

(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
2020年4月30日(30.04.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/085510 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/7088 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/042049

(22) 国際出願日: 2019年10月25日(25.10.2019)

(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 2018-201074 2018年10月25日(25.10.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 熊本大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号 Kumamoto (JP). 国立大学法人弘前大学 (HIROSAKI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 Aomori (JP).

(72) 発明者: 勝田 陽介 (KATSUDA Yosuke); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 佐藤 慎一 (SATO Shinichi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 萩原 正規 (HAGIHARA Masaki); 〒0368560 青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内 Aomori (JP). 井原 敏博 (IHARA Toshihiro); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 北村 裕介 (KITAMURA Yusuke); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪2丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

(54) Title: METHOD FOR SUPPRESSING PROTEIN TRANSLATION REACTION USING STAPLE NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: Staple 核酸を利用したタンパク質翻訳反応の抑制法

(57) Abstract: Provided is a method for suppressing protein expression. In this method, protein expression is suppressed by bringing guanine-repeated sequences close to each other to form a guanine quadruplex structure, using oligomers that hybridize to regions near the guanine-repeated sequences of an RNA having a first, a second, a third, and a fourth guanine-repeated sequences (each referred to as a first G sequence, a second G sequence, a third G sequence, and a fourth G sequence).

(57) 要約: タンパク質発現を抑制する方法の提供。第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列 (それぞれ、第一G配列、第二G配列、第三G配列、第四G配列という) を有するRNAに対し、前記グアニン繰り返し配列の近傍領域にハイブリダイズするオリゴマーを用いて前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構造を形成させることによりタンパク質発現を抑制する方法。



WO 2020/085510 A1

明 細 書

発明の名称：

S t a p l e 核酸を利用したタンパク質翻訳反応の抑制法

技術分野

[0001] 本発明は、配列選択的に標的mRNA配列に結合し、標的mRNA上にグアニン四重鎖構造の形成を誘発することによりリボゾームのペプチド合成反応を阻害し、タンパク質翻訳反応を抑制する方法に関する。

背景技術

[0002] マイクロRNAやsiRNAなど様々な遺伝子発現抑制技術が知られている^{1,2}（非特許文献1、2）。しかし、いずれの技術に関してもmRNAに結合するという単純な機構で遺伝子発現抑制機能を発揮するため、予期せぬ効果（オフ・ターゲット効果）が避けられない³（非特許文献3）。また、導入核酸の細胞内安定性向上を目的として修飾核酸を使用すると、マイクロRNA効果やsiRNA活性が著しく低下し、期待するタンパク質発現抑制効果が得られない問題も生じる⁴（非特許文献4）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. Nature 1998, 391, 806.

非特許文献2：Ambros, V. Nature 2004, 431, 350.

非特許文献3：Jackson, A. L.; Linsley, P. S. Nature reviews. Drug discovery 2010, 9, 57.

非特許文献4：Jackson, A. L.; Burchard, J.; Leake, D.; Reynolds, A.; Schelter, J.; Guo, J.; Johnson, J. M.; Lim, L.; Karpilow, J.; Nichols, K.; Marshall, W.; Khvorova, A.; Linsley, P. S. Rna 2006, 12, 1197.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 創薬を視野に入れた核酸医薬を開発するには、生体内で安定な修飾核酸が利用可能であり、且つ、オフ・ターゲット効果が生じにくいタンパク質翻訳抑制技術を採用することが求められる。

[0005] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、Staple核酸と呼ばれるオリゴマーを用いることにより、配列選択的にグアニン四重鎖を形成させ、ひいてはタンパク質合成を抑制することに成功し、本発明を完成するに至った。

課題を解決するための手段

[0006] すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列（それぞれ、第一G配列、第二G配列、第三G配列、第四G配列という）を含む標的RNAに対し、前記グアニン繰り返し配列の近傍にハイブリダイズするオリゴマーを用い、当該オリゴマーの折り返しにより前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構造を形成させることによりタンパク質発現を抑制する方法であって、

前記オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一G配列と第二G配列との間であってそれぞれ第一G配列の近傍及び第二G配列の近傍、第二G配列と第三G配列との間であってそれぞれ第二G配列の近傍及び第三G配列の近傍、又は第三G配列と第四G配列との間であってそれぞれ第三G配列の近傍及び第四G配列の近傍にハイブリダイズする、前記方法。

(2) 前記オリゴマーは、その折り返しの方向がグアニン四重鎖構造側を向いてハイブリダイズするように設計される、(1)に記載の方法。

(3) 標的RNAがmRNA、TPM3又はMYD8である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) オリゴマーがDNA又はRNAである、(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) オリゴマーがダイマーである、(1)～(4)のいずれか1項に記載

の方法。

(6) タンパク質発現が、逆転写反応又はタンパク質翻訳反応である、(1) ~ (5) のいずれか1項に記載の方法。

(7) 第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列（それぞれ、第一G配列、第二G配列、第三G配列、第四G配列という）を含む標的RNAに対し、前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構造を形成させるオリゴマーであって、

前記オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一G配列と第二G配列との間であってそれぞれ第一G配列の近傍及び第二G配列の近傍、第二G配列と第三G配列との間であってそれぞれ第二G配列の近傍及び第三G配列の近傍、又は第三G配列と第四G配列との間であってそれぞれ第三G配列の近傍及び第四G配列の近傍にハイブリダイズして、その折り返しにより前記グアニン繰り返し配列を近づけるものである、

前記オリゴマー。

(8) 前記折り返しの方向がグアニン四重鎖構造側を向いてハイブリダイズするように設計される、(7)に記載のオリゴマー。

(9) DNA又はRNAである、(7)又は(8)に記載のオリゴマー。

(10) ダイマーである、(7) ~ (9) のいずれか1項に記載のオリゴマー。

(11) (7) ~ (10) のいずれか1項に記載のオリゴマーの製造方法であって、

オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一G配列と第二G配列との間であってそれぞれ第一G配列の近傍及び第二G配列の近傍、第二G配列と第三G配列との間であってそれぞれ第二G配列の近傍及び第三G配列の近傍、又は第三G配列と第四G配列との間であってそれぞれ第三G配列の近傍及び第四G配列の近傍にハイブリダイズするように設計し合成することを特徴とする前記方法

。

(12) (7) ~ (10) のいずれか1項に記載のオリゴマー、又は(11)に記載の方法により製造されたオリゴマーを含む、タンパク質発現抑制キット。

発明の効果

[0007] 本発明により、配列選択的に標的mRNA配列に結合（ハイブリダイズ）するオリゴマーの設計法を開発し、設計されたオリゴマーを用いて標的mRNAに安定なグアニン四重鎖構造を誘起することで、リボゾームのペプチド合成反応を阻害することが可能となった。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]グアニン四重鎖（G-quadruplex）の概要図である。（a）G-quadruplexの構造。グアニン繰り返し領域が4本近接することによってG-quadruplex構造を形成する。（b）G-quadruplex形成ルール。核酸の熱安定性に基づく高次構造予測によるとグアニンが3塩基以上繰り返し、グアニン繰り返し配列同士をつなぐ塩基数が7塩基以下の場合G-quadruplexを構築すると言われている。（c）mRNA中においてG-quadruplexを構築するとリボゾームのペプチド伸長反応が阻害され、結果、タンパク質合成反応が抑制されることが知られている。

[図2]DNAオリガミ法の概要を示す図である。（a）1本鎖環状DNAに226本の短いDNA鎖を混ぜてアニーリングすることによって任意のDNAナノ構造体を作ることができる。（b）作製したナノ構造体を高速原子間力顕微鏡（高速AFM）で観察した結果。

[図3]Thioflavin Tを用いたG-quadruplexの形成を確認した検討結果を示す図である。（a）Thioflavin Tの化学構造式。（b）2+2 100nt型および2+2 100nt mutA型テンプレートRNAの配列。赤文字：近接させるグアニン繰り返し配列。およびアデニン繰り返し配列。（c）staple核酸を導入した後の構造イメージ。グアニン繰り返し配列が近接することでG-quadruplexを構築する。（d）蛍光シグナルを測定した結果。

[図4]ストップアッセイ評価の概要を示す図である。(a) ストップアッセイの原理。RNA G-quadruplexは逆転写酵素の伸長反応を停止させる。従って逆転写酵素が止まった位置までにできたcDNAの塩基配列を解読することで、RNA G-quadruplexが構築されている位置を確認できる。(b) 2+2 100nt RNAを用いたストップアッセイの結果。inside loop2以外はRNA G-quadruplexの存在を示す顕著なピークを確認することができた。(c) グアニンの柱同士を繋ぐループ塩基の長さを変えた場合のストップアッセイの結果。(d) 1+3 100nt RNA型をストップアッセイで評価した結果。(d) 導入するstaple核酸をDNAからRNAに変えた結果。

[図5]in vitro translationアッセイの概要を示す図である。(a) 5' UTR領域に2+2 100nt RNA等様々なパターンの評価対象をFirefly Luciferaseの上流に配置し、Staple核酸によるタンパク質発現抑制効果を評価した結果。(b) 2+2 100nt RNAを対象にしたin vitro translationアッセイの結果。(c) 全てのパターンのmRNAに対してin vitro translationアッセイを行った結果。

[図6]天然配列を標的としたStaple核酸の評価実験の結果を示す図である。(a) 評価に用いたTPM3とMYD88の配列。(b) TPM3およびMYD88を対象としたストップアッセイの結果。Staple核酸の存在によりRNA G-quadruplexが構築されていることがわかる。(c) TPM3およびMYD88を標的としたin vitro translationアッセイの結果。いずれもStaple核酸の存在でタンパク質発現量が減少していることがわかる。(d) 細胞内におけるstaple核酸の機能評価を行うための評価対象のデザイン。IRESが存在することで5' 末端、およびIRESのニヶ所からリボソームが侵入し、タンパク質が合成される。(e) 細胞内タンパク質翻訳アッセイの結果。

[図7]Staple核酸を逆向きに連結したときの評価実験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、第一、第二、第三及び第四の4つのグアニン繰り返し配列を有するRNAに対し、前記グアニン繰り返し配列の近傍領域にハイブリダイズするオリゴマーを用いて前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構

造を形成させることにより、タンパク質発現を抑制する方法に関する。

[0010] mRNA上に存在する安定なグアニン四重鎖構造（G-quadruplex構造ともいう）は、リボソームのペプチド伸長反応を阻害することが知られている。任意のmRNA上に、人為的にG-quadruplex構造を誘起することが出来れば、疾病に関連するタンパク質の発現量を抑制することが可能となる。本発明は、DNA origami技術を応用し、配列選択的に標的mRNAを捉えて折りたたみ、標的mRNA上に安定なG-quadruplex構造を誘起することで、標的mRNA選択的にタンパク質の翻訳を抑制する新規核酸医薬の設計法を提供するものである。

[0011] 本発明において使用されるオリゴマーは、その一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、RNAの第一のグアニン繰り返し配列（第一G配列という）、第二のグアニン繰り返し配列（第二G配列という）、第三のグアニン繰り返し配列（第三G配列という）及び第四のグアニン繰り返し配列（第四G配列という）において、それぞれ、第一G配列と第二G配列、第二G配列と第三G配列、及び第三G配列と第四G配列の近傍領域の核酸にハイブリダイズするものである。このオリゴマーを、本発明では、「Staple核酸」ともいう。

[0012] 本発明の方法が細胞内で機能するには、核酸の配列認識能とG-quadruplex構造形成能を同時に満たす必要があり、これまでの核酸医薬を凌駕する標的選択性の実現できる。本発明の有用性は、モデル配列を利用した検証により、（１）グアニン繰り返し領域の長さや配列に関わらずStaple核酸を導入することでRNA G-quadruplexが構築されること、（２）誘起されたG-quadruplex構造が、逆転写酵素の伸長反応やリボソームのタンパク質翻訳反応を抑制することにより証明した。また、がん関連遺伝子であるTMP3とMYD88 mRNAの5' UTRに存在するグアニンクラスターを折りたたみ、タンパク質合成を阻害できることが、無細胞系発現システムおよび哺乳動物細胞を用いた発現評価により確認できた。

[0013] 本発明においては、タンパク質の翻訳抑制機構にRNA四重鎖構造であるRNA G-quadruplex構造に着目した（図1(a)）。RNA G-quadruplex構造は、3塩基

以上のグアニン連続配列が、7塩基未満の近接したスペーシングで4箇所存在する時に構築される安定なRNA高次構造である（図1(b)）⁵。このRNA G-quadruplex構造がmRNAの5' 非翻訳領域（5' UTR）に存在すると、リボソームのタンパク質合成反応を抑制する（図1(c)）⁶。

[0014] 近年、本発明者は7塩基以上のスペーシングで存在するグアニン連続配列が、RNA G-quadruplex構造を構築することを見出した⁷。この事実は、mRNAが形成する高次構造により、一次配列で離れた位置にあるグアニン連続配列が空間的に近接し、RNA G-quadruplex構造を形成していることを示すものである。この知見を基に、本発明者は、離れた位置に存在するグアニン連続配列を空間的に近接させ、標的とするmRNA上に人為的なRNA G-quadruplex構造を誘起させる本発明の方法を考案した。

[0015] ところで、7000塩基を超える一本鎖環状DNAを、設計された200本程度の30塩基強の短鎖DNA（Staple oligomer）と自己集合させることでナノ構造体を作る技術であるDNA origami法が知られている（図2）⁸。この技術のStaple oligomerは、一本鎖環状DNAの離れた位置に存在している配列を手繰り寄せ、コンパクトな構造体を形成する。この技術に習い、標的mRNA上のグアニン連続配列を近接させるStaple核酸を設計・導入すれば、標的mRNA上にG-quadruplex構造を誘起することが期待され、結果、タンパク質翻訳反応を抑制することが可能となる。そこで本発明では、人為的なRNA G-quadruplex構造の誘起に、DNAナノ構造体の作製法であるDNA origami法を応用することができる。

[0016] 前記の通り、グアニン繰り返し領域が4本近接すると、G-quadruplex構造を形成する（図1a）。本発明においては、RNA上に存在する4か所のグアニン繰り返し領域を近づけるため、所定のオリゴマーを用いる。このオリゴマーは、第一のグアニン繰り返し配列と第二のグアニン繰り返し配列、第二のグアニン繰り返し配列と第三のグアニン繰り返し配列、又は第三のグアニン繰り返し配列と第四のグアニン繰り返し配列とを近づけて全体として4か所のグアニン繰り返し配列が近接するように機能するオリゴマーであり、本明細書では「Staple核酸」という。

[0017] ここで、標的RNAとしては、例えばmRNA、TPM3、MYD8などが挙げられる。TPM3とは、筋収縮に関連する遺伝子であり、MYD8とは、Tollおよびインターロイキン（IL）1受容体シグナル伝達を媒介するアダプタータンパク質である。

標的となるRNAに含まれるグアニン繰り返し配列は、4か所に限らず、5か所以上含まれていてもよい。また、第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列は、4か所以上のグアニン繰り返し配列から任意に選択される4か所の配列を意味し、必ずしも、連続する4か所のグアニン繰り返し配列にG-quadruplex構造を形成させることを意味するものではない。例えば、あるRNAに6か所のグアニン繰り返し配列が存在すると仮定すると、5'側から順に第1、第2、第3及び第4番目のグアニン繰り返し配列によりG-quadruplex構造を形成させてもよく、第1、第2、第5及び第6番目のグアニン繰り返し配列によりG-quadruplex構造を形成させることもできる。要するに、G-quadruplex構造を形成してRNAのタンパク質発現が抑制される限り、4か所のグアニン繰り返し単位の位置は不問である。

ここで、本発明においてタンパク質発現の抑制とは、例えばmRNAからの逆転写反応の抑制、RNAからタンパク質への翻訳反応の抑制などが含まれる。

[0018] 図3(b)は、第一及び第二のグアニン繰り返し配列（図の左から1番目及び2番目の「●●●」印）、並びに第三及び第四のグアニン繰り返し配列（図の左から3番目及び4番目の「●●●」印）が互いに近接しており、第二のグアニン繰り返し配列と第三のグアニン繰り返し配列とが100ヌクレオチドの長さを有する態様を示す。図3bにおいて、左から1番目のグアニン繰り返し配列を第一G配列、左から2番目のグアニン繰り返し配列を第二G配列、左から3番目のグアニン繰り返し配列を第三G配列、左から4番目のグアニン繰り返し配列を第四G配列とすると、第二G配列と第三G配列との間が離れているため、この領域を折りたたんで第二G配列と第三G配列とを近づけるようにする。

[0019] そこで、Staple核酸は、その一端側（例えば3'側）の一部の領域の核酸が第二G配列のすぐ下流の領域の核酸とハイブリダイズし、他端側（例えば

5'側)の一部の領域の核酸が第三G配列のすぐ上流の領域の核酸とハイブリダイズするように設計する。この場合、前記一端側領域及び他端側領域の核酸は、折り返し方向(凸側)がG-quadruplex構造側を向くようにハイブリダイズする。Staple核酸がRNAとハイブリダイズする領域は、RNAの種類に応じて適宜設計することができる。例えば図3bに示すRNAに対してStaple核酸を設計する場合は、第二G配列の下流側の13~20塩基塩基の領域から、ハイブリダイズする領域として13~20塩基の領域を選択し、また、第三G配列の上流側の13~20塩基塩基の領域から、ハイブリダイズする領域として13~20塩基の領域を選択すればよい。他の領域に対するStaple核酸を設計する場合も同様である。

Staple核酸は、DNAであってもよく、RNAであってもよい。Staple核酸の長さは、26~40ヌクレオチド長である。Staple核酸がRNAにハイブリダイズする領域の長さは、前記一端側領域及び他端側領域の長さが同じであっても異なってもよく、限定されるものではない。Staple核酸は、市販の核酸合成装置を用いることにより容易に得ることができる。

[0020] このように設計されたStaple核酸を用いて、グアニン繰り返し配列を近接させた態様を図4に示す。図4bにおいて、「Inside loop 1」の態様は、Staple核酸の両端側の一部のがRNAにハイブリダイズするとともに、Staple核酸の折り返し(折り畳み)方向がグアニン四重鎖構造側を向いている。図4では、折り返し方向は理解しやすくするためにループ状で表示してあるが、本発明のStaple核酸は、RNAにハイブリダイズする一方の領域と他方の領域との境界を支点として折り返される。図4bにおいて、「Outside loop」の態様もInside loop 1と同様であり、Staple核酸の両側の一部の領域がRNAにハイブリダイズするとともに、折り返し方向(ループ状に表示してある部分の凸側(外周側))がG-quadruplex構造側を向いている。また本発明においては、Staple核酸は1本鎖である必要はなく、2本以上が結合又はハイブリダイズしてダイマー、トリマー等を形成することもできる。図4bにおいて、「Dimer」の態様は、2本のStaple核酸により構成されており、RNAにハイブリダイズしない

領域同士（１又は複数の塩基）がハイブリダイズして折り返し領域を形成するとともに（図では折り返し領域は複数の塩基で例示してある）、全体としてダイマーを形成している。このダイマー型Staple核酸においては、両側の一部の領域がRNAにハイブリダイズするとともに、折り返し部がG-quadruplex構造側を向いている。

[0021] 上記のとおり設計されたStaple核酸とRNAとの反応、すなわち、G-quadruplex構造の形成反応は、例えば、RNAを含む溶液中にStaple核酸を混合して、アニーリングすることにより行うことができる。あるいはRNAを含む溶液中にStaple核酸を単に混ぜるだけでもよい。あるいはShort hairpin expression vectorを導入し、細胞内からStaple核酸を発現させることを行うことができる。RNAとStaple核酸との反応時間は、例えば１分（試験管実験）～２日（細胞実験）であり、反応温度は例えば２４～５５℃である。G-quadruplex構造が形成されたことの確認は、例えば実施例に示されるin vitroトランスレーションアッセイのほか、チオフラビンTと反応させることによる蛍光シグナル測定法、ストップアッセイ法などにより行うことができる。

[0022] 本発明の方法により設計されたStaple核酸は、タンパク質発現抑制に使用されることから、タンパク質発現抑制キットに含めることができる。従って、本発明は、前記オリゴマー（Staple核酸）を含む、タンパク質発現抑制キットを提供する。本発明のキットには、前記オリゴマーのほか、緩衝液、PCR用試薬、in vitro translation用試薬、ルシフェラーゼ、使用説明書などを含めることができる。

[0023] 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 １

[0024] １．材料

（１）DNAオリゴヌクレオチド

DNAオリゴヌクレオチドはユーロフィンジェノミクス株式会社、Integrated

DNA Technologies株式会社、Thermo Fisher Scientific株式会社より購入した。すべてのサンプルはOPC精製または脱塩されており、RNA G-quadruplexの形成や存在位置の確認やin vitroにおけるタンパク質翻訳反応阻害効果を評価するために使用した。

[0025] 2. 方法

(1) 2+2_100nt RNA、2+2_100nt_Mut A RNAの準備とThioflavin Tを用いたRNA G-quadruplex形成の確認

下記ヌクレオチドを用いてアニールエクステンションを行った。

5' -TAATACGACTCACTATAGATTAGCATACGCTACTGCAGATGCGC-3' (配列番号1)

5' -GCTGAATAGCTTGCAAGTCATGGCATGCGCATCTGCAGTAGCGT-3' (配列番号2)

[0026] 伸長されたヌクレオチドを鋳型として、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物は、pMD19 vector (タカラバイオ.) にクローニングした。

フォワードprimer : 5' -TAATACGACTCACTA TAG-3' (配列番号3)

リバーズprimer : 5' - TCCAACATATGTATACCTGCTGAATAGCTTGCAAGTC-3' (配列番号4)

[0027] そして、上記で作製したplasmid DNAを鋳型とし、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行い、insert DNAを作製した。

フォワードprimer : 5' -CTATAGTGAGTCGTATTAAATCGTCGAACGGCAGG-3' (配列番号5)

リバーズprimer : 5' -CAGGTATA CATAGTTGGAAATCTCTGGAAGATCCG-3' (配列番号6)

[0028] また、下記配列を有するヌクレオチドを鋳型及びプライマーとして用いてPCR増幅を行い、linear vectorを作製した。

鋳型 :

5' -ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGTTTGCACG CCTGCCGTTGACGATTTAA
TACGACTCACTATAGATTAGCATACGCTACTGCAGTGGGTGGGTGTCGACCTAGATTAATGCAATTCGT
ACGAAGTTCATAGCATTTCCAGCACCCAATTGAAGCTTTGGGTGGGTGCATGCCATGACTTGCAAGCTA

TTCAGCAGGTATACATAGTTGGAAATCTCTGGAAGATCCGCGCGTACCGAGTTCTAATTCAGTGGCCGT
CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCA-3' (配列番号 7)

フォワードprimer : 5' -TAATACGACTCACTATAGAA-3' (配列番号 8)

リバーズprimer : 5' -TCCAATATGTATAC CTG-3' (配列番号 9)

[0029] そして、HiFiAssembly(NEB)を用いて作製したinsert DNA とlinear vector
を繋げた (pMD19-2+2_63nt)。さらに、pUC19 vector (タカラバイオ.) を鋳
型にし、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行い、insert DNAを作製した。

フォワードprimer : 5' -CCTAGATTAATGCAATTC GTGTGAAGATCCTTTTTGATAATCT
CATGAC-3' (配列番号 10)

リバーズprimer : 5' -TCAATTGGGTGCT GGAAATGAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAG-3' (配列番号 11)

[0030] また、pMD19-2+2_63ntを鋳型にし、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行
い、linear vectorを作製した。

フォワードprimer : 5' -CATTTCCA GCACCCAATTGAAGCTT-3' (配列番号 1
2)

リバーズprimer : 5' -ACGAATTGCATTAATCTAG GTCGAC-3' (配列番号 1 3
)

[0031] そして、HiFiAssembly(NEB)を用いて作製したinset DNAとlinear vectorを
繋げた (pMD19-2+2_100nt)。

[0032] 作製したpMD19-2+2_100ntを鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRに
より2+2_100ntを増幅し、pIRES vector (タカラバイオ.) のEcoR Iサイトに
クローニングした。

フォワードprimer : 5' - CTAGCCTCGAGAATTGATTAGCAT ACGTACTGC-3' (配
列番号 14)

リバーズprimer : 5' - CCATGGTGGCGAATTCTGAATAGCTTGCAAGTC AT-3' (配
列番号 15)

[0033] GGGからAAAへの変異体である2+2_100nt_Mut Aでは鋳型DNA、フォワードpr
imer、リバーズprimerに、以下の配列のものを用いてそれぞれアニールエク

ステンションを行い、得られた産物をPCRによって繋いだ (2+2_100nt_Mut A)。

(i) MutA-1

鋳型 : 5' -AGGGATTAGCATACGCTACTGCAGTAAAT AAATGTCGACCTAG-3' (配列番号 16)

フォワードprimer : 5' -CGGTACCCGGGGATCTAATACGACTCACTATAGGGAT TAGC-3' (配列番号 17)

リバーズprimer : 5' -CACGAATTGCATTAATCTAGGTCGAC-3' (配列番号 18)

(ii) MutA-2

鋳型 : pMD19-2+2_100nt

フォワードprimer : 5' -GTCGACCTAGATTAATGCAATTCGTG-3' (配列番号 19)

リバーズprimer : 5' -AAGCTTCAATTGGGTGCTGGAA ATG-3' (配列番号 20)

(iii) MutA-3

鋳型 : 5' -ATTGAAGCTTTAAATAAATGCATGCCATGACTTGCAAG-3' (配列番号 21)

フォワードprimer : 5' -CATTTCCAGCACCCAATTGAAGCTT-3' (配列番号 22)

リバーズprimer : 5' -CGACTCTAGAGGATCCTGAATAGCTT GCAAGTCAT-3' (配列番号 23)

[0034] これをpUC19 vector (タカラバイオ.) のBamH Iサイトにクローニングした (pUC19-2+2_100nt_Mut A)。すべてのPCR産物は1%アガロースゲル電気泳動後、切り出し精製を行った。作製したpIRES-2+2_100ntおよびpUC19-2+2_100nt_Mut Aを鋳型とし、以下のいずれかのプライマーを用いてPCR増幅によりRNA転写に用いるlinear dsDNAsを準備した。

フォワードprimer : 5' -TAATACGACTCACTATAGG GCTAGCCTCGAG-3' (配列番号 24)

リバーズprimer : 5' -CCATGGTGGCGAATTCTGAATAGCTTGCAAGTCAT-3' (配列

番号 25)

または

フォワードprimer: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号 26)

リバーズprimer: 5' -CGACTCTAGAGGATCCTGAATAG CTTGCAAGTCAT-3' (配列番号 27)

[0035] さらに、このdsDNAsを鋳型としてRiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いてdsDNAsからRNAsを転写した。残ったNTPsを除去するためにRNAsはNAP-5カラムを用いて精製した。作製したRNA (400 nM)、KCl (40 mM)、20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)、Staple (500 nM) またはmilliQ (control) となるように測定溶液を調製し、90℃で2分間インキュベートし、毎分1℃の速さで20℃まで温度を下げた。その後、200 nM ThTとなるようにThTを添加して室温で30分間インキュベートし、FP-8500 spectrofluorometer (JASCO) を用いて440 nmの光で励起させ、487 nmの蛍光を測定した。測定波長は450 nm~700 nmの範囲で測定を行った。

[0036] (2) 人工配列 (2+2_100nt) および天然遺伝子 (TPM3、MYD88) の5' UTR配列を用いたStop Assay

human genomic DNA (Novagen) を鋳型にし、以下のプライマーを用いてTPM3-5' UTRとMYD88-5' UTRのPCR増幅を行った。

フォワードprimer: 5' -GTCACATCC GGGCGGGTTGGTGAGT-3' (配列番号 28)

リバーズprimer: 5' -GGTGCCACCCAGCTACTGCTCGCG-3' (配列番号 29)

または

フォワードprimer: 5' -AGATTCCTACTTCTTACGCCCCCA-3' (配列番号 30)

リバーズprimer: 5' -TGTCTGCCAGCGCTTCTCTTTCTC-3' (配列番号 31)

[0037] 得られたPCR産物を鋳型にして以下のプライマーを用いてさらにPCR増幅を行い、得られたPCR産物をpMD19 vector (タカラバイオ.) にクローニングした (pMD19-TPM3、pMD19-MYD88)。

フォワードprimer: 5' -TAATACGACTCACTATAGGTCACATCCGG GCGGGTTGGTGAGT

-3' (配列番号32)

リバープライマー: 5' -TCCAACATGTATACCTGGGTGCCCACCCAGCTACT GCTCGCG-3'

' (配列番号33)

または

フォワードプライマー: 5' -TAATACGACTCACTATAGAGATTCCTACTTCTTACGCCCC CA

-3' (配列番号34)

リバープライマー: 5' -TCCAACATGTATACCTGTGTCTGCCAGCGCTTCCTCTTTCTC-3'

(配列番号35)

[0038] pMD19-5' UTR (2+2_100nt、TPM3、MYD88) を鋳型として、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行い、RNA転写に用いるlinear dsDNAsを準備した。

フォワードプライマー: 5' -ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAG-3' (配列番号36)

リバープライマー: 5' -TGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG-3' (配列番号37)

[0039] さらに、このdsDNAsを鋳型とし、HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB) を用いてdsDNAsからRNAsを転写した。転写したRNAsはAfter Tri-Reagent RNA Clean-Up Kit (チヨダサイエンス) を用いて精製した。

RNA (0.3 μ M) と5' -FAM-labeled 3' -DNA primer (0.1 μ M)、Staples (1 μ M) を含む溶液を80°Cで3分間インキュベートし、30分かけて30°Cまで温度を下げた。この溶液にReverTra Ace reverse transcriptase (TOYOBO)、MgCl₂、dNTPsを加えて30分間逆転写反応を行い、得られた逆転写産物をABI3500キャピラリーDNAシーケンサー (ライフテクノロジーズジャパン) によりフラグメント解析を行った。

[0040] (3) 人工配列 (2+2_100nt) および天然遺伝子 (TPM3、MYD88) の5' UTR配列を用いたin vitro translation

psiCHECK-2 vector (タカラバイオ) を鋳型とし、以下のプライマーを用いてFirefly luciferase (F.L.) のPCR増幅を行い、得られたPCR産物をpIRES vector (タカラバイオ) のEcoR Iサイトにクローニングした (pIRES-F.L.

）。

フォワードprimer : 5' -CTAGCCTCGAGAATT CGCCACCATGGCCGATGCTAAGAAC-3'
' (配列番号38)

リバーズprimer : 5' -CTCGACGCGTGAATTTT ACACGGCGATCTTGCC-3' (配列
番号39)

[0041] フォワードprimerはクローニング後にF.L.の上流にEcoR Iサイトが復活するように設計した。5' UTR (2+2_100nt、TPM3、MYD88) はpMD19-5' UTR (2+2_100nt、TPM3、MYD88) を鋳型として、以下のプライマーを用いてPCR増幅を行い、得られたPCR産物をpIRES-F.L. vectorのEcoR Iサイトにクローニングした (pIRES-5' UTR-F.L. (5' UTR : 2+2_100nt、TPM3、MYD88)) 。

フォワードprimer : 5' -CTAGCCTCGAGAATTGAT TAGCATACGCTACTGC-3' (配
列番号40)

リバーズprimer : 5' -CCATGGTGGCGAATTCTGAATAGCTTGCAAGTC AT-3' (配
列番号41)

または

フォワードprimer :

5' -CTAGCCTCGAGAATTTACATCCGGGCGGGTTG-3' (配列番号42) 若しくは

5' -CTAGCCT CGAGAATTAGATTCTACTTCTTACGCC-3' (配列番号43)

リバーズprimer : 5' -CCATGGTGGCGAATTGTTTTCCC AGTCACGACG-3' (配列
番号44)

[0042] すべてのPCR産物は1%アガロースゲル電気泳動後、切り出し精製を行った。pIRES-5' UTR-F.L. を鋳型とし、以下のプライマーを用いたPCR増幅によりRNA転写に用いるlinear dsDNAsを準備した。

フォワードprimer :

5' -TAATACGACTCACTATAGGGCTAGCCT CGAG-3' (配列番号45)

5' -TAATACGACTCACTATAGGGTCACATCCGGG-3' (配列番号46) または

5' -TAATACGACTCACTATAGGGAGATTCCTAC-3' (配列番号47)

リバーズprimer : 5' -CTCGACGCGTGAAT TTTACACGGCGATCTTGCC-3' (配列番号 48)

[0043] さらに、このdsDNAsを鋳型としてRiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) を用いてdsDNAsからRNAsを転写した。残ったNTPsを除去するためにRNAsはNAP-5カラム (GE Healthcare) を用いて精製した。得られた5' UTR-F.L. (5' UTR : 2+2_100nt or TPM3 or MYD88) は、Staple (100 nM) またmilliQ (control) を含む無細胞タンパク質合成反応溶液 (RTS 100 Wheat Germ Kit、biotechrabbit) 12.5 μ lのmRNA (1 μ g) として用いた。この反応溶液を24℃で1時間インキュベートした後、Luciferase Assay kit (Promega) とPOWERSCAN H1 microplate reader (BioTek) を用いてルシフェラーゼ活性を評価した。

[0044] (4) 天然遺伝子 (TPM3、MYD88) の5' UTR配列を用いたin celltranslation nLuc vector (タカラバイオ.) またはpsiCHECK-2 vector (タカラバイオ.) を鋳型とし、以下のプライマーを用いてNanoLuc luciferase (nLuc) およびrenilla luciferase (renilla) のPCR増幅を行い、得られたPCR産物をそれぞれpIRES vector (タカラバイオ.) のEcoR I、Not Iサイトにクローニングした (pIRES-nLuc-renilla) 。

フォワードprimer : 5' -CTAGCCTCGAGAATTCGCCACCATGGTCTTCACACTCGAAG-3' (配列番号 49)

リバーズprimer : 5' -CTAGCCTCGAGAATTCGCCACCATGGTCTTCACACTCGAAG-3' (配列番号 50)

または

フォワードprimer : 5' -TCGACCCGGGCGGCCATGGCTTCCAAGGTGTACG-3' (配列番号 51)

リバーズprimer : 5' -TAAAGGGAAGCGGCCTTACTGCTCGTTCTTCAGC-3' (配列番号 52)

[0045] nLucのPCRに用いたフォワードprimerはクローニング後にnLucの上流にEcoR Iサイトが復活するように設計した。すべてのPCR産物は1%アガロースゲル電

気泳動後、切り出し精製を行った。さらに、pMD19-TPM3またはpMD19-MYD88を鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRにより増幅し、得られたPCR産物をpIRES-nLuc-renillaのEcoR Iサイトにクローニングした（pIRES-5' UTR-nLuc-renilla（5' UTR：TPM3、MYD88））。

フォワードprimer：5' -CTAGCCTCGAGAATTTACATCCGGGCGGGTTG-3'（配列番号53）または5' -CTAGCC TCGAGAATTAGATTCTACTTCTTACGCC-3'（配列番号54）

リバーズprimer：5' -CCATGGTGCGGAATT GTTTTCCAGTCACGACG-3'（配列番号55）

[0046] また、以下のプライマーの組合せのいずれかを用いてそれぞれアニールエクステンションを行い、Staples（TPM3_30nt、26ntおよびMYD88_30nt、26nt）を作製した。

(i)プライマーSTM1

フォワードprimer：5' -GATCCCCTACCGGAACCTACCA GCTACTGCTCGCGCTTTTTTA-3'（配列番号56）

リバーズprimer：5' -AGCTTAAAAAAGCGCGAGCAGTAGCTGGT GAGTTCCGGTAGGG-3'（配列番号57）

[0047] (ii)プライマーSTM2

フォワードprimer：5' -GATCCCCCGGAACCTACCGAGCTACTGCTCGCG TTTTTA-3'（配列番号58）

リバーズprimer：5' -AGCTTAAAAACGCGAGCAGTAGCTGGTGAGTTCCGGGGG-3'（配列番号59）

[0048] (iii)プライマーSTM3

フォワードprimer：5' -GATCCCCTCTATCTCCTGCGGCACAATCTGGAGCCCCTTTTTA-3'（配列番号60）

リバーズprimer：5' -AGCT TAAAAAGGGGCTCCAGATTGTGCCGCAGGAGATAGAGGG-3'（配列番号61）

[0049] (iv)プライマーSTM4

フォワードprimer : 5' -GATCCCCTATCTCCTGCGGCACAATCTGGAGCCTTTTTA-3'

(配列番号 6 2)

リバーズprimer : 5' -AGCTTAAAAAGG CTCCAGATTGTGCCGCAGGAGATAGGG-3'

(配列番号 6 3)

[0050] 作製したStaple核酸の塩基配列を以下に示す。

ThT実験に用いたStaple (40nt) 2+2_100nt :

insideloop TTGCATTAATCTAGGTCGACAAGCTTCAATTGGGTGCTGG (配列番号 6 4)

Stop assayに用いたStaple 2+2_100nt :

insideloop 40nt TTGCATTAATCTAGGTCGACAAGCTTCAATTGGGTGCTGG (配列番号 6 5)

2+2_100nt :

insideloop_逆連結 40nt AAGCTTCAATTGGGTGCTGGTTGCATTAATCTAGGTCGAC (配列番号 6 6)

TPM3 : DNA Staple insideloop 40nt GAAATACCGGAACTCACCAAAGCTACTGCTCGCG CTCCGG (配列番号 6 7)

MYD88 : DNA Staple outsideloop 40nt TTCCTCTTCTCCTGCGGCATACAATCTGGAG CCCCAGAGC (配列番号 6 8)

2+2_100nt : RNA Staple insideloop 30nt UUAUUCUAGGUCGACAAGCUUCAUUGG U (配列番号 6 9)

2+2_100nt : RNA Staple insideloop 26nt AAUCUAGGUCGACAAGCUUCAUUGG (配列番号 7 0)

[0051] in vitro translationに用いたStaple (40nt)

2+2_100nt : insideloop TTGCATTAATCTAGGTCGACAAGCTTCAATTGGGTGCTGG (配列番号 7 1)

2+2_100nt : insideloop_逆連結AAGCTTCAATTGGGTGCTGGTTGCATTAATCTAGGTCGAC (配列番号 7 2)

TPM3 : insideloop TGAAATACCGGAACTCACCAAGCTACTGCTCGCGCTCCGGT (配列番号 7 3)

MYD88 : outsideloop CTTCTCTTTCTCTCTGCGGCACAATCTGGAGCCCCGAGCA (配列番号 7 4)

[0052] In cell translationに用いたRNA Staple TPM3 :

RNA Staple insideloop 30nt UACCGGAACUCACCAGCUACUGCUCGCGCU (配列番号 7 5)

TPM3 : RNA Staple insideloop 26nt CCGGAACUCACCAGCUACUGCUCGCG (配列番号 7 6)

MUD88 : RNA Staple UAU outsideloop 30nt UCUAUCUCCUGCGGCACAAUCUGGAGCC CC (配列番号 7 7)

MYD88 : RNA Staple UAU outsideloop 26nt UAUCUCCUGCGGCACAAUCUGGAGCC (配列番号 7 8)

[0053] これをpSuper neo. A (oligoengine) のBgl II-Hind IIIサイト間にクローニングした (pSuper neo. A-Staple (Staple : TPM3_30nt、26ntおよびMYD88_30nt、26nt))。HEK293T細胞は培地A (100 units/mlペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、10 % (v/v) fetal bovine serumを含むDulbecco's modified Eagle medium) を用いて37℃、CO₂濃度5%のインキュベーター内で培養した。96-well plateに1 well当たり 2×10^4 cellsのHEK293T細胞をまいた。

[0054] 24 時間後、Transfection試薬 (FuGENE、Promega) を用いてpSuper neo. A -Staple (Staple : TPM3_30nt、26ntおよびMYD88_30nt、26nt) またはmilliQ (control) をHEK293T細胞に導入しインキュベートした。48時間後、同様にしてpIRES-5' UTR-nLuc-renilla (5' UTR : TPM3 or MYD88) をHEK293T細胞に導入しインキュベートした。

6時間後、細胞をPBSで洗浄しPassive Lysis Bufferを用いて細胞溶解液を回収した。この細胞溶解液を4℃、3000 rpmで1分間遠心した後、その上澄み液とLuciferase Assay kit (Promega) 、POWERSCAN H1 microplate reader (BioTek) を用いてルシフェラーゼ活性を評価した。

[0055] 結果 :

Staple核酸によるG-quadruplex構造の構築は、G-quadruplex構造に結合すると蛍光シグナルを発することが知られているThioflavin Tを指示薬として用いて評価した（図 3(a)）⁹。この実験では、100塩基のループ配列の両末端に近接したグアニン連続配列が2つ存在するモデルDNA配列（2+2 100nt型）を設計・使用した。また、コントロールとして、グアニン連続配列のグアニンをアデニンに変異させたDNA（2+2 100nt mutA型）を用いた（図3(b)(c)）。

これらのDNA配列に対してStaple核酸を加えた結果、2+2 100nt型のDNAはStaple核酸の存在下でのみThioflavin Tの蛍光シグナルが増大した。一方で、2+2 100nt mutA型ではStaple核酸の有無にかかわらず、顕著な蛍光シグナル増大を確認することはできなかった。この結果は、Staple核酸が2+2 100nt型上にG-quadruplex構造を誘起したことを示すものである。

[0056] G-quadruplex構造は、カリウムイオンの依存的に構築される¹⁰。2+2 100nt型モデル配列とStaple核酸で形成された構造体が、G-quadruplex構造であることを確認するため、KCl またはMgCl₂を含むトリス緩衝液中におけるThioflavin Tの蛍光シグナル強度の比較検討を行った。

その結果、KClを含むトリス緩衝液中においてのみ強い蛍光シグナルが観察された（図 3(d)）。これらの結果は、2+2 100nt型モデルDNAがStaple核酸により折りたたまれ、G-quadruplex構造を形成したことを示すものである。

[0057] 次に、Staple核酸によるRNA G-quadruplex構造形成能を、逆転写酵素によるcDNA合成により評価した（ストップアッセイ）。Staple核酸非存在下において、設計した鋳型RNAからは、逆転写反応により完全長cDNAを得ることができる。しかし、Staple核酸を加えるとRNA G-quadruplex構造が形成され、逆転写酵素のDNA伸長反応は停止し、不完全長のcDNAが合成される。得られたcDNAサンプルをシーケンシングで解析することで、RNA G-quadruplex構造形成部での逆転写反応の停止が確認できる（図4(a)）¹¹。

[0058] 本実施例においては、100塩基のループ配列の両末端に近接したグアニン連続配列が2つ存在するモデルRNA配列（2+2 100nt RNA型）と、4種の短鎖DNA

(inside loop 1, outside loop, dimer, inside loop 2)を設計・利用した。Staple核酸として機能するinside loop 1, outside loop, dimerの3種類を加えた時、RNA G-quadruplex構造の構築を示すピークが観察された。一方で、Staple核酸として機能しないと予想していたinside loop 2はRNA G-quadruplex構造を構築せず、完全長のcDNAのみが得られた（図4(b)）。

[0059] この結果は、RNAが鋳型である場合でも、DNA origami技術によりRNAが設計通り折りたたまれ、RNA G-quadruplex構造を誘起できることを意味する。また、ループ長が63nt、140ntという2種類のモデルRNA配列（2+2 63nt RNA型, 2+2 140nt RNA型）を設計して、inside loop 1を用いた同検討を行ったところ、いずれのRNAに対してもRNA G-quadruplex構築を示すピークが確認された（図4(c)）。

[0060] また、片方の末端にはグアニン繰り返し配列が1回、もう片方の末端には3回としたグアニン連続配列のパターンの異なるモデルRNA配列（1+3 100nt RNA型）においてもStaple核酸の導入によりRNA G-quadruplex構造の構築を示すピークが観察された（図4(d)）。この結果は、多様なRNA種をStaple核酸により折りたたみ、RNA G-quadruplex構造を形成できることを示しており、本発明の方法が任意のmRNA標的に対して利用可能であることを示す。Staple核酸は、DNAだけでなくRNAを利用した場合でも、同様の効果を示すことから（図4(e)）、相補鎖形成能を持つ人工修飾核酸の利用も可能である。

[0061] RNA G-quadruplex構造は逆転写反応のみならず、タンパク質翻訳反応も抑制することが知られている⁶。Staple核酸を用いて標的mRNA上に人為的なRNA G-quadruplexを構築することができれば、標的遺伝子のタンパク質発現を抑制できるため、医薬品応用の可能性も広がると考えられる。そこで本実施例では、2+2 100nt RNA型5' -UTR領域としてその下流にFireflyルシフェラーゼ遺伝子が導入されているmRNA（2+2 100nt RNA型_Firefly）を作製し、無細胞タンパク質翻訳システムを用いてstaple核酸の有無によるタンパク質合成量を定量的に評価した（図5(a)）。

[0062] その結果、inside loop1が存在する場合には、下流に存在するFirefly Luc

iferaseタンパク質の発現量が低下した。一方、inside loop 2存在下ではタンパク質発現量が低下していないことから、単にstaple核酸が標的mRNAに結合してアンチセンス効果を発揮しているのではなく、RNA G-quadruplexを構築することで遺伝子発現抑制効果を示していることが示される（図5(b)）。

[0063] また、ストップアッセイに用いた2+2 63nt RNA型_Firefly、2+2 140nt RNA型_Firefly、1+3 63nt RNA型_Firefly、1+3 100nt RNA型_Firefly、1+3 140nt RNA型_Fireflyに関しても同様の検討を行ったところ、いずれの場合においてもRNA G-quadruplex構造を形成できるinside loop 1を加えた場合のみ、Fireflyルシフェラーゼの発現量が減少することを示せた（図5(c)）。この結果は、Staple核酸によるRNA G-quadruplex構造の人為的誘起と誘起されたRNA G-quadruplex構造によるタンパク質翻訳反応の抑制に対する一般性を示すものである。

[0064] 次に、Staple核酸によるRNA G-quadruplex構想形成および遺伝子発現抑制効果を天然遺伝子配列であるTPM3とMYD88において評価した（図6(a)）。まず、TPM3とMYD88の5' -UTRにおいてRNA G-quadruplex構造の誘起が可能なStaple核酸を設計した。TPM3に関してはグアニン連続配列を繋ぐループ塩基は103塩基でStaple核酸はinside loop1型として設計した。MYD88についてはグアニン連続配列を繋ぐループ塩基が28塩基と短いため、outside loop型で設計した。

[0065] ストップアッセイによる評価で、どちらの5' UTRにおいても設計したStaple核酸でRNA G-quadruplex構造が誘起されることを確認した（図6(b)）。次に、TPM3とMYD88の5' -UTRをFireflyルシフェラーゼ遺伝子に配置したモデルmRNAを作製し、Staple核酸のタンパク質翻訳抑制能を評価した。

その結果、無細胞タンパク質翻訳システムを用いたレポーターアッセイで、どちらの5' UTRを配置したモデルmRNAからのタンパク質翻訳もStaple核酸存在下で約60%抑制された（図6(c)）。この結果は、Staple核酸が天然の標的mRNAからのタンパク質発現を抑制することを強く示す。

[0066] 最後に、哺乳動物細胞内におけるStaple核酸のタンパク質翻訳阻害活性を

評価した。細胞実験を行う上で、本発明者は、NanoLucとRenillaルシフェラーゼが発現する遺伝子を用意した。二つの遺伝子は一本のmRNAに導入されており、NanoLucは5' -capから翻訳されるのに対し、RenillaルシフェラーゼはInternal Ribosomal Entry Site (IRES) から翻訳される。このシステムを用いることでtransfection効率やmRNAの安定性の影響をRenillaルシフェラーゼ遺伝子の発現量で規格化し、5' -capからの翻訳反応を定量的に比較できる（図6(d)）¹²。

[0067] 本実施例においてはNanoLucの上流にTPM3及びMYD88の5' -UTR領域を配置したレポータ遺伝子を導入し、HEK293細胞内でのStaple核酸の効果を評価した。細胞実験では、Short hairpin expression vector (pSuper) により発現されるRNA Staple核酸を利用し、Staple核酸によるタンパク質翻訳反応への影響を評価した。その結果、Staple核酸を導入するとタンパク質翻訳量の減少が確認され、細胞内においてもStaple核酸が機能することが示された（図6(e)）。

[0068] 核酸医薬開発は明らかに停滞している。その原因は細胞内導入が難しいこと、またオフ・ターゲット効果を避けることができないことなどが考えられる。細胞内導入に関する問題点は近年におけるドラッグ・デリバリーシステムの研究開発の貢献により大きな改善が認められる一方、オフ・ターゲット効果の改善は以前困難である。この原因はアンチセンス核酸やsiRNAはいずれも標的mRNAに結合するために相補核酸を利用していることである。相補核酸の認識能を向上させるような修飾核酸を導入すると、siRNAはたちまちRISC複合体形成能が低下し、効果が大きく減少する。このように一つ問題を解決しようと試みると新しい問題が生じるというジレンマに挟まれる。

[0069] このような背景から、本発明者は、今までにない新しいタンパク質翻訳反応抑制システムを提案した。このシステムは意図せぬ位置にStaple核酸が結合しても近接させるグアニン繰り返し配列が存在せず、タンパク質抑制効果は発現しない。また導入するStaple核酸はDNAのみではなくRNAでも同様の効果を得ることができることも明らかにしている。この事実は、Staple核酸の

多様性を示すものである。

[0070] 通常、天然核酸配列は細胞内に導入することで分解されてしまうため、核酸医薬を目指す上では化学合成による修飾核酸を使う必須である。本発明の方法は、siRNAのようなタンパク質複合体を形成する必要があることから、単純に細胞内安定性を向上させることのみに専念すればよく、原理上、修飾核酸によるタンパク質発現抑制効果の減少は考えにくい。様々な修飾を施すことが可能である本発明の方法は、核酸医薬開発のために極めて有用である。

実施例 2

[0071] Materials & Methods (Staple_TPM3_26nt_逆連結)

(1) DNAオリゴヌクレオチド

DNAオリゴヌクレオチドはユーロフィンジェノミクス株式会社、Integrated DNA Technologies株式会社、Thermo Fisher Scientific株式会社より購入した。すべてのサンプルはOPC精製または脱塩されており、RNA G-quadruplexの形成や存在位置の確認やin vitroにおけるタンパク質翻訳反応阻害効果を評価するために使用した。

[0072] (2) Method

天然遺伝子 (TPM3、MYD88) の5' UTR配列を用いたin cell translation (Staple_TPM3_26nt_逆連結)

[0073] 1. pIRES-TPM3_5' UTR_nLuc_renillaの作製

nLuc vector (タカラバイオ.) またはpsiCHECK-2 vector (タカラバイオ.) を鋳型とし、以下のプライマー1のセット又はプライマー2のセットを用いてNanoLuc luciferase (nLuc) およびrenilla luciferase (renilla) のPCR増幅を行い、得られたPCR産物をそれぞれpIRES vector (タカラバイオ.) のEcoR I、Not Iサイトにクローニングした (pIRES-nLuc-renilla) 。

[0074] (i) プライマー1

フォワードプライマー1：

fw. primer [5' -CTAGCCTCGAGAATTCGCCACCATGGTCTTCAGACTCGAAG-3'] (配列番号79)

リバースプライマー 1 :

rv. primer [5' -CTCGACGCGTGAATTTTACGCCAGAATGCGTTCG-3'] (配列番号 80)

(ii) プライマー 2

フォワードプライマー 2 :

fw. primer [5' -TCGACCCGGGCGGCCATGGCTTCCAAGGTGTACG-3'] (配列番号 81)

リバースプライマー :

rv. primer [5' -TAAAGGGAA GCGGCCTTACTGCTCGTTCTTCAGC-3'] (配列番号 82)

[0075] nLucのPCRに用いたfw. primerはクローニング後にnLucの上流にEcoR Iサイトが復活するように設計した。すべてのPCR産物は1%アガロースゲル電気泳動後、切り出し精製を行った。

human genomic DNA (Novagen) を鋳型にし、以下のプライマーを用いてTPM 3-5' UTRの PCR増幅を行った。

fw. primer [5' -GTCACATCC GGGCGGGTTGGTGAGT-3'] (配列番号 83)

rv. primer [5' -GGTGCCACCCAGCTACTGCTCGCG-3'] (配列番号 84)

得られたPCR産物を鋳型にして以下のプライマーを用いてさらにPCR増幅を行い、得られたPCR産物をpMD19 vector (タカラバイオ.) にクローニングした (pMD19-TPM3)。

fw. primer [5' -TAATACGACTCACTATAGGTCACATCCGG GCGGGTTGGTGAGT-3'] (配列番号 85)

rv. primer [5' -TCCAATATGTATACCTGGGTGCCACCCAGCTACTGCTCGCG-3'] (配列番号 86)

[0076] さらに、pMD19-TPM3を鋳型として、以下のプライマーを用いてPCRにより増幅し、得られたPCR産物をpIRES-nLuc-renillaのEcoR Iサイトにクローニングした (pIRES-TPM3_5' UTR-nLuc-renilla)。

fw. Primer : [5' -CTAGCCTCGAGAATTTACATCCGGGCGGGTTG-3'] (配列番号

87))

rv. primer: [5' -CCATGGTGGCGAATT GTTTTCCCAGTCACGACG-3'] (配列番号88)

[0077] 2. pSuper neo. A-Staple (Staple: TPM3_26nt_逆連結)の作製

また、以下のプライマーを用いてアニーリングを行い、Staple insert (TPM3_26nt_逆連結)を作製した。これをpSuper neo. A (oligoengine) のBgl I I-Hind IIIサイトにクローニングした (pSuper neo. A-Staple (Staple: TPM3_26nt_逆連結))。

fw. primer [5' - GATCCCCGCTACTGCTCGCGCCGGAAGTCACCAT TTTTA -3'] (配列番号89)

rv. primer [5' - AGCTTAAAAATGGTGAGTTCCGGCGCGAGCAGTAGCGGG -3'] (配列番号90)

[0078] 3. in cell translation

HEK293T細胞は培地A (100 units/mlペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10 % (v/v) fetal bovine serumを含むDulbecco's modified Eagle medium) を用いて37℃、CO₂濃度5%のインキュベーター内で培養した。96-well plateに1 well当たり2×10⁴ cellsのHEK293T細胞をまいた。24 時間後、Transfection試薬 (FuGENE、Promega) を用いてpSuper neo. A-Staple (Staple: TPM3_26nt_逆連結) またはmilliQ (control) をHEK293T細胞に導入しインキュベートした。

[0079] 48時間後、同様にしてpIRES-TPM3_5' UTR-nLuc-renillaをHEK293T細胞に導入しインキュベートした。6時間後、細胞をPBSで洗浄しPassive Lysis Bufferを用いて細胞溶解液を回収した。この細胞溶解液を4℃、3000 rpmで1分間遠心した後、その上澄み液とLuciferase Assay kit (Promega)、POWERSCAN・H1 microplate reader (BioTek) を用いてルシフェラーゼ活性を評価した。

結果を図7に示す。TPM3をStaple核酸として使用 (結合) しなかった場合は、発現の抑制は観察されなかった (図7)。

[0080] 参考文献

- (1) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* 1998, 391, 806.
- (2) Ambros, V. *Nature* 2004, 431, 350.
- (3) Jackson, A. L.; Linsley, P. S. *Nature reviews. Drug discovery* 2010, 9, 57.
- (4) Jackson, A. L.; Burchard, J.; Leake, D.; Reynolds, A.; Schelter, J.; Guo, J.; Johnson, J. M.; Lim, L.; Karpilow, J.; Nichols, K.; Marshall, W.; Khvorova, A.; Linsley, P. S. *Rna* 2006, 12, 1197.
- (5) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. *Nucleic acids research* 2007, 35, 406.
- (6) Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. *Nature chemical biology* 2007, 3, 218.
- (7) Katsuda, Y.; Sato, S.; Asano, L.; Morimura, Y.; Furuta, T.; Sugiyama, H.; Hagihara, M.; Uesugi, M. *Journal of the American Chemical Society* 2016, 138, 9037.
- (8) Rothmund, P. W. *Nature* 2006, 440, 297.
- (9) Fujita, H.; Kataoka, Y.; Tobita, S.; Kuwahara, M.; Sugimoto, N. *Analytical chemistry* 2016, 88, 7137.
- (10) Bugaut, A.; Murat, P.; Balasubramanian, S. *Journal of the American Chemical Society* 2012, 134, 19953.
- (11) Hagihara, M.; Yoneda, K.; Yabuuchi, H.; Okuno, Y.; Nakatani, K. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2010, 20, 2350.
- (12) Jang, S. K.; Davies, M. V.; Kaufman, R. J.; Wimmer, E. *Journal of virology* 1989, 63, 1651.

配列表フリーテキスト

[0081] 配列番号 1 ～ 68、71 － 74、79 － 90 : 合成DNA

配列番号 69、70、75 － 78 : 合成RNA

請求の範囲

- [請求項1] 第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列（それぞれ、第一G配列、第二G配列、第三G配列、第四G配列という）を含む標的RNAに対し、前記グアニン繰り返し配列の近傍にハイブリダイズするオリゴマーを用い、当該オリゴマーの折り返しにより前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構造を形成させることによりタンパク質発現を抑制する方法であって、
- 前記オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一G配列と第二G配列との間であってそれぞれ第一G配列の近傍及び第二G配列の近傍、第二G配列と第三G配列との間であってそれぞれ第二G配列の近傍及び第三G配列の近傍、又は第三G配列と第四G配列との間であってそれぞれ第三G配列の近傍及び第四G配列の近傍にハイブリダイズする、前記方法。
- [請求項2] 前記オリゴマーは、その折り返しの方向がグアニン四重鎖構造側を向いてハイブリダイズするように設計される、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 標的RNAがmRNA、TPM3又はMYD8である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] オリゴマーがDNA又はRNAである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] オリゴマーがダイマーである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] タンパク質発現が、逆転写反応又はタンパク質翻訳反応である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] 第一、第二、第三及び第四のグアニン繰り返し配列（それぞれ、第一G配列、第二G配列、第三G配列、第四G配列という）を含む標的RNAに対し、前記グアニン繰り返し配列を近づけてグアニン四重鎖構

造を形成させるオリゴマーであって、

前記オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一 G 配列と第二 G 配列との間であってそれぞれ第一 G 配列の近傍及び第二 G 配列の近傍、第二 G 配列と第三 G 配列との間であってそれぞれ第二 G 配列の近傍及び第三 G 配列の近傍、又は第三 G 配列と第四 G 配列との間であってそれぞれ第三 G 配列の近傍及び第四 G 配列の近傍にハイブリダイズして、その折り返しにより前記グアニン繰り返し配列を近づけるものである、

前記オリゴマー。

[請求項8] 前記折り返しの方向がグアニン四重鎖構造側を向いてハイブリダイズするように設計される、請求項 7 に記載のオリゴマー。

[請求項9] DNA又はRNAである、請求項 7 又は 8 に記載のオリゴマー。

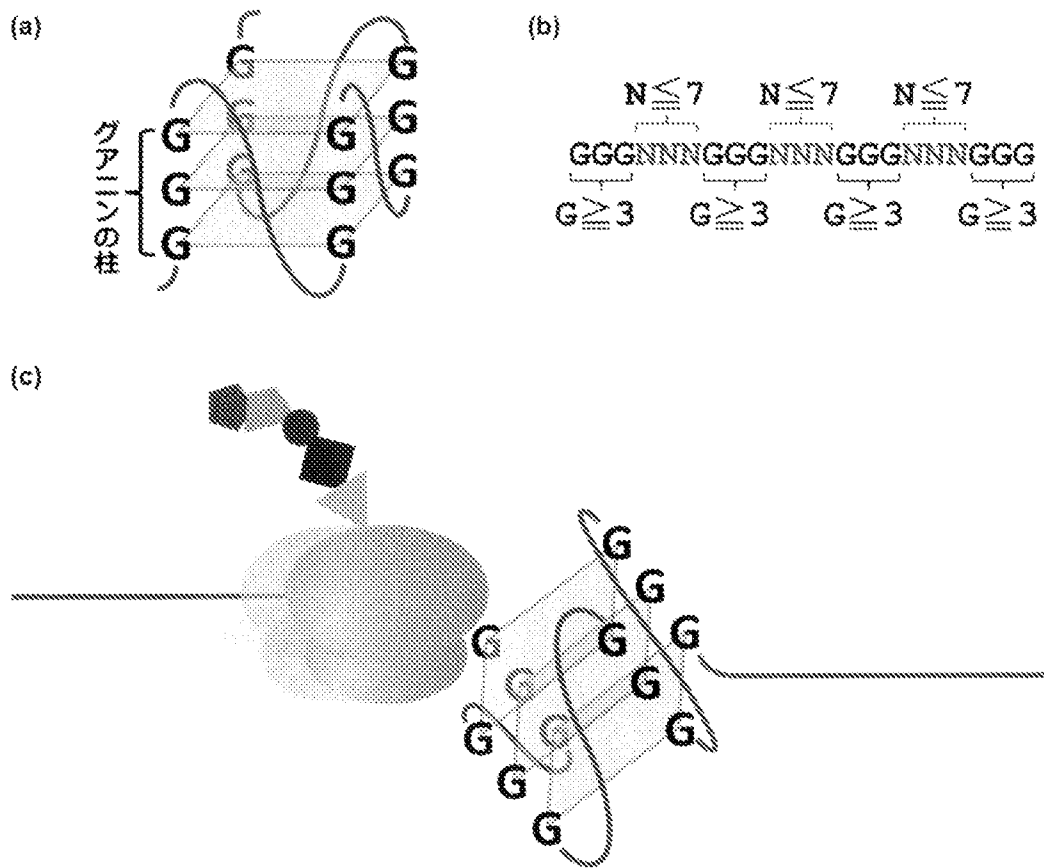
[請求項10] ダイマーである、請求項 7 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー。

[請求項11] 請求項 7 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のオリゴマーの製造方法であって、

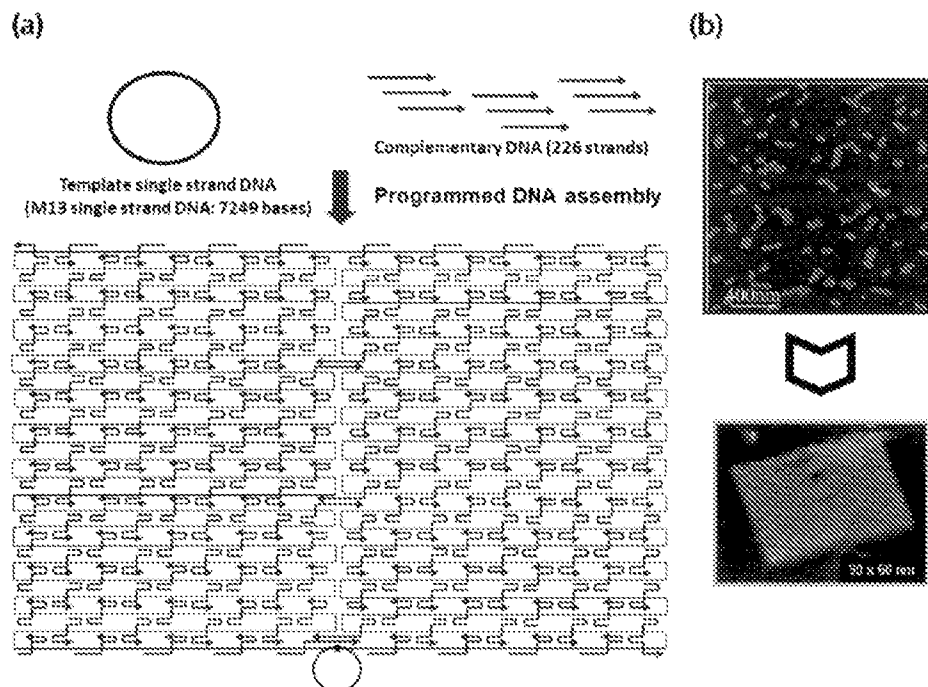
オリゴマーの一端側の一部の領域（一端側領域）の核酸及び他端側の一部の領域（他端側領域）の核酸が、第一 G 配列と第二 G 配列との間であってそれぞれ第一 G 配列の近傍及び第二 G 配列の近傍、第二 G 配列と第三 G 配列との間であってそれぞれ第二 G 配列の近傍及び第三 G 配列の近傍、又は第三 G 配列と第四 G 配列との間であってそれぞれ第三 G 配列の近傍及び第四 G 配列の近傍にハイブリダイズするように設計し合成することを特徴とする前記方法。

[請求項12] 請求項 7 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のオリゴマー、又は請求項 11 に記載の方法により製造されたオリゴマーを含む、タンパク質発現抑制キット。

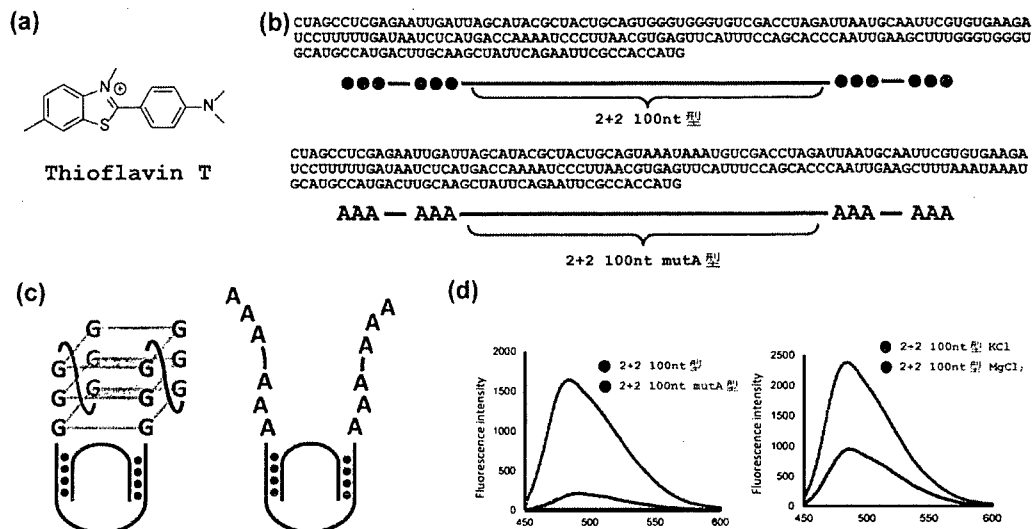
[図1]



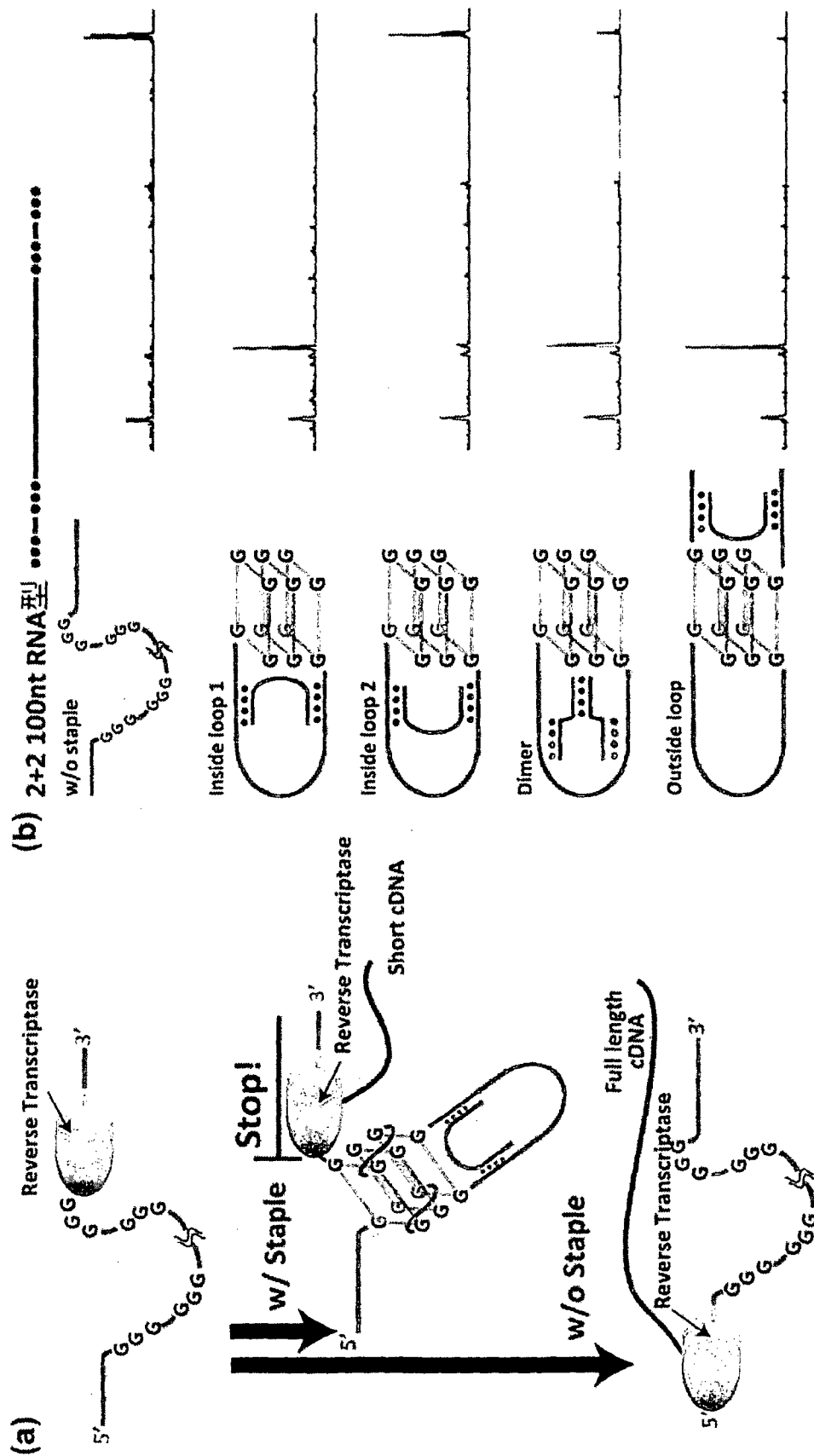
[図2]



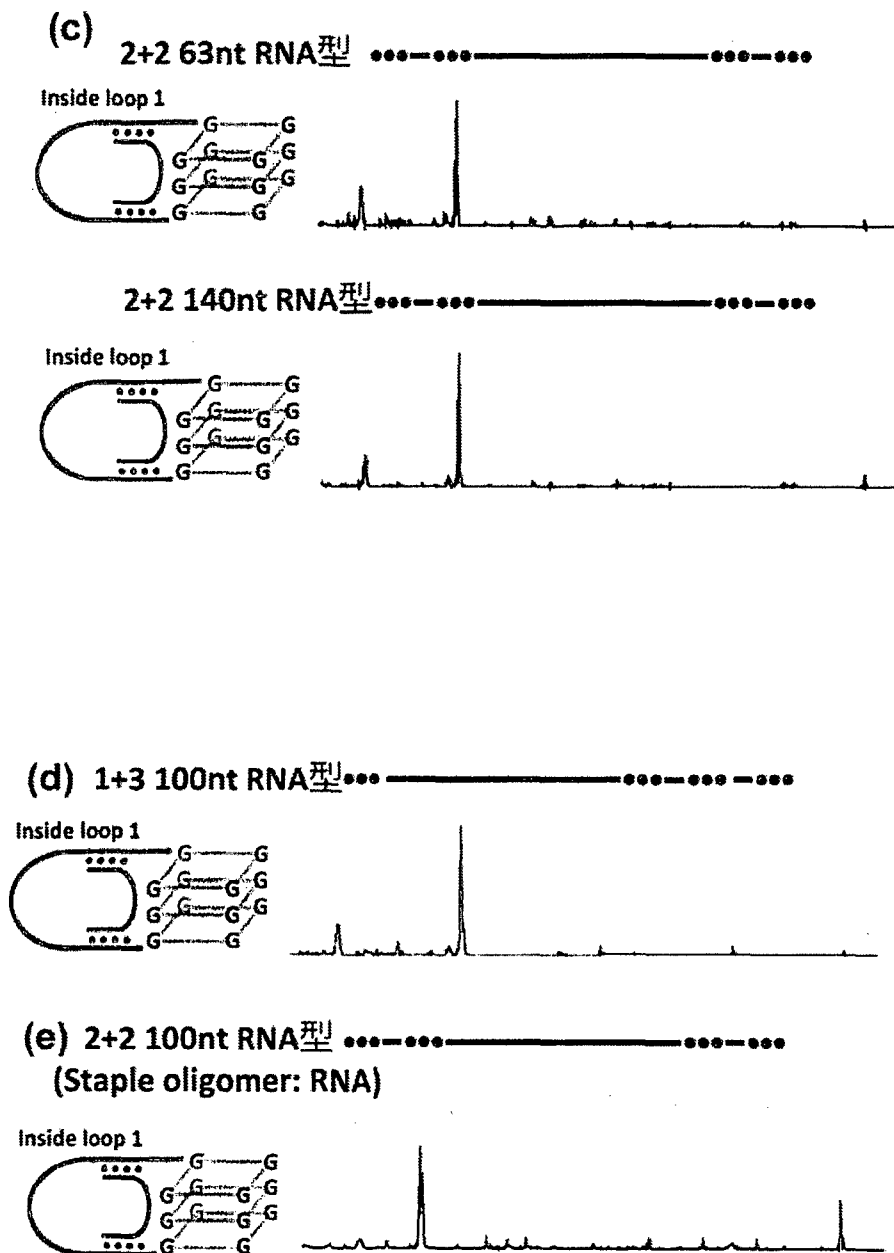
[図3]



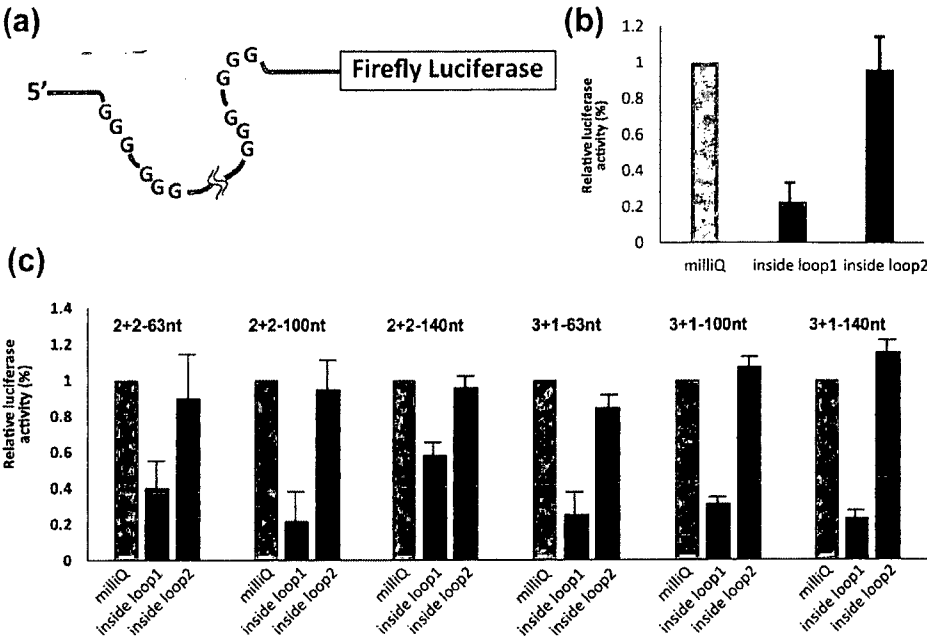
[図 4]



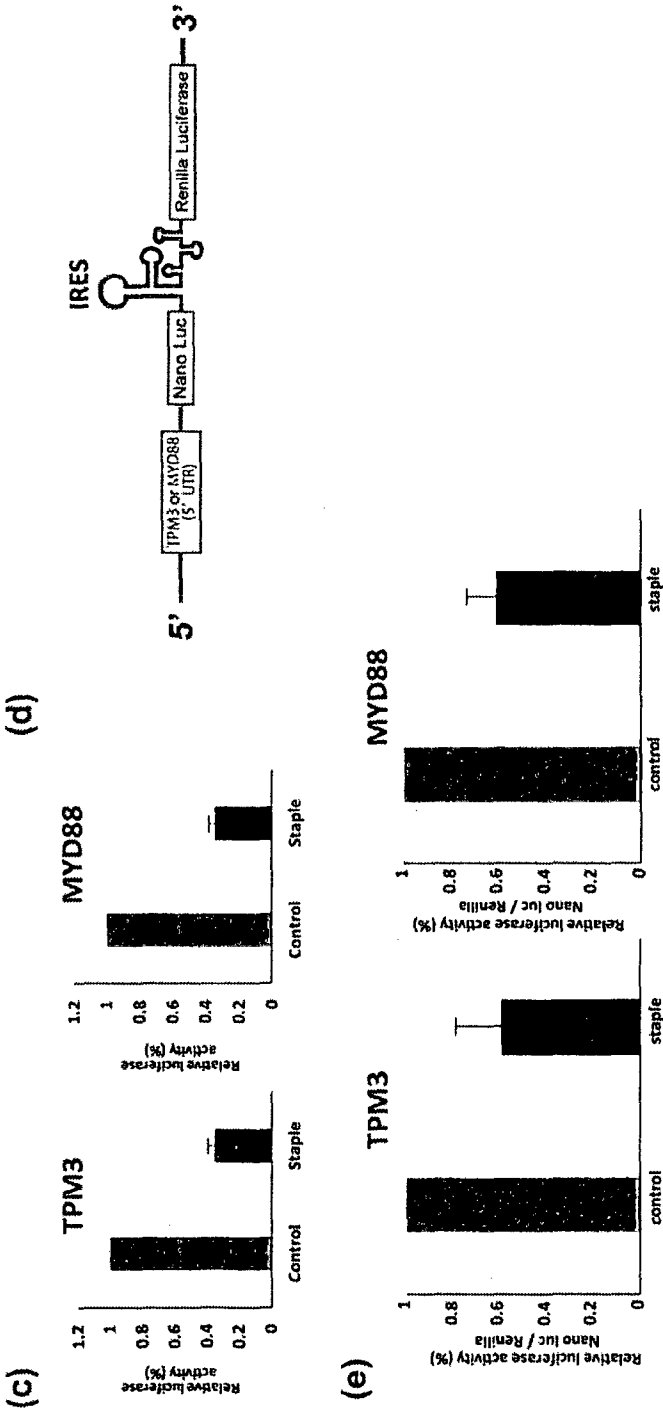
[図 4]の続き



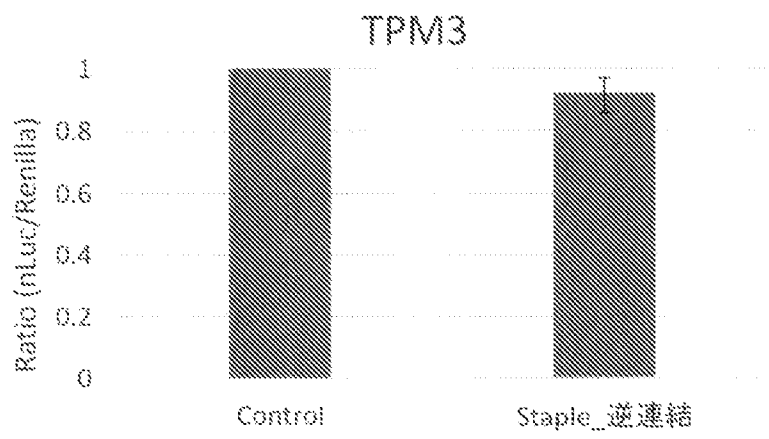
[図5]



[図 6]の続き



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i
FI: C12N15/113; A61K31/7088; A61P43/00 111; C12N15/113 Z ZNA

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)

A61K; A61P; C12N15/00-15/90

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN); DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0046932 A1 (NANYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY) 18.02.2016 (2016-02-18), claims, fig. 2, 3	1-12
A	HAGIWARA, M. et al, "Antisense-Induced Guanine Quadruplexes Inhibit Reverse Transcription by HIV-1 Reverse Transcriptase", J. AM. CHEM. SOC., 2010, vol. 132, pp. 11171-11178, in particular, abstract, fig. 1	1-12
A	RAJENDRAN, A. et al, "HIV-1 Nucleocapsid Proteins as Molecular Chaperones for Tetramolecular Antiparallel G-Quadruplex Formation", J. AM. CHEM. SOC., 2013, vol. 135, pp. 18575-18585, in particular, abstract	1-12



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

"I" 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
06 January 2020 (06.01.2020)

Date of mailing of the international search report
21 January 2020 (21.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/042049

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GE, B. et al, "A Robust Electronic Switch Made of Immobilized Duplex/Quadruplex DNA", Angew. Chem. Int. Ed., 2010, vol. 49, pp. 9965-9967, in particular, p. 9965, right column, fig. 1	1-12
A	遠藤政幸 他, DNA オリガミを使った 1 分子解析, 生物物理, 2013, 53(3), pp. 153-157, in particular, page 155, 3. Application of DNA structural change to single-molecule observation, (ENDO, Masayuki et al., "Single-molecule Analysis Using DNA Origami Nanostructures", Seibutsu Butsuri)	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2019/042049

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
---	------------------	---------------	------------------

US 2016/0046932 A1	18 Feb. 2016		
--------------------	--------------	--	--

WO 2014/098773 A1			
claims, fig. 2, 3			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/7088(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i FI: C12N15/113; A61K31/7088; A61P43/00 111; C12N15/113 Z ZNA										
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（IPC）） A61K; A61P; C12N15/00-15/90										
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2020年									
日本国実用新案登録公報	1996-2020年									
日本国登録実用新案公報	1994-2020年									
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); DDBJ/GeneSeq										
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								
A	US 2016/0046932 A1 (NANYANG TECHNOLOGICAL UNIVERSITY) 18.02.2016 (2016-02-18) Claims, Figure2,3	1-12								
A	HAGIWARA, M. et al, Antisense-Induced Guanine Quadruplexes Inhibit Reverse Transcription by HIV-1 Reverse Transcriptase, J. AM. CHEM. SOC., 2010, Vol.132, pp.11171-11178 特にAbstract, Figure 1	1-12								
A	RAJENDRAN, A. et al, HIV-1 Nucleocapsid Proteins as Molecular Chaperones for Tetramolecular Antiparallel G-Quadruplex Formation, J. AM. CHEM. SOC., 2013, Vol.135, pp.18575-18585 特にAbstract	1-12								
A	GE, B. et al, A Robust Electronic Switch Made of Immobilized Duplex/Quadruplex DNA, Angew. Chem. Int. Ed., 2010, Vol.49, pp.9965-9967 特にp.9965 right column, Figure 1	1-12								
A	遠藤政幸 他, DNAオリガミを使った1分子解析, 生物物理, 2013, 53(3), pp.153-157 特に第155頁3. DNA構造変化の1分子観察への応用	1-12								
☐ 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抵触するものではなく、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 06.01.2020		国際調査報告の発送日 21.01.2020								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 松本 淳 4B 4675 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

PCT/JP2019/042049