間へ挿入した。得られたベクターを、pBC1-i ベクターとした (図 2 A)。

次に、pBC1-i/BACE1 を調製するために、哺乳動物細胞において BACE1 に対する効果的な siRNA であることが明らかな、19ヌクレオチドの配列を選択した [11]。そして、一つのステムを含む短いヘアピン RNA (shRNA)を形成するように、選択した配列 (センス鎖) とセンス鎖に相補的な配列 (逆向きの配列) (アンチセンス鎖) との間にスパーサーを挿入した配列を作製し、この配列をマルチクローニングサイトの Hind III と BamHI サイトを用いて pBC1-i ベクターに挿入した(図 2 A、B)。得られたベクターを、pBC1-i/BACE1 とした。

20 (2) 細胞培養と遺伝子導入

NG108-15 細胞、NIH3T3 細胞および SH-SY5Y 細胞は、10%牛胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。

海馬ニューロンの初代培養は、胎生 18 日 (E18) ラットの脳から調製した。細胞はポリリジンでコートしたガラスの上で、0.5 mM L-グルタミン、2%の B-27 Supplement (インビトロジェン) 含有 neurobasal 培地で 2 日間維持した。

細胞へのベクターの導入は、LipofectAmine 2000 試薬を用い、製造元 (インビトロジェン) の説明書に記載の方法にしたがって行った。

DNA (1~2 μ g) を opti medium 100 μ l に加えたものと、5 μ l の LipofectAmine2000 を opti medium 95 μ l に加えて混和したものとを合わせ、室温で 30 分放置後、さらに opti medium 800 μ l を加えて 1ml とした。直径 3.5 cm のディッシュに 60~70% コンフルエントとなっている細胞を、この溶液を用いて 5 時間培養した後、培養液を DMEM に交換して、1~2 日間培養した。

(3) ノーザンブロット解析

Total RNA は、培養細胞から AGPC 法 [12] によって抽出した。RNA (10 μ g) は、変性させ、ホルムアミド変性アガロースゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。ハイブリダイゼーションは、 32 P で標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションバッファー (5 x SSPE、5 x Denhardt's 試薬、50% ホルムアミド、1% SDS、0.1 mg/ml サケ精巢 DNA) 中で 42°C で一晩行った。

ニトロセルロース膜は、2 x SSC-0.1% SDS で室温で 30 分洗浄し、続いて 0.2 x SSC-0.1% SDS で 52°C で 10 分間の洗浄を 2 回行った。ハイブリダイゼーションシグナルは、オートラジオグラフィーで検出した。

15 (4) ウェスタンブロット解析

ベクターを導入した細胞を、24 時間培養した後、回収した。回収した細胞を溶解して細胞溶解液を調製し、得られた細胞溶解液を SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写し、ブロッキングバッファー (すなわち、5% スキムミルクを含む TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween 20)) で一晩ブロッキングした。タンパク質は抗 BACE1 抗体 (Calbiochem) とブロッキングバッファー中で 2 時間反応させた。その膜を洗浄した後、西洋ワサビ過酸化酵素を結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Biosciences) と 1 時間インキュベートした。最後に、膜を TBST で洗浄し、タンパク質のシグナルを ECL キット (Amersham Biosciences) で検出した。

25 (5) 免疫細胞化学

初代海馬ニューロンに、pEGFP と pBC1-i/BACE1 を共導入した (co-transfection)。36 時間インキュベーションした後、細胞を PBS で洗い、

4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で 10 分間固定した後、1% Triton-X100 含有 PBS で 15 分間処理した。固定された細胞を、5%スキムミルク含有 PBS 中で抗 BACE1 抗体と 2 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄し、Alexa Fluor 546 を結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) を加え、1 時間インキュベートした。蛍光シグナルは、DP-70 イメージングシステムとリンクしたオリンパス倒立顕微鏡を用いて観察した。

2. 結果

(1) 培養神経系細胞で効率的な転写を起こす BC1 RNA 遺伝子のプロモーター領域

本実施例では、培養神経系細胞で RNAi を行うことを目的として、shRNA を産生するために本発明のプロモーターを応用した。

まず、BC1 RNA がラット神経系細胞株である NG108-15 細胞で選択的に発現し、非神経系細胞株である NIH3T3 細胞では、BC1 RNA の発現が非常に低レベルであることを、ノーザンブロット解析により確かめた (図 1 A)。

図 1 B は、BC1 RNA 遺伝子における、BC1 RNA 転写の調節配列を示している。様々なエレメントが遺伝子内部とその上流に位置する隣接領域に存在している。隣接領域には、BC1 RNA 転写を活性化する E2 サイト (E-box 配列、-248) が存在し、さらに上流域に存在する BCRE (BC1 RNA repressive element、-683) は BC1 RNA 転写を抑制する。そのため、この E2 サイトを含む隣接領域が、培養神経系細胞中で効果的かつ選択的に BC1 RNA の転写を起こすかどうかを、次に検討した。

検討では、E2 サイトを含むプロモーターを有し、さらに BC1 RNA 遺伝子の 3' 部分に特異的な tag 配列 (20 塩基長) をつけたレポータープラスミド clone K3-tag (図 1 B) を細胞に導入した。そのレポーター遺伝子から新たに合成された BC1 RNA は、tag プローブにより、神経系細胞である NG108-15 細胞では検出されたが、非神経系細胞の NIH3T3 細胞では検出されなかった (図 1 C)。こ

の結果は、E2 サイトを含む本発明のプロモーター配列が、神経系細胞選択的に低分子の RNA を転写させることに利用できることを示している。

(2) げっ歯類の神経系細胞中における、本発明のプロモーターから生じる shRNA による遺伝子発現の抑制

5 本発明のプロモーターを用いた神経系細胞選択的な RNAi の可能性を確かめるために、プラスミドベクター DNA である pBC1-i ベクターを構築した。pBC1-i ベクターは、Pol III による転写に必要な内部プロモーターを含む BC1 RNA 構造遺伝子の 5' 側半分の領域およびその上流に存在する転写活性化配列である隣接領域を有している (-324~+78) (図 2 A、B)。

10 次に、BACE1 mRNA をターゲットにした短い逆向きのくり返し配列を、ステム付の shRNA を形成するように、pBC1-i ベクターのマルチクロニングサイトにつなぎ、pBC1-i/BACE1 を作製した (図 2 B)。挿入した塩基配列を配列番号 3 に記載する。

配列番号 3 :

15 GCTTTGTGGAGATGGTGGActtccggtcaTCCACCATCTCCACAAAGC

ここで、BACE1 は、全ての組織で発現しているが、脳で最も高レベルに発現し、アルツハイマー病の進行の鍵となる酵素として知られている。なお、これまでに、このターゲット配列を二本鎖の siRNA にして、初代培養ニューロンに導入すると、BACE1 の発現を効果的に抑制できるということが示されている[11]。

20 また、BACE1 を欠損するように改変したマウスや BACE1 をノックダウンした細胞では、重大な異常性は観察されないと言われている[9-11、13]。したがって、文献に記載のターゲット配列を用いて RNAi により BACE1 をノックダウンさせた場合は、BACE1 のノックダウン以外の細胞の異常を考慮する必要が無く、BACE1 の減少のみに注目できると考えられる。

25 続いて、NG108-15 細胞と NIH3T3 細胞について、pBC1-i/BACE1 あるいは対照として pBC1-i ベクターを導入し、細胞内の BACE1 タンパク質を検出するために抗 BACE1 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

その結果、図 2 C に示すように、BACE1 発現は NG108-15 細胞では抑制されたのに対し、NIH3T3 細胞では抑制されなかった。このことは、本発明のプロモーターが神経系細胞選択的に機能し、このプロモーターを介して転写された転写産物は siRNA として効果があることを示している。

- 5 次に、pBC1-i/BACE1 が、ラット初代海馬ニューロンでも機能するか否かを調べた。ニューロンに、pBC1-i/BACE1 と導入のマーカースとして pEGFP 発現ベクターとを共導入した。GFP を発現しているニューロンの BACE1 タンパク質レベルは、抗 BACE1 抗体を用いた免疫蛍光染色で調べた（図 3）。

- 10 その結果、コントロールである pBC1-i ベクター（図 3 「CR」）を導入したニューロンに比べて、pBC1-i/BACE1 を導入したニューロンでは、明らかな BACE1 のタンパク質レベルの減少が観察された。したがって、本発明の RNAi ベクター、pBC1-i/BACE1 は、初代海馬ニューロン中で選択的に BACE1 の発現を抑制することが明らかとなった。

- 15 （3）ヒト神経系細胞における RNAi に対する、本発明のプロモーターの効果

- 神経系細胞で選択的に転写される BC1 RNA 遺伝子は、げっ歯類に特異的な遺伝子である。そのため、これまでに、BC1 RNA 遺伝子プロモーターのヒト神経系細胞での活性は調べられていなかった。そこで、本実施例では、ヒト神経系細胞である SH-SY5Y 細胞における、本発明のプロモーターの活性を調べることを
20 目的とした。

図 4 A に示すように、BC1 RNA はげっ歯類由来の NG108-15 細胞では検出されるが、ヒト由来の SH-SY5Y 細胞では検出されないことから、ヒト神経系細胞では、BC1 RNA が発現していないことが確認された。

- 次に、SH-SY5Y 細胞に clone K3-tag を導入したところ、その遺伝子から tag
25 配列を含む BC1 RNA が転写された（図 4 B）。この結果は、本発明のプロモーターがヒトの神経系細胞でも機能することを意味している。

さらに、本発明のプロモーターから転写された RNAi 用の低分子の RNA が、

SH-SY5Y 細胞でターゲット遺伝子の発現を抑制できるかを調べるために、SH-SY5Y 細胞に pBC1-i/BACE1 を導入した。

その結果、BACE1 の発現量は、pBC1-i/BACE1 を導入した細胞で減少した (図 4 C) 。このことは、本発明のプロモーターが、ヒト神経系細胞へも応用できることを示しており、ヒト神経系細胞における RNAi においても効果が認められることを示している。

以上のように、本実施例では、本発明のプロモーターは、げっ歯類の神経系腫瘍細胞である NG108-15 では機能するが、げっ歯類の線維芽細胞腫 NIH3T3 では機能しないこと、そして、RNAi ベクター pBC1-i/BACE1 は、NG108-15 細胞と初代海馬ニューロン中で選択的に BACE1 の発現を抑制することを示した (図 1 ~ 3) 。これらの結果は、本発明の発現ベクターシステムが、今後、げっ歯類で行われるであろう神経系選択的な RNAi のための遺伝子導入において、ひとつの有効なツールとなり、神経系組織選択的な RNAi の開発に利用されうることを意味している。

本発明の pBC1-i ベクターシステムでは、BC1 RNA の 5'側の半分と、ターゲット配列を有する二本鎖の短いヘアピンタイプ RNA (shRNA) との融合型 RNA を生じる。近年、tRNA-siRNA の融合転写産物は、より確実に細胞質に存在し、U6-siRNA よりも効果的にダイサーにプロセッシングを受けるということが示されている[17]。ここで、BC1 RNA は、脳の細胞質 RNA で、その 5'側半分の領域は tRNA^{Ala} に由来している[18]。したがって、本発明の pBC1-i ベクターシステムで生じる融合型 RNA は、tRNA-siRNA の融合転写産物に相当するものであるといえる。すなわち、このことは、pBC1-i/BACE1 からの低分子の融合型転写産物と tRNA-siRNA ベクターからの低分子の融合型転写産物とのどちらについても、転写後のプロセッシングには同様なメカニズムが施されることを示唆している。なお、pBC1-i/BACE1 からの融合型転写産物を発現している細胞は、BACE1

発現の減少を除いては何も異常は見られなかった。

興味深いことに、本発明のプロモーターはヒトの神経芽腫である SH-SY5Y 細胞においても活性を持ち、pBC1-i/BACE1 を導入した細胞では BACE1 発現が抑制された (図 4)。このことは、げっ歯類とヒトの神経系培養細胞では、BC1 RNA の転写のために同様な因子が使われていることを示唆している。したがって、本発明のベクターを基にした RNAi システムは、疾病の治療法に有用である。なお、霊長類の脳では、BC200 RNA が、神経系細胞特異的に Pol III で転写されている [19]。しかし、BC200 RNA の転写調節機構についてはよくわかっていない。本発明のベクターシステムを BC200 RNA に応用することで、霊長類で働くベクターを基にした、もうひとつの siRNA 転写システムを作り上げることが可能になるだろう。

産業上の利用の可能性

本発明により、神経系細胞選択的に RNA を発現させるプロモーター、神経系細胞に選択的に RNA を発現させるベクターおよび神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法が提供される。

本発明により、神経系細胞に選択的に RNA を発現させることができる。したがって、例えば、RNAi に用いられる siRNA、shRNA といった低分子 RNA を神経系細胞に発現させることにより、神経系細胞特異的に RNAi を誘導することができる。また、アプタマーなどの機能的な RNA を神経系細胞に特異的に発現させることにより、神経系細胞のタンパク質の機能解析を行うことができる。

また、本発明はげっ歯類だけでなく、ヒト由来の細胞においても適用できるため、種々の神経系細胞におけるタンパク質の機能的解析や創薬研究に役立てることができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 8 : プライマー

配列番号 9 : プライマー

参考文献

- 5 [1] C.D. Novina, P.A. Sharp, The RNAi revolution, *Nature* 430 (2004) 161-164.
- [2] R. Wadhwa, S.C. Kaul, M. Miyagishi, K. Taira, Vectors for RNA interference, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6 (2004) 367-372.
- [3] J.A. Martignetti, J. Brosius, BC1 RNA: transcriptional analysis of a neural
10 cellspecific RNA polymerase III transcript, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995)
1642-1650.
- [4] S. Kobayashi, K. Anzai, Mutational analysis reveals that an array of
GCAAG/CTTGC motifs between sprit promoter sequences for RNA
polymerase III is essential for neural BC1 RNA transcription, *Biochim.
Biophys. Res. Commun.* 239 (1997) 407-411.
- 15 [5] S. Kobayashi, K. Agui, S. Kamo, Y. Li, K. Anzai, Neural BC1 RNA
associates with pur alpha, a single-stranded DNA and RNA binding
protein, which is involved in the transcription of the BC1 RNA gene,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 277 (2000) 341-347.
- [6] S. Kobayashi, K. Anzai, An E-box sequence acts as a transcriptional
20 activator for BC1 RNA expression by RNA polymerase III in the brain,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 245 (1998) 59-63.
- [7] S. Kobayashi, S. Kamo, A. Ohmae, K. Agui, Y. Li, K. Anzai, Identification
of a negative regulatory DNA element for neuronal BC1 RNA expression
by RNA polymerase III, *Biochim. Biophys. Acta* 1493 (2000) 142-150.
- 25 [8] S. Kobayashi, S. Kamo, K. Agui, T. Funakoshi, K. Anzai, Positive and
negative regulators for neuronal BC1 RNA transcription by RNA
polymerase III are possible members of the RNA polymerase II

transcription system, *Mol. Brain Res.* 111 (2003) 211-215.

- [9] S.L. Roberds, J. Anderson, G. Basi, M.J. Bienkowski, D.G. Branstetter, K.S. Chen, S.B. Freedman, N.L. Frigon, D. Games, K. Hu, K. Johnson-Wood, K.E. Kappenman, T.T. Kawabe, I. Kola, R. Kuehn, M. Lee, W. Liu, R. Motter, N.F. Nichols, M. Power, D.W. Robertson, D. Schenk, M. Schoor, G.M. Shopp, M.E. Shuck, S. Sinha, K.A. Svensson, G. Tatsuno, H. Tintrup, J. Wijsman, S. Wright, L. McConlogue, BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1317-1324.
- [10] Y. Luo, B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J.C. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, R. Vassar, Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation, *Nat. Neurosci.* 4 (2001) 231-232.
- [11] S.C. Kao, A.M. Krichevsky, K.S. Kosik, L.H. Tsai, BACE1 suppression by RNA interference in primary cortical neurons, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1942-1949.
- [12] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159.
- [13] Y. Luo, B. Bolon, M.A. Damore, D. Fitzpatrick, H. Liu, J. Zhang, Q. Yan, R. Vassar, M. Citron, BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time, *Neurobiol. Dis.* 14 (2003) 81-88.
- [14] A.M. Krichevsky, K.S. Kosik, RNAi functions in cultured mammalian neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11926-11929.

- [15] T.R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science* 296 (2002) 550-553.
- [16] P.J. Paddison, A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, D.S. Conklin,
5 Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells, *Genes Dev.* 16 (2002) 948-958.
- [17] H. Kawasaki, K. Taira, Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 700-707.
- 10 [18] T.S. Rozhdestvensky, A.M. Kopylov, J. Brosius, A. Huttenhofer, Neuronal BC1 RNA structure: evolutionary conversion of a tRNA(Ala) domain into an extended stem-loop structure, *RNA* 7 (2001) 722-730.
- [19] J.A. Martignetti, J. Brosius, BC200 RNA: a neural RNA polymerase III product encoded by a monomeric Alu element, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90
15 (1993) 11563-11567.

請求の範囲

1. BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において BC1 RNA 遺伝子上流に位置する E2 サイトから BC1 RNA 遺伝子中の内部プロモーター配列までを含むポリヌクレオチドからなるプロモーター。
5
2. BC1 RNA 遺伝子の塩基配列において少なくとも-324 番目から+78 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドからなるプロモーター。
3. 以下の(a)または(b)のポリヌクレオチドからなるプロモーター。
 - (a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド
 - 10 (b) 配列番号 2 で表される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド
4. 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のプロモーターを含むベクター。
5. 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの発現制御下に神経系細胞選択的に RNA を発現させるように外来性ポリヌクレオチドを連結させたベクター。
15
6. RNA が低分子 RNA である、請求項 5 に記載のベクター。
7. 低分子 RNA が、アプタマー、shRNA、siRNA およびマイクロ RNA からなる群から選択されるいずれか 1 つである、請求項 6 に記載のベクター。
- 20 8. 神経系細胞がヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である、請求項 5 に記載のベクター。
9. RNA 干渉に用いられる請求項 4 または 5 に記載のベクター。
10. 請求項 4 または 5 に記載のベクターが導入された形質転換体。
11. 神経系細胞である、請求項 10 に記載の形質転換体。
- 25 12. 神経系細胞がヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である、請求項 11 に記載の形質転換体。
13. 請求項 4 または 5 に記載のベクターを神経系細胞に導入することを含む、

神経系細胞選択的に RNA を発現させる方法。

1 4. RNA が低分子 RNA である、請求項 1 3 に記載の方法。

1 5. 低分子 RNA が、アプタマー、shRNA、siRNA およびマイクロ RNA からなる群から選択されるいずれか 1 つである、請求項 1 4 に記載の方法。

5 1 6. 神経系細胞がヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である、請求項 1 3 に記載の方法。

1 7. 請求項 4 または 5 に記載のベクターを神経系細胞に導入し、shRNA または siRNA を神経系細胞選択的に発現させることを含む、RNA 干渉方法。

10 1 8. 神経系細胞がヒト由来の神経系細胞またはげっ歯類由来の神経系細胞である、請求項 1 7 に記載の方法。

1 9. 請求項 4 または 5 に記載のベクターが導入された ES 細胞。

2 0. 請求項 4 または 5 に記載のベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

15 2 1. 請求項 1 9 に記載の ES 細胞から発生させた、請求項 2 0 に記載のトランスジェニック非ヒト哺乳動物。

1

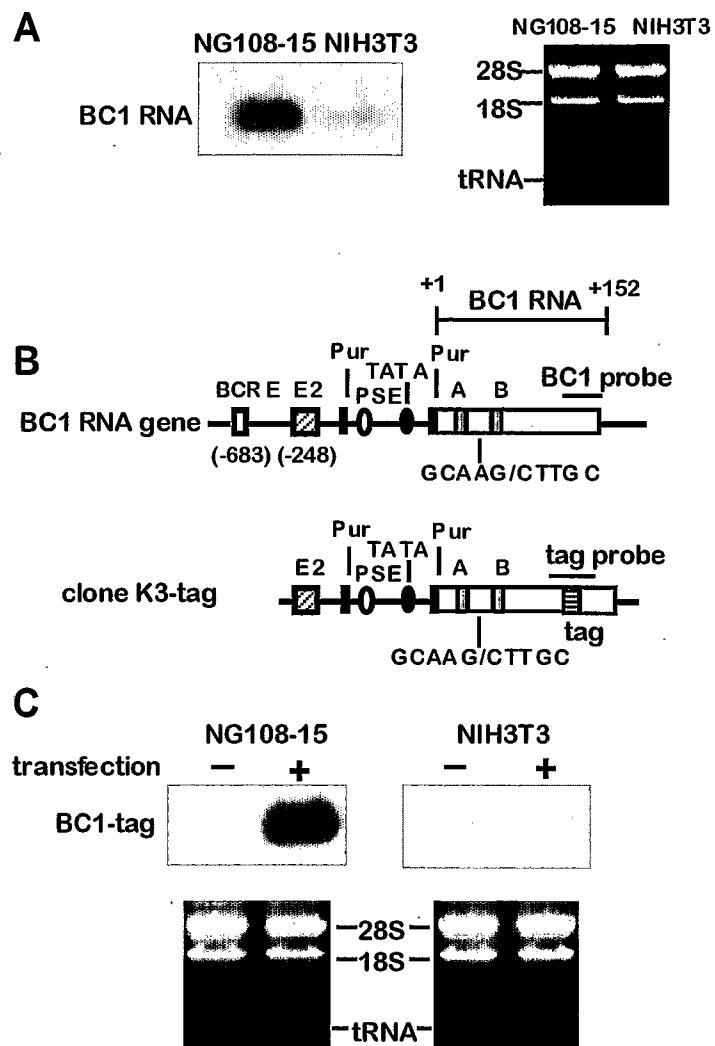


図 2

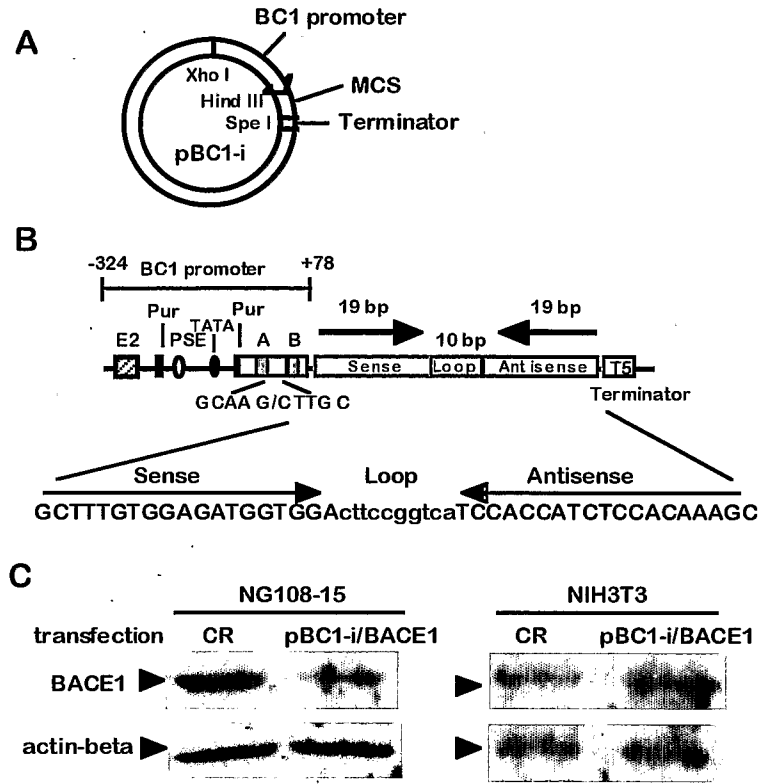


図 3

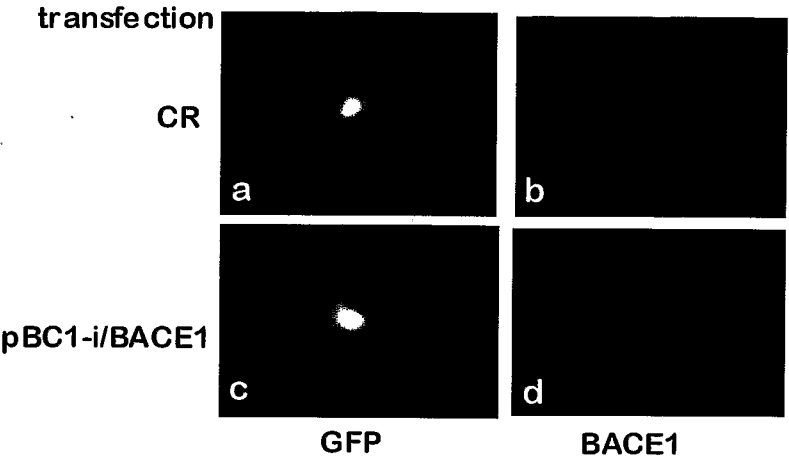
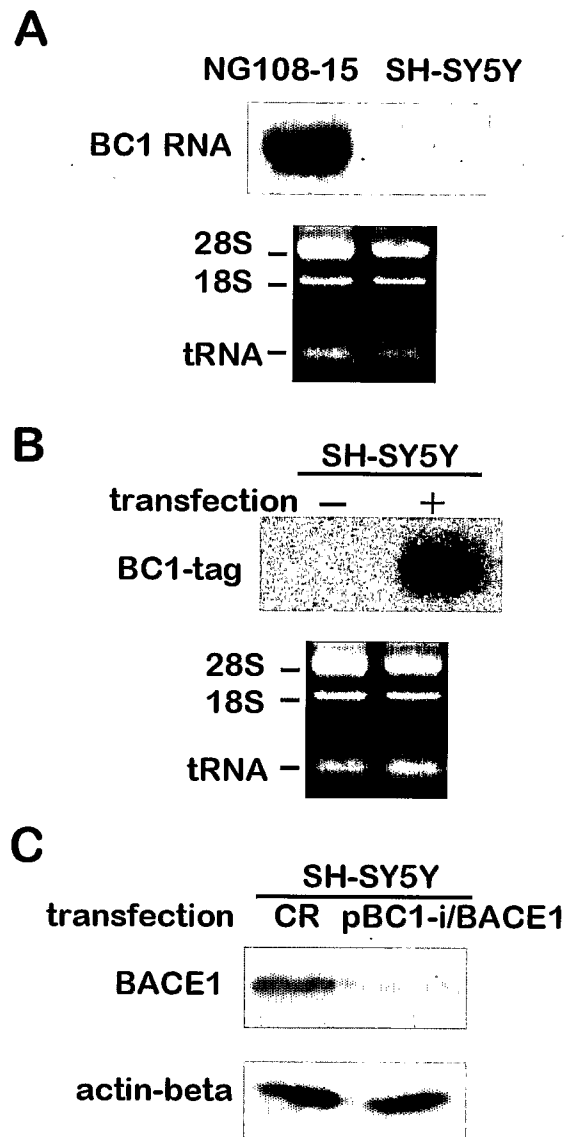


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> Nihon University

<120> An expression vector for RNA in neuronal cells

<130> PCT06-0052

<150> US 60/702,019

<151> 2005-07-22

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 152

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

ggggttgagg atttagctca gtggtagagc gcttgccctag caagcgcaag gccctgggtt 60

cggtcctcag ctccgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagac aaaataacaa aaagacccaa 120

aaaaaacaag gtaactggca cacacaacct tt 152

<210> 2

<211> 402

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

gtgtgttcac ttagccctcc aatcaattat attgtgtctc tggctctctt catacagaag 60

ctgatcaact tgtagcaat tgtagtctaa ggaatttact gtactttgga atactttttt 120

aaactatatt ttggaaggta tctctgatgt aaatgagaaa gctaacttca gtttctgctt 180

tttggaatgt gggtagctat gggattggag cgcttgagca aagtggtcc tcctgccggc 240

cagcccttcg gtaccatctg atacttgact gtgtatgaaa tacttcagtt ttgcttttaa 300

tactggcagc aagagctaac gttcgggggtt ggggatttag ctgagtggta gagcgcttgc 360

ctagcaagcg caaggccctg gttcgggtcc tcagctccga aa 402

<210> 3

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gctttgtgga gatggtggac ttccggtcat ccaccatctc cacaagc 48

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> rattus norvegicus

<400> 4
ggggttggg

10

<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> rattus norvegicus

<400> 5
tagctcagtg gt

12

<210> 6
<211> 10
<212> DNA
<213> rattus norvegicus

<400> 6
ggttcggtcc

10

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> rattus norvegicus

<400> 7
agagcgcttg cctagcaagc gcaaggcct g

31

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 8
tgtgctcgag tgtgttcact tagccctcc

29

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
ttttaagctt cggagctgag gaccgaac

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, A01K67/027(2006.01) i, C12N5/10(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, A01K67/027, C12N5/10

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 1996-2006

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

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

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed,

Science Direct, JSTPlus (JDream2), Igaku-Yakugaku Yokoshu Zenshun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOBAYASHI, S. et al., Application of the BC1 RNA gene promoter for short hairpin RNA expression in cultured neuronal cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 18 July, 2005 (18.07.05), Vol.334, pages 1305 to 1309, [on line], [retrieved on 10 August, 2006 (10.08.06)], Science Direct: URL<http://www.sciencedirect.com/>	1-21
A	KOBAYASHI, S. et al., Positive and negative regulators for neuronal BC1 RNA transcription by RNA polymerase III are possible members of the RNA polymerase II transcription system, Brain Res. Mol. Brain Res., 2003, Vol.111, pages 211 to 215	1-21

☒ 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
10 August, 2006 (10.08.06)Date of mailing of the international search report
22 August, 2006 (22.08.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315078

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOBAYASHI, S. et al., Identification of a negative regulatory DNA element for neuronal BC1 RNA expression by RNA polymerase III, Biochim.Biophys.Acta., 2000, Vol.1493, pages 142 to 150	1-21
A	KOBAYASHI, S. et al., An E-box sequence acts as a transcriptional activator for BC1 RNA expression by RNA polymerase III in the brain, Biochem.Biophys.Res.Comm., 1998, Vol.245, pages 59 to 63	1-21
A	KOBAYASHI, S. et al., Neural BC1 RNA associates with pur alpha, a single-stranded DNA and RNA binding protein, which is involved in the transcription of the BC1 RNA gene, Biochem. Biophys.Res.Comm., 2000, Vol.277, pages 341 to 347	1-21
A	KOBAYASHI, S. et al., Mutational analysis reveals that an array of GCAAG/CTTGC motifs between sprit promoter sequences for RNA polymerase III is essential for neural BC1 RNA transcription, Biochem.Biophys.Res.Comm., 1997, Vol.239, pages 407 to 411	1-21
A	PADDISON P.J. et al., Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells, Genes Dev., 2002, Vol.16, pages 948 to 958	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/315078

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

Ichushi WEB

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, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/10(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, A01K67/027, C12N5/10

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 0 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 6 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)

BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, Science Direct, JSTPlus (JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース, 医中誌 WEB

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	KOBAYASHI S. et al., Application of the BC1 RNA gene promoter for short hairpin RNA expression in cultured neuronal cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005 July 18, vol.334, p.1305-1309, [on line], [retrieved on 2006-08-10], Science Direct: URL< http://www.sciencedirect.com/ >	1-21

☒ 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

1 0 . 0 8 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

2 2 . 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)

坦ケ 隆幸

4 B

3 2 2 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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	KOBAYASHI S. et al., Positive and negative regulators for neuronal BC1 RNA transcription by RNA polymerase III are possible members of the RNA polymerase II transcription system, Brain Res. Mol. Brain Res., 2003, vol.111, p.211-215	1-21
A	KOBAYASHI S. et al., Identification of a negative regulatory DNA element for neuronal BC1 RNA expression by RNA polymerase III, Biochim. Biophys. Acta., 2000, vol.1493, p.142-150	1-21
A	KOBAYASHI S. et al., An E-box sequence acts as a transcriptional activator for BC1 RNA expression by RNA polymerase III in the brain, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, vol.245, p.59-63	1-21
A	KOBAYASHI S. et al., Neural BC1 RNA associates with pur alpha, a single-stranded DNA and RNA binding protein, which is involved in the transcription of the BC1 RNA gene, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, vol.277, p.341-347	1-21
A	KOBAYASHI S. et al., Mutational analysis reveals that an array of GCAAG/CTTGC motifs between sprit promoter sequences for RNA polymerase III is essential for neural BC1 RNA transcription, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, vol.239, p.407-411	1-21
A	PADDISON P.J. et al., Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells, Genes Dev., 2002, vol.16, p.948-958	1-21