

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2022-158252

(P2022-158252A)

(43)公開日 令和4年10月17日(2022.10.17)

|                         |                |                   |
|-------------------------|----------------|-------------------|
| (51)国際特許分類              | F I            | テーマコード (参考)       |
| C 1 2 N 15/115(2010.01) | C 1 2 N 15/115 | Z Z N A 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/6825(2018.01) | C 1 2 Q 1/6825 | Z                 |
| C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  | C 1 2 Q 1/02   |                   |

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全24頁)

|          |                           |         |                   |
|----------|---------------------------|---------|-------------------|
| (21)出願番号 | 特願2021-63014(P2021-63014) | (71)出願人 | 301021533         |
| (22)出願日  | 令和3年4月1日(2021.4.1)        |         | 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
|          |                           |         | 東京都千代田区霞が関1-3-1   |
|          |                           | (74)代理人 | 100099623         |
|          |                           |         | 弁理士 奥山 尚一         |
|          |                           | (74)代理人 | 100107319         |
|          |                           |         | 松島 鉄男             |
|          |                           | (74)代理人 | 100125380         |
|          |                           |         | 弁理士 中村 綾子         |
|          |                           | (74)代理人 | 100142996         |
|          |                           |         | 弁理士 森本 聡二         |
|          |                           | (74)代理人 | 100166268         |
|          |                           |         | 弁理士 田中 祐          |
|          |                           | (74)代理人 | 100180231         |
|          |                           |         | 弁理士 水島 亜希子        |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 RNA 蛍光体複合体

(57)【要約】

【課題】 高輝度かつ抗褪色性の蛍光RNAレポーターシステムを提供する。

【解決手段】 (1) 5'→3' 方向に：UGAAAからなる第1の末端オリゴヌクレオチド；GUHGAGUDGMGUGUGからなる第1の蛍光体結合オリゴヌクレオチド；およびGGCUCからなるヌクレオチド配列または前記ヌクレオチド配列において1～3個のヌクレオチドが置換または挿入されたヌクレオチド配列からなる第1の中央オリゴヌクレオチドを含む第1のRNA分子；ならびに(2) 5'→3' 方向に：前記第1の中央オリゴヌクレオチドと少なくとも80%の配列相補性を有するヌクレオチド配列からなる第2の中央オリゴヌクレオチド；GGUCGGGUCからなる第2の蛍光体結合オリゴヌクレオチド；およびUUUCAからなる第2の末端オリゴヌクレオチドを含む第2のRNA分子を含んでなる、RNAアプタマー。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(1) 5' → 3' 方向に、

U G A A A からなる第 1 の末端オリゴヌクレオチド、

G U H G A G U D G M G U G U G (配列番号 1) からなる第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド、ここで、H は、A、C または U であり、D は、A、G または U であり、M は、A または C であり、および

G G C U C からなるヌクレオチド配列または前記ヌクレオチド配列において 1 ~ 3 個のヌクレオチドが置換または挿入されたヌクレオチド配列からなる第 1 の中央オリゴヌクレオチド

10

を含む第 1 の RNA 分子、ならびに

(2) 5' → 3' 方向に、

前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドと少なくとも 80% の配列相補性を有するヌクレオチド配列からなる第 2 の中央オリゴヌクレオチド、

G G U C G G G U C C (配列番号 2) からなる第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド、および

U U U C A からなる第 2 の末端オリゴヌクレオチド

を含む第 2 の RNA 分子

を含んでなり、

ここで、前記第 1 の末端オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の末端オリゴヌクレオチドが対合して第 1 のステム領域を形成し、

20

前記第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドと一緒に蛍光体結合モチーフを形成し、

前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドが対合して第 2 のステム領域を形成する、

RNA アプタマー。

## 【請求項 2】

前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドと前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドとが、少なくとも 4 ヌクレオチド長のスパーサーオリゴヌクレオチドにより連結されてなる、請求項 1 に記載の RNA アプタマー。

30

## 【請求項 3】

前記スパーサーオリゴヌクレオチドが 4 ~ 10 ヌクレオチド長であり、テトラループ配列を含む、請求項 2 に記載の RNA アプタマー。

## 【請求項 4】

前記テトラループ配列が、U N C G、C U U G および A G N N からなる群から選択され、ここで、N は、A、C、G または U である、請求項 3 に記載の RNA アプタマー。

## 【請求項 5】

前記第 2 のステム領域がミスマッチまたはバルジを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の RNA アプタマー。

## 【請求項 6】

40

U G A A A G U U G A G U A G A G U G U G G G C U C C U U G G A G A C G G U C G G G U C C U U U C A (配列番号 28) を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の RNA アプタマー。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の RNA アプタマーと、HBI 誘導体とを含んでなる RNA 蛍光体複合体。

## 【請求項 8】

前記 HBI 誘導体が D F H B I または D F H B I - 1 T である、請求項 7 に記載の RNA 蛍光体複合体。

## 【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、RNA蛍光体複合体およびそれを作製するためのRNAアプタマーに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

蛍光性低分子と、それを特異的に認識する発蛍光性RNAアプタマーとを用いた蛍光RNAレポーターシステムは、近年注目されている技術である。蛍光RNAレポーターは、GFPのような蛍光タンパク質のRNA模倣体であり、RNAの検出や可視化、特に生細胞内RNAイメージングのための強力なツールとなり得る。最初に報告された蛍光RNAレポーターシステムは、GFPの蛍光団の模倣体DFHBIと発蛍光性RNAアプタマーSpinachとを用いたものである（非特許文献1）。Spinach/DFHBI複合体は、インビトロにおいては、非常に弱い励起光を照射することよりGFPと同等以上の蛍光特性を示したが、低マグネシウムイオン濃度下における蛍光強度は微弱であり、かつ、強い励起光照射によっては瞬時に褪色してしまうため、細胞内における使用には適しない。2014年には、低マグネシウムイオン濃度下における蛍光強度をある程度改善したBroccoli/DFHBI-1Tシステムが報告された（非特許文献2）。しかし、Broccoli/DFHBI-1T複合体の蛍光強度も、生細胞内RNAイメージングのためには依然として不十分である。そのため、より高輝度かつ抗褪色性の蛍光RNAレポーターシステムの開発が望まれている。

10

20

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0003】

【非特許文献1】Paige, J. S. et al., (2011), Science, 333 (6042): 642-646

【非特許文献2】Filonov, G. S. et al., (2014), Journal of the American Chemical Society, 136 (46): 16299-16308

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

30

## 【0004】

本発明は、生細胞内RNAイメージングに適用可能な、高輝度かつ抗褪色性の蛍光RNAレポーターシステムを提供することを目的としてなされたものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

これまでに報告されているSpinach/DFHBIまたはBroccoli/DFHBI-1Tシステムに基づく蛍光RNAレポーターシステムはいずれも、DFHBIまたはDFHBI-1Tに対する特異的認識能を獲得するための共通のステムループ構造に基づいて構築されていた。発明者らは、Broccoli/DFHBI-1Tシステムに基づきつつも、上記改変上の制限を取り除くことにより、高輝度かつ抗褪色性の蛍光RNAレポーターを作出することに成功した。

40

## 【0006】

すなわち、本発明は、一実施形態によれば、(1) 5'→3'方向に: UGAAAからなる第1の末端オリゴヌクレオチド; GUHGAGUDGMGUGUG (配列番号1) からなる第1の蛍光体結合オリゴヌクレオチド、ここで、Hは、A、CまたはUであり、Dは、A、GまたはUであり、Mは、AまたはCであり; およびGGCUCからなるヌクレオチド配列または前記ヌクレオチド配列において1~3個のヌクレオチドが置換または挿入されたヌクレオチド配列からなる第1の中央オリゴヌクレオチドを含む第1のRNA分子; ならびに(2) 5'→3'方向に: 前記第1の中央オリゴヌクレオチドと少なくとも80%の配列相補性を有するヌクレオチド配列からなる第2の中央オリゴヌクレオチド; GG

50

U C G G G U C C (配列番号 2) からなる第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド ; および U U U C A からなる第 2 の末端オリゴヌクレオチドを含む第 2 の RNA 分子を含んでなり ; ここで、前記第 1 の末端オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の末端オリゴヌクレオチドが対合して第 1 のステム領域を形成し、前記第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドと一緒に蛍光体結合モチーフを形成し、前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドが対合して第 2 のステム領域を形成する、RNA アプタマーを提供するものである。

【0007】

前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドと前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドは、少なくとも 4 ヌクレオチド長のスパーサーオリゴヌクレオチドにより連結されていることが好ましい。

10

【0008】

前記スパーサーオリゴヌクレオチドは、4 ~ 10 ヌクレオチド長であることが好ましく、テトラループ配列を含むことが好ましい。

【0009】

前記テトラループ配列は、U N C G、C U U G および A G N N からなる群から選択されることが好ましく、ここで、N は、A、C、G または U である。

【0010】

前記第 2 のステム領域は、ミスマッチまたはバルジを含んでもよい。

【0011】

上記 RNA アプタマーは、U G A A A G U U G A G U A G A G U G U G G G C U C C U U G G A G A C G G U C G G G U C C U U U C A (配列番号 28) を含んでなることが好ましい。

20

【0012】

また、本発明は、一実施形態によれば、上記 RNA アプタマーと、H B I 誘導体とを含んでなる RNA 蛍光体複合体を提供するものである。

【0013】

前記 H B I 誘導体は、D F H B I または D F H B I - 1 T であることが好ましい。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係る RNA 蛍光体複合体は、従来の RNA 蛍光体複合体を大きく上回る蛍光強度および抗褪色性を有する。また、本発明に係る RNA 蛍光体複合体は、マグネシウムイオン依存性、熱安定性、フォールディング効率などの、蛍光 RNA レポーターとしての性能に関連するその他の重要なパラメーターについても、従来の RNA 蛍光体複合体を上回る。そのため、本発明に係る RNA 蛍光体複合体は、生細胞内 RNA イメージングのためのレポーターシステムとして有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1】図 1 は、発蛍光性 RNA アプタマー B r o c c o l i と、その循環置換変異体 c p B r o c c o l i の一次構造を示す図である。

40

【図 2】図 2 は、B r o c c o l i および c p B r o c c o l i の蛍光特性を示す図である。

【図 3】図 3 は、c p B r o c c o l i において第 1 のステム領域 (ステム B ' / B) を変更した変異体 m 1 ~ m 9 の蛍光強度を示すグラフである。

【図 4】図 4 は、c p B r o c c o l i の m 8 変異体に基づく変異体 m 8 - 1 ~ m 8 - 6 の蛍光強度を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、c p B r o c c o l i の m 8 - 1 変異体においてループ配列等を変更した変異体 m 8 - 1 - 1 ~ m 8 - 1 - 12 の蛍光強度を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、c p B r o c c o l i 変異体である R o m a n e s c o の一次構造を示す図である。

50

【図 7】図 7 は、Romanesco および既報の Broccoli 変異体の蛍光強度を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、Romanesco 変異を導入した Broccoli の蛍光強度を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、Broccoli および Romanesco の励起スペクトルを示す図である。

【図 10】図 10 は、Broccoli および Romanesco の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 11】図 11 は、Broccoli および Romanesco の褪色速度を示すグラフである。

【図 12】図 12 は、Broccoli および Romanesco の DFHBI-1T に対する親和性を示すグラフである。

【図 13】図 13 は、Broccoli および Romanesco のマグネシウムイオン依存性を示すグラフである。

【図 14】図 14 は、Broccoli および Romanesco の熱安定性を示すグラフである。

【図 15】図 15 は、Broccoli および Romanesco のフォールディング効率を示すグラフである。

【図 16】図 16 は、Broccoli または Romanesco を組み入れた tRNA を発現する細胞の蛍光顕微鏡像を示す図である。

【図 17】図 17 は、Broccoli または Romanesco を組み入れた tRNA を発現する細胞のフローサイトメトリー解析により得られたスキャッタグラムである。

【図 18】図 18 は、Broccoli または Romanesco を組み入れた tRNA を発現する細胞の蛍光強度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

【0017】

本発明は、第一の実施形態によれば、(1) 5' → 3' 方向に：UGAAA からなる第 1 の末端オリゴヌクレオチド；GUHGAGUDGMGUGUG (配列番号 1) からなる第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド、ここで、H は、A、C または U であり、D は、A、G または U であり、M は、A または C であり；および GGCUC からなるヌクレオチド配列または前記ヌクレオチド配列において 1 ~ 3 個のヌクレオチドが置換または挿入されたヌクレオチド配列からなる第 1 の中央オリゴヌクレオチドを含む第 1 の RNA 分子；ならびに (2) 5' → 3' 方向に：前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドと少なくとも 80% の配列相補性を有するヌクレオチド配列からなる第 2 の中央オリゴヌクレオチド；GGUCGGGUC (配列番号 2) からなる第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド；および UUUCA からなる第 2 の末端オリゴヌクレオチドを含む第 2 の RNA 分子を含んでなり；ここで、前記第 1 の末端オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の末端オリゴヌクレオチドが対合して第 1 のステム領域を形成し、前記第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドと一緒に蛍光体結合モチーフを形成し、前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドおよび前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドが対合して第 2 のステム領域を形成する、RNA アプタマーである。

【0018】

本実施形態の RNA アプタマーは、第 1 の構成部分として、UGAAA からなる第 1 の末端オリゴヌクレオチドおよび UUUCA からなる第 2 の末端オリゴヌクレオチドが対合することにより形成される、第 1 のステム領域を含む。

【0019】

本実施形態の RNA アプタマーは、第 2 の構成部分として、GUHGAGUDGMGU

G U G (配列番号 1) からなる第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドおよび G G U C G G G U C C (配列番号 2) からなる第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドにより形成される蛍光体結合モチーフを含む。ここで、配列番号 1 のヌクレオチドにおいて、H は、A、C または U であり、D は、A、G または U であり、M は、A または C である。

#### 【0020】

本実施形態の RNA アプタマーにおける蛍光体結合モチーフは、B r o c c o l i またはその変異体の蛍光体結合モチーフに基づいている。したがって、本実施形態において「蛍光体」とは、G F P 由来の蛍光体 4-ヒドロキシベンジリデンイミダゾリノン (H B I) の誘導体を意味する。H B I 誘導体には、例えば、D F H B I ( ( Z ) - 4 - ( 3 , 5 - ジフルオロ - 4 - ヒドロキシベンジリデン ) - 1 , 2 - ジメチル - 1 H - イミダゾール - 5 ( 4 H ) - オン)、D F H B I - 1 T ( ( Z ) - 4 - ( 3 , 5 - ジフルオロ - 4 - ヒドロキシベンジリデン ) - 2 - メチル - 1 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロエチル ) - 1 H - イミダゾール - 5 ( 4 H ) - オン)、D F H O ( 4 - ( 3 , 5 - ジフルオロ - 4 - ヒドロキシベンジリデン ) - 1 - メチル - 5 - オキソ - 4 , 5 - ジヒドロ - 1 H - イミダゾール - 2 - カルバルデヒドオキシム)、B I ( ( Z ) - 3 - ( ( 1 H - ベンゾ [ d ] イミダゾール - 4 - イル ) メチル ) - 5 - ( 3 , 5 - ジフルオロ - 4 - ヒドロキシベンジリデン ) - 2 - メチル - 3 , 5 - ジヒドロ - 4 H - イミダゾール - 4 - オン) などが挙げられるが、これらに限定されない。本実施形態の RNA アプタマーにおける蛍光体結合モチーフは、任意の H B I 誘導体と結合するものであってよいが、好ましくは D F H B I または D F H B I - 1 T と結合するものである。

10

20

#### 【0021】

本実施形態の RNA アプタマーは、第 3 の構成部分として、第 1 の中央オリゴヌクレオチドおよび第 2 の中央オリゴヌクレオチドが対合することにより形成される、第 2 のステム領域を含む。ここで、「対合する」とは、2 つのオリゴヌクレオチド間で塩基対が形成されることを意味しており、塩基対には、G : C および A : U のみならず、ゆらぎ塩基対 ( G : U ) も含まれ得る。

#### 【0022】

本実施形態の RNA アプタマーにおける第 2 のステム領域は、B r o c c o l i の骨格に基づいており、B r o c c o l i の骨格と同様の二本鎖構造が形成されればよい。すなわち、本実施形態の RNA アプタマーにおける第 1 の中央オリゴヌクレオチドは、G G C U C からなるヌクレオチド配列または前記ヌクレオチド配列において 1 ~ 3 個のヌクレオチドが置換または挿入されたヌクレオチド配列からなる。置換または挿入されるヌクレオチドの種類および位置は、特に限定されず、第 1 の中央オリゴヌクレオチドと第 2 の中央オリゴヌクレオチドとが対合して二本鎖を形成できる限り任意であってよい。

30

#### 【0023】

第 2 の中央オリゴヌクレオチドは、第 1 の中央オリゴヌクレオチドと少なくとも 70 %、80 %、90 %、または 100 % の配列相補性を有するヌクレオチド配列からなる。言い換えれば、本実施形態の RNA アプタマーにおける第 2 の中央オリゴヌクレオチドは、第 1 の中央オリゴヌクレオチドと第 2 の中央オリゴヌクレオチドとが対合して二本鎖を形成できることを限度として、第 1 の中央オリゴヌクレオチドに対して完全に相補的な配列において、例えば 3 個以下、2 個または 1 個のヌクレオチドが置換されたものであってよい。なお、配列の相補性は、当分野における慣用の計算アルゴリズム ( N C B I B L A S T など) を用いて計算することができる。

40

#### 【0024】

さらに、本実施形態の RNA アプタマーにおける第 2 のステム領域は、第 1 の中央オリゴヌクレオチドと第 2 の中央オリゴヌクレオチドとが対合して二本鎖を形成できることを限度として、例えば 1 個、2 個または 3 個のミスマッチまたはバルジを任意の位置に含んでもよい。

#### 【0025】

本実施形態の RNA アプタマーにおける第 2 のステム領域は、好ましくは、B r o c c

50

o l i の対応する骨格部分と同一である。すなわち、第 1 の中央オリゴヌクレオチドは G G C U C からなることが好ましく、第 2 の中央オリゴヌクレオチドは G A G A C からなることが好ましい。

#### 【0026】

本実施形態の RNA アプタマーは、第 4 の構成部分として、少なくとも 4 ヌクレオチド長のスペーサーオリゴヌクレオチドを含むことができ、これにより、前記第 1 の中央オリゴヌクレオチドと前記第 2 の中央オリゴヌクレオチドとが連結されてよい。言い換えれば、本実施形態の RNA アプタマーは、分割された 2 つの RNA 分子から構成されてもよいし、スペーサーオリゴヌクレオチドにより連結された単一の RNA 分子から構成されてもよい。本実施形態の RNA アプタマーにおいて、スペーサーオリゴヌクレオチドは、上記第 1 ～第 3 の構成部分の構造が維持される限り任意の長さであってよく、例えば、4 ～ 50 ヌクレオチド長、4 ～ 30 ヌクレオチド長、4 ～ 20 ヌクレオチド長、または 4 ～ 10 ヌクレオチド長であってよい。また、スペーサーオリゴヌクレオチドは、上記第 1 ～第 3 の構成部分の構造が維持される限り任意の配列を有してよく、任意の構造を形成してよいが、ループ構造またはヘアピン構造を形成することが好ましい。

10

#### 【0027】

本実施形態の RNA アプタマーにおけるスペーサーオリゴヌクレオチドは、好ましくは 4 ～ 10 ヌクレオチド長であり、テトラループ配列を含む。本実施形態の RNA アプタマーにおけるテトラループ配列は、特に限定されず、例えば、G N R A、U N C G、U - T U R N、C U U G、A G N N などの任意の公知のテトラループ配列（N は、A、C、G または U である）であってよい。本実施形態の RNA アプタマーにおけるテトラループは、好ましくは、U N C G、C U U G または A G N N であり、特に好ましくは U U C G、A G U U または C U G G である。

20

#### 【0028】

本実施形態において、第 1 の末端オリゴヌクレオチド、第 1 の蛍光体結合オリゴヌクレオチド、第 1 の中央オリゴヌクレオチド、スペーサーオリゴヌクレオチド、第 2 の中央オリゴヌクレオチド、第 2 の蛍光体結合オリゴヌクレオチドおよび第 2 の末端オリゴヌクレオチドは、直接連結されることが好ましいが、それぞれの連結部に、1 または 2 ヌクレオチドが挿入されてもよい。挿入されるヌクレオチドは、上記各構成部分の構造が維持される限り、任意の種類であってよい。

30

#### 【0029】

本実施形態の RNA アプタマーの特に好ましい具体例としては、U G A A A G U U G A G U A G A G U G U G G G C U C C U U G G A G A C G G U C G G G U C C U U U C A （配列番号 28）を含んでなる RNA アプタマーを挙げることができる。

#### 【0030】

B r o c c o l i などの蛍光 RNA アプタマーのアプリケーションは種々報告されており（N e u b a c h e r, S. a n d H e n n i g, S., 2019, A n g e w. C h e m i e I n t. E d., 58 (5): 1266-1279）、本実施形態の RNA アプタマーは、そのような公知の蛍光 RNA アプタマーと同様に使用することができる。すなわち、本実施形態の RNA アプタマーは、H B I 誘導体と結合して複合体を形成でき、かつ、複合体の発蛍光能が維持されることを限度として、第 1 および／もしくは第 2 の RNA 分子の 5' ならびに／または 3' 末端に任意の長さおよび配列からなる核酸が付加されてよい。

40

#### 【0031】

本実施形態の RNA アプタマーは、当分野において公知の方法により、化学合成または遺伝子工学的的手法により生合成することができる。例えば、本実施形態の RNA アプタマーは、鋳型となる DNA を調製し、それを RNA ポリメラーゼにより転写することによって製造することができる。なお、本実施形態の RNA アプタマーは、すべて RNA から構成されてもよいし、その一部に修飾 RNA が含まれてもよい。修飾 RNA としては、例えば、ホスホロチオエート化 RNA、ボラノホスフェート化 RNA、2'-O-メチル化 R

50

NA、2'-F化RNA、2',4'-BNA（別名LNA（Locked Nucleic Acid））、などが挙げられる。

【0032】

本実施形態のRNAアプタマーは、それをコードする核酸を含む発現ベクターを用いることにより、細胞内で発現させてもよい。発現ベクターは、RNAアプタマーを導入する細胞の種類に応じて、適切なウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを選択して用いることができる。

【0033】

本実施形態のRNAアプタマーは、Broccoliなどの公知の蛍光RNAアプタマーよりもHBI誘導体に対して高い結合親和性を有する。さらに、本実施形態のRNAアプタマーとHBI誘導体との複合体は、Broccoliなどの公知の蛍光RNAアプタマーとHBI誘導体との複合体と比較して、増大した蛍光強度および安定性を有する。そのため、本実施形態のRNAアプタマーとHBI誘導体とを組み合わせることで、従来よりも高輝度かつ抗褪色性の発蛍光性RNAアプタマーレポーターシステムを提供することができる。

【0034】

本発明は、第二の実施形態によれば、上記RNAアプタマーとHBI誘導体とを含んでなるRNA蛍光体複合体である。本実施形態における「HBI誘導体」は、第一の実施形態において定義したものと同様である。本実施形態のRNA蛍光体複合体は、DFHBIまたはDFHBI-1Tを含んでなることが好ましく、配列番号3のRNA配列を含むRNAアプタマーとDFHBIまたはDFHBI-1Tとを含んでなることが特に好ましい。

【0035】

本実施形態のRNA蛍光体複合体は、上記RNAアプタマーおよびHBI誘導体を接触させることにより調製することができる。具体的には、上記RNAアプタマーおよびHBI誘導体を含む溶液を調製し、一定時間インキュベートすればよい。溶液は、例えば、1～100mMのHEPES（pH6.0～9.0）や1～100mMのTrisなどの当分野において一般的に用いられる緩衝液に対し、RNAアプタマーおよびHBI誘導体を添加して調製すればよい。溶液におけるRNAアプタマーの終濃度は、例えば、1nM～100μMの範囲であってよい。溶液におけるHBI誘導体の終濃度は、例えば、1nM～100μMの範囲であってよい。インキュベート時間は適宜決定することができ、例えば、1分～1時間であってよい。

【0036】

あるいは、上記RNAアプタマーおよびHBI誘導体を細胞に導入することにより、本実施形態のRNA蛍光体複合体を細胞内で形成させてもよい。この場合、RNAアプタマーは、リポフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどの周知の核酸導入方法により細胞に導入されてもよいし、RNAアプタマーをコードする核酸を含む発現ベクターを細胞に導入して発現させてもよい。HBI誘導体は、例えば、HBI誘導体を添加した緩衝液または培地中で細胞をインキュベートすることにより細胞に導入され得る。緩衝液および培地には、細胞の種類に応じて適切なものを用いることができる。緩衝液または培地におけるHBI誘導体の終濃度は、例えば、100nM～100μMの範囲であってよい。インキュベート時間は適宜決定することができ、例えば、1分～2時間であってよい。

【0037】

本実施形態のRNA蛍光体複合体は、高輝度かつ抗褪色性の発蛍光性RNAアプタマーレポーターであり、細胞内環境でも優れた蛍光活性、フォールディング効率および安定性を示す。そのため、本実施形態のRNA蛍光体複合体は、生細胞内RNAイメージングのために有用である。

【実施例】

【0038】

以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

【0039】

<1. 循環置換変異体 cpBroccoli の調製>

Broccoli 改変上の制限を取り除くために、Broccoli のループ配列 (UUCG) の上流の配列と下流の配列とを相互に置き換えた循環置換変異体 cpBroccoli を作製した。Broccoli および cpBroccoli の一次構造を図 1 に示す。cpBroccoli では、Broccoli の 25 番目のウラシルが 5' 末端となり、20 番目のアデニンが 3' 末端となる (図 1、太字)。

【0040】

Broccoli (配列番号 3) または cpBroccoli (配列番号 4) の cDNA 配列に T7 プロモーターの相補配列を付加した配列からなる DNA を、Sigma-Aldrich に委託して合成した。これを鋳型として、T7 プライマー (配列番号 34) および Klenow Fragment (タカラバイオ) を用いて、二本鎖 DNA を調製した。ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit (東洋紡) を用いたインビトロ転写反応 (37℃、150 分間) により、二本鎖 DNA から RNA を合成した。得られた RNA を、Micro Bio-Spin P-30 カラム (バイオ・ラッド) を用いて精製した。変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、RNA が正しい長さを有することを確認した。

【0041】

Broccoli (配列番号 3)

【化 1】

GAGACGGUCGGGUCCAGAUAUUCGUAUCUGUCGAGUAGAGUGUGGGGCUC

【0042】

cpBroccoli (配列番号 4)

【化 2】

UAUCUGUCGAGUAGAGUGUGGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCAGAU

【0043】

1 μM の RNA および 10 μM の DFHBI-1T (Lucerna) / HEPES バッファー (40 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) を調製し、37℃ で 30 分間インキュベートした。その後、分光蛍光光度計 (FP-8300, 日本分光) を用いて、25℃ で蛍光を測定した。測定には以下のパラメータを用いた: 励起波長 470 nm, スリット幅 5 nm, 蛍光波長 505 nm, スリット幅 5 nm。

【0044】

結果を図 2 に示す。cpBroccoli の蛍光強度、励起スペクトルおよび蛍光スペクトルは、Broccoli と同等であった。

【0045】

<2. cpBroccoli への変異導入>

cpBroccoli の第 1 のステム領域 (図 1、ステム B' / B) の配列を変更した変異体 m1 ~ m9 を上記 1 と同様の手順により調製し、DFHBI-1T との複合体を調製し、それらの蛍光を測定した。変異体 m1 ~ m9 の配列を以下に示す。下線は、cpBroccoli からの変異箇所を示す。

【0046】

変異体 m1 (配列番号 5)

10

20

30

40

50

【化 3】

UACCAGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUGGUA

【0 0 4 7】

変異体 m 2 (配列番号 6)

【化 4】

CCAUCGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCGAUGG

10

【0 0 4 8】

変異体 m 3 (配列番号 7)

【化 5】

GCCCCGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCGGGGC

【0 0 4 9】

変異体 m 4 (配列番号 8)

【化 6】

AACUUGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCAAGUU

20

【0 0 5 0】

変異体 m 5 (配列番号 9)

【化 7】

CACUGGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCAGUG

【0 0 5 1】

変異体 m 6 (配列番号 1 0)

【化 8】

GCAUCGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCGAUGC

30

【0 0 5 2】

変異体 m 7 (配列番号 1 1)

【化 9】

GUUCCGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCGGAAC

40

【0 0 5 3】

変異体 m 8 (配列番号 1 2)

【化 1 0】

UGAAAGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

【0 0 5 4】

変異体 m 9 (配列番号 1 3)

50

## 【化 1 1】

UUAGUGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCACUAA

## 【0 0 5 5】

結果を図 3 に示す。ステム B' / B が U G A A A / U U U C A に置換された変異体 m 8 と D F H B I - 1 T との複合体が、大幅に上昇した蛍光強度を示した。

## 【0 0 5 6】

次いで、変異体 m 8 に、先行研究 (Ageely, E. A. et al., (2016), ACS Chem. Biol., 11:2398-2406) に開示された Broccoli の蛍光強度を上昇させる変異を、単独または複数組み合わせさらに導入した変異体 m 8 - 1 ~ m 8 - 6 を、上記 1 と同様の手順により調製し、D F H B I - 1 T との複合体を調製し、蛍光を測定した。変異体 m 8 - 1 ~ m 8 - 6 の配列を以下に示す。下線は、変異体 m 8 からの変異箇所を示す。

## 【0 0 5 7】

変異体 m 8 - 1 (配列番号 1 4)

## 【化 1 2】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0 0 5 8】

変異体 m 8 - 2 (配列番号 1 5)

## 【化 1 3】

UGAAAGUCGAGUUGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0 0 5 9】

変異体 m 8 - 3 (配列番号 1 6)

## 【化 1 4】

UGAAAGUUGAGUUGAGUGUGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0 0 6 0】

変異体 m 8 - 4 (配列番号 1 7)

## 【化 1 5】

UGAAAGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUAAGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0 0 6 1】

変異体 m 8 - 5 (配列番号 1 8)

## 【化 1 6】

UGAAAGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0 0 6 2】

変異体 m 8 - 6 (配列番号 1 9)

## 【化 1 7】

UGAAAGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCUUAAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

10

20

30

40

50

## 【0063】

結果を図4に示す。変異体m8に対してC8U変異のみを導入した変異体m8-1とDFHBI-1Tとの複合体が最も強い蛍光強度を示した。

## 【0064】

最後に、変異体m8-1の蛍光体結合モチーフにさらなる変異を導入した、またはループ領域を自然界に存在するRNAループ配列により置換した、変異体m8-1-1~m8-1-12を、上記1と同様の手順により調製し、DFHBI-1Tとの複合体を調製し、蛍光を測定した。変異体m8-1-1~m8-1-12の配列を以下に示す。下線は、変異体m8-1からの変異箇所を示す。

## 【0065】

10

変異体m8-1-1（配列番号20）

## 【化18】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGAGGGCUCUUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0066】

変異体m8-1-2（配列番号21）

## 【化19】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCAUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

20

## 【0067】

変異体m8-1-3（配列番号22）

## 【化20】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCGUCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0068】

変異体m8-1-4（配列番号23）

## 【化21】

30

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCUACGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0069】

変異体m8-1-5（配列番号24）

## 【化22】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCGCGGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0070】

40

変異体m8-1-6（配列番号25）

## 【化23】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGCUCUUCGGAGAGGGUCGGGUCCUUUCA

## 【0071】

変異体m8-1-7（配列番号26）

50

【化 2 4】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCACUAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

【0 0 7 2】

変異体 m 8 - 1 - 8 (配列番号 2 7)

【化 2 5】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCAGUAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

10

【0 0 7 3】

変異体 m 8 - 1 - 9 (Romanesco) (配列番号 2 8)

【化 2 6】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCCUUGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

【0 0 7 4】

変異体 m 8 - 1 - 1 0 (配列番号 2 9)

【化 2 7】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCGAAAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

20

【0 0 7 5】

変異体 m 8 - 1 - 1 1 (配列番号 3 0)

【化 2 8】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCUAAAGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

【0 0 7 6】

変異体 m 8 - 1 - 1 2 (配列番号 3 1)

【化 2 9】

UGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUCUACGAGACGGUCGGGUCCUUUCA

30

【0 0 7 7】

結果を図 5 に示す。UNC G 型ループを有する変異体 m 8 - 1、AGNN 型ループを有する変異体 m 8 - 1 - 8、CUUG 型ループを有する変異体 m 8 - 1 - 9、GNRA 型ループを有する変異体 m 8 - 1 - 1 0、および U-TURN 型ループを有する変異体 m 8 - 1 - 1 1 など、幅広い種類の変異体と DFHBI-1 T との複合体が、Broccoli / DFHBI-1 T 複合体よりも高い蛍光強度を示した。この結果から、ループ配列が蛍光強度に与える影響は小さいことが確認された。とりわけ、変異体 m 8 - 1 - 9 / DFHBI-1 T 複合体が最も高い蛍光強度を示した (Broccoli / DFHBI-1 T 複合体の蛍光強度の 3.7 倍)。そこで、変異体 m 8 - 1 - 9 を「Romanesco」と命名し、Romanesco / DFHBI-1 T 複合体の蛍光特性をさらに解析することとした。Romanesco の一次構造を図 6 に示す。図 6 中、太字は c p Broccoli からの変異部分を示す。

40

【0 0 7 8】

比較例として、先行研究 (Ageely, E. A. et al., (2016), ACS Chem. Biol., 11: 2398-2406) に開示された高輝度 Broccoli 変異体 Broc 2 および Broc 3 を、上記 1 と同様の手順により調製し、DF

50

HBI-1Tとの複合体を調製し、蛍光を測定した。

【0079】

Brocc2（配列番号32）

【化30】

GAGACGGUCGGGUCCAGAUAAUUAUCUGUUGAGUUGAGUGUGGGGCUC

【0080】

Brocc3（配列番号33）

【化31】

GAGACGGUCGGGUCCAGAUAAUAAUUAUCUGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUC

10

【0081】

結果を図7に示す。Broccoli/DFHBI-1T複合体の蛍光強度と比較して、Brocc2/DFHBI-1T複合体は1.54倍、Brocc3/DFHBI-1T複合体は1.89倍の蛍光強度を示したのに対し、Romanesco/DFHBI-1T複合体は3.70倍の蛍光強度を示した。この結果から、Romanesco/DFHBI-1T複合体は、従来公知の高輝度Broccoli変異体/DFHBI-1T複合体よりも、はるかに高輝度であることが確認された。

20

【0082】

さらに、比較例として、Romanescoにおける変異に対応する変異をBroccoliに対して導入した変異体（Broccoli Romanesco mutation）およびm8-1変異体における変異に対応する変異をBroccoliに対して導入した変異体（Broccoli m8-1 mutation）を、上記1と同様の手順により調製し、DFHBI-1Tとの複合体を調製し、蛍光を測定した。変異体Broccoli Romanesco mutationおよびBroccoli m8-1 mutationの配列を以下に示す。下線は、Broccoliからの変異箇所を示す。

【0083】

Broccoli Romanesco mutation（配列番号34）

【化32】

GAGACGGUCGGGUCCUUUCACUUGUGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUC

30

【0084】

Broccoli m8-1 mutation（配列番号35）

【化33】

GAGACGGUCGGGUCCUUUCAUUCGUGAAAGUUGAGUAGAGUGUGGGGCUC

40

【0085】

結果を図8に示す。Broccoli Romanesco mutation/DFHBI-1T複合体およびBroccoli m8-1 mutation/DFHBI-1T複合体のいずれも、Broccoli/DFHBI-1T複合体よりも低い蛍光強度を示した。この結果から、上記実施例において見出された変異の組み合わせは、cpBroccoliの蛍光強度を大幅に増強する一方、Broccoliの蛍光強度を増強するためには有効ではないことが明らかとなった。

【0086】

<3. Romanesco/DFHBI-1T複合体の特性>

50

### (3-1) 励起スペクトルおよび蛍光スペクトル

Romanesco／DFHBI-1T複合体とBroccoli／DFHBI-1T複合体の励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを、上記1と同様の手順により測定した。  
【0087】

励起スペクトルを図9、蛍光スペクトルを図10に示す。Romanesco／DFHBI-1T複合体は、Broccoli／DFHBI-1T複合体の約4倍の蛍光強度を示す一方、スペクトルの形状はBroccoli／DFHBI-1T複合体と類似していることが確認された。  
【0088】

### (3-2) 褪色速度

RomanescoまたはBroccoli (1  $\mu$ M) およびDFHBI-1T (50 nM) を含むHEPESバッファを調製し、37℃で30分間インキュベートした。その後、分光蛍光光度計 (FP-8300, 日本分光) を用いて、25℃で蛍光を測定した。蛍光測定には微量測定用キュベット (50  $\mu$ l) を用い、励起光のスリット幅を最大 (20 nm) に設定して、溶液全体に励起光を照射した。測定には以下のパラメータを用いた: 励起波長470 nm, スリット幅20 nm, 蛍光波長505 nm, スリット幅1 nm。得られたデータセットをExcelを使用して解析し、各タイムポイントにおける蛍光強度を0秒における蛍光強度に対して正規化した。  
【0089】

結果を図11に示す。測定開始後0.3秒間におけるBroccoli／DFHBI-1T複合体の褪色速度は0.49ユニット／秒であったのに対し、Romanesco／DFHBI-1T複合体の褪色速度は0.39ユニット／秒であった。この結果から、Romanesco／DFHBI-1T複合体は、Broccoli／DFHBI-1T複合体よりも褪色しにくいことが明らかとなった。  
【0090】

### (3-3) DFHBI-1T親和性

50 nMのRomanescoまたはBroccoliを含むHEPESバッファに対して異なる濃度のDFHBI-1Tを添加し、37℃で30分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー (Infinite 200 Pro, Tecan) を用いて25℃で蛍光強度を測定した。測定には以下のパラメータを用いた: 励起波長470 nm, スリット幅9 nm, 蛍光波長510 nm, スリット幅20 nm。得られたデータセットを、Excelのソルバーツールを使用して4パラメーターロジスティックモデルに基づく曲線にフィッティングし、DFHBI-1Tの濃度増加と蛍光強度増加の関数から複合体の解離定数 ( $K_D$ ) を決定した。  
【0091】

結果を図12に示す。Broccoli／DFHBI-1Tの $K_D$ は246 nMであったのに対し、Romanesco／DFHBI-1Tの $K_D$ は151 nMであった。この結果から、RomanescoはBroccoliよりもDFHBI-1Tに対して高い親和性を有することが確認された。  
【0092】

### (3-4) マグネシウムイオン依存性

RomanescoまたはBroccoli (1  $\mu$ M) およびDFHBI-1T (10  $\mu$ M) を、異なる濃度のMgCl<sub>2</sub>を含む40 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM KClバッファ中で混合した。37℃で30分間インキュベート後、マイクロプレートリーダー (Infinite 200 Pro, Tecan) を用いて25℃で蛍光強度を測定した。測定には以下のパラメータを用いた: 励起波長470 nm, スリット幅9 nm, 蛍光波長510 nm, スリット幅20 nm。  
【0093】

結果を図13に示す。1 mMのMgCl<sub>2</sub>存在下での蛍光強度と比較して、MgCl<sub>2</sub>不在下でのBroccoli／DFHBI-1T複合体の蛍光強度は41%であったのに

10

20

30

40

50

対し、Romanesco／DFHBI-1T複合体の蛍光強度は65%であった。この結果から、RomanescoはBroccoliよりもマグネシウムイオン依存性が低いことが明らかとなった。

【0094】

(3-5) 熱安定性

RomanescoまたはBroccoli (1  $\mu$ M) およびDFHBI-1T (10  $\mu$ M) を含むHEPESバッファーを調製し、37℃で30分間インキュベートした。その後、リアルタイムPCRシステム (ABI 7500、サーモフィッシャー・サイエンティフィック) を用いて蛍光を測定した。測定には以下のパラメータを用いた：温度範囲10～90℃、温度間隔0.3℃、加熱速度4℃/分。得られたデータセットをExcelを使用して解析し、最大値での強度に対して正規化した。

【0095】

結果を図14に示す。50%蛍光強度を与える温度が、Broccoli／DFHBI-1T複合体では45℃であったのに対し、Romanesco／DFHBI-1T複合体では47℃であった。この結果から、Romanesco／DFHBI-1T複合体の方がBroccoli／DFHBI-1T複合体よりも熱安定性が高いことが明らかとなった。

【0096】

(3-6) フォールディング効率

複合体のフォールディング効率を評価するために、次の2条件の溶液の蛍光強度を比較した：微量 (1  $\mu$ M) のRomanescoまたはBroccoliに対して過剰量 (20  $\mu$ M) のDFHBI-1Tを供給する (条件1)；微量 (1  $\mu$ M) のDFHBI-1Tに対して過剰量 (20  $\mu$ M) のRomanescoまたはBroccoliを供給する (条件2)。37℃で30分間インキュベート後、マイクロプレートリーダー (Infinite 200 Pro、Tecan) を用いて25℃で蛍光強度を測定した。測定には以下のパラメータを用いた：励起波長470 nm、スリット幅9 nm、蛍光波長510 nm、スリット幅20 nm。条件1の蛍光強度を条件2の蛍光強度で割ることにより、複合体が正しくフォールディングされ、DFHBI-1Tの蛍光を活性化できるRomanescoまたはBroccoliの割合を決定した。

【0097】

結果を図15に示す。Broccoliは全量のうち14%しか正しく複合体をフォールディングしていないのに対し、Romanescoは全量のうち21%が正しく複合体をフォールディングした。この結果から、RomanescoはBroccoliよりもDFHBI-1Tとの複合体を効率よく形成することが明らかとなった。

【0098】

以上の結果から、蛍光強度、褪色速度、DFHBI-1T親和性、マグネシウムイオン依存性、熱安定性およびフォールディング効率のすべての特性において、RomanescoはBroccoliよりも優れていることが確認された。

【0099】

< 4. 哺乳類細胞におけるRomanesco／DFHBI-1T複合体の蛍光強度 >

(4-1) RNA発現プラスミドの調製

pCPRU6ベクター (Nucleic Acids Res., 2005; 33 (15): 1-9) をバックボーンベクターとして使用し、tRNALysスキャフォールドに組み込まれたRomanescoもしくはBroccoli (それぞれ「tRomanesco」、「tBroccoli」と表記する) またはtRNALysをU6プロモーターによって発現するプラスミドを構築した。表1に記載のオリゴヌクレオチド (FASMACに委託して合成；小文字はIn-Fusion反応に必要な相同領域を示す) を用いたKlenow反応によりインサート断片を調製し、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ) により、tRomanesco (配列番号46)、tBroccoli (配列番号47) またはtRNALys (配列番号48) を含むイ

10

20

30

40

50

ンサート全長を得た。得られたインサート全長をPCRで増幅し、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて、BfuA1で切断したpcPURU6にクローニングした。

【0100】

表1. tRomanesco、tBroccoliまたはtRNALys調製のためのオリゴヌクレオチド

【表1】

| 名称                    | ヌクレオチド配列                                                                        | 配列番号 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| 5)IF-T7-tR5           | tatcatcgataagcttTAATACGACTCACTATAGGGGCGGATAGCTCA<br>GTCGGTAGAGCAGCG             | 36   |
| 3)IF-T7-Bro           | aaccctggaccgcgGAGCCACACTCTACTCGACAGATACGAATATCTG<br>GACCCGACCGTCTCCGCTGCTCTACCG | 37   |
| 3)IF-T7-Romanesco     | aaccctggaccgcgTGAAAGGACCCGACCGTCTCCAAGGAGCCACACT<br>CTACTCAACTTTCACGCTGCTCTACCG | 38   |
| 5)IF-tR3-T7term       | cgcgggtccagggttCAAGTCCTGTTCGGGCGCCA                                             | 39   |
| 3)IF-tR3-T7term       | ttcgcgtagtgtctaaCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCA<br>GGGGTTATTGGCGCCCGA         | 40   |
| 5)IF-T7-tRNALys5'-2   | tatcatcgataagcttTAATACGACTCACTATAGGGGCGGATAGCTCA<br>GTCGGTAGAGCATCAGA           | 41   |
| 3)IF-T7-tRNALys5'     | ttgaaccctggaccctCAGATTAAAGTCTGATGCTCTACCGACT                                    | 42   |
| 5)IF-T7-tRNALys3'     | gggtccagggttcaaGTCCCTGTTCGGGCGCCA                                               | 43   |
| 5)IF-pcPURU6-tRNALys3 | aaaggacgaaacaccGACTACCGTGAGCCCGGATAGCTCAGTCGGT                                  | 44   |
| 3)IF-pcPURU6-tRNALys3 | acgccaagcttgcataAAAAAAGATACCGCCCGAACAGGGACTTGAA                                 | 45   |

10

20

【0101】

tRomanesco (配列番号46)

【化34】

GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAGCGUGAAAGUUGAGUAGAGUGUGG  
GCUCCUUGGAGACGGUCGGGUCCUUUCACGCGGGUCCAGGGUUCAAGUCC  
CUGUUCGGGCG

30

【0102】

tBroccoli (配列番号47)

【化35】

GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAGCGGAGACGGUCGGGUCCAGAUAU  
UCGUAUCUGUCGAGUAGAGUGUGGGCUCCGCGGGUCCAGGGUUCAAGUCC  
CUGUUCGGGCG

40

【0103】

tRNALys (配列番号48)

【化36】

GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAUCAGACUUUUAUCUGAGGGUCCA  
GGGUUCAAGUCCUGUUCGGGCG

50

## 【0104】

トランスフェクションコントロールには、pCX-CR (pCX-EGFP (FEBS Lett., 1997; 407 (3): 313-9) 中のEGFP遺伝子をmCherry遺伝子に置換したもの) を作製し、使用した。具体的には、mCherry遺伝子 (Nat. Biotechnol., 2004; 22 (12): 1567-72) をPCRで増幅し、In-Fusion反応によりpCXベクターに組み込んだ。PCRで増幅されたmCherry遺伝子の配列をDNAシーケンス解析によって確認した。

## 【0105】

## (4-2) 生細胞蛍光イメージング

HEK293T細胞 (理研BRC) を、ポリリジンでコーティングされた35mmマルチウェルガラスボトムディッシュ (Matsunami Glass) に約 $5.0 \times 10^4$ 細胞/ウェルの濃度で播種し、10% FBS (Hyclone Laboratories) および1% Antibiotic-Antimycotic (100X) (サーモフィッシャー・サイエンティフィック) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (高グルコース) (ナカライテスク) 中、5% CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。FuGENE HD試薬 (プロメガ) を用いて、試薬に添付のプロトコルに従って、上で調製した発現ベクターを細胞にトランスフェクションした。RNA発現プラスミドとpCX-CRプラスミドの比率を4:1、DNAの総量を0.2 µg/ウェルとした。トランスフェクションの2日後、イメージングを行う30分前に、培養液を除去し、25mMのHEPES (pH 7.4)、5mMのMgSO<sub>4</sub>、20 µMのDFHBI-1Tおよび2 µg/mlのHoechst 33342を含むHBSSに置換した。蛍光画像を、蛍光顕微鏡 (IX81、オリンパス) を用いて取得し、ImageJ 1.52aソフトウェア (NIH) で分析した。

## 【0106】

結果を図16に示す。図中の小窓には、同視野のヘキスト染色像を示す。tRomanesco発現細胞からは、tBroccoli発現細胞よりもはるかに強い蛍光が観察された。

## 【0107】

## (4-3) フローサイトメトリー

上記(4-2)と同様の手順により、RNA発現プラスミドとpCX-CRプラスミドをトランスフェクションしたHEK293T細胞を用意した。トランスフェクションの2日後、細胞をPBSで洗浄し、2% FBSおよび40 µMのDFHBI-1Tを含むPBSに懸濁した。BD Accuri C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences) により、FITC (533/30 nm) とPE (585/40 nm) の2つのフィルターと488 nmレーザーを使用して、細胞懸濁液を分析した。得られたデータをFlowJo (BD Biosciences) により分析した。蛍光強度上位5%の細胞の平均蛍光強度を計算した。

## 【0108】

フローサイトメトリー解析により得られたスキャッタグラムを図17に示す。tRomanesco発現細胞は、tBroccoli発現細胞よりも高い蛍光強度を示す細胞を高い比率で含むことが確認された。また、tRomanesco発現細胞およびtBroccoli発現細胞の、蛍光強度上位5%の細胞の平均蛍光強度を図18に示す。tRomanesco発現細胞は、tBroccoli発現細胞よりも平均して3倍の蛍光強度を示すことが確認された。

10

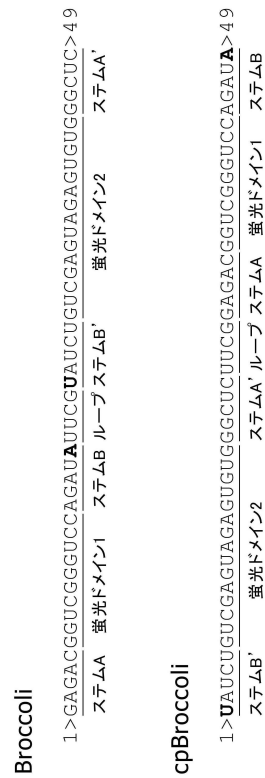
20

30

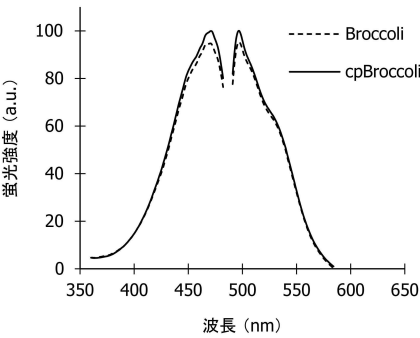
40

50

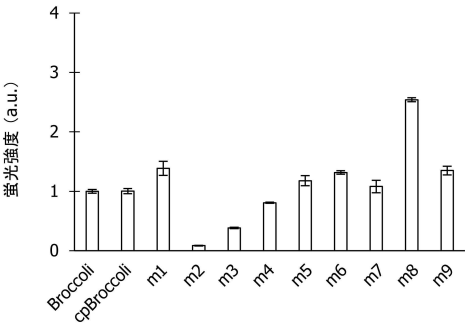
【図面】  
【図 1】



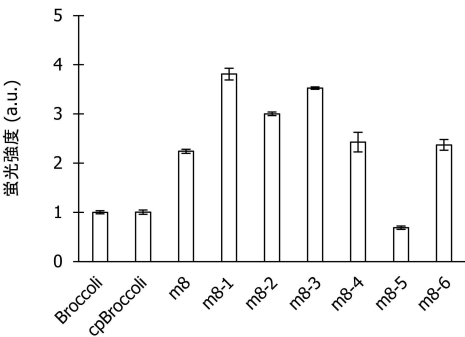
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

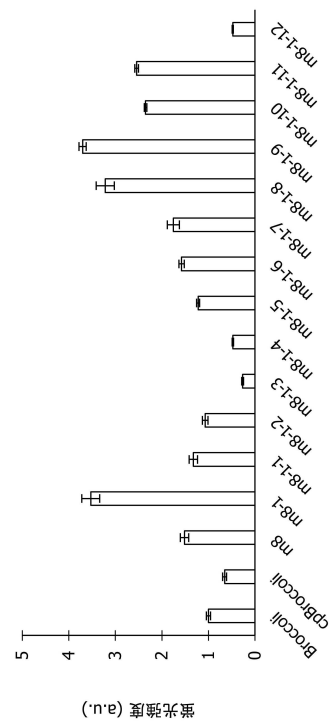
20

30

40

50

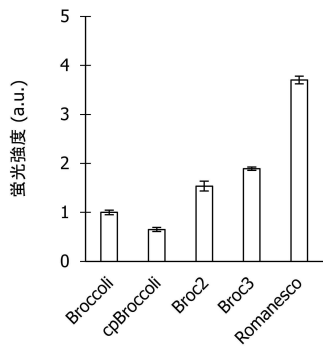
【図 5】



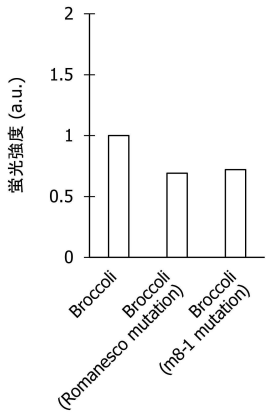
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

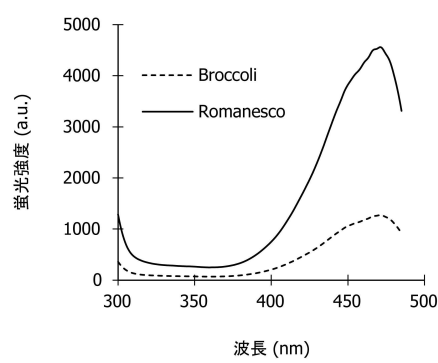
20

30

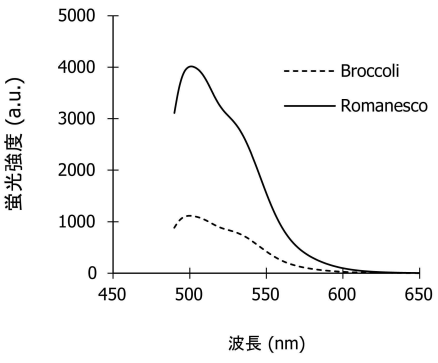
40

50

【図 9】

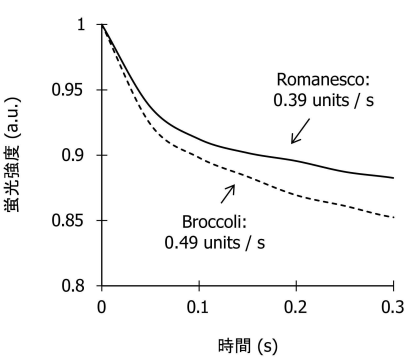


【図 10】

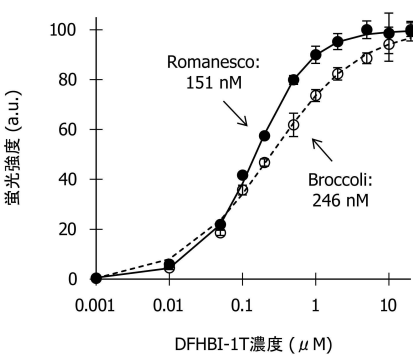


10

【図 11】



【図 12】



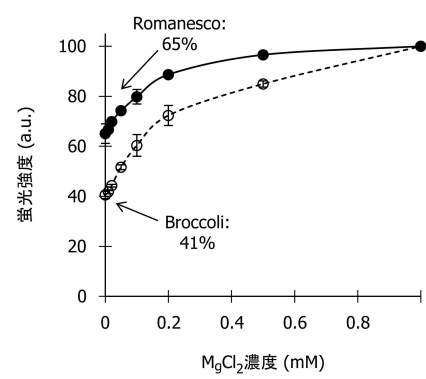
20

30

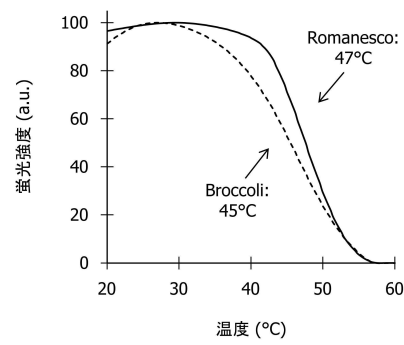
40

50

【図 1 3】

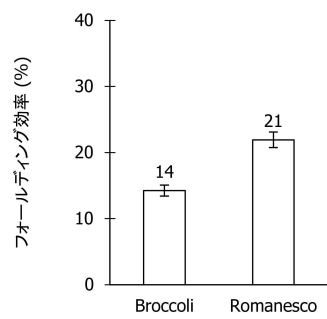


【図 1 4】

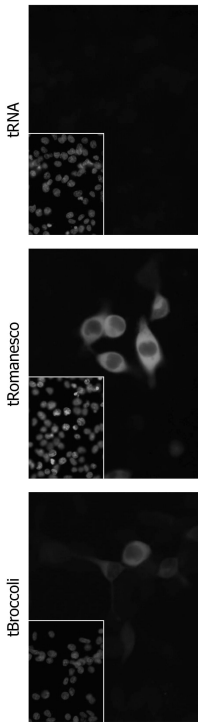


10

【図 1 5】



【図 1 6】



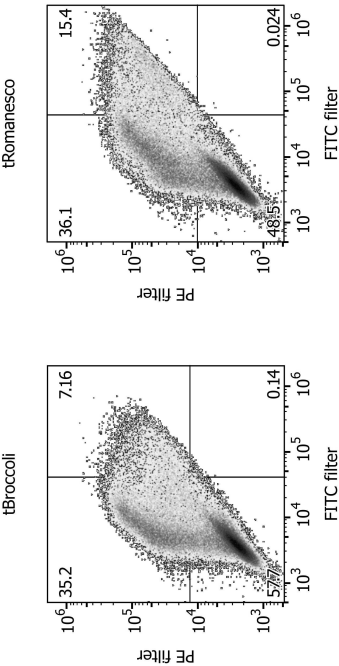
20

30

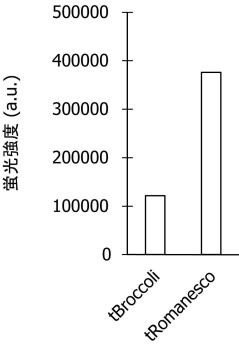
40

50

【図 1 7】



【図 1 8】



【配列表】

2022158252000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100096769

有原 幸一

(72)発明者 古旗 祐一

茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ52 QR35 QR66 QS34 QX02