

(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
2010 年 1 月 28 日(28.01.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/010862 A1

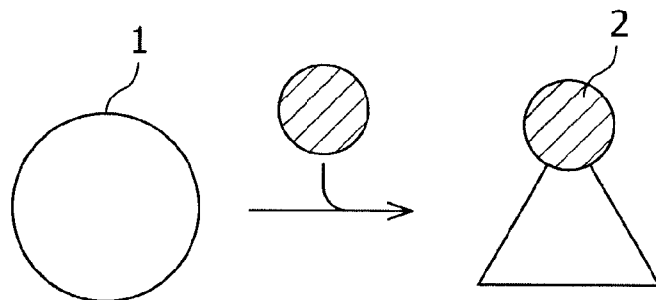
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/063023
- (22) 国際出願日: 2009 年 7 月 21 日(21.07.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-188241 2008 年 7 月 22 日(22.07.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(Japan Science and Technology Agency) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町 4-1-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 井上 丹 (INOUE, Tan). 齊藤 博英(SAITO, Hirohide). 大野 博久(OHNO, Hirohisa).
- (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂 3 丁目 2 番 1 2 号赤坂ノアビル 8 階 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTION OF ARTIFICIAL RNP NANO-STRUCTURE BY UTILIZING RNA-PROTEIN COMPLEX INTERACTION MOTIF

(54) 発明の名称: RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを利用して人工RNPナノ構造体を構築する方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a method for constructing an artificial RNP nano-structure by utilizing an RNA-protein complex interaction motif. Also disclosed is a method for inducing the change in structure of an RNA molecule with a protein. Specifically disclosed is a method for inducing the specific change in structure of an RNA molecule with a protein molecule. The method is characterized by adding a protein molecule which comprises an amino acid sequence capable of binding specifically to a nucleotide sequence derived from an RNA-protein complex interaction motif in a non-naturally occurring RNA molecule comprising the nucleotide sequence to the RNA molecule.

(57) 要約: RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを利用して人工RNPナノ構造体を構築する方法及び、RNA分子の構造変化を蛋白質で誘導する方法を提供することを目的とする。RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導する方法であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子に、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子を添加することを特徴とする方法。



WO 2010/010862 A1



-
- 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))

明 細 書

発明の名称：

RNA－蛋白質複合体相互作用モチーフを利用して人工RNPナノ構造体を構築する方法

技術分野

[0001] 本発明は、RNA－蛋白質複合体相互作用モチーフを利用して人工RNPナノ構造体を構築する方法、RNA－蛋白質複合体相互作用モチーフを利用したRNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導する方法、及びこの方法に用いるためのRNA分子に関する。

背景技術

[0002] ポストゲノム科学の進展により、蛋白質やRNAなどの生体分子の構造、機能に関する情報が蓄積している。そのような増加していく情報を活用し、これまでの還元的、分析的な生物学とは対照的に、「合成」を通して生命システムを理解しようとする合成生物学（シンセティックバイオロジー）の気運が高まっている。中でも、生体分子や遺伝子回路を人工的に構成、または再構成することは、生命科学研究にとどまらず産業応用の面からも非常に注目されている。

[0003] 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、また蛋白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」は核酸あるいは蛋白質である。

[0004] 生体分子を用いたナノスケール構造体構築の先行技術が知られている。この技術においては、三種類のDNA鎖を組み合わせたDNA多面体の形成が報告されている（非特許文献1を参照）。しかし、DNAは構造が単純であり、構造体の設計が容易である反面、構造体を作成する部品としてのバリエーションが少ないという問題があった。

[0005] ほかに、RNAのKissinger-loopと相補鎖間での二本鎖形成を

利用したRNAジグソーパズルの作成が報告されている（非特許文献2を参照）。RNAはDNAと比較して多彩な構造、機能を有し、かつその分子自体の構造も比較的単純であるため、構造体の設計、合成により適している。しかし、構造体を作成する部品としてのバリエーションは十分であるとはいえない。

[0006] 生体分子材料としては蛋白質も考えられるが、蛋白質は複雑な構造を持つため、分子設計するのが難しいという問題がある。

[0007] 生体分子や遺伝子回路を人工的に構成、または再構成する材料として有用な、所望の構造変化が期待できる、有用な生体分子材料の報告は未だに存在しない。

非特許文献1: He Y, Nature. 2008 Mar 13; 452 (7184): 198-201.

非特許文献2: Chworos A, Science. 2004 Dec 17; 306 (5704): 2068-72.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、人工RNA-蛋白質ナノ構造体を設計、構築し、かつRNA分子の構造変化を蛋白質で誘導する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 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、RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導する方法であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子に、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子を添加することを特徴とする方法である。ここで、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列とは、該RNA分子に導入したRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフに由来する、蛋白質を構成するアミノ酸配列をいい、また

、該アミノ酸配列に若干の変異を導入したアミノ酸配列も含まれる。若干の変異とは、RNA-蛋白質複合体相互作用に影響を与えない程度の変異をいう。

[0010] 本発明は、別の実施の形態によれば、特異的に構造変化するRNA分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子である。

[0011] 本発明は、また別の実施の形態によれば、上述の特異的に構造変化するRNA分子の製造方法であって、所望の構造変化が知られているRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを選択するステップと、RNA分子の塩基配列を決定するステップであって、上記RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、足場塩基配列とを、コンピュータ分子モデリング法を用いて配置することにより決定するステップと、上記決定するステップにより得られた塩基配列に基づき、RNA分子を製造するステップとを含む方法である。足場塩基配列とは、特異的な構造変化が生ずるRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列以外の塩基配列をいう。

[0012] 本発明は、さらにまた別の実施の形態によれば、RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導するためのキットであって、上述の特異的に構造変化するRNA分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子と、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子とを含んでなる。

[0013] 前記キットが、前記RNA-蛋白質複合体形成に競合するRNA分子をさらに含むことが好ましい。ここで、競合するRNAは、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するものである。

[0014] 本発明は、さらにまた別の実施の形態によれば、機能性RNA-蛋白質複合体であって、上述の特異的に構造変化するRNA分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子と、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基

配列に特異的に結合するアミノ酸配列と、機能性蛋白質とを含んでなる蛋白質分子とを含む。

[0015] 前記機能性蛋白質が、マーカー蛋白質、膜透過性蛋白質、腫瘍に特異的な蛋白質、治療効果を有する蛋白質、特定の細胞表面を認識する抗体から選択される一以上であることが好ましい。

[0016] 本発明は、さらにまた別の実施の形態によれば、RNA-蛋白質複合体ナノ構造体を作成する方法であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子に、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含んでなる蛋白質分子と、任意選択的に金属イオンとを添加することを特徴とする。

発明の効果

[0017] 本発明の効果として、RNA分子の構造変化を蛋白質で誘導することができる。また、蛋白質により誘導可能なRNA分子、及びそのRNA分子からなる構造体を構築することができる。さらには、蛋白質により誘導可能なRNA分子と、該蛋白質との複合体による機能性分子を提供することができる。これらの方法または、分子は、いずれも、生体分子、多機能性ナノ構造体、または遺伝子回路を人工的に構成、または再構成する材料として有用である。

図面の簡単な説明

[0018] [図1] 図1は、第1実施形態による、RNA分子1の構造変化を蛋白質分子2で誘導する方法を概略的に示す図である。

[図2] 図2は、L7AeとBoxC/Dとにより形成される複合体を示すリボンダイアグラムである。

[図3] 図3中、(a)は、固定されていない状態のBoxC/D配列の状態を概略的に示す図であり、(b)は、L7Aeにより60℃に屈曲した構造に固定されたBoxC/D配列の状態を概略的に示す図である。

[図4] 図4は、BoxC/D配列の屈曲部分を拡大した模式図である。

[図5] 図5は、RNA分子1が蛋白質分子2で誘導されてできた正八面体の構造体を示す模式図である。

[図6] 図6は、機能性蛋白質分子がRNA分子に配置されたRNA-蛋白質複合体を示す図である。

[図7] 図7は、第4実施形態による、RNA分子に複数の異なる機能性蛋白質分子を配置する方法を概略的に示す図である。

[図8] 図8は、Discovery Studio 2.0を用いて描写したRNA分子の二次構造を示す図である。

[図9] 図9は、実施例1においてコンピュータ分子設計した、RNA分子の一次配列を示す図であり、(a)はLong chainの一次配列を示し、(b) Short chainの一次配列を示す図である。

[図10] 図10は、実施例1においてコンピュータ分子設計した、RNA分子の二次構造を示す図である。

[図11] 図11は、ゲルシフトアッセイによるRNP構造体形成を確認した結果を示す図である。

[図12] 図12は、原子間力顕微鏡を用いて、バッファーのみを含む溶液を観察した結果を示す顕微鏡写真である。

[図13] 図13は、原子間力顕微鏡を用いて、RNA分子のみを含む溶液を観察した結果を示す顕微鏡写真であり、RNA分子は環状で存在することがわかる。

[図14] 図14は、原子間力顕微鏡を用いて、L7Aeのみを含む溶液を観察した結果を示す顕微鏡写真であり、L7Aeは点状に観察できる。

[図15] 図15は、原子間力顕微鏡を用いて、RNA分子とL7Aeを含む溶液を観察した結果を示す顕微鏡写真であり、RNA分子とL7Aeによる三角形の構造体が生成していることがわかる。

[図16] 図16は、Discovery Studio 2.0を用いて描写した大きなL7-3kakuの図であり、3つのL7Ae-Box C/Dを48塩基対のRNAで連結した三角形である。

[図17] 図17は、Discovery Studio 2.0を用いて描写したL7-3 kissのリボンダイアグラムであり、三角形の一辺は10 nmである。

[図18] 図18は、L7 Ae-Box C/D モチーフ、Kissing-loopモチーフによる三角形形成の仮定的なスキームを示す図である。

[図19] 図19は、Discovery Studio 2.0を用いて描写したDelivery-3 kakuの図であり、一つの角には蛍光蛋白質GFPが結合しており、二つの角にはポリアルギニンモチーフが結合している。

[図20] 図20は、実施例7においてコンピュータ分子設計した、分割したDelivery-3 kakuを構成するRNA分子の二次構造を示す図である。

符号の説明

- [0019]
- 1 RNA分子
 - 2 蛋白質分子
 - 2 a 融合蛋白質分子
 - 2 b 融合蛋白質分子
 - 2 c 融合蛋白質分子
 - 3 機能性蛋白質分子
 - 4 機能性蛋白質分子
 - 5 機能性蛋白質分子

発明を実施するための最良の形態

[0020] 以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。しかし、以下の説明は本発明を限定するものではない。

[0021] 20世紀後半から現在に至る、分子生物学の急速な発展により、膨大な数の遺伝子が同定され、それらがコードする蛋白質を中心に、さまざまな生体高分子の機能が明らかにされて来た。さらにはDNA、RNAおよび蛋白質の詳細な立体構造が解明され、それらは分子間の相互作用および選択的な化

学反応により機能することが原子レベルで証明された。よって、これらの相互作用および化学反応を自在に制御することができれば、新しい病気治療法や、エネルギー問題などを解決する方法が開発できるはずである。

[0022] これを実現する手法としては、ターゲットとなる分子の機能を、分子間相互作用により、直接制御する機能をもつ新しい分子をデザイン・作成し、それにより細胞や組織を制御することがあげられる。RNAは多様な立体構造を形成できる。蛋白質に加え、RNAには酵素機能をもつものがあり、その機能と構造の相関関係は、立体構造の解析を通じて詳細に解明されて来た。また、4種の基本ユニット（塩基）で作られるRNAは、シンプルな構築原理により形成される。よって、ナノブロックとしての高度な立体構造を持つ分子の設計・構築に広くRNAを用いることができる。しかしながら、RNA単独では、モチーフの数に限りがあり、作成できる構造が限定されている。一方、20種もの基本ユニット（アミノ酸）で作られる蛋白質は、RNAよりはるかに多彩かつ複雑な立体構造および機能をもつ。現在、天然の蛋白質の構造が、膨大な数、高分解能で解析されているものの、その分子設計・構築は難しく、単純な構造を持つものに限られている。これらから、現時点では、ナノスケールで、複雑な機能と構造を持つ3Dオブジェクトとしては、RNP（RNA-蛋白質複合体）を設計・構築することが、現実的であり、具体的には「分子設計により作成する人工RNA」と「天然の構造既知の蛋白質」を組み合わせることが、分子デザインによる機能をもつ分子の開発へ向けての実現性の高い手法である。

[0023] 本発明者らは、ナノスケールの構造体や酵素のような機能性分子を設計・構築するための材料として、RNA-蛋白質相互作用モチーフ（RNP）を用いることを考え、この材料を応用した人工的な分子を構築し、ナノ構造体を設計、及び作成することにより、発明を完成するに至った。核酸に比べてRNPは構造的に多様であり、設計の容易なRNAを基本骨格として設計することで、核酸のみでは作れない複雑な構造も比較的容易に設計・構築できると考えられる。

[0024] 本発明は、第1実施形態によれば、RNA分子の構造変化を蛋白質で誘導する方法であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するRNA分子に、該塩基配列に特異的に結合する蛋白質を含む分子を添加する工程から構成される。

[0025] 本実施形態による方法のスキームを、図1に概略的に示す。図1に示すスキームによれば、蛋白質の非存在下において、環状で存在するRNA分子1に、蛋白質2を添加することによって、一つの角に一つの蛋白質2が結合した三角形のRNA分子に、特異的に誘導することができる。なお、図1は、概略的なものであって、本発明は、特定の形状から、別の特定の形状への誘導に限定されるものではない。以下に、本発明により構造変化が誘導されるRNA分子の構成、その調製方法、及びRNA分子の構造変化を蛋白質で誘導する方法について詳細に説明する。

[0026] [RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するRNA分子の構成]

本実施形態による方法において用いる、蛋白質によりその構造変化が誘導されるRNA分子は、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するRNA分子である。さらに具体的には、本実施形態による構造変化が誘導されるRNA分子は、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、それ以外の塩基配列である足場塩基配列とを含んでなる非天然の分子である。なお、足場塩基配列、RNA-蛋白質相互作用モチーフの各々は、天然に存在する分子の配列から抽出することができる。RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列は、RNA分子において、蛋白質との結合により構造変化を生ずる部分として機能する。足場塩基配列は、RNA分子において、ナノ構造体の骨格として作用し、構造変化を生じない部分である。本実施形態によるRNA分子は、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含むものであればよいが、蛋白質に非特異的に結合するRNA塩基配列などの部分を含まないことが好ましい。

[0027] [1. RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列]

ここで、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列とは、天然の、既知のRNA-蛋白質複合体における、RNAと蛋白質との相互作用モチーフの、RNA側の配列として知られている塩基配列と、試験管内進化法（*in vitro selection*法）により得られた人工的なRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフにおけるRNA側の配列である塩基配列とが含まれる。RNA-蛋白質複合体とは、生体において多数確認されている蛋白質とRNAとの会合体であり、複雑な構造を持つ3Dオブジェクトである。

[0028] 天然のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列は、通常、約5～30塩基で構成されており、特定の蛋白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ことが知られている。このような天然のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列は、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選択することができる。本実施形態において好ましく用いられるRNA-蛋白質相互作用モチーフは、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蛋白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、蛋白質が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のぞましい。

[0029]

[表1]

RNA 名	蛋白質名	Kd	文献
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> oocyte)	5R1	0.64 ± 0.10 nM	Nat Struct Biol. 1998 Jul;5(7):543-6
5S RNA (<i>Xenopus laevis</i> 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.

[0030]

[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)	Vis1p	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

[0031] 人工のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列とは、人工

的に設計したRNA-蛋白質複合体における、RNAと蛋白質との相互作用モチーフの、RNA側の塩基配列である。このような塩基配列は、通常、約5～30塩基で構成されており、特定の蛋白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。また、以下の表3に挙げる塩基配列も知られており、これらもまた本発明のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列として用いることができる。

[0032]

[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

[0033] 人工のRNA-蛋白質複合体は、分子デザイン方法、または試験管内進化法、あるいはそれらの両方を併用することで作成することができる。試験管内進化法では、様々な配列多様性をもつ分子ライブラリーから、機能性RNAを選別し、その遺伝子（DNA）を増幅、転写するといった反応を繰り返すことで、アプタマーやリボザイムを得ることができる。従って、分子デザインであらかじめ目的の機能構造をもったRNPに適応したRNA-蛋白質相互作用モチーフを天然RNP分子から抽出、または試験管内進化法により人工的に作成することが可能となる。

[0034] 本実施形態において、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列は、その塩基配列の由来となるRNA-蛋白質複合体の解離定数 K_d が、約0.1 nM～約1 μ M程度であるものが好ましい。この理由は、RNA-蛋白質相互作用の親和性が高く、構造変化を誘導した後も、その状態を保持することが可能となるからである。

[0035] 具体的なRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列としては、RNAのメチル化やシュードウリジン化といったRNA修飾に関わることが知られている、超高温硫酸還元古細菌由来L7Ae（配列番号1）（More T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818 (2004)）が結合する塩基配列である、5' GGCGUGAUGCGAAAGCUGACCC3'（配列番号2）、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、大腸菌由来Threonyl-tRNA synthetase（Cell (Cambridge, Mass.) v97, pp. 371-381 (1999)）が結合する塩基配列である、5' GGCGUAUGUGAUCUUUCGUGUGGUCACCCACUGCGCC3'などの塩基配列（配列番号3）が挙げられるが、これらには限定されない。

[0036] なお、これらのRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列が決まると、同一のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフに由来するアミノ

酸配列は同時に決定され、これらは、生理条件下で、特異的、かつ非共有結合的な結合を生ずる。

[0037] ところで、このような天然のもしくは人工のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフは、RNAと、蛋白質とが複合体を形成する前と、複合体形成後では、RNAの構造が変化することが知られている。上記L7Aeが結合する塩基配列である、5' GGGCGUGAUGCGAAAGCUGACCC 3'（配列番号4）（以下、BoxC/Dという）と、L7Aeとの複合体を例に挙げて、その複合体形成時の構造変化につき、説明する。L7AeとBoxC/Dとは、図2のような複合体を形成することが知られている（Moore T et al., Structure Vol. 12, pp. 807-818（2004））。特に、L7Aeは、相補配列部分が二本鎖を形成した状態のBoxC/D配列に特異的に結合することが知られている。

[0038] 二本鎖を形成した状態のBoxC/D配列は、L7Aeが結合する前は、フレキシブルな固定されない構造をもつ分子である。このようなBoxC/D配列の状態を、図3（a）に、概略的に示す。ここで、二本鎖を形成したBoxC/D配列に、L7Aeを添加すると、BoxC/D配列とL7Aeとが相互作用して、複合体を形成する。すると、このBoxC/D配列は60℃に屈曲した構造に固定される。このような状態におけるBoxC/D配列とL7Aeとを、図3（b）に、概略的に示す。さらに、詳細にみると、この60℃に屈曲した構造は、上記配列中、5'側から6番目のsingle strand部位の塩基Uを中心にして、形成される。屈曲部分を拡大した模式図を、図4に示す。これが、BoxC/D配列とL7AeとのRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフにおいて知られている特異的な構造変化である。

[0039] なお、BoxC/D配列とL7AeとのRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフは一例であり、上記表に挙げたそのほかのRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフも、それぞれ特異的な構造変化をすることが知られている。例

えば、3-way junction (3-ウェイジャンクション) 構造をとる、バチルス菌由来S15 (RNA: GGGCGGCCUUCGGGC UAGACGGUGGGAGAGGCCUUCGGCUGGUCCACCCG UGACGCUC (配列番号5)) (蛋白質: MPICKEEKQKVIQ EFARFPGDTGSTEVQVALLTLRLSEHLKVHK KDHHSHRGLLMMVGQRRRLRLRYLQREDPERYRAL IEKLG I (配列番号6))、蛋白質の結合により角度が90度に折れ曲がった構造をとる、高度好熱性細菌由来L1蛋白質 (RNA: GGGAGU GAAGGAGGCCUUCGGCCGCGAAACUUCACUCCC (配列番号7)) (蛋白質: PKHGKRYRALLEKVDPNKIYTI D EAAHLVKELATAKFDETVEVHAKLGIDPRRSDQN VRGTVSLPHGLGKQVRVLAIAKGEKIKEAEEAGA DYVGGEI IQKILDGWMDFDAVVATPDVMGAVGS KLGRILGPRGLLPNPKAGTVGFNIGEIIREIKAG RIEFRNDKTGAIHAPVGKASFPPEKLADNIRAFI RALEAHKPEGAKGTFLRSVYVTTTGMGPSVRINPH S (配列番号8)) (Nevskaya, N., Tishchenko, S., Volchkov, S., Kljashtorny, V., Nikonova, E., Nikonov, O., Nikulin, A., Kohrer, C., Piendl, W., Zimmermann, R., Stockley, P., Garber, M., Nikonov, S. (2006) New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA. J. Mol. Biol. 355: 747-759)、RNA二本鎖が60度に折れ曲がった構造をとる、ヒト由来U1A (RNA: GGCAGAGUCCUUCGGGACAUUGCACCU GCC (配列番号9)) (蛋白質: AVPETRPNHTIYINNLNE KIKKDELKKSLHAIFSRFGQILDILVSRSLKMRG

Q A F V I F K E V S S A T N A L R S M Q G F P F Y D K P M R I Q Y A
K T D S D I I A K M K G T F V（配列番号10））などが知られている。

[0040] 本実施形態においては、一つのRNA分子に、同一の複数のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列が配置されていてもよい。または、一つのRNA分子に、異なる複数の種類のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列が配置されていてもよい。一つのRNA分子に、異なる複数のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を配置することで、一つのRNA分子に対し、複数種類の構造変化部分を導入し、複数種類の構造変化を誘導することが可能となる。

[0041] [RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列以外の塩基配列]

本実施形態によるRNA分子を構成する、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列以外の塩基配列は、構造変化を生じない部分である。別の表現としては、構造変化を生ずる部分を配置するための、足場となる部分ともいえる。このような構造変化を生じない塩基配列は、人工的な塩基配列であってもよく、または天然由来の塩基配列であってもよい。構造変化を生じない部分として好ましい配列は、例えば、複雑な立体構造をとらない配列、ワトソン-クリック型の塩基対形成による二本鎖、tRNA、3-way junction、kissing-loopやloop-receptorのようなRNA-RNA相互作用モチーフ等が挙げられるが、これらには限定されない。構造変化を生じない部分である塩基配列は、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列との関係で、その長さ、配置位置等を適宜決定することができる。なお、長さ、配置位置等の決定を含めた本実施形態に用いるRNA分子の製造方法は、後述する。

[0042] [構造変化を誘導する蛋白質分子]

本実施形態による方法において用いる、構造変化を誘導する蛋白質分子は、上記RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と同一のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフに由来するアミノ酸配列を含む蛋白質分子である。ここで、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由

来のアミノ酸配列は、構造変化が誘導されるRNA分子が有するRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、特異的に相互作用するものである。すなわち、RNA分子と、構造変化を誘導する蛋白質分子とは、RNA-蛋白質複合体を形成するように選択される。

なお、本実施形態において、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来のアミノ酸配列とを選択する際には、既知のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の配列に、変異を導入したものであってもよい。当業者であれば、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフにおいて、相互作用特性を変えない範囲の変異を、適宜決定し、導入することができる。例えば、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列のみに1～5塩基程度の変異を導入してもよい場合があり、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来のアミノ酸配列のみに1～5ペプチド程度の変異を導入してもよく、両方に変異を導入することも可能である。なお、このような変異の数は、使用するRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフによっても異なり、これらの値に限定されるものではない。

[0043] 蛋白質分子は、そのようなアミノ酸配列を有するものであれば、そのほかに機能性蛋白質を含む、融合蛋白質分子であってもよい。機能性蛋白質としては、マーカー機能を有する蛍光蛋白質類、治療効果を有するアポトーシス誘導型蛋白質等が挙げられるが、これらには限定されない。このような蛋白質分子は、所望の蛋白質の既知のDNA配列情報に基づき、ベクター等を用いて、当業者が適宜製造することができる。

[0044] なお、構造変化が誘導されるRNA分子が、一つのRNA分子に、異なる複数の種類のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列が配置されているものである場合には、それぞれに対応する、異なる複数の種類のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来のアミノ酸配列を有する蛋白質分子が必要となる。

[0045] [RNA分子の構造変化の誘導]

RNA分子の構造変化の誘導は、液体中で行うことができる。さらに詳細には、大気圧下、 $4 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH } 3.5 \sim 10.5$ の生理条件下の液体であれば行うことができる。本実施形態による方法は、上記RNA分子を含む生理条件下の液体に、上記蛋白質分子を混合することで行うことができる。混合量は、RNA分子上の相互作用するRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列の数、相互作用時のモル比等によって決定することができる。なお、RNA-蛋白質複合体の相互作用時のモル比は、各RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフに固有である。

[0046] [RNA分子の構造変化の誘導の確認]

本実施形態にかかる方法においては、RNA分子の構造変化の誘導が実際に行われたかを確認することができる。確認は、蛋白質分子を混合する前と後とで、RNA分子を含む溶液を、当業者には既知の所定の方法でサンプルにし、ゲル電気泳動法や原子間力顕微鏡で観察することにより、実施することができる。原子間力顕微鏡によれば、原子レベルで構造を視認することができるため、RNA分子に導入したRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフから予測される構造変化が生じているのか否かを簡単に判別することができる。

[0047] [RNA分子の構造変化の誘導例]

次に、蛋白質によるRNA分子の特異的な構造変化の誘導例を挙げて説明する。

一例として、RNA分子として、上記 $B \circ x C / D$ 配列を等間隔で3つ有する環状の二本鎖RNA分子を設計することができる。この場合、蛋白質の非存在下では、環状のRNA二本鎖分子として、生理条件下の液体中に存在する。ここに、 $L7Ae$ 分子を、RNA分子の三倍モル量以上添加する。これによって、3つの $L7Ae$ 分子が二本鎖RNA分子に結合し、 60° の角を等間隔で三つ持った構造体、すなわち正三角形が誘導される。

[0048] 別の例として、RNA分子として、上記 $B \circ x C / D$ 配列を等間隔で3つ有する環状の二本鎖RNA分子と、蛋白質である $L7Ae$ 分子が二つ融合し

た L7Ae ダイマーとを設計することができる。この場合、L7Ae ダイマーの非存在下では、RNA 分子は、環状の RNA 二本鎖分子として、生理条件下の液体中に存在する。ここに、L7Ae ダイマーを、二本鎖 RNA 分子 4 分子に対し、L7Ae ダイマー 6 分子以上となるようなモル量で添加する。これによって、6 個の L7Ae ダイマーが、四分子の RNA 分子に結合し、正八面体の構造体が誘導される。この場合の模式図を、図 5 に示す。図 5 において、各辺を構成するのが、RNA 分子であり、頂点に位置するのが、L7Ae ダイマーである。このような正八面体の形成は、RNA 分子と L7Ae ダイマーを混合するだけで、自発的に行われるものである。

[0049] また、正方形の RNP をデザインすることもできる。蛋白質 L1 に結合する RNA モチーフを二本鎖 RNA の 4 辺の頂点に挿入する。蛋白質比存在下では、環状の構造をとると予想されるが、L1 蛋白質が各頂点に結合することで、正形状の RNP 分子が形成できると予想できる。

[0050] 本発明の第 1 実施形態による方法によれば、特定の非天然の RNA 分子、蛋白質分子を設計することにより、特定の RNA 分子の特異的な構造変化を蛋白質で誘導することができる。このような RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを利用した、非天然の RNA 分子構造の制御はこれまでに報告がなく、生体分子や遺伝子回路を人工的に構成、または再構成する材料等に用いるためのツールとして、有望である。

[0051] 次に、本発明の第 2 実施形態として、RNA 分子材料を製造する方法につき、説明する。第 2 実施形態によれば、上述の特異的に構造変化する RNA 分子の製造方法であって、所望の構造変化が知られている RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを選択するステップと、RNA 分子の塩基配列を決定するステップであって、上記 RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、足場塩基配列とを、コンピュータ分子モデリング法を用いて配置することにより決定するステップと、上記決定するステップにより得られた塩基配列に基づき、RNA を製造するステップとを含む。

[0052] 本実施形態において製造する RNA 分子は、上記第一の形態で述べた特徴

を有する、蛋白質分子によりその構造変化が誘導されるRNA分子である。

[0053] 所望の構造変化が知られているRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを選択するステップでは、導入したい構造変化を実現しうるRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを、前述の表またはデータベースから選択する。例えば、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフで導入可能なRNA分子の構造変化としては、60度の屈曲、90度の屈曲、二本鎖RNAから一本鎖RNAへの変化、一本鎖RNAから二本鎖RNAへの変化等が挙げられるが、これらには限定されない。一つのRNA分子に対して、複数の構造変化を実現させることもでき、その場合には、所望の、複数の異なるRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを組み合わせて選択することができ、複数の同一のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを導入することができる。

[0054] RNA分子材料の塩基配列を決定するステップは、コンピュータ分子モデリング法により行うことができる。これには、市販の分子モデリングソフトウェアを用いることができる。コンピュータ分子モデリングにおいては、まず、所望のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフの三次元立体構造を取得する。そして、構造変化導入後のRNA-蛋白質複合体が、所望の構造体的形成するように、一つまたは複数のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列以外の塩基配列とを決定してゆく。RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列以外の塩基配列は、特には、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を配置するための足場としての役割を果たすため、望ましくない二次構造や三次構造等を形成しないように、そのような二次構造等を形成しないことが既知の配列を選択することができる。その後、設計された配列を持つRNAが取りうる二次構造を予測し、設計した二次構造が最も安定な構造であることおよび他に安定な二次構造をとらないことを確認する。これには、web上で使用する核酸の二次構造予測プログラムmfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>) を好適に用いることができる。

- [0055] 上記決定するステップにより得られた塩基配列に基づき、RNA分子を製造するステップでは、得られた塩基配列から、既知の方法によって、RNA分子を製造する。所定のRNA配列が与えられていれば、これに基づいてRNA分子を製造することは当業者には通常行われることであり、例えば、PCRによって鋳型DNAを合成し、RNA合成酵素を用いた転写反応によりRNA分子を製造することができる。そのほかに、約30塩基程度の短い鎖長RNAであれば、化学合成法により直接RNAを合成することもできる。このような方法により、RNA分子を製造することができる。
- [0056] このようにして製造された構造変化が誘導されるRNA分子は、第1実施形態に用いることができるほか、後述するキットとして、構造変化を誘導する蛋白質分子と一緒に、分子材料として用いることができる。
- [0057] 本発明の第2実施形態によれば、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフのデータベース、コンピュータ分子モデリング法、遺伝子工学的方法を組み合わせて、構造変化が誘導されるRNA分子を設計し、製造することができる。かかる方法によれば、高い精度で分子設計をすることができるため、所望の構造変化が誘導されるRNA分子を、容易に、かつ正確に設計することができる。また、遺伝子工学的方法により、そのようなRNA分子を実際に大量に生産することができる。第2実施形態による方法は、所望のRNA分子を製造する際に、非常に有用である。
- [0058] 本発明は、第3実施形態によれば、RNA分子の構造変化を蛋白質分子で誘導するためのキットであって、上述の特異的に構造変化するRNA分子と、該RNA分子が有するRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子とを含んでなる。
- [0059] このようなキットにおいて、特異的に構造変化するRNA分子及びRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来のアミノ酸配列を含む蛋白質分子は、上記第1実施形態において説明した任意のものであってよい。
- [0060] 本実施形態によるキットには、任意的な構成成分として、RNA-蛋白質複合体形成に競合するRNA分子を含んでもよい。具体的なRNA-蛋白質

複合体形成に競合するRNAの塩基配列は、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するものとすることができる。

[0061] 本実施形態において、キットに含まれる特異的に構造変化するRNA分子及びRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来のアミノ酸配列を含む蛋白質分子は、所定の条件下で混合すると複合体を形成する。この結合は水素結合による安定な、かつ特異的な非共有結合である。しかし、この溶液に、RNA-蛋白質複合体形成に競合するRNA分子を添加することによって、簡単に結合を抑制し、RNP構造の形成を制御することができる。

[0062] 本発明の第3実施形態にかかるキットによれば、生理条件下でRNA分子の特異的な構造変化を誘導することができる。また、任意選択的な成分であるRNA-蛋白質複合体形成に競合するRNA分子を含むことにより、RNPナノ構造の可逆的な構造変化が可能になる。

[0063] 本発明は、第4実施形態によれば、上述の機能性RNA-蛋白質複合体であって、特異的に構造変化するRNA分子と、該RNA分子が有するRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列と、機能性蛋白質とを含む蛋白質分子とを含んでなる。

[0064] 図6に、第4実施形態による機能性RNA-蛋白質複合体を模式的に示す。図示する複合体は、各辺が第1実施形態において詳述した構造変化が誘導される、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するRNA分子1から構成される三角形の3つの頂点に、当該塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列部分2と、機能性蛋白質分子3、4、5とを含んでなる融合蛋白質分子が結合している。機能性蛋白質分子3、4、5は3つとも種類が異なっている。

[0065] ここで、機能性蛋白質とは、所定の機能が知られている蛋白質のことをいい、例えば、GFP、YFPなどの蛍光蛋白質類、ポリアルギニンモチーフなどの膜透過性機能を有する蛋白質類、組織特異的に発現している膜蛋白質に結合する蛋白質類、アポトーシス誘導蛋白質等、特定の疾患に治療効果を有する蛋白質等、癌細胞表面に特異的に結合する抗体が挙げられるが、これ

らには限定されない。

[0066] このような複合体は、第1実施形態で説明したようにRNA分子を設計し、かつ該RNA分子に導入したRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子に、任意の機能性蛋白質分子を結合させた融合蛋白質分子を製造し、RNA分子と融合蛋白質分子とを混合することで得ることができる。たとえば、第1実施形態で例示したL7Ae-B_{ox}C/DをRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフとして用いる場合には、L7Ae蛋白質と任意の蛋白質またはペプチドとの融合蛋白質分子を作製しておけば、第1実施形態で例示したRNA鎖と混合するだけで、任意の複数の機能を持つRNA-蛋白質複合体が容易に作製できる。このように、複数種類の機能性蛋白質分子を、一つのRNA分子に結合させる場合には、添加する複数種類の機能性蛋白質分子のモル比を変化させることで、結合する機能性蛋白質分子の数や種類を制御することができる。例えば、図6に示す複合体は、B_{ox}C/D配列を等間隔に3つ有する環状のRNA分子1に、機能性蛋白質分子を添加することによって形成させることができるが、この複合体は、機能性蛋白質分子3、4、5を、等モルで加えることにより得られる。また、図示はしないが、図6と同じRNA分子を用いた場合でも、機能性蛋白質分子3、4のみが、1:2の比率で結合した複合体を形成させたい場合には、機能性蛋白質分子3と、機能性蛋白質分子4とを、1:2の比率で添加することで、三角形の一つの角に機能性蛋白質分子3が、三角形の残り二つの角に機能性蛋白質分子4が結合した複合体を形成することができる。

[0067] 機能性RNA-蛋白質複合体構築の概略的なスキームを、図7に示す。図7は、RNA分子に、異なる三種の機能性蛋白質分子2a、2b、2cを添加する場合のスキームである。このように、機能性蛋白質分子が融合したRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の蛋白質分子を一種類添加するたびに、RNA分子の構造を変化させ、最終的に所望の形状の機能性RNA-蛋白質複合体を作成することができる。

[0068] 機能性RNA-蛋白質複合体の作製において、たとえば、膜透過性ペプチドや組織特異的に発現している膜蛋白質に結合する蛋白質を用いれば、特定の細胞へと上記のような複合体を届けるデリバリーに利用することができる。また、GFPやYFPなどの蛍光蛋白質を用いれば、複合体のデリバリーを可視化して観察できるという利点もある。さらに、アポトーシス誘導蛋白質を癌細胞に届けるといった治療薬としての利用が考えられる。図6に示す複合体のように、複数の異なる機能の蛋白質を結合した複合体は、これらの利点を全て併せ持つものといえる。また、RNAと蛋白質とは、特異的、かつ非共有結合的な結合により結合されているため、従来の共有結合的な結合と比較して、フレキシブルな結合態様による複合体とすることができる。したがって、RNA結合モチーフをもつ任意の蛋白質を自在に交換(インストール)することができ、機能性RNA-蛋白質複合体のモジュラーエンジニアリングが可能となる。また、本手法で設計したRNA分子は、後述の実施例、図16でも示されるように、安定な二本鎖を形成し、末端ヌクレオチドの水酸基を細胞内に存在するRNaseから保護することが可能になる。このため、細胞内で安定に存在することが期待できる。

[0069] 本発明は、第5実施形態によれば、RNA-蛋白質複合体ナノ構造体を作成する方法であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を有するRNA分子に、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子と、必要な場合には、マグネシウムやカルシウムなどの金属イオンとを添加することを特徴とする。

[0070] 本実施形態においては、第1実施形態と同様に、RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導することにより、RNA-蛋白質複合体ナノ構造体を作成する。RNA分子の設計により所望の構造体を得ることができ、具体的な構造体としては、第1実施形態で例示した正三角形、正八面体、正方形等が挙げられるが、これらには限定されない。

[0071] 別の例として、RNA分子と、蛋白質分子と、金属イオンとを添加するこ

とによる、RNA-蛋白質複合体ナノ構造体の作成方法を挙げることできる。この方法は、RNA分子に足場塩基配列として、Kissinger-loop配列を導入した場合に好ましく用いられる。このとき、一つのRNA分子は、蛋白質分子により構造変化が導入されて、一つのRNA-蛋白質複合体を形成する。そして、金属イオンの添加によって、一つのRNA-蛋白質複合体は、別のRNA-蛋白質複合体と相互作用する。このような、Kissinger-loop配列を用いた場合に、金属イオンはRNA分子同士を、非共有結合的に連結することができる。これにより、複数のRNA分子が結合したRNA-蛋白質複合体ナノ構造体を製造することができる。このような、複数の分子を結合する物質は、導入されるモチーフ等にもよるが、ほかに、RNAループ・レセプターモチーフが挙げられる。

[0072] この場合にも、第4実施形態で説明したのと同様に、蛋白質分子を、機能性蛋白質を融合させた融合蛋白質とすることができる。

[0073] 本発明の第5実施形態によれば、単にRNA分子に構造変化を導入し、複合体を形成するのみならず、いくつかの複合体を組み合わせるナノ構造体を作成する方法を提供することができる。このような方法によれば、より多くの所望のナノ構造体を作成することができ、生体分子や遺伝子回路を人工的に構成するためのツールとしてより応用しやすいといえる。

[0074] [実施例]

RNPを用いたナノ構造体創製の方法を示す。本手法は、蛋白質のみあるいはRNAのみを用いる場合よりも容易に、ナノスケールの構造体や機能性分子の創製が行える技術である。以下に、具体的実験例を挙げる。

実施例 1

[0075] [RNPナノ構造体のコンピュータ分子設計]

RNPナノ構造体の分子設計には分子モデリングソフトウェアであるDiscovery Studio 2.0 (Accelrys社)を用いた。まず、分子設計に用いるRNPモチーフの三次元立体構造として、L7Ae-Box C/Dの構造が記述されたpdbファイルをThe RCSB P

rotein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) より取得した (PDB ID: 1RLG)。取得したファイルに含まれる Box C/D の 3 塩基目、5 塩基目および 21 塩基目の 5' ブロモウリジンは、実際に合成する RNA に合わせてウリジンに置換した。配列任意の直鎖状の二本鎖 A ヘリックス RNA の分子モデルを生成し、頂点となる 3 つの L7Ae-Box C/D が同一平面状に配置されるように二本鎖の長さを調節し辺部分に挿入した。Box C/D を連結する二本鎖の長さは 26 塩基対である。辺部分の二本鎖の配列は、望まない二次構造を形成しないよう、類似の試みを行った R. P. Goodman らの DNA 四面体の辺の配列に置換した (Science, 2005, 310, 1661-1665)。

[0076] 図 8 (a) は、Discovery Studio 2.0 を用いて描写した L7-3kaku を上面から見た図であり、図 8 (b) は、図 8 (a) を 90 度回転させた三角形側面の図である。RNA は 114 nt の long chain (図 9 (a)) および 150 nt の short chain (図 9 (b)) からなり、これらの RNA の相補的な対合により、3 つの Box C/D を持つ環状 RNA 鎖が形成される。これらの Box C/D 配列に L7Ae が結合することで環状になった RNA の三箇所が 60 度に固定され三角形が形成されると期待される。形成される RNA 三角形の一辺の長さは約 10 nm である (図 10)。分子モデルを設計した後、モデルの構造の妥当性を評価するため、Minimization Protocol を用いてエネルギー最小化計算を行った。設計した分子モデルの構造とエネルギー最小化計算後の構造を重ね合わせたところ構造上の差異はほとんどなかったため、設計した分子モデルはエネルギー的に安定であることが確認できた。

実施例 2

[0077] [RNP ナノ構造体の合成・構築]

[L7Ae の作製]

RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフの蛋白質、L7AeはAlexander Huttenhofer氏から譲り受けたプラスミド（配列番号11）を利用して発現させた。そのプラスミドはA. Fulgidus氏からL7Ae Fwd（5'-CTGACATATGTACGTGAGATTGAGGTTTC-3'）（配列番号12）、L7Ae Rev（5'-CTGACTCGAGTTACTTCTGAAGGCCTTTAATC-3'）（配列番号13）のプライマーを使って増幅したインサートを、制限酵素NdeIおよびXhoIで切断したpET-28b+ベクター（Novagen）に組み込み作製されていた。発現精製法は以下に示す。まず、大腸菌BL21（DE3）pLysSに形質転換した。得られたコロニーを25 μ g/mLカナマイシン、100 μ g/mLクロラムフェニコールを含むLB培地5 mLに植菌し、37°Cで一晩振蕩培養した。続いて培養液全量を25 μ g/mLカナマイシン、100 μ g/mLクロラムフェニコールを含むLB培地500 mLに植え継いだ。O. D.₆₀₀が0.6~0.7になるまで37°Cで振蕩培養し、その後、発現誘導をするため1M IPTGを500 μ L加え（最終濃度1 mM）、30°Cで一晩振蕩培養した。遠心分離（4°C、6000 rpm、20分）で菌体を回収し、ソニケーションバッファー（50 mM Na phosphate、0.3 M NaCl、pH 8.0）5 mLを加え、超音波処理を行い、菌体を破碎した。なお、超音波処理は、氷上で冷却後、15秒間超音波を当てる、という操作を6回繰り返した。その後、80°C、15分で、不純蛋白質を変性させた。遠心分離（4°C、6000 rpm、20分）を行い、上清を回収し、ヒスチジンタグが付いた蛋白質をNi-NTAカラム（Qiagen）を用いてバッチ法により精製した。具体的には、まず上清とNi-NTA 1 mLを混合し、4°Cで1時間攪拌を行った。その後、カラムに充填し、washバッファー（50 mM Na phosphate、0.3 M NaCl、20 mM imidazole、pH 8.0）4 mLで2回洗浄した。50 mM、100 mM、200 mM、300 mMのimidazoleを含む溶出バッファー（50 mM N

a phosphate、0.3M NaCl、pH8.0にimidazoleを加えて作製)を1mLずつ2回で段階的に溶出させた。確認は17% SDS-PAGEにより行った。続いて、マイクロコン YM-3 (Millipore)を用いて、蛋白質の濃縮を行い、透析バッファー(20mM Hepes-KOH、1.5mM MgCl₂、150mM KCl、5% グリセロール、pH7.5)に置換した。また、蛋白質の濃度はプロテインアッセイ(BIO-RAD)を用い、Bradford法で決定した。

[0078] [RNAの合成]

long chainの鋳型DNAは、L Fwd (10μM、5'-CTAATACGACTCACTATAGGCGCAAAGGCCTGTAA TCGGCGTGATG-3' 配列番号14) 1.5μL、L Rev (10μM、5'-TTGCTACGCTCATCACGCCCGGATGGG CATGCTCTTCCCGTAGAGGCTC-3' 配列番号15) 1.5μL、L template (1ng/μL、5'-GGCCTGTAA TCGGCGTGATGAGCCATGCGAGGAGGAAATGAAG TCCAATGGCGTGATGAGCCTCTACGGGAAGAGC-3' 配列番号16) 1μL、KOD⁺ (TOYOBO) 1μL、10×KOD⁺ buffer 5μL、25mM MgSO₄ 1.6μL、2.5mM dNTPs 4μL、超純水34.4μLを混合し、94°C 15秒、55°C 30秒、68°C 60秒の3ステップで15サイクルPCRを行い作製した。short chainの鋳型DNA合成は、まずS template (1ng/μL、5'-GCCTTTGCGCCTTGCTACGCTCTGACCCGGATGGGCATGCTCTTCCCGTAGAGGCTCTGACCATTTGGACTTC-3' 配列番号17) 1μL、S Rev (10μM、5'-TGTAATCGGTCAGAGCCATGCGAGGAGGAAATGAAGTCCAATGGTCAGAG-3' 配列番号18) 5μL、Ex Taq (Takara) 1μL、10×Ex Taq buffer 10μL、2.5mM dNTPs 8μL、超純水7

5 μ Lを混合し、94°C 30秒、55°C 30秒、68°C 30秒の3ステップで5サイクルPCRを行った。合成されたDNA鎖は、フェノール抽出、ジエチルエーテル抽出、エタノール沈殿を行い精製した。

[0079] 次に、このDNA (1 ng/ μ L) 1 μ Lを鋳型とし、S Fwd (10 μ M、5' -CTAATACGACTCACTATAGGCCTTTGCGCCTTGCTACG-3' 配列番号19) 1.5 μ L、S new Rev (10 μ M、5' -TGTAATCGGTCAGAGCCATGCGAGG-3' 配列番号20) 1.5 μ L、KOD⁺ (TOYOBO) 1 μ L、10 $\times$ KOD⁺ buffer 5 μ L、25mM MgSO₄ 1.6 μ L、2.5mM dNTPs 4 μ L、超純水34.4 μ Lを混合し、94°C 15秒、55°C 30秒、68°C 60秒の3ステップを15サイクルでPCRを行い、鋳型DNAを合成した。それぞれの鋳型DNAは、4%アガロースゲル電気泳動で合成できたことを確認し、フェノール抽出、ジエチルエーテル抽出、エタノール沈殿を行い精製した。精製した鋳型DNAは8 μ Lの超純水に溶解し、転写に用いた。転写にはMEGAshortscript (商標) (Ambion) を用い、以下の通り行った。鋳型DNA 8 μ L、T7 10 $\times$ Reaction Buffer 2 μ L、T7 ATP Solution (75mM) 2 μ L (CTP、GTP、UTPに関しても同様)、T7 Enzyme Mix 2 μ Lを混合した全20 μ Lを37°Cで一晩反応させた。反応後は、TURBO DNase 1 μ L加え、37°Cで1時間インキュベートし、鋳型DNAを分解させた。反応液に、115 μ Lの超純水と15 μ L酢酸アンモニウムストップ溶液を加え、さらにフェノール処理、ジエチルエーテル抽出、エタノール沈殿を行い精製した。沈殿を20 μ Lの変性色素 (80%ホルムアミド、0.17% XC、0.27% BPB) に溶解し、10% ポリアクリルアミド (1/30 ビスアクリルアミド) 変性ゲル電気泳動で分離した。目的のサイズのバンドを切り出し、500 μ Lの溶出緩衝液 (0.3M 酢酸ナトリウム、pH 7.0) を加え、37°Cで一晩インキュベートし溶出した。溶出したRNAは

再びフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出およびエタノール沈殿を行って精製し、超純水に溶かして以降の実験に用いた。

実施例 3

[0080] [ゲルシフトアッセイによるRNP構造体形成の確認]

RNAと蛋白質の結合の確認は、二種類のRNAの濃度がそれぞれ2 ng/μL、20mM Hepes-KOH、150mM KCl、1.5mM MgCl₂、2mM DTT、3%グリセロール、蛋白質100~1000 nMの反応条件で、以下のように行った。5×binding buffer (100mM Hepes-KOH (pH7.5)、750mM KCl、7.5mM MgCl₂、10mM DTT、15% グリセロール) 2 μLと、short chainおよびlong chain (ともに10 ng/μL) 2 μLずつを混合し、80℃で3分間加熱してRNAを変性させた後、氷上に置いて急冷してフォールディングさせた。L7Aeを加え、超純水で反応液量を10 μLにし、氷上で15分間静置してRNAとL7Ae (100 nM、300 nM、1000 nM) を結合させた。色素 (0.25% BPB、0.25% XC、30% グリセロール) を1 μL加え、非変性5%ポリアクリルアミドゲルに重層し、4℃で3~4時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルをSYBR Greenで染色し、FLA-7000 (FUJI FILM) でバンドを確認した。結果を図11に示す。その結果、short chainとlong chainが結合したRNAに3つのL7Aeが結合していることが示唆された。

実施例 4

[0081] [原子間力顕微鏡による構造体の観察]

原子間力顕微鏡で観察するための試料は以下のように調製した。5×binding buffer (100mM Hepes-KOH (pH7.5)、750mM KCl、7.5mM MgCl₂、10mM DTT、15% グリセロール) 2 μLとshort chainおよびlong chain (ともに10 ng/μL) 2 μLずつを混合し、80℃で3分間加

熱してRNAを変性させた後、氷上に置いて急冷してフォールディングさせた。3 μ Lの超純水と1 μ Lの10 μ M L7Ae（最終濃度1000 nM）を混合後、氷上で15分間静置してRNAとL7Aeを結合させた。反応液2 μ Lに10 mM HEPES-KOH（pH 7.5）18 μ Lを加えて10倍に希釈し、一回の測定にはこの希釈液10 μ Lを使用した。試料は雲母基板上に固定化して観察した。まず、雲母基盤表面に20 μ Lの10 mM スペルミジンを滴下し、室温で10分間静置した。窒素ガスでスペルミジンを吹き飛ばして乾燥させた後、試料10 μ Lを滴下して室温で10分間静置し、試料を雲母片表面に付着させた。1 mLの超純水で雲母片表面を洗い流し、窒素ガスを吹き当てて乾燥させた。この雲母基盤を原子間力顕微鏡（Veeco社製）にセットして走査し、500 nm $\times$ 500 nmのスケールで画像化した。原子間力顕微鏡の制御及び画像の処理にはNano scope（Veeco社製）を用いた。結果を図12、図13、図14、図15に示す。その結果、単独では楕円状で存在したRNA分子（図13）が、蛋白質L7AeとRNA分子とが共存した場合（図15）には三角形の構造体を形成することが観察でき、蛋白質L7Ae存在下でのみ設計通りの三角形の構造体を確認できた。

[0082] また、得られた画像をもとに、観察されたRNAまたはRNP構造体の粒径および高さの分布を測定し解析した。その結果、RNAのみの場合（サンプル数N=121、粒径の平均値=26.15 nm、標準偏差 σ =4.62、高さの平均値=1.80 nm、標準偏差 σ =0.66）と比較して、L7Ae添加時の方が分布のばらつき（標準偏差）が小さく、粒径、高さともに一定の値付近に収束していた（サンプル数N=122、粒径の平均値=24.26 nm、標準偏差 σ =2.68、高さの平均値=1.24 nm、標準偏差 σ =0.20）。この実験解析から、そのみでは強固な単一の構造を取り得ない、フレキシブルな構造をもつRNAが、L7Ae蛋白質と結合することにより設計通りの三角形構造を安定に形成したことが明らかとなった。

実施例 5

[0083] [大きなL7-3 kakuのコンピュータ分子設計]

実施例1と同様に、分子モデリングソフトウェアであるDiscovery Studio 2.0 (Accelrys社)を用いて、3つのL7Ae-BoxC/Dモチーフが同一平面状で正三角形を形成するよう、48bpのRNA二本鎖でつないだ大きなL7-3 kakuを設計した。図16は、Discovery Studio 2.0を用いて描写した大きなL7-3 kakuの図である。この大きなL7-3 kakuにおいて、三角形はRNA二本鎖で構成され、RNAが形成する三角形の一辺は約17nm、48bpであった。

[0084] コンピュータ分子設計の結果、long chainの配列は、GGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGGCGCCGAGCGGCGUGAUGAGCUGUUCACCGGCAUCGUGCCCAUCAUGCGAGGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCGUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUGCCCAUCCGCCUGAUCGAGCUGAAUGGCGAUGGCGUGAUGAGCAUGGUGAGCAAGUAGCAA (配列番号21)、short chainの配列は、GGCCUUUGCGCCUUGCUACUUGCUCACCAUGCUCUGACCAUCGCCAUUCAGCUCGAUCAGGCGGAUGGGCAUGCUCUUCGCGUAGAGGCUCUGACCAUUGGACUUCAUUUUCCUCCUCGCAUGAUGGGCACGAUGCCGGUGAACAGCUCUGACCGCUCGGCGCCCGAUUACA (配列番号22)と決定された。

[0085] また、異なる配列の組み合わせから構成される、大きなL7-3 kakuを設計及び作成した。その際に利用したlong chain及びshort chainの配列は以下の通りである。long chainの配列は、5'-GGACGAGCUGUACACCAUGGUGACCGCCGCGGGCGUGAUGAGCUCCAAGGACCCCAACGAGAA GCGCGAUCACAUGAUCUACUUCGGCUUCGGCGUG

AUGAGCCCUGUGCUGCUGCCCCGAUAACCACUACC
UGCCAUCACCCACGGCCCUGGGCGUGAUGAGCAU
UCCACCCAGAGCGC-3' (配列番号28、Artificial、180nt) に、short chainの配列は、5' -GGUGU
ACAGCUCGUCCGCGCUCUGGGUGGAAUGCUCUGA
CCCAGGGCCGUGGGUGAUGGCAGGUAGUGGUUAU
CGGGCAGCAGCACAGGGCUCUGACCGAAGCCGAA
GUAGAUCAUGUGAUCGCGCUUCUCGUUGGGGGUCC
UUGGAGCUCUGACCCGGCGGGCGGUCACCAU-3' (配列番号29、Artificial、171nt) を作成した。

[0086] [RNAの合成]

long chainの鋳型DNAは、L Fwd (2 μ M、5' -CT
AATACGACTCACTATAGGACGAGCTGTACACCAT
GGTGACCGCCGCGGGCGTGATGAGCTCCAAGGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATCTACTTC
GGCTT-3'、配列番号30、Artificial、109nt) 1
0 μ L、L Rev (2 μ M、5' -GCGCTCTGGGTGGAATG
CTCATCACGCCCAGGGCCGTGGGTGATGGCAGGT
AGTGGTTATCGGGCAGCAGCACAGGGCTCATCAC
GCCGAAGCCGAAGTAGATCATGTG-3'、配列番号31
、Artificial、109nt) 10 μ L、Ex Taq (Taka
ra) 0.5 μ L、10 $\times$ Ex Taq buffer 5 μ L、2.5m
M dNTPs 4 μ L、超純水21.5 μ Lを混合し、94 $^{\circ}$ C 30秒間
、48 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 30秒間の3ステップで5サイクルPCRを行
い作製した。

[0087] short chainの鋳型DNAは、S Fwd (2 μ M、5' -C
TAATACGACTCACTATAGGTGTACAGCTCGTCCG
CGCTCTGGGTGGAATGCTCTGACCCAGGGCCGTG

GGTGATGGCAGGTAGTGGTTATCGGGCAGCAGCA
CA-3' (配列番号32、Artificial、105nt)) 10 μ L、S Rev (2 μ M、5'-ATGGTGACCGCCGCGGGT
CAGAGCTCCAAGGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGATCTACTTCGGCTTCGGTCAGAGCCCTGT
GCTGCTGCCCGATAACC-3' (配列番号33、Artificial、104nt)) 10 μ L、Ex Taq (Takara) 0.5
 μ L、10 $\times$ Ex Taq buffer 5 μ L、2.5mM dNTPs 4 μ L、超純水21.5 μ Lを混合し、94 $^{\circ}$ C 30秒間、56 $^{\circ}$ C 1
分間、72 $^{\circ}$ C 30秒間の3ステップで5サイクルPCRを行い作製した。
合成された鋳型DNA鎖は、非変性6%アクリルアミドゲル(1/30 ビスアクリルアミド)で電気泳動を行い、目的のサイズのバンドを切り出した。
切り出したゲル片に500 μ Lの溶出緩衝液(0.1% SDS、0.3
M 酢酸ナトリウム、pH 7.0)を加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベート
しDNAを溶出した。その後フェノール抽出、ジエチルエーテル抽出および
エタノール沈殿を行い、20 μ Lの超純水に溶かして、8 μ Lを以下の転写
反応に用いた。

- [0088] 転写にはMEGAshortscript (商標) (Ambion)を用
い、以下の通り行った。鋳型DNA 8 μ L、T7 10 $\times$ Reaction
Buffer 2 μ L、T7 ATP Solution (75mM)
2 μ L (CTP、GTP、UTPに関しても同様)、T7 Enzyme
Mix 2 μ Lを混合した全20 μ Lを37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応後
は、TURBO DNase 1 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュペー
トし、鋳型DNAを分解させた。反応液に20 μ Lの変性色素(80%ホル
ムアミド、0.17% XC、0.27% BPB)を加え、10% ポ
リアクリルアミド(1/30 ビスアクリルアミド)変性ゲル電気泳動で分
離した。目的のサイズのバンドを切り出し、500 μ Lの溶出緩衝液(0.
1% SDS、0.3M 酢酸ナトリウム、pH 7.0)を加え、37 $^{\circ}$ C

で一晩インキュベートし溶出した。溶出したRNAはフェノール抽出、ジエチルエーテル抽出およびエタノール沈殿を行い、超純水に溶かして以降の実験に用いた。

[0089] [ゲルシフトアッセイによるRNP構造体形成の確認]

実施例3と同様に、RNAと蛋白質の結合をゲルシフトアッセイで確認した。二種類のRNAの最終濃度はそれぞれ50 fmol/ μ L、20 mM HEPES-KOH、150 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、2 mM DTT、3%グリセロール、蛋白質100~1000 nMの反応条件で、以下のように行った。5×binding buffer (100 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、750 mM KCl、7.5 mM MgCl₂、10 mM DTT、15% グリセロール) 2 μ Lと超純水6 μ L、short chainおよびlong chain (ともに1 pmol/ μ L) 0.5 μ Lずつを混合し、80°Cで3分間加熱してRNAを変性させた後、氷上に置いて急冷してフォールディングさせた。1 μ LのL7Aeを加え、氷上で15分間静置してRNAとL7Ae (最終濃度100 nM、300 nM、500 nM、1000 nM) を結合させた。色素 (0.25% BPB、0.25% XC、30% グリセロール) を1 μ L加え、非変性5%ポリアクリルアミドゲルに重層し、室温で3~4時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルをSYBR Green IIで染色し、FLA-7000 (FUJIFILM) でバンドを確認した。その結果、long chainとshort chainが結合したRNAに3つのL7Aeが結合していることが示唆された。

[0090] [原子間力顕微鏡による構造体の観察]

実施例4と同様に、試料を以下のように調製し原子間力顕微鏡で観察した。5×binding buffer (100 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、750 mM KCl、7.5 mM MgCl₂、10 mM DTT、15% グリセロール) 2 μ Lと超純水6 μ L、short chainおよびlong chain (ともに1 pmol/ μ L) 0.5 μ Lず

つを混合し、80℃で3分間加熱してRNAを変性させた後、室温に10分間置きフォールディングさせた。1μLの7.5μM L7Ae（最終濃度750nM）を混合後、室温で15分間静置してRNAとL7Aeを結合させた。反応液2μLに10mM HEPES-KOH（pH7.5）18μLを加えて10倍に希釈し、一回の測定にはこの希釈液10μLを使用した。試料は雲母基板上に固定化して観察した。まず、雲母基盤表面に20μLの10mMスperlミジンを滴下し、室温で10分間静置した。窒素ガスでスperlミジンを吹き飛ばして乾燥させた後、試料10μLを滴下して室温で10分間静置し、試料を雲母片表面に付着させた。1mLの超純水で雲母片表面を洗い流し、窒素ガスを吹き当てて乾燥させた。この雲母基盤を原子間力顕微鏡（Veeco社製）にセットして走査した。原子間力顕微鏡の制御及び画像の処理にはNano scope（Veeco社製）を用いた。その結果、RNAのみの場合には、RNA同士が自己集合または会合したと考えられる大きな環状構造体や直鎖状の構造体が観察された。対して、L7Ae存在下ではそれらの構造体の減少と、コンピューターデザイン通りの三角形構造体の形成が観察され、L7Ae存在下で設計通りにRNP構造体形成が行われていることが確認できた。

実施例 6

[0091] [L7-3kissのコンピュータ分子設計]

実施例1と同様に、分子モデリングソフトウェアであるDiscovery Studio 2.0（Accelrys社）を用いて、3つのL7Ae-BoxC/DモチーフをKissing-loopモチーフでつないだ三角形である、L7-3kissを設計した。Kissing-loopモチーフは、Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site, Eric Ennifar, Philippe Walter, Bernard Ehresmann, Chantal Eh

resmann and Philippe Dumas, Nature Structural Biology, Vol. 8, Number 12, 1064-1068, 2001により知られており、互いに逆相補配列を持つ二つのループが、ループ間での塩基対形成とスタッキングで安定に結合したモチーフである。このL7-3 kissは、RNP モチーフおよびRNA-RNA相互作用モチーフを利用した構造変化制御の例として設計した。

[0092] 設計の前提として、図18に、L7Ae-Box C/D モチーフ、Kissin g-loopモチーフによる三角形形成の仮定的なスキームを示す。中央部にBox C/Dモチーフを有し、二本鎖を形成するループ状のRNAは、L7AeやMg²⁺イオンの非存在下では、ループ状で存在すると考えられる。このループ状のRNAに、L7Aeを添加すると、60度の屈曲構造を呈する屈曲ループRNAに、特異的に構造変化すると考えられる。さらに、Mg²⁺イオンを添加すると、Kissin g-loopモチーフにより、三角形を形成すると考えられる。なお、ループ状のRNAに、L7Aeを添加することなく、Mg²⁺イオンのみを添加すると、ループ状のRNAのままで、Kissin g-loopモチーフにより相互作用し、非特異的な様々な形状を構成すると考えられる。この方法では、前の設計と異なり、短いRNAのフラグメントを混ぜただけで自己集合して、構造体を形成できるという利点がある。

[0093] 図17は、Discovery Studio 2.0を用いて描写したL7-3 kissのリボンダイアグラムである。このL7-3 kissにおいて、一つの三角形は3つのRNA鎖からなり、3つのRNA鎖は同一の配列とした。RNAが形成する三角形の一辺は約10nmであった。3つのRNA鎖は、L7Aeにより、60度の屈曲構造を呈し、kissin g-loop相互作用によりホモトリマーを形成し、三角形となった。

[0094] コンピュータ分子設計の結果、3つの同一のRNAの配列は、CUACGGGAAGCGCGCACCCGUAGAGGCUCUGACCCGGAU

GGGCAAGCGCGCAGCCCAUCCGGGGCGUGAUGAGCCU（配列番号23）と決定された。

実施例 7

[0095] [Delivery-3kakuのコンピュータ分子設計]

実施例1と同様に、分子モデリングソフトウェアであるDiscovery Studio 2.0（Accelrys社）を用いて、3つのL7Ae-Box C/Dモチーフが同一平面状で正三角形を形成するよう、26bpのRNA二本鎖でつなぎ、かつ3つのL7Aeのうち、一つには蛍光蛋白質GFPを結合させ、二つにはポリアルギニンモチーフを結合させた、Delivery-3kakuを設計した。図19は、Discovery Studio 2.0を用いて描写したDelivery-3kakuの図である。図中、左上の角、及び右上の角に、ポリアルギニンモチーフが融合したL7Aeが結合しており、左下の角に蛍光蛋白質GFPが融合したL7Aeが結合している、このDelivery-3kakuにおいて、三角形はRNA二本鎖で構成され、RNAが形成する三角形の一辺は約10nmであった。

[0096] コンピュータ分子設計の結果、long chainの配列は、5'-GGCGCAAAGGCCUGUAAUCGGCGUGAUGAGCCAUGCAGAGGAGGAAAUGAAGUCCAAUGGCGUGAUGAGCCUCUACGGGAAGAGCAUGCCCAUCCGGGGCGUGAUGAGCGUAGCAA-3'（配列番号24）、short chainの配列は、5'-GGCCUUUGCGCCUUGCUACGCGUCUGACCCGGAUGGGCAUGCUCUCCCGUAGAGGCUCUGACCAUUGGACUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGCUCUGACCGAUUACA-3'（配列番号25）、L7Ae-蛍光蛋白質GFPのペプチド配列は、VPEDMQNEALSLLEKVRRESGKVKKGTNETTKAVERGLAKLVYIAEDVDPPEIVAHLLCEEKNVPYIYVKSKNDLGRAVGIEVPCASAAI

IN EGELRKELGSLVEKIKGLQKPFTVSKGEELFT
GVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLT
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTTLGVQCFSRYPDHMK
QHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA EVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNS
HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDGSVQLADH
YQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSKDPNEKR
DHMVLLLEFVTAAGITLGMDELY（配列番号26）、L7A
eーポリアルギニンモチーフのペプチド配列は、EDMQNEALSLLE
KVRESGKVKKGTNETTKAVERGLAKLVYIAEDVD
PPEIVAHLPLLCEEKNVPYIYVKSKNDLGRAVG I
EVP CASAAI IN EGELRKELGSLVEKIKGLQKRRR
RRRRRRRRR（配列番号27）と決定された。

[0097] また、3箇所の頂点部位に確実に3種類の異なるL7Ae融合蛋白質を結合させるため、分割したDelivery-3kakuの設計も行った。RNAを三角形の辺部分で3つに分割したもので、辺部分の粘着末端間の塩基対形成により三角形が構築される。それぞれの頂点ごとにL7Ae融合蛋白質を結合させた後、それら3種類のRNA-蛋白質複合体を混合することにより、3つの異なる蛋白質を1つずつ持つDelivery-3kakuが得られる。3つのパーツはそれぞれ2本のRNA鎖からなり、三角形全体は計6種類のRNA鎖からなる。図20は、実施例7においてコンピュータ分子設計した、分割したDelivery-3kakuを構成するRNA分子の二次構造を示す図である。

[0098] 分割したDelivery-3kakuを構成する6種類のRNAはそれぞれ、chain A-Longの配列は、5'-GGCGCAAAGGC CUGUAAUCGGUGCGAUGAGCCAUGCGA-3'（配列番号34、Artificial、38nt）、chain A-Shortの配列は、5'-GGCUUCAUUUCCUCCUCGCAUGGCUC

UGACCGAUUACA-3' (配列番号35、Artificial、38nt)、chain B-Longの配列は、5'-GGAGGAAAUGAAGCCCAAUGGCGUGAUGAGCCUCUACG-3' (配列番号36、Artificial、38nt)、chain B-Shortの配列は、5'-GGCAUGCUCUUCCCGUAGAGGCU CUGACCAUUG-3' (配列番号37、Artificial、33nt)、chain C-Longの配列は、5'-GGAAGAGCAU GCCCAUCCGGGUGCGAUGAGCGUAGCAA-3' (配列番号38、Artificial、38nt)、chain C-Shortの配列は、5'-GGCCUUUGCGCCUUGCUACGCUCUG ACCCGGAUG-3' (配列番号39、Artificial、34nt)と決定された。

請求の範囲

- [請求項1] RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導する方法であって、
- RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子に、該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子を添加することを特徴とする方法。
- [請求項2] 特異的に構造変化するRNA分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子。
- [請求項3] 請求項2に記載の特異的に構造変化するRNA分子の製造方法であって、
- 所望の構造変化が知られているRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフを選択するステップと、
- RNA分子の塩基配列を決定するステップであって、上記RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列と、足場塩基配列とを、コンピュータ分子モデリング法を用いて配置することにより決定するステップと、
- 上記決定するステップにより得られた塩基配列に基づき、RNA分子を製造するステップと
- を含む方法。
- [請求項4] 請求項2に記載の特異的に構造変化するRNA分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然のRNA分子と、
- 該RNA分子のRNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含む蛋白質分子と
- を含んでなる、RNA分子の特異的な構造変化を蛋白質分子で誘導するためのキット。
- [請求項5] 前記RNA-蛋白質複合体形成に競合するRNA分子をさらに含む

請求項 4 に記載のキット。

[請求項6] 請求項 2 に記載の特異的に構造変化する RNA 分子であって、RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然の RNA 分子と、

 該 RNA 分子の RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列と、機能性蛋白質とを含んでなる蛋白質分子と

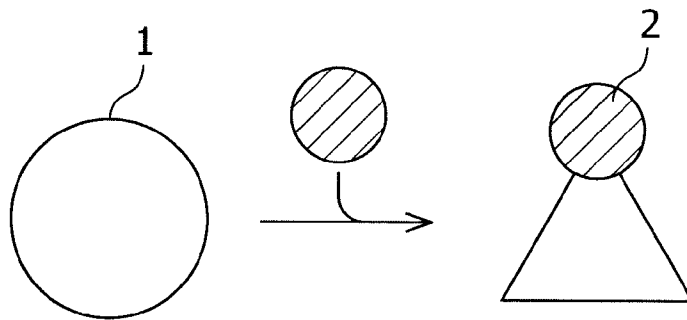
 を含む機能性 RNA-蛋白質複合体。

[請求項7] 前記機能性蛋白質が、マーカー蛋白質、膜透過性蛋白質、腫瘍に特異的な蛋白質、治療効果を有する蛋白質、特定の細胞表面を認識する抗体から選択される一以上である請求項 7 に記載の機能性 RNA-蛋白質複合体。

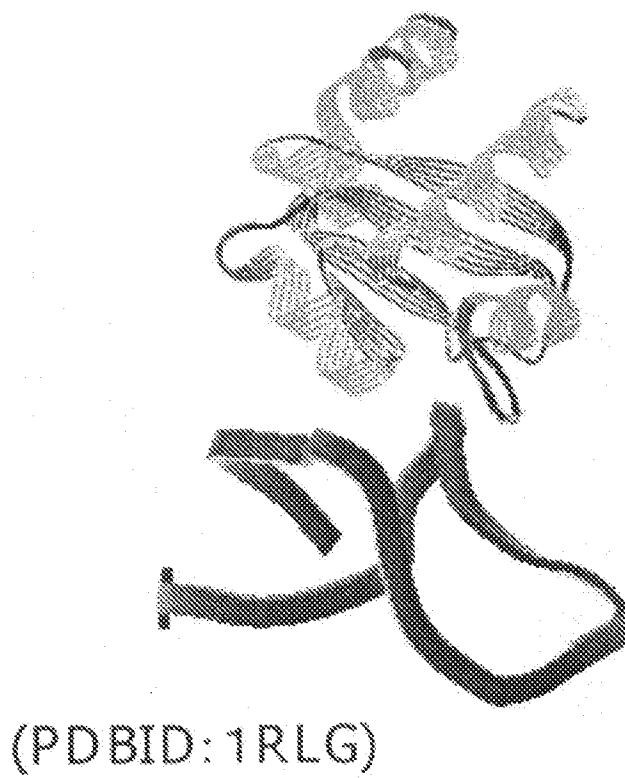
[請求項8] RNA-蛋白質複合体ナノ構造体を作成する方法であって、

 RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列を含んでなる非天然の RNA 分子に、該 RNA 分子の RNA-蛋白質複合体相互作用モチーフ由来の塩基配列に特異的に結合するアミノ酸配列を含んでなる蛋白質分子と、任意選択的に金属イオンとを添加することを特徴とする方法。

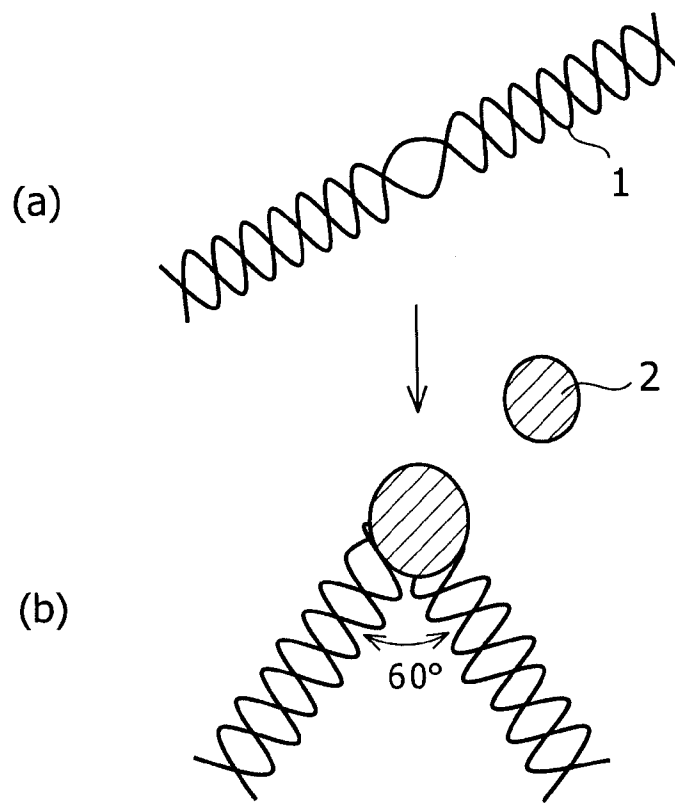
[図1]



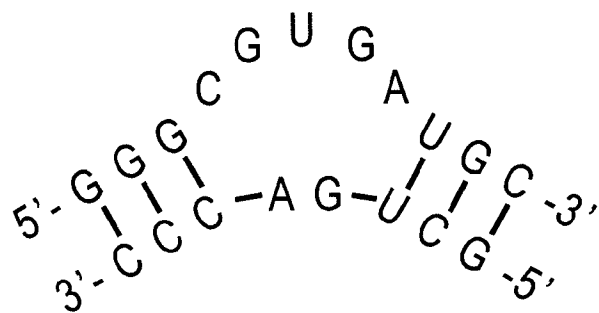
[図2]



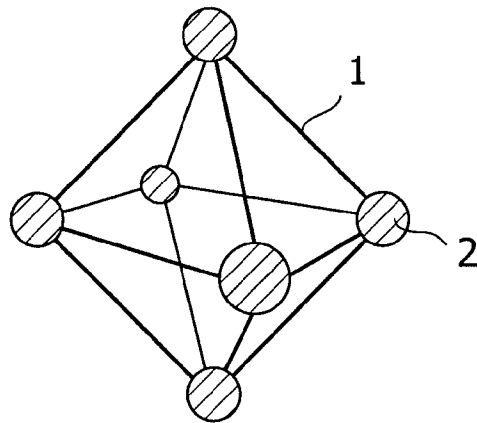
[図3]



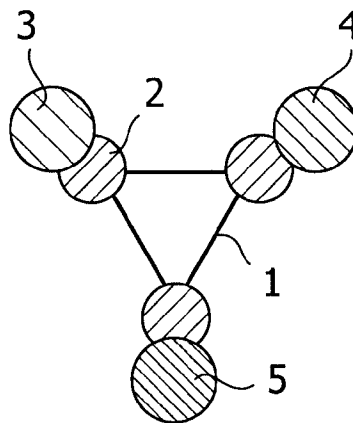
[図4]



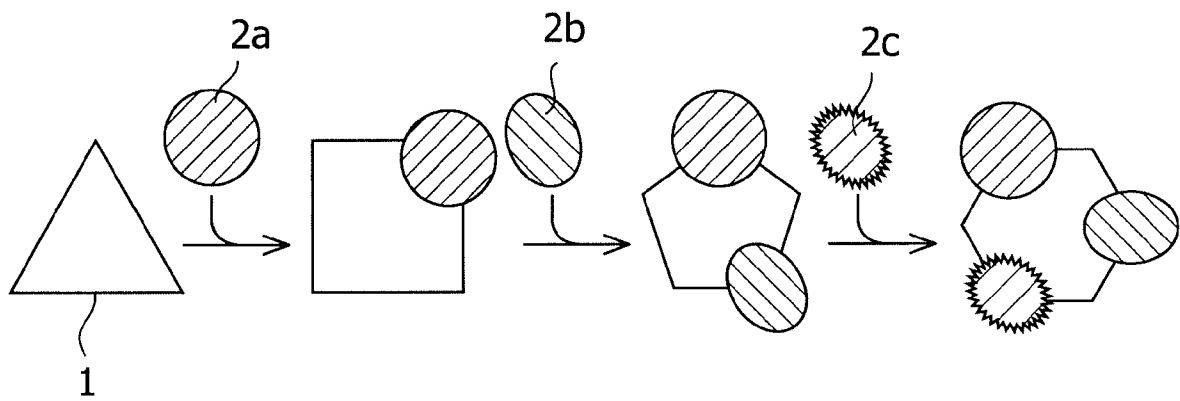
[図5]



[図6]

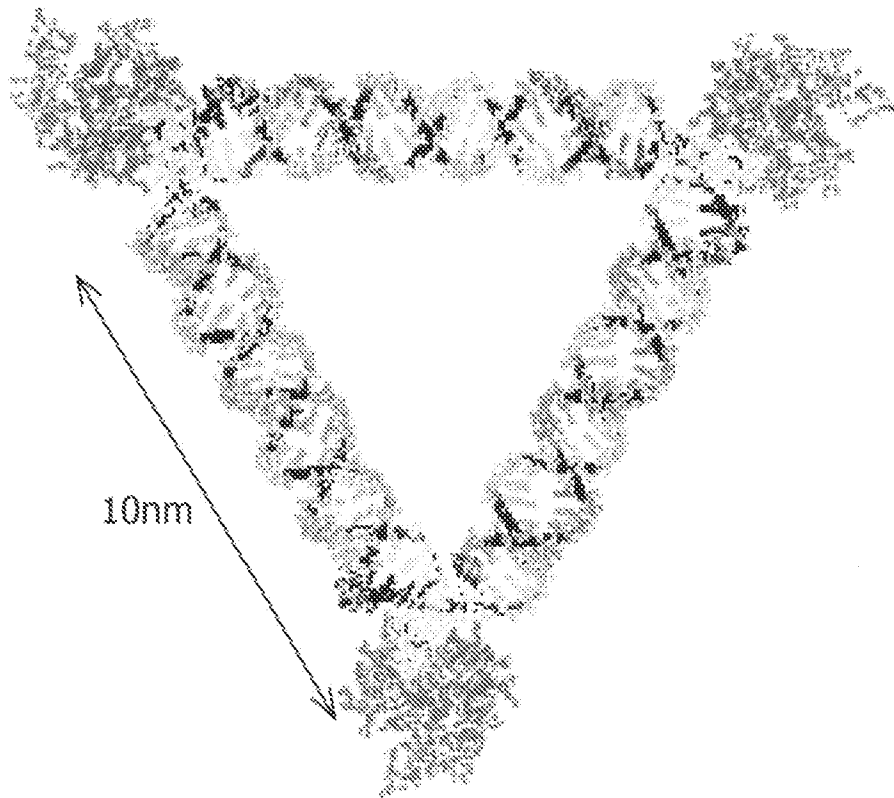


[図7]



[図8]

(a)



(b)



[図9]

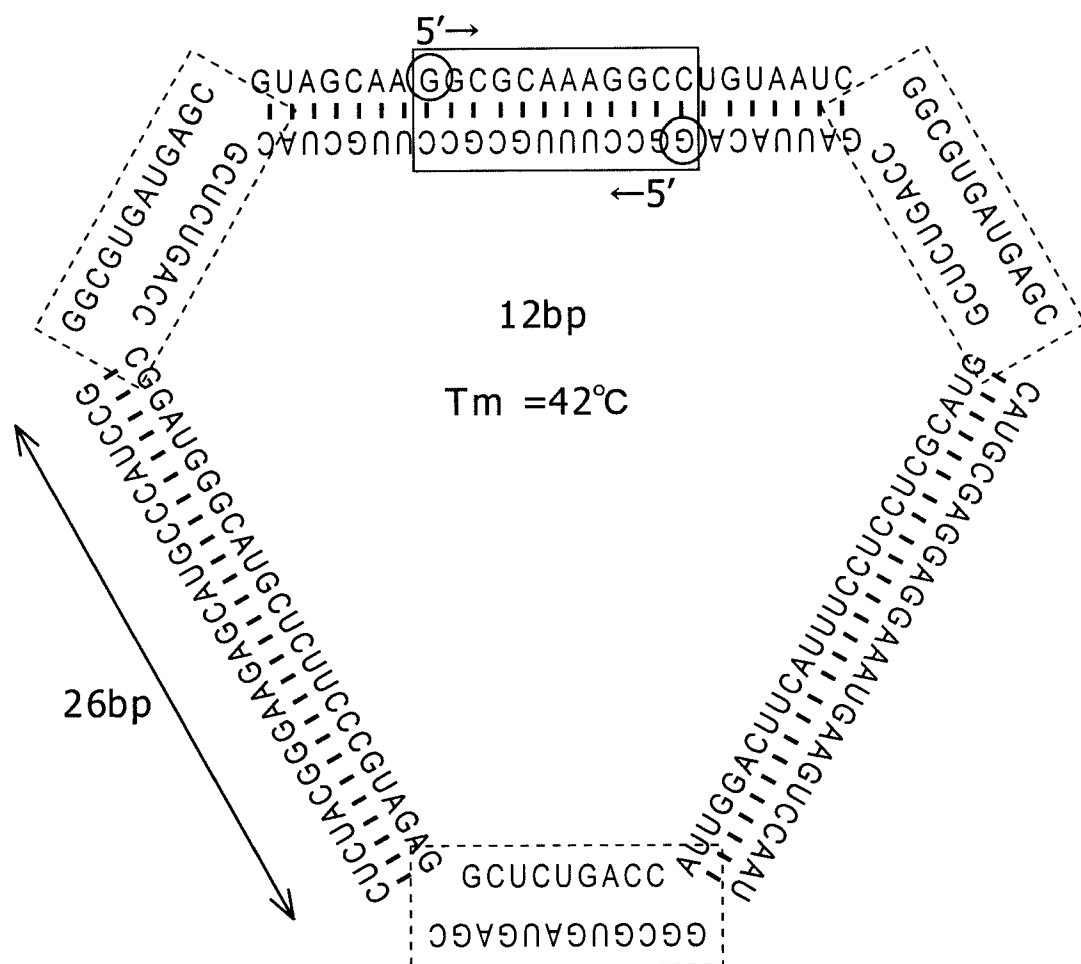
(a)

•Long chain (114 nt)
GGCGCAAGG CCUGUAAUC|G GCGUGAUGAG C|CAUGCGAGG AGGAAUGAA GUCCAAU|GGC
GUGAUGAGC|C UCUACGGGA GAGCAUGCCC AUCCG|GGCGU GAUGAGC|GUA GCAA

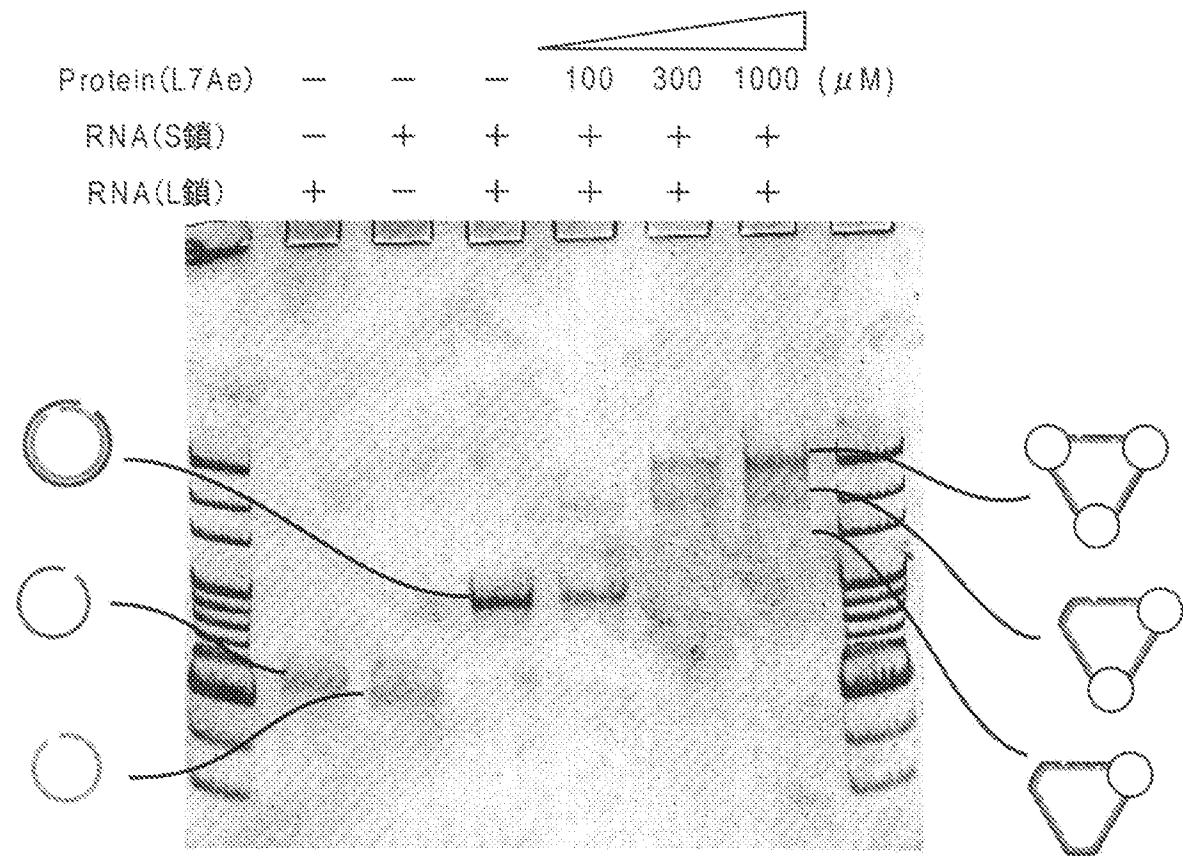
(b)

•Short chain (105 nt)
GGCCUUUGCG CCUUGCUCAC|G CUCUGAC|CG GAUGGGCAUG CUCUCCCGU AGAG|GCUCUG
ACC|AUUGGAC UUCAUUUCCU CCUGCAUG|G CUCUGACC|GA UUACA

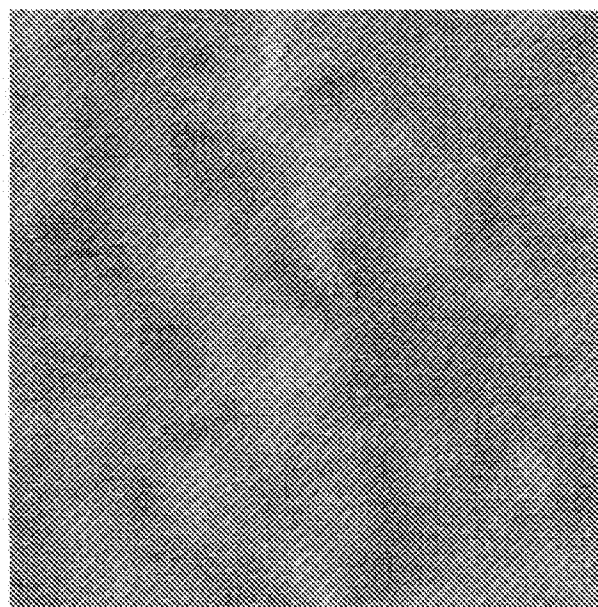
[図10]



[図11]

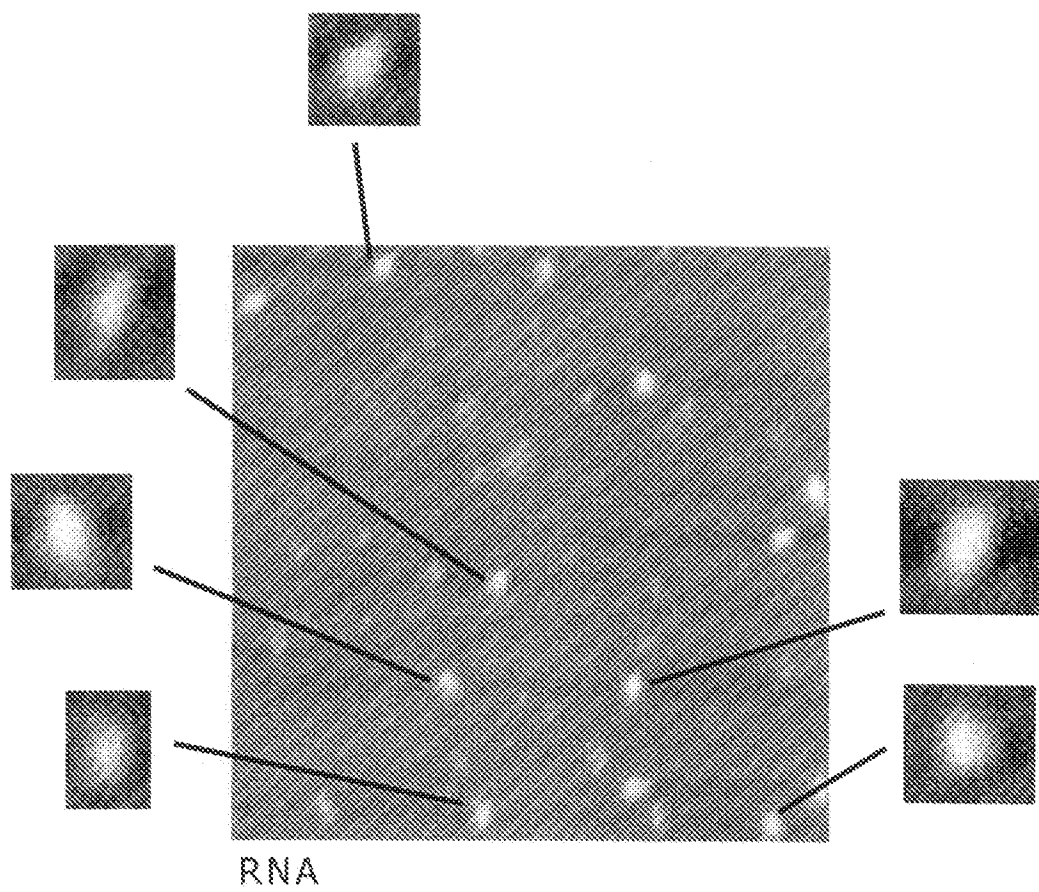


[図12]

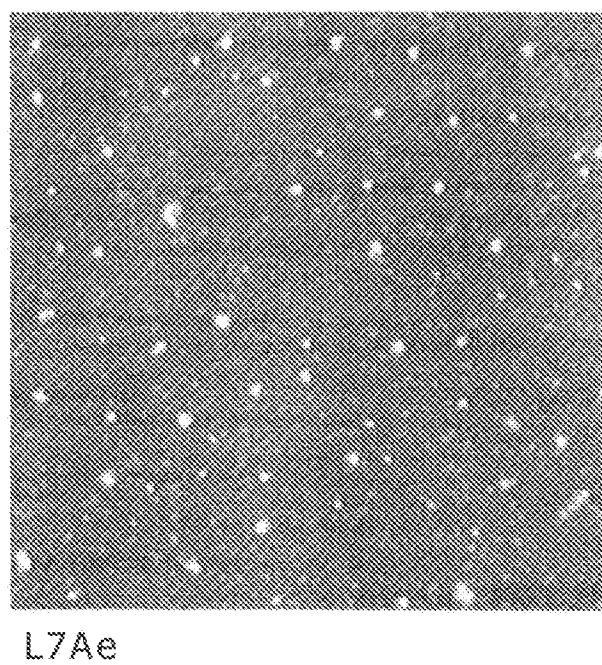


Buffer only

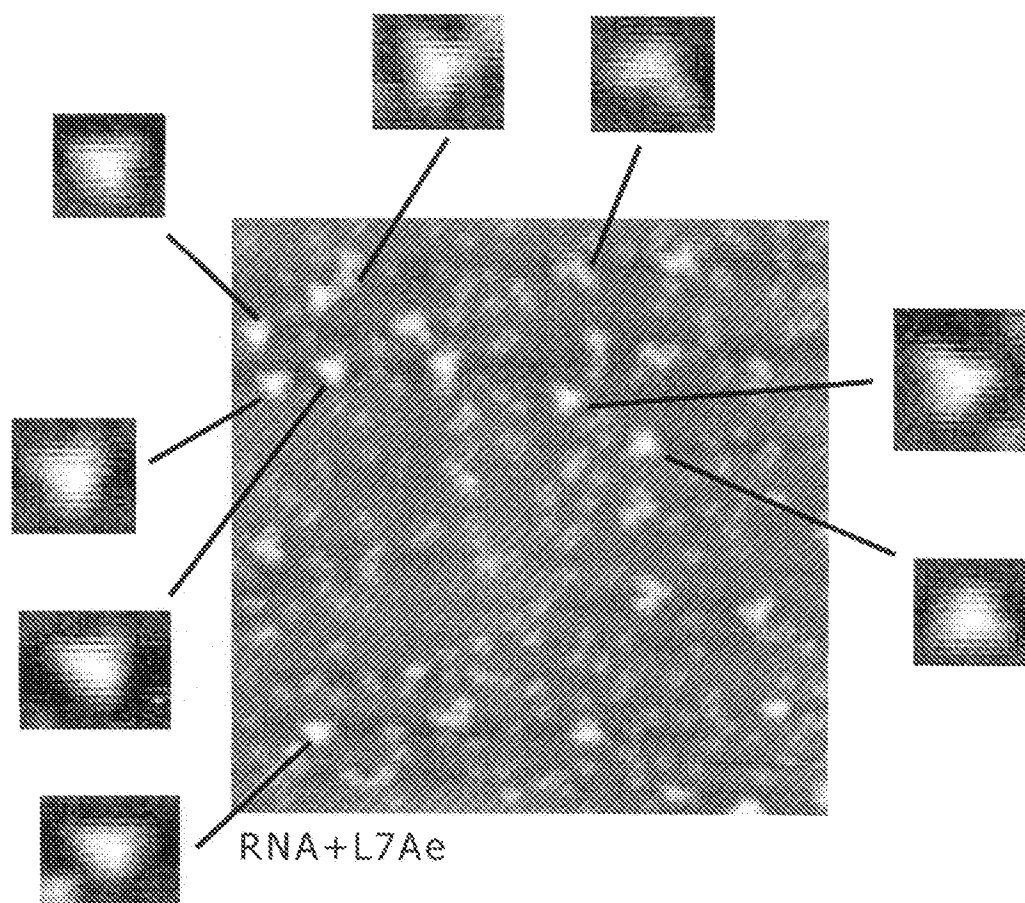
[図13]



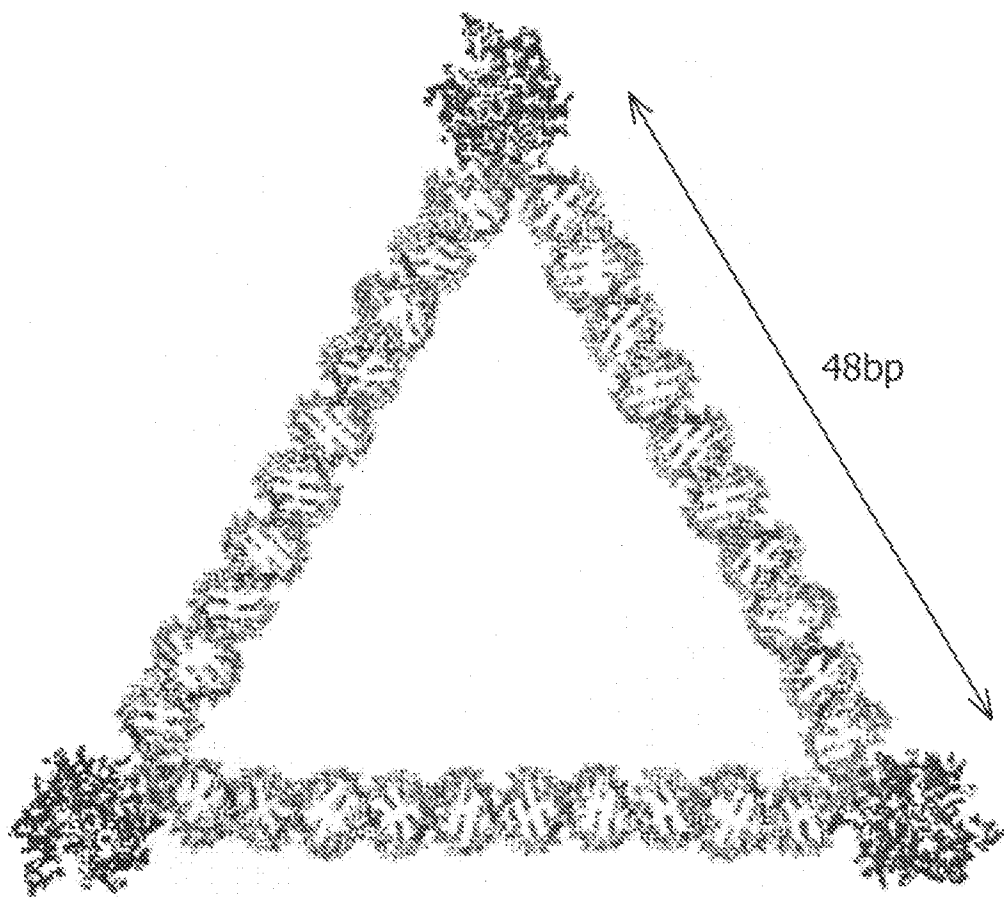
[図14]



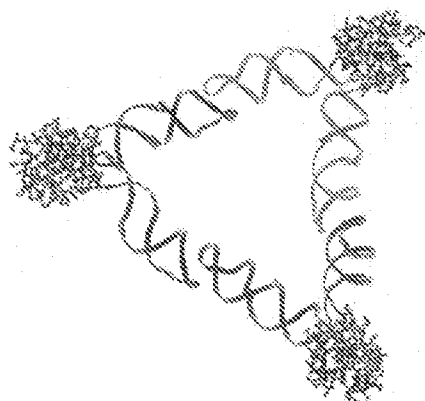
[図15]



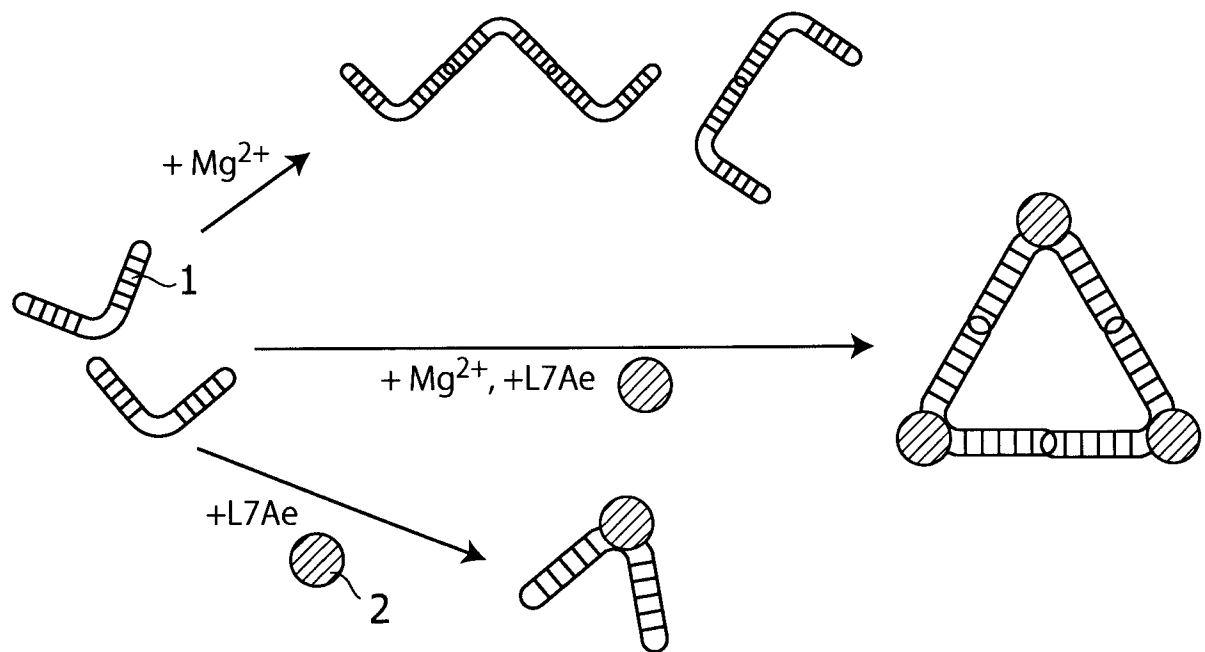
[図16]



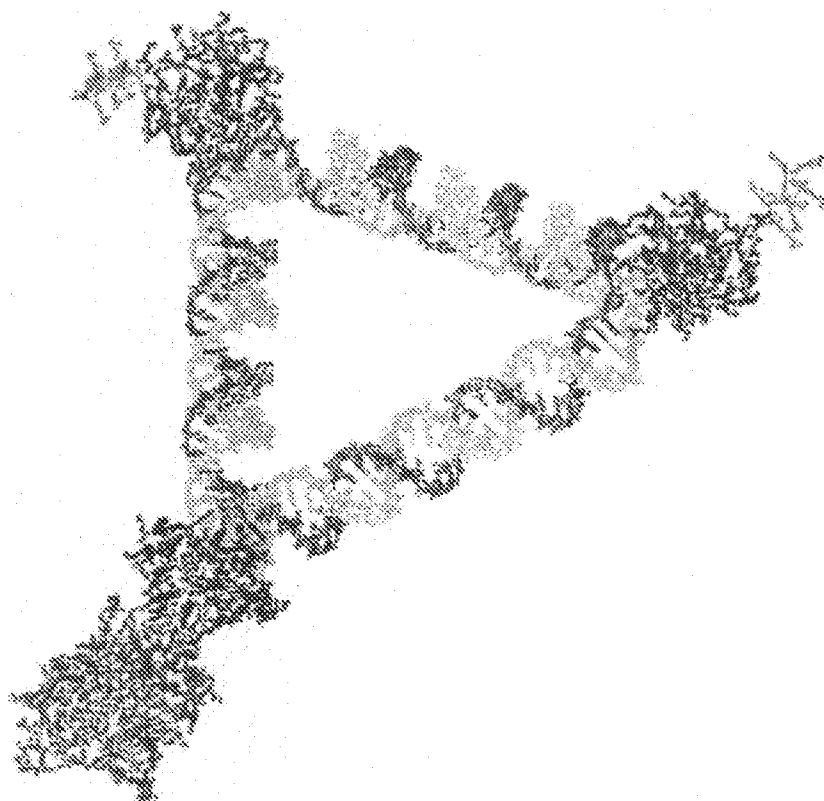
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/063023

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01) i, C07H21/02(2006.01) i, C07K14/47(2006.01) i, C12N15/09(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)

C12N15/00, C07H21/02, C07K14/47, C12N15/09

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

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

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUMAR P., "RNA no Kozo Henka ga Idenshi no Switch o ON ni suru", Sansoken TODAY, 2005, Vol.5, No.5, pages 20 to 21, full text	1-17
Y	KUMAREVEL T., et al., Structural basis of HutP-mediated anti-termination and roles of the Mg ²⁺ ion and L-histidine ligand., Nature, 2005, vol. 434, no. 7030, p. 183-191, full text	1-17
T	Tomoaki HARA et al., "RNP Motif L7Ae/Box C/D o Riyo shita Tanpakushitsu Oto Seigyo System no Kochiku", Dai 10 Kai Nippon RNA Gakkai Nenkai Yoshishu, 23 July, 2008 (23.07.08), page 141 (P-41)	1-17



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

17 August, 2009 (17.08.09)

Date of mailing of the international search report

25 August, 2009 (25.08.09)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/063023

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SURYADI J., et al., The crystal structure of the Methanocaldococcus jannaschii multifunctional L7Ae RNA-binding protein reveals an induced-fit interaction with the box C/D RNAs., Biochemistry, 2005, vol. 44, no. 28, p. 9657-9672	1-17

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N15/00, C07H21/02, C07K14/47, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)			
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
Y	KUMAR P., RNAの構造変化が遺伝子のスイッチをONにする, 産総研 TODAY, 2005, vol. 5, no. 5, p. 20-21, 全文		1-17
Y	KUMAREVEL T., et al., Structural basis of HutP-mediated anti-termination and roles of the Mg ²⁺ ion and L-histidine ligand., Nature, 2005, vol. 434, no. 7030, p. 183-191, 全文		1-17
☒ 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			
国際調査を完了した日 17.08.2009		国際調査報告の発送日 25.08.2009	
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） 中野 あい 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

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
T	原知明 他, RNP モチーフ L7Ae/Box C/D を利用したタンパク質応答制御システムの構築, 第10回日本RNA学会年会要旨集, 2008.07.23, p. 141 (P-41)	1-17
A	SURYADI J., et al., The crystal structure of the Methanocaldococcus jannaschii multifunctional L7Ae RNA-binding protein reveals an induced-fit interaction with the box C/D RNAs., Biochemistry, 2005, vol. 44, no. 28, p. 9657-9672	1-17