

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 2 月 24 日 (24.02.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/017145 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/00, 15/09, A61K 31/711

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/011624

(22) 国際出願日: 2004 年 8 月 12 日 (12.08.2004)

(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2003-293129 2003 年 8 月 13 日 (13.08.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム (JAPAN BIOLOGICAL INFORMATICS CONSORTIUM) [JP/JP]; 〒1040032 東京都中央区八丁堀二丁目 2 番 9 号 グランデビルディング Tokyo (JP). ビッツ株式会社 (BITS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒4110801 静岡県三島市谷田並木 5 3 7-1 Shizuoka (JP). 独立行政法人産業技術総合

研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

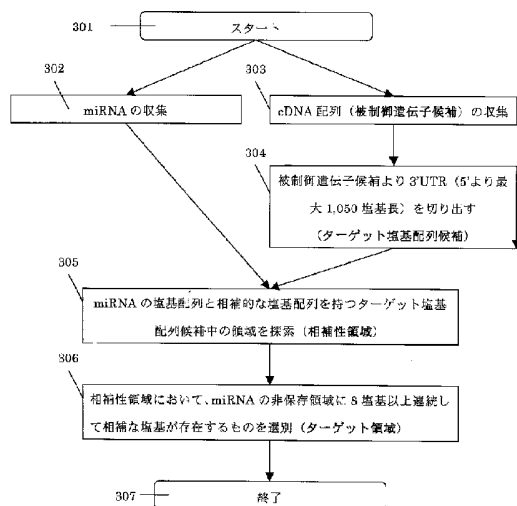
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): バレロ ロベルト A (BARRERO Roberto Antonio) [BO/JP]; 〒1040032 東京都中央区八丁堀 2-2 6-9 グランデビルディング 社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム内 Tokyo (JP). 田村 卓郎 (TAMURA, Takuro) [JP/JP]; 〒4110801 静岡県三島市谷田並木 5 3 7-1 ビッツ株式会社内 Shizuoka (JP). 今西 規 (IMANISHI, Tadashi) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海 2-4 1-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 五條堀 孝 (GOJOBORI, Takashi) [JP/JP]; 〒1350064 東京都江東区青海 2-4 1-6 独立行政法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 多比良 和誠 (TAIRA, Kazunari) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING OR PRESUMING GENE UNDER REGULATION REGULATED BY FUNCTIONAL RNA AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: 機能性 RNA が制御する被制御遺伝子の同定・予測方法及びその利用方法



301...START
 302...COLLECTION OF MIRNA
 303...COLLECTION OF CDNA SEQUENCES (CANDIDATES FOR GENE UNDER REGULATION)
 304...CUTTING OUT 3'UTR (1,050 BASES IN LONGEST FROM 5') FROM CANDIDATE FOR GENE UNDER REGULATION (CANDIDATE FOR TARGET BASE SEQUENCE)
 305...SEARCHING FOR REGION HAVING BASE SEQUENCE COMPLEMENTARY TO MIRNA BASE SEQUENCE IN CANDIDATE FOR TARGET BASE SEQUENCE (COMPLEMENTARY REGION)
 306...SELECTION OF BASE HAVING 8 OR MORE CONSECUTIVE BASES COMPLEMENTARY TO UNCONSERVED REGION OF MIRNA IN COMPLEMENTARY REGION (TARGET REGION)
 307...END

(57) Abstract: To control gene expression with the use of miRNAs via the phenomenon of gene expression regulation by miRNA, which is a gene regulation system occurring in nature, it is intended to presume or identify miRNA(s) and one or more genes under the regulation targeted thereby. Base sequences of miRNA molecules are divided into a region having a base sequence common to a plural number of miRNAs (a conserved region) and another region with uncommon base sequences (region other than the conserved region; unconserved region). Then ambiguities (searching accuracy levels) of different standards are set in these regions, that is, ambiguity of a relatively mild standard is set in the conserved region while ambiguity of a relatively strict standard is set in the unconserved region. Using the base sequences for searching thus obtained, a gene having a base sequence complementary to a functional RNA molecule (namely, a candidate for the gene under the regulation) is searched for followed by presumption or identification.

(57) 要約: miRNAによる遺伝子発現制御は自然界に存在する遺伝子制御の仕組みであるが、この現象を利用してmiRNAを用いて遺伝子の発現を制御するために、miRNAとそれらのターゲットとなる1つまたは複数の被制御遺伝子を予測又は同定すること。miRNA分子の塩基配列を、複数のmiRNA間で共通性のある塩基配列を有する領域(保存領域)と共通でない塩基配列を有する領域(保存領域以外の領域)(非保存領域)とに分別し、該保存領域では比較的穏やかな基準で、及び非保存領域では比較的厳密な基準で、各々別々の基準で設定した曖昧さ(探索精度水準値)を与え、探索用塩基配列とし、機能性RNA分子に相補である塩基配列を有する遺伝子(被制御遺伝子候補)を探索することにより、予測又は同定する。



〒3058562 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 4 独立
行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 川崎 広
明 (KAWASAKI, Hiroaki) [JP/JP]; 〒3058562 茨城県つ
くば市東 1-1-1 中央第 4 独立行政法人産業技術
総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町
M T ビル 1 9 階 平木国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

機能性RNAが制御する被制御遺伝子の同定・予測方法及びその利用方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子制御の分野に関連する。より詳細には、本発明は、核酸分子を用いて遺伝子発現制御を行うための方法に関連する。

背景技術

[0002] 核酸分子が遺伝子発現の制御を行う方法としては、動物ではRNAi、植物ではPTGSと呼ばれるプロセスによって生成されるsiRNAと呼ばれる短い2本鎖のRNAによる方法が知られている(非特許文献1 Hutvagner and Zamore 2002 Curr. Opin. Gen. Dev. 12:225-232)。RNAiとPTGSは、siRNA配列と高い相補性を持つmRNAを選択的に破壊することで、遺伝子発現を阻害する。この方法は、遺伝子発現研究の分野において、人為的に二本鎖RNAを細胞に導入することによって目的遺伝子の発現を抑制することに利用されている。近年、このsiRNAと同様に、遺伝子発現の制御に関わる短い生体RNA分子として、miRNAと呼ばれる1本鎖の短いRNAが注目されている(非特許文献2 Lagos-Quintana et al. 2001 Science 294: 858-862)。2001年10月に、ほぼ同時に3つのグループが、ショウジョウバエ、線虫、ヒトで、合わせてほぼ100種類の21-22塩基の小さなRNAファミリーが存在することを報告した。それらの小さいRNAは、発生の時期に特異的と考えられ、MicroRNA(miRNA)と名づけられた。miRNAに特徴的であるのは、前駆体RNAと考えられる配列の2次構造を予測すると、すべてdsRNA(2重鎖RNA)領域を含むステムループ構造shRNA(short hairpin RNA)をとることである。miRNAは、おそらくdsRNAに誘導されるさまざまな遺伝子の発現を防ぐために、塩基対のミスマッチを含むバジル構造を持った数十から数百の塩基の長い前駆体RNAとして転写され、Dicerによってプロセッシングされと考えられている(非特許文献3 RNAi実験プロトコールp.22)。

[0003] miRNAは、ヒトを含む多くの生物種において、数百種類が報告されている。miRNAは、5'側の塩基配列に共通の構造が多いことが知られている(非特許文献4 Eric

C.Lai Nature Genetics 30, 363-364 (2002)). また、siRNAが、相補性の高い標的 mRNAを特異的に切断することによる遺伝子発現阻害であるのに対し、miRNAは、3' UTRに相補性領域のあるmRNAと作用し、その翻訳を抑制すると考えられている。

非特許文献1: Hutvagner and Zamore 2002 Curr. Opin. Gen. Dev. 12:225-232

非特許文献2: Lagos-Quintana et al. 2001 Science 294: 858-862

非特許文献3: 「RNAi実験プロトコール」実験医学別冊 p.22 (2003)

非特許文献4: Eric C.Lai Nature Genetics 30, 363-364 (2002)

発明の開示

[0004] RNAi及びPTGSの生体における本来の役割は、生態防御システムとして機能し、細菌感染によって混入してくる外来RNAを破壊することが主であると考えられている。すなわち、これらを用いた遺伝子発現制御は、主に人工的な制御点を対象とした制御となる。

[0005] 一方、miRNAは、対象となるmRNAと相互作用することにより遺伝子の発現を制御していると考えられている。miRNAによるmRNAの発現制御は自然界に存在する遺伝子制御の仕組みであり、miRNAとそれらのターゲットとなる1つまたは複数の被制御遺伝子を予測又は同定することができれば、この仕組みにより、該被制御遺伝子を対象として、生体における遺伝子発現制御を意図的に操作することが可能となる。

[0006] さらに、miRNA分子及び被制御遺伝子の情報を基に実験的手法を適用することにより、生体における遺伝子の役割の解明や、疾病のための処置手法の開発、また、疾病のための処置そのものが可能となる。

[0007] 本発明においては、miRNAとそれらのターゲットとなる1つまたは複数の被制御遺伝子を予測又は同定する方法として、ヒト又はそれ以外の動植物細胞において存在することが確認されているmiRNA分子を対象として、miRNAの塩基配列の特徴を調査し、得られた特徴を考慮してmiRNAのターゲットとなるmRNA分子を予測した。

[0008] 予測したmiRNAとターゲットmRNA分子の組み合わせは実験によって確認し、その機能と有用性を実証した。

[0009] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2003-293129号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] 本件発明は、遺伝子発現を制御することができる機能性RNA分子、例えば、miRNA等に対して、当該機能性RNA分子がターゲットとして制御する遺伝子(mRNA)を予測又は同定する方法を提供する。
- [0011] 更に、本件発明は、あるmiRNAがターゲットとするmRNAを同定することにより、そのmiRNAを用いる当該mRNAの発現を制御する方法、及びmRNAの発現を制御するための、miRNAを有効成分として含む発現制御剤、並びに該発現制御剤を含有する医薬を提供する。
- [0012] 更に本件発明には、当該miRNAに対し分解作用を有するsiRNAを調製し、細胞中で、当該miRNAにより翻訳阻害されている被制御遺伝子を、翻訳阻害から解放し、翻訳させることも含まれる。
- [0013] 本件発明における機能性RNA分子としては、16から25塩基長のRNA分子であって、遺伝子発現制御活性を持つものが含まれる。具体的には、機能性RNA分子としては、miRNAが含まれる。
- [0014] 本件発明における機能性RNA分子は、ヒト、線虫、ショウジョウバエ、等いずれの生物でも、天然に存在するmiRNAを用いることができる。
- [0015] [miRNAが制御する対象遺伝子の同定]
以下に機能性RNA分子が、miRNAの場合について以下に具体的に説明する。
- [0016] 他の機能性RNA分子についても同様に行うことができる。
- [0017] 本件発明のmiRNAが制御する遺伝子(被制御遺伝子)の予測又は同定方法は、次の第1ステップ及び第2ステップを含んでいる。
- [0018] 第1ステップは、miRNA分子の塩基配列を、複数のmiRNA間で共通性のある領域を有する領域(保存領域)と共通でない塩基配列を有する領域(保存領域以外の領域)(非保存領域)とに分別するステップである。
- [0019] 第2ステップとして、該保存領域では比較的穏やかな基準で、及び非保存領域では比較的厳密な基準で、各々別々の基準で設定した曖昧さ(探索精度水準値)を与え探索用塩基配列とし、探査用塩基配列(機能性RNA分子)に相補である塩基配列を有する遺伝子(被制御遺伝子候補)を探索するステップ(工程)である。具体的には

、「miRNA配列全体に相補な領域」の探索を、保存領域と非保存領域に異なる相補性の強さを要求して行うことができる。

[0020] なお、第2ステップとしては、保存領域と非保存領域を合わせた全長機能性RNA分子配列について比較的穏やかな基準で、非保存領域では厳密な基準で、各々別々の基準で設定した曖昧さ(探索精度水準値)を与え探索用塩基配列として、機能性RNA分子に相補である塩基配列を有する遺伝子(被制御遺伝子候補)を探索するステップ(工程)とすることもできる。具体的には、(1)探索用塩基配列として全長機能RNA分子を用いて、全長機能RNA分子配列について比較的穏やかな基準で相補的である塩基配列を有する遺伝子を探索し、次に(2)当該機能性RNA分子の非保存領域を探索用塩基配列とし、比較的厳密な基準で相補的な配列を有する遺伝子(被制御遺伝子候補)を探索するステップが挙げられる。

[0021] そして、第2ステップで探索精度水準値以上の被制御遺伝子候補が見出されれば、これを、機能性RNA分子が制御する遺伝子(被制御遺伝子)と予測又は同定する。

[0022] 本件発明において用いるmiRNAの配列は、各種データベースに既に収集されている任意のmiRNAの配列を用いることができる。

[0023] 上記第1ステップとしては、種々のmiRNAの間での比較から、5'末端から6〜8塩基長の領域にいくつかのmiRNA間でモチーフ配列に相補である配列(共通性を有する配列)が存在することが見出されたことを利用して分別する。モチーフ配列の例を図4及び図5に掲げた。このようなモチーフ配列としては、例えば、UAUCACAGが挙げられる。

[0024] そこで、miRNAの5'末端から6〜8塩基領域、を「保存領域」、保存領域に隣接する7〜9塩基以降を「非保存領域」と分別する。好適には、miRNAの5'末端から8塩基領域を「保存領域」、保存領域に隣接する5'末端から9塩基以降を「非保存領域」と分別する。

[0025] なお、miRNAの5'末端から第1番目の塩基はモチーフと相違する場合も見られることから、少なくとも5'末端から第2番目の塩基から5〜7塩基領域を保存領域としても良い。

[0026] あるmiRNAが制御の標的(ターゲット)とする遺伝子、つまり被制御遺伝子の候補に

については、既に、多数の遺伝子の配列(cDNA)がデータベースに保存されていることから、DDBJ、EBI等任意のデータベースに保存されているcDNA配列を用いることができる。特に好適には、NCBI(米国National Center for Biotechnology Information、以下NCBIと略すことあり)のデータベースに保存されているcDNA配列を利用することができる。

- [0027] 具体的には、任意のデータベースから、3'UTRが含まれるcDNAを抽出する。そして、抽出されたcDNAについて、それぞれ、3'UTRの開始位置、つまりmRNA上の蛋白質コード領域の終了直後から、たとえば、3500塩基から500塩基の範囲内で、具体的には、3000塩基、好適には、1500塩基、更に好適には、1000塩基を検討対象の配列とすることができる。
- [0028] 第2ステップとして次のようなステップを採用することもできる。
- [0029] まず、miRNAと検討対象配列(ターゲット塩基配列候補)とを比較参照し、一定の水準(探索精度水準の内、機能性RNA分子の全長についての比較的穏やかな基準)を満たす配列を探索する。例えば、miRNA配列と一定値以上の相補性がある部分を有するターゲット塩基配列候補を相補性領域としてまず一次選抜する。一定値以上の相補性としては、相補性50〜90%、好適には60%〜75%の間で選択される適切な値以上の相補性、具体的には、50%以上、55%以上、80%以上、又は90%以上、好適には、60%以上、65%以上、70%以上、又は75%以上の相補性を採用できる。更に好適には、miRNAの塩基配列に対して3分の2以上の塩基が相補的である領域を有するターゲット塩基配列を相補性領域として1次選抜する。なお、ここで、3分の2以上の塩基が相補的であるとは、miRNAの塩基数の3分の2以上が相補的であることを意味し、例えば、miRNAが22塩基からなる場合は、15塩基以上が相補的であることを意味する。機能性RNA分子の全長についての比較的穏やかな基準とは、このような選択基準を採用することができる。
- [0030] 次にこの1次選抜されたターゲット塩基配列候補(相補性領域)の中から、更に、miRNAの非保存性領域中の連続する8塩基に対し、対応するターゲット塩基配列候補中連続した8塩基が、相補的な配列である、ターゲット塩基配列候補をターゲット塩基配列として選抜する。この選抜基準を、非保存領域における探索精度水準とす

ることができる。このようにして選抜されたターゲット塩基配列が抽出された遺伝子を、当該miRNAが制御対象とする遺伝子(被制御遺伝子)であると予測又は同定する。

- [0031] なお、第2ステップの他の態様としては、例えば、保存領域、非保存領域でミスマッチ率を、非保存領域ではミスマッチが少ないように変える、例えば、許容されるミスマッチ率を保存領域に対して、非保存領域では、半分以下、好適には、4分の1以下とし、両者のミスマッチ率を満たす塩基配列を有する遺伝子を当該miRNAが制御対象とする遺伝子(被制御遺伝子)であると予測又は同定する方法を採用することもできる。

- [0032] [miRNAが被制御遺伝子を制御していることの確認]

本発明の方法の予測又は同定は、更に、例えば、上記の第2ステップで特定された被制御遺伝子をmiRNAが制御していることを確認するステップを包含しても良い。miRNAが被制御遺伝子を制御していることを確認するステップは、実際にmiRNAを試料細胞中に導入して、予測又は同定された被制御遺伝子の発現が影響されるか否かを、例えば、ノーザンブローディング、ウェスタンブローディング等のmRNAの存在又はタンパク質の発現を検出する手段によることができる。

- [0033] 被制御遺伝子の発現への影響は、被制御遺伝子候補又はその相補鎖の断片、通常当該被制御遺伝子候補又はその相補鎖を他遺伝子から区別できる連続して15塩基以上、好適には約20から30塩基のプローブとなる配列を多数配置したDNAチップを用いて、miRNAを導入した細胞から採取されたmRNA又はcDNAライブラリーを対象に、発現確認することができる。このようなDNAチップ(マイクロアレイ)には、光リソグラフィ法によるDNAチップ、DNA試料をドット固着させる方法など、周知の方法で調製できる。

- [0034] [miRNAの使用方法]

[標的遺伝子の発現抑制剤]

miRNAにより発現が制御される標的遺伝子が、同定されれば、当該miRNAを用いてその標的遺伝子の発現を制御することができ、miRNAは、当該標的遺伝子の発現抑制剤として用いることができる。

- [0035] 例えば、miRNAは、そのまま細胞に導入するほか、miRNAを生成する発現ベクター

を調製することができる。標的遺伝子の発現抑制剤は、miRNA又はmiRNA発現ベクター、及び、必要があれば、対象生物への導入に有効な他の添加剤、例えば、リン酸カルシウム、リポフェリン、ポリリジン、その他の添加剤を含有することができる。

[0036] miRNA発現ベクターの調製には、通常その対象生物種により採用されている遺伝子組み換え法を用いることができる。例えば、植物については、ヘアピン型RNA発現プラスミド法によることができる。動物については、siRNA発現ベクター法を応用して用いることができる。siRNAを発現させる系としては、RNAPolymeraseIIIを用いることができ、タンデムタイプと、ステムループタイプがある。例えば、piGENETMhU6、piGENETMtRNA (iGENE Therapeutics)を用いることができ、好適には、(i)選択されたmiRNAに対応するsiRNAをセンス、アンチセンス配列を含むプライマーで増幅し、増幅断片を制限酵素で切断し、U6プロモーターの下流に挿入し、タンデムタイプとするか、(ii)センス、ループ、アンチセンス配列を含むオリゴヌクレオチドをアニールし、U6プロモーターの下流に挿入することができる(「RNAi実験プロトコール」実験医学別冊第95-110頁)。発現ベクターは、EffectinTMなどの細胞導入用キットを用いて、細胞に導入することができる。

[0037] 調製miRNA発現ベクターは、周知の方法で、例えば、エレクトロポレーション、Ca⁺ポリリン酸法、パーティクルガン法等により、細胞又は、生物体に導入される。

[0038] 次に、このように特定された制御対象遺伝子の発現が実際にmiRNAの導入により、阻害されるかどうかを確認する。もし、その制御対象遺伝子の機能が、確認されていない場合については、更に阻害された結果の表現型の変化を確認する。

[0039] [miRNAに対するsiRNAの設計]

被制御遺伝子の発現を細胞中で阻害している天然のmiRNAを阻害するために、当該miRNAに対し、相補的なsiRNAを設計することができる。これにより、標準状態において、miRNAにより発現が制御されている被制御遺伝子によりコードされる蛋白質が、該miRNAの存在により生産が抑制されている場合、siRNAによって対象miRNAの蛋白質の翻訳阻害活性が抑制されることにより生産が開始させることができる。このように、siRNAによって、被制御遺伝子がコードする蛋白質の発現が制御可能となる。本発明には、miRNAにより発現が制御されている被制御遺伝子によりコードされる蛋白

質が、該miRNAの存在により生産が抑制されている場合に、siRNAを用いる、蛋白質に関連した疾病のための処置の開発、及び、疾病のための処置をも包含している。

[0040] [標的配列に対する人工miRNAの設計]

miRNAを不変領域と可変領域に分け設計することができる。例えば、既知のmiRNA配列を元に、不変領域、可変領域ににおいて、別々に設定した曖昧度においてあらゆる可能性のある塩基配列を生成し、miRNA配列データライブラリーを作成する。このように生成したmiRNA配列データに対し、翻訳制御対象としたいmRNAの3'UTR上に相補な配列が存在するかどうかを検索することができる。

[0041] 本発明によって予測したmiRNAにより制御される被制御遺伝子(ターゲット遺伝子)を、miRNA又はmiRNAに作用するsiRNAによって、遺伝子発現の制御、蛋白質翻訳の制御をすることができる。これにより、予測したターゲット遺伝子がコードする蛋白質に関連した疾病のための処置の開発、及び、予測したターゲット遺伝子がコードする蛋白質に関連した疾病のための処置に利用することができる。

実施例

[0042] 実施例1

国際DNAデータバンク及び論文より、既知のヒトmiRNA、107種類(表1)を収集した(302)。

[表1]

(表1) 既知のヒトmiRNA

名称	塩基配列		
let-7a	TGAGGTAGTAGCTTCTATACTT	miR-33	GTGCATTGTAGTTGCATTG
let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	miR-91	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT
let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGCTT	miR-92	TATTGCACTTGTCCCGCCTGT
let-7d	AGAGGTAGTAGGTTGCATACT	miR-93	AAAGTGCTGTTCTGTGCAGGTAG
let-7e	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT	miR-95	TTCAACCGCTATTTATTGAGCA
let-7f	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	miR-96	TTTGCCACTAGCACATTTTTCG
miR-15	TAGCAGCACATAATGTTTGTG	miR-98	TGAGGTACTAAGTTGTATTGTT
miR-16	TAGCAGCACGTAAATATGGCG	miR-99	AACCCGTAGATCCGATCTTGTG
miR-17	ACTGCAGTGAAGGCACTTGT	miR-100	AACCCGTAGATCCGAACTTGTG
miR-18	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATA	miR-101	TACAGTACTGTGATAACTGAAG
miR-19a	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA	miR-102	TAGCACCATTTTGAAATCAGT
miR-19b	TGTGCAAATCCATGCAAACTGA	miR-103-20	AGCAACATTGTACAGGGCTATGA
miR-20	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTA	miR-103-1	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	miR-104	TCAACATCAGTCTGATAAGCTA
miR-22	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT	miR-105	TCAAATGCTCAGACTCCTGT
miR-23	ATCACATTGCCAGGGATTTC	miR-106	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGC
miR-24	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG	miR-107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA
miR-25	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	miR-192	CTGACCTATGAATTGACAGCC
miR-26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	miR-196	TAGGTAGTTTCATGTTGTTCG
miR-26b	TTCAAGTAATTCAGGATAGGT	miR-197	TTCAACACCTTCTCCACCCAGC
miR-27	TTCAAGTGGCTAAGTTCCGCC	miR-198	GGTCCAGAGGGGAGATAGG
miR-28	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAG	miR-199	CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTT
miR-29	CTAGCACCATCTGAAATCGGTT	miR-208	ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT
miR-30a-s	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGC	miR-129	CTTTTTCGGGTCTGGGCTTGC
miR-30a-as	CTTTCAGTCGGATGTTTGCAGC	miR-148	TCAGTGCACTACAGAACTTTGT
miR-31	GGCAAGATGCTGGCATAGCTG	miR-30c	TGTAAACATCCTACACTCTCAGC
miR-32	TATTGCACATTACTAAGTTGC	miR-30d	TGTAAACATCCCGACTGGAAG

miR-124b	TTAAGGCACGCGGTGAATGC	miR-220	CCACACCCATCTGACACTTT
miR-139	TCTACAGTGACGCTGTCT	miR-221	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
miR-147	GTGTGTGGAAATGCTTCTGC	miR-222	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCTC
miR-7	TGGAAGACTAGTGATTTTGTT	miR-223	TGTCAGTTTGTCAAATACCCC
miR-10a	TACCCTGTAGATCCGAATTTGTG	miR-224	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTA
miR-10b	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT	miR-108	ATAAGGATTTTATAGGGGCATT
miR-34	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	miR-109	CTGGTCGAGTCGGCCTCCGC
miR-181a	AACATTCAACGCTGTGGTGAGT	miR-110	TCGAGCGGCCGACGTCG
miR-181b	ACCATCGACCCTTCATTGTACC	miR-111	TGTGCAAATCTATGCAAACTGT
miR-181c	AACATTCAACCTGTGGTGAGT	miR-112	GGTCCTGACATCCACGGAA
miR-182	TGCTTCTAGACTTCCAACTA	miR-113	TCGAGCCCTGGTGGCGCCACCA
miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCAGT	miR-114	TAGCTGCACGTAAATATTGGCG
miR-187	TCGTCTCTTGTGTTGCAGCCG	miR-115	TGAAGCGGAGCTGGAA
miR-199a	CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTT	miR-116	TTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTG
miR-199b	CCCAGTGTTCAGACTATCTGTTT	miR-117	TTCAGCAGGAACAGTT
miR-203	GTCAAATGTTTAGGACCACTAG	miR-118	ATGCCCTTGAGTGTAGGAT
miR-204	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	miR-119	ATTGCCAGGGATTACCAT
miR-205	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG	miR-120	GGCGGGACGCAGCCTGT
miR-210	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTG	miR-121	TGAACCACCTGATCCCTTCCCGAA
miR-211	TTCCCTTTGTCATCCTTCGCCT	miR-2X	ATCCAATAAAATAAATAAATAA
miR-212	TAACAGTCTCCAGTCACGGCC	miR-117a	CTTTCAGCAGGAACAGTT
miR-213	AACATTCAATGCTGTGGTGGGTT	miR-117b	TTCAGCAGGAACAGTTGT
miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAG	miR-117c	CTTTCAGCAGGAACAGTTGT
miR-215	ATGACCTATCAATTGACAGAC	miR-117d	CCCTTTCAGCAGGAACAGTT
miR-216	TAATCTCAGCTGGCAACTGTG	miR-117e	TTCAGCAGGAACAGTTCTAT
miR-217	TACTGCATCAGGAACTGATTGGAT		
miR-218	TTGTGCTGATCTAACCATCT		
miR-219	TGATGTCCAAACGCAATTCT		

[0043] これらの配列においては、5'側に幾つかのmiRNAで共通性のある配列、例えば let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, 及びlet-7fの間では、それぞれの配列が相補的な配列としてのモチーフ配列 uGACCUAUが存在している。このような傾向より、miRNAの5'側8塩基を「保存領域」、9塩基以降を「非保存領域」と定義した。

[0044] 被制御遺伝子の候補として、米国National Center for Biotechnology Informationに

におけるReference Sequence Projectが構築しているRefSeqデータベースより、ゲノム上にマップされた完全長cDNA16,133種類を収集した(2002/8/13)(以下図1参照)。その内、20塩基長以上の3'UTRを持つcDNA15,062種類を被制御遺伝子候補(303)とした。続いて被制御遺伝子候補の3'UTRの開始位置(5'端)より1,050塩基長の塩基配列を、ターゲット塩基配列候補とした(304)。

[0045] ターゲット塩基配列候補中に収集した既知のヒトmiRNAに相補性のある領域を検索し、相補性領域とした。相補性領域の検索においては、比較的穏やかな基準による探索、具体的にはmiRNAの全長塩基配列に対して3分の2以上の塩基が相補的である領域を選抜し、相補性領域とした(305)。

[0046] さらに、相補性領域の内、miRNA塩基配列の非保存領域に対応する領域において、厳格な基準による探索、具体的には、8塩基以上連続して相補的な塩基配列が存在するものを選別し、ターゲット領域とした(306)。その結果、95種類のヒトmiRNAに対応する474箇所ターゲット領域が得られた。すなわち、各miRNAに対するターゲット領域を有する遺伝子がターゲット遺伝子(被制御遺伝子)である(表2)。

[表2]

(表2) miRNAと予測されたターゲットmRNA

let-7a	NM_001718	miR-17	NM_001949	miR-22	NM_014943	miR-26b	NM_004523
let-7b	NM_004805	miR-17	NM_014256	miR-22	NM_002982	miR-26b	NM_006980
let-7b	NM_014795	miR-17	NM_016158	miR-22	NM_021809	miR-26b	NM_001289
let-7c	NM_024584	miR-17	NM_032350	miR-23	NM_005145	miR-26b	NM_032358
let-7d	NM_016057	miR-17	NM_024885	miR-23	NM_005081	miR-26b	NM_017638
let-7d	NM_002164	miR-17	NM_021948	miR-23	NM_006407	miR-26b	NM_133491
let-7d	NM_016538	miR-17	NM_024922	miR-23	NM_000113	miR-26b	NM_022783
let-7d	NM_018992	miR-17	NM_018090	miR-23	NM_052918	miR-26b	NM_005824
let-7d	NM_018036	miR-17	NM_004681	miR-23	NM_016285	miR-26b	NM_018982
let-7e	NM_001045	miR-17	NM_003156	miR-23	NM_138285	miR-28	NM_001038
let-7e	NM_001718	miR-17	NM_006749	miR-23	NM_025108	miR-28	NM_005588
let-7e	NM_017977	miR-18	NM_004094	miR-23	NM_032788	miR-28	NM_014400
let-7e	NM_005108	miR-18	NM_020423	miR-23	NM_021079	miR-28	NM_025070
let-7e	NM_004676	miR-18	NM_144601	miR-23	NM_014673	miR-28	NM_006695
let-7e	NM_012124	miR-19b	NM_000216	miR-23	NM_022770	miR-28	NM_017920
let-7e	NM_014660	miR-19b	NM_017630	miR-23	NM_005652	miR-29	NM_000271
let-7e	NM_031952	miR-19b	NM_020200	miR-24	NM_001619	miR-29	NM_020390
let-7f	NM_003138	miR-19b	NM_002246	miR-24	NM_001980	miR-30a-s	NM_006517
let-7f	NM_002956	miR-19b	NM_030926	miR-24	NM_014862	miR-30a-as	NM_021205
let-7f	NM_002981	miR-20	NM_002284	miR-24	NM_024633	miR-30a-as	NM_032312
miR-16	NM_003881	miR-21	NM_014168	miR-24	NM_024345	miR-31	NM_001569
miR-17	NM_000560	miR-21	NM_014331	miR-24	NM_017994	miR-31	NM_005513
miR-17	NM_001038	miR-21	NM_032446	miR-25	NM_018370	miR-31	NM_000214
miR-17	NM_001630	miR-21	NM_024593	miR-26a	NM_017638	miR-31	NM_014074
miR-17	NM_000436	miR-22	NM_001047	miR-26a	NM_133491	miR-31	NM_022568
miR-17	NM_002956	miR-22	NM_007136	miR-26b	NM_006447		
miR-17	NM_006925	miR-22	NM_013343	miR-26b	NM_006795		
miR-17	NM_014030	miR-22	NM_016158	miR-26b	NM_000297		

miR-31	NM_030764	miR-33	NM_145023	miR-95	NM_032316	miR-102	NM_012097
miR-31	NM_018622	miR-33	NM_004397	miR-96	NM_000868	miR-102	NM_024838
miR-32	NM_000415	miR-33	NM_022766	miR-96	NM_002355	miR-102	NM_080756
miR-32	NM_004575	miR-33	NM_033272	miR-96	NM_018018	miR-102	NM_020640
miR-32	NM_006602	miR-33	NM_022111	miR-96	NM_022776	miR-102	NM_018323
miR-32	NM_004841	miR-92	NM_013368	miR-96	NM_015570	miR-102	NM_005023
miR-32	NM_004926	miR-93	NM_024777	miR-96	NM_138473	miR-102	NM_003096
miR-32	NM_014650	miR-95	NM_000857	miR-96	NM_007191	miR-102	NM_016073
miR-32	NM_006603	miR-95	NM_001038	miR-96	NM_002160	miR-102	NM_004779
miR-32	NM_004079	miR-95	NM_002001	miR-96	NM_025181	miR-102	NM_014899
miR-32	NM_018177	miR-95	NM_021871	miR-96	NM_144983	miR-102	NM_013410
miR-32	NM_139279	miR-95	NM_005668	miR-96	NM_016622	miR-102	NM_014923
miR-32	NM_020185	miR-95	NM_018939	miR-98	NM_000315	miR-102	NM_018287
miR-32	NM_144969	miR-95	NM_052972	miR-99	NM_000167	miR-103-20	NM_007373
miR-33	NM_001451	miR-95	NM_022901	miR-101	NM_018573	miR-103-1	NM_004321
miR-33	NM_003023	miR-95	NM_030815	miR-101	NM_006588	miR-103-1	NM_020820
miR-33	NM_003154	miR-95	NM_016179	miR-101	NM_032888	miR-104	NM_005389
miR-33	NM_005139	miR-95	NM_004839	miR-101	NM_023929	miR-104	NM_031915
miR-33	NM_031363	miR-95	NM_005356	miR-102	NM_001735	miR-104	NM_006756
miR-33	NM_021151	miR-95	NM_001498	miR-102	NM_002870	miR-105	NM_000114
miR-33	NM_002283	miR-95	NM_002004	miR-102	NM_002709	miR-105	NM_004403
miR-33	NM_057173	miR-95	NM_023940	miR-102	NM_004496	miR-105	NM_023914
miR-33	NM_018725	miR-95	NM_024592	miR-102	NM_004055	miR-105	NM_018017
miR-33	NM_030781	miR-95	NM_013237	miR-102	NM_004405	miR-105	NM_015356
miR-33	NM_003960	miR-95	NM_015516	miR-102	NM_030752	miR-105	NM_024503
miR-33	NM_005329	miR-95	NM_139172	miR-102	NM_017506		
miR-33	NM_018039	miR-95	NM_016066	miR-102	NM_032240		
miR-33	NM_003836	miR-95	NM_144675	miR-102	NM_016603		

miR-105	NM_092483	miR-197	NM_006509	miR-129	NM_001849	miR-147	NM_015994
miR-105	NM_134422	miR-197	NM_014246	miR-129	NM_001846	miR-147	NM_022454
miR-105	NM_024837	miR-197	NM_006288	miR-129	NM_024301	miR-147	NM_015043
miR-105	NM_006554	miR-197	NM_138694	miR-129	NM_015080	miR-147	NM_030821
miR-106	NM_012219	miR-197	NM_022006	miR-129	NM_033027	miR-147	NM_022468
miR-107	NM_003846	miR-197	NM_139235	miR-148	NM_002200	miR-147	NM_144628
miR-192	NM_000876	miR-197	NM_052949	miR-148	NM_002552	miR-147	NM_144642
miR-192	NM_014207	miR-197	NM_024674	miR-148	NM_005626	miR-147	NM_003309
miR-192	NM_012066	miR-197	NM_015024	miR-148	NM_006643	miR-147	NM_005178
miR-192	NM_019847	miR-198	NM_001159	miR-148	NM_004274	miR-147	NM_030576
miR-196	NM_004768	miR-198	NM_003120	miR-30d	NM_006517	miR-7	NM_000724
miR-196	NM_004482	miR-198	NM_002209	miR-30d	NM_015320	miR-7	NM_002971
miR-196	NM_015642	miR-198	NM_004802	miR-30d	NM_032827	miR-7	NM_000632
miR-196	NM_033218	miR-198	NM_005275	miR-30d	NM_138412	miR-7	NM_017434
miR-196	NM_052862	miR-198	NM_014343	miR-124b	NM_012151	miR-7	NM_020524
miR-196	NM_015643	miR-198	NM_002230	miR-124b	NM_001565	miR-7	NM_015941
miR-196	NM_002157	miR-198	NM_005768	miR-124b	NM_020538	miR-7	NM_145756
miR-196	NM_005257	miR-198	NM_014671	miR-124b	NM_000682	miR-7	NM_014522
miR-196	NM_016103	miR-198	NM_000966	miR-124b	NM_025099	miR-34	NM_080921
miR-196	NM_019067	miR-198	NM_002990	miR-124b	NM_017529		
miR-196	NM_004181	miR-199	NM_017902	miR-124b	NM_018510		
miR-197	NM_000054	miR-199	NM_032178	miR-124b	NM_020348		
miR-197	NM_000165	miR-208	NM_003557	miR-139	NM_012155		
miR-197	NM_005248	miR-208	NM_018996	miR-147	NM_032800		
miR-197	NM_005544	miR-129	NM_003012	miR-147	NM_004598		
miR-197	NM_020539	miR-129	NM_006298	miR-147	NM_032242		
miR-197	NM_024334	miR-129	NM_000438	miR-147	NM_005228		
miR-197	NM_017728	miR-129	NM_052889	miR-147	NM_020237		

miR-181a	NM_001647	miR-214	NM_006032	miR-214	NM_005134	miR-220	NM_145265
miR-182	NM_013348	miR-214	NM_004186	miR-214	NM_016256	miR-221	NM_025150
miR-182	NM_021048	miR-214	NM_006814	miR-214	NM_017670	miR-221	NM_002246
miR-182	NM_022131	miR-214	NM_015991	miR-214	NM_033392	miR-223	NM_004655
miR-182	NM_019027	miR-214	NM_004457	miR-214	NM_002946	miR-223	NM_001957
miR-183	NM_021624	miR-214	NM_031407	miR-214	NM_005894	miR-223	NM_004849
miR-183	NM_003769	miR-214	NM_016817	miR-215	NM_000596	miR-223	NM_017704
miR-187	NM_001336	miR-214	NM_007148	miR-215	NM_014733	miR-108	NM_002948
miR-187	NM_014135	miR-214	NM_030900	miR-216	NM_001945	miR-108	NM_004257
miR-187	NM_020676	miR-214	NM_031432	miR-216	NM_005793	miR-108	NM_021101
miR-199a	NM_032178	miR-214	NM_018718	miR-216	NM_053004	miR-109	NM_012282
miR-199b	NM_003716	miR-214	NM_001921	miR-216	NM_015236	miR-109	NM_002860
miR-203	NM_025146	miR-214	NM_032196	miR-216	NM_017850	miR-109	NM_005898
miR-204	NM_006163	miR-214	NM_025163	miR-216	NM_002866	miR-109	NM_144640
miR-204	NM_032264	miR-214	NM_018111	miR-218	NM_001351	miR-109	NM_133640
miR-204	NM_018203	miR-214	NM_003387	miR-218	NM_000261	miR-111	NM_003922
miR-205	NM_015254	miR-214	NM_005207	miR-218	NM_005627	miR-111	NM_015939
miR-205	NM_001467	miR-214	NM_005262	miR-218	NM_053045	miR-112	NM_000160
miR-210	NM_007260	miR-214	NM_003852	miR-218	NM_019114	miR-112	NM_002082
miR-210	NM_014725	miR-214	NM_017608	miR-218	NM_020400	miR-112	NM_032294
miR-210	NM_012205	miR-214	NM_006665	miR-219	NM_002460	miR-112	NM_080610
miR-210	NM_030576	miR-214	NM_016953	miR-219	NM_024645	miR-112	NM_032689
miR-211	NM_003633	miR-214	NM_138808	miR-220	NM_016349	miR-112	NM_138422
miR-214	NM_001096	miR-214	NM_023076	miR-220	NM_002442	miR-113	NM_006858
miR-214	NM_000841	miR-214	NM_030914	miR-220	NM_003413	miR-114	NM_022121
miR-214	NM_002147	miR-214	NM_031453	miR-220	NM_014080		
miR-214	NM_004475	miR-214	NM_032209	miR-220	NM_015584		
miR-214	NM_007031	miR-214	NM_019091	miR-220	NM_144660		

miR-115	NM_000065	miR-119	NM_000361
miR-115	NM_002790	miR-119	NM_012145
miR-115	NM_006041	miR-119	NM_025135
miR-115	NM_006748	miR-119	NM_004184
miR-115	NM_078483	miR-119	NM_033316
miR-115	NM_001913	miR-119	NM_018189
miR-115	NM_001128	miR-119	NM_017791
miR-115	NM_006813	miR-119	NM_014007
miR-115	NM_016257	miR-119	NM_016396
miR-115	NM_000481	miR-119	NM_138323
miR-115	NM_006274	miR-119	NM_018561
miR-116	NM_018482	miR-119	NM_030790
miR-117	NM_004157	miR-120	NM_032255
miR-117	NM_007195	miR-120	NM_144640
miR-117	NM_013448	miR-121	NM_014887
miR-117	NM_016033	miR-121	NM_015996
miR-117	NM_006479		
miR-117	NM_014394		
miR-117	NM_020648		
miR-117	NM_144684		
miR-117	NM_144983		
miR-118	NM_016563		
miR-118	NM_006687		
miR-118	NM_004256		
miR-118	NM_002959		
miR-118	NM_022060		
miR-118	NM_002921		
miR-118	NM_144679		

実施例1で得られた結果より、3種類のmiRNA (miR-17 (配列番号9), miR-29 (配列番号23), miR-102 (配列番号38))を選び、また、各miRNAについて予測されたターゲット遺伝子より1遺伝子を選択し(NM_001949 (配列番号108), NM_020390 (配列番号109), NM_004496 (配列番号110))、実験により、各合成miRNAが、各ターゲット遺伝子がコードしている蛋白質(E2F3, eIF5A, HNF3alpha)の発現に与える影響を見ることにより蛋白質翻訳阻害活性を調べた(図2)。

- [0048] ヒトHepG2細胞は、10%牛胎児血清(FBS)添加ベルベッコのイーグル改変培地(DMEM:Dulbecco's modified Eagle's Medium)で培養された。
- [0049] 表1記載のmiR-17, miR-29及びmiR-102をそれぞれ合成した。上記合成miRNAをそれぞれ2 μ Mで、ヒトHepG2細胞に、OligofectaminTM(Invitrogen)を用いて導入した。
- [0050] ヒトHepG2細胞から回収した全タンパク質を、10%ポリアクリルアミドゲルでSDS電気泳動し、PVDF膜にエレクトロブローディングにより移した。E2F3, eIF5A, HNF3alphaに対するポリクローナル抗体及びECL検出キット(アマシャム)で免疫複合体が可視化された。
- [0051] その結果、WT(野生株、miRNAを導入していない株)とそれぞれのmiRNAを導入した細胞におけるタンパク質の発現を比較することにより、上記3種類の蛋白質は、上記3種類のmiRNAの存在により抑制され、miRNAにより蛋白質の翻訳が阻害されていることが証明された(図4)。
- [0052] 以上により、上記3種類のmiRNAが上記3種類の蛋白質の発現を制御することを確認し、また、上記3種類の合成miRNAにより上記3種類の蛋白質の発現が制御可能であることを示した。
- [0053] ところで、(1)NM_001949は、E2F transcription factor 3 [同義名:KIAA0075, Transcription factor E2F3, E2F-3]であり、E2F転写因子は、細胞周期調節や遺伝子複製にかかわる蛋白質をコードした遺伝子のプロモータ領域で見つかっているE2部位認識部位(TTTCC/GCGC)を介して、DB蛋白質と共同してDNAに結合する。DRTF1/E2F複合体は、細胞周期のG1期からS期への移行のコントロールにおいて機能する。E2F3は、細胞周期に依存して、retinoblastoma protein 1(RB1)に選択的に結

合する。E2F3蛋白質の抑制によって、細胞周期の移行、細胞分裂、分化が機能不全となり、さらに、ガンの進行と、無調節なE2F2の発現には相関がある。したがって、miR-17によるE2F3の発現抑制は、ヒトガン腫瘍における細胞分裂をブロックすることに利用可能であり、すなわち、ガンの治療に利用可能である。

[0054] また、(2)NM_020390 は、Eukaryotic translation initiator factor 5A2 といわれ、[同義名 : eIF-5A2 protein, eIF5AII, eIF-5A2 protein]である。Eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A)(eIF-4D, eIF-5A) は、ribosomal peptidyl transferase活性 (HIV-1-mRNAsを輸送しexportin1と4に結合する)を刺激する。eIF-5Aは、HIV-1トランスアクティベータ蛋白質Revの必須コファクターとして同定されている。RevはHIV-1遺伝子発現の複合調節において、それゆえ、ウィルス粒子の感染の発生においてかぎとなる役割を演じる。eIF-5Aの発現は、Revの機能に必須であり、この相互作用の阻害はウィルスの複製サイクルのブロックにつながる。したがって、miR-29によるeIF5A蛋白質の発現抑制は、HIVウィルス複製サイクルのブロックに利用可能であり、すなわち、HIV疾患の治療に利用可能と考えられる。

[0055] 更に、(3)NM_004496は、Hepatocyte nuclear factor 3, alpha [同義名 : HNF3a, HNF3A, MGC33105, TCF3A, forkhead box A1, hepatocyte nuclear factor 3-alpha (HNF-3a)(Forkhead box protein A1)] である。HNF-3aは、AFP, Albumin, tyrosine aminotransferase, PEP CKといった、多くの肝臓の遺伝子の転写アクティベーターとして働く。これらの遺伝子のシス調節領域と相互作用する。HNF-3aはDNA-結合蛋白質であるforkheadクラスのメンバーである。マウスにおける同様のファミリーのメンバーは、すい臓と肝臓における代謝の違いを調節する役割を持っている。最近、食道 (esophageal) ガンや肺ガンにおける、この遺伝子の腫瘍形成における潜在的な役割が示唆されている。したがって、miR-102によるHNF3a蛋白質の発現抑制は、ヒトガン腫瘍の増殖のブロックに利用可能であり、すなわち、ガンの治療に利用可能と考えられる。

[0056] これらの結果はまた、本発明が、上記3種類の蛋白質に関連した疾病のための処置の開発、及び、疾病のための処置に有用であることを示している。

[0057] なお、上記番号(NM_001949, NM_020390, NM_004496)等NM_で始まる番号は、NC

BIで付与されている遺伝子登録番号を示す。

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>で検索することができる。

[0058] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[0059] 更に、本件出願は、2003年8月13日に日本国特許庁になされた特願2003-293129号に基づく優先権を主張する出願であって、上記出願の内容を引用により、取り込むものである。

産業上の利用の可能性

[0060] 本発明によれば、本発明における機能性RNAの被制御遺伝子探索手法によって予測されたmiRNAと被制御遺伝子の組み合わせによって、被制御遺伝子にコードされた蛋白質の発現の制御が可能で、遺伝子工学の技術分野において利用することができる。

[0061] さらに本発明によれば、miR-17, miR-29, 及びmiR-102、またはそれらをターゲットとしたsiRNAによって、蛋白質、E2F3, eIF5A, 及びHNF3alphaの発現を制御することが可能である。また、本発明における蛋白質発現制御を利用した疾病のための処置の開発及び疾病のための処置が可能である。

図面の簡単な説明

[0062] [図1]図1は、miRNAターゲット遺伝子予測手順のフローチャート

[図2]図2は、実験により実証したmiRNA、ターゲット遺伝子、対象蛋白質の組み合わせ

[図3]図3は、miRNA (miR-17, miR-29, miR-102)のE2F3, eIF5A, HNF3alphaの発現に与える影響

[図4]図4は、モチーフ配列と、当該モチーフ配列を有するmiRNAの例

[図5]図5は、同じモチーフを持つmiRNAの例

請求の範囲

- [1] 遺伝子発現制御機能を持つ16〜25塩基長の機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法であって、
- (1)複数種類の機能性RNA分子の塩基配列間で共通の塩基配列を有する領域(保存領域)と共通でない塩基配列を有する領域(非保存領域)とに分別決定するステップと、
- (2)機能性RNA配列の全長について比較的穏やかな基準で、非保存領域では厳密な基準で、各々別々の基準で設定した曖昧さ(探索精度水準値)を与え、探索用塩基配列とし、前記機能性RNA分子の塩基配列に相補である塩基配列を有する遺伝子(被制御遺伝子候補)を探索するステップとを含み、
- 探索精度水準値を満たす被制御遺伝子候補を前記対象生物の機能性RNA分子より予測又は同定された被制御遺伝子とする、機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法。
- [2] 前記(1)のステップが、機能性RNA分子の塩基配列間での共通の塩基配列を有する領域(保存領域)として5'末から8塩基の領域を、共通でない塩基配列を有する領域(非保存領域)として5'末から9塩基以降の領域に分別するステップである請求の範囲第1項記載の方法。
- [3] 前記(2)のステップが、機能性RNA配列の全長について比較的穏やかな基準として機能性RNA配列全長と3分の2以上が相補的な配列を有する被制御遺伝子候補を選択する基準で、前記非保存領域での厳密な基準として、miRNAの非保存性領域中の連続する8塩基に対し相補的な配列である被制御遺伝子候補を選択する基準である請求の範囲第1項記載の方法。
- [4] 遺伝子発現制御機能を持つ16〜25塩基長の機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法であって、
- (1)複数種類の機能性RNA分子の塩基配列間で共通の塩基配列を有する領域(保存領域)と共通でない塩基配列を有する領域(非保存領域)とに分別決定するステップと、
- (2)機能性RNA配列の全長について比較的穏やかな基準で、非保存領域では厳密

な基準で、各々別々の基準で設定した曖昧さ(探索精度水準値)を与えるステップ、及び

(3)被制御遺伝子候補から、(i)全長の機能性RNA配列と比較的緩やかな基準による相補性を満たす塩基配列を有する遺伝子であって、且つ(ii)機能性RNA配列の非保存領域と厳密な基準による相補性を満たす塩基配列を有する遺伝子を、被制御遺伝子として抽出するステップとを含む、

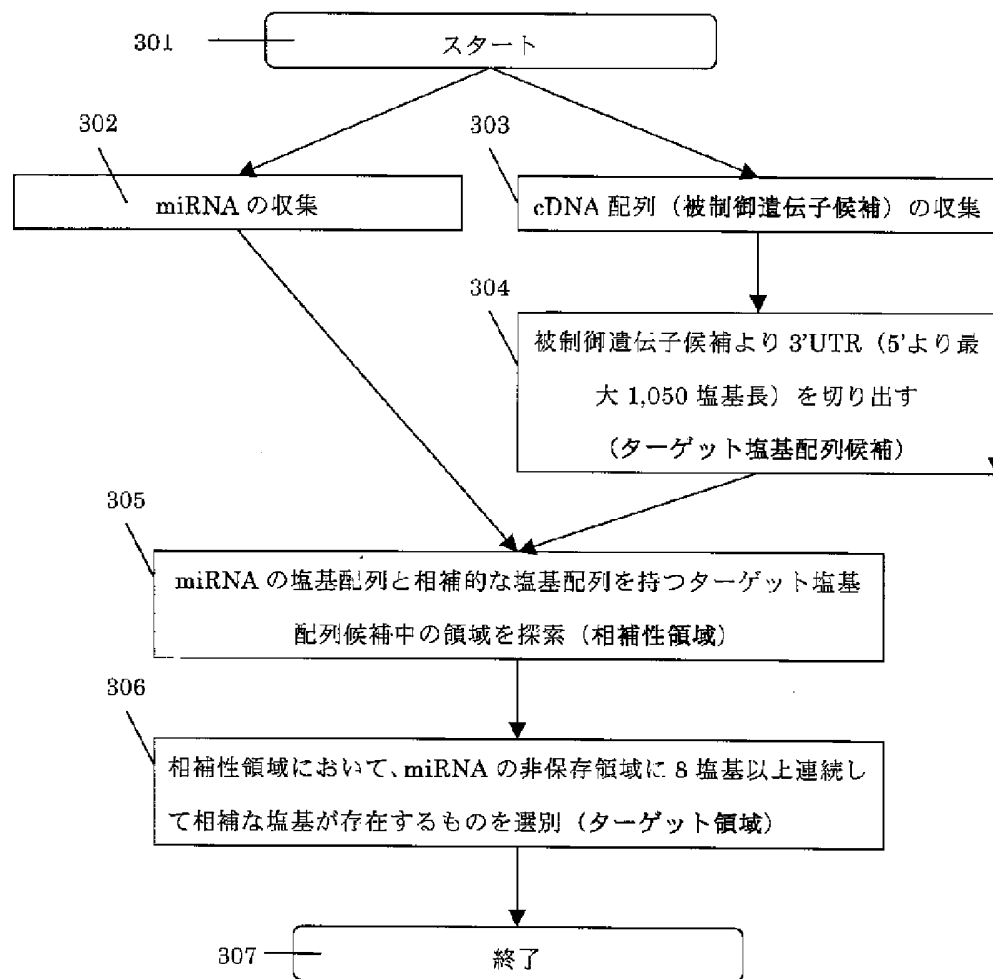
機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法。

- [5] 更に、機能性RNA分子を細胞に導入し、被制御遺伝子の発現に対する影響を確認するステップを更に含む、請求の範囲第1〜4いずれか1項記載の機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法。
- [6] 複数の被制御候補遺伝子又はその相補鎖を表面に配置した核酸チップを用いて、被制御遺伝子のmRNA又はcDNAを検出することにより、被制御遺伝子候補の発現の影響を調べることを更に含む請求の範囲第1〜5いずれか1項記載の機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法。
- [7] 機能性RNA分子がmiRNA (microRNA) である請求の範囲第1〜6項記載の方法。
- [8] 機能性RNAが、配列番号1〜107のいずれか1の配列番号で表されるmiRNAである、請求の範囲第7項の被制御遺伝子の予測又は同定方法。
- [9] 以下に示されるX_nの遺伝子の発現を制御するため、それぞれ、Y_nで表される核酸を有効成分として含むX_n遺伝子発現制御剤(但しn=1、2、3又は4)。
 X1:E2F転写因子3 (E2F transcription factor 3 (NM_001949)、配列番号108)
 X2:eIF-5A2タンパク質 (eIF-5A2 protein (NM_020390)、配列番号109)
 X3:肝細胞核因子3 α hepatocyte nuclear factor 3, alpha (NM_004496)、配列番号110)
 Y1:(1) ACTGCAGTGAAGGCACTTGT (配列番号9)
 Y2:(2) CTAGCACCATCTGAAATCGGTT (配列番号23)
 Y3:(3) TAGCACCATTTGAAATCAGT (配列番号38)
- [10] 請求項9記載のX_n遺伝子発現制御剤を有効成分として含む医薬。(但し、n=1、2又は3で、X1は、E2F transcription factor 3 (NM_001949)、X2は、eIF-5A2 protein

(NM_020390)、X3は、hepatocyte nuclear factor 3, alpha (NM_004496)を表す。)

- [11] 機能性RNA分子を用いて、請求の範囲第1〜6項いずれか1項記載の方法で当該機能性RNA分子により発現が制御されると予測又は同定された被制御遺伝子の発現を制御する方法。
- [12] 機能性RNA分子を用いて、請求の範囲第1〜6項いずれか1項記載の方法で予測又は同定された被制御遺伝子の発現を制御することにより、(ヒト以外の)生体機能を制御する方法。
- [13] 疾病の処置の開発のために、(ヒト以外の)生体機能を制御する請求の範囲第11項に記載の方法。
- [14] 疾病の処置のために(ヒト以外の)生体機能を制御する、請求の範囲第11項に記載の方法。

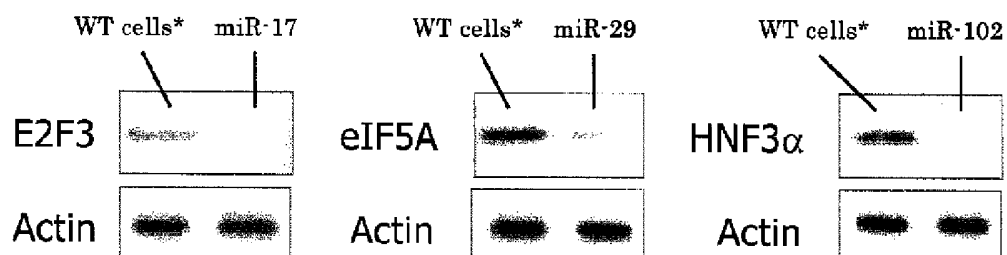
[図1]



[図2]

miRNA	ターゲット遺伝子	蛋白質	アノテーション
miR-17	NM_001949	E2F transcription factor 3	Homo sapiens E2F transcription factor 3 (E2F3)
miR-29	NM_020390	eIF-5A2 protein	eukaryotic translation initiation factor 5A2
miR-102	NM_004496	hepatocyte nuclear factor 3, alpha	Homo sapiens hepatocyte nuclear factor 3, alpha (HNF3A)

[図3]



***HepG2 WT cells**

[図4]

モチーフ名	モチーフ配列	モチーフを持つmiRNA
Let-box	uGACCUAU	let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f,
HsMmCeDm-box	ACCCGUAg	miR-56, mir-55, miR-53, miR-99, miR-99a, miR-100, miR-99b, miR-10, miR-51
Ce2-box	UGAGAUCA	miR-82, mir-81, miR-80
K-box	uAUCACAg	miR-13a, miR-13b, miR-2a, miR2b, miR11, miR-6, miR23a, miR-23b, miR-23a, miR-23b
Brd-box	UAAAAGCT	miR-131, miR-4, miR-75
HsMmCe-box	UAGCUGCA	miR-114, miR-102, miR-29, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-83
HsCe-box	GGCAAGAU	miR-31, miR-72, miR-74, miR-73
Ce3-box	UCACCCGG	miR-35, miR-36, miR-37, miR-38, miR-39, miR-40, miR-41, miR-42
HsMm-box	AAAGUCUu	miR-20, miR-106, miR-91, miR-94, miR-93
MmAt-box	UCGGAcCa	miR-165a, miR-165b, miR-166a, miR-166b, miR-166c, miR-166d, miR-166e, miR-166f, miR-166g, miR-127
At-box	UGACAGAA	miR-157a, miR-157b, miR-157c, miR-156a, miR-156b, miR-156c, miR-156d, miR-156e, miR-156f
MmCeDmAt-box	UGGAUUGt	miR-159, miR-11b, miR-1c, miR1d, miR-1,

[図5]

K-boxモチーフ

Dm_miR-13b-2	TATCACAGCCA-TTTTGACGAGT
Dm_miR-13b-1	TATCACAGCCA-TTTTGACGAGT
Dm_miR-13a	TATCACAGCCA-TTTTGATGAGT
Dm_miR-2b-2	TATCACAGCCAGCTTTGAGGAGC
Dm_miR-2b-1	TATCACAGCCAGCTTTGAGGAGC
Dm_miR-2a-2	TATCACAGCCAGCTTTGATGAGC
Dm_miR-2a-1	TATCACAGCCAGCTTTGATGAGC
Dm_miR-11	CATCACAGT---CTGAGTCTTGC
Dm_miR-6-3	TATCACAGTGG-CTGTTCTTTT
Dm_miR-6-2	TATCACAGTGG-CTGTTCTTTT
Dm_miR-6-1	TATCACAGTGG-CTGTTCTTTT
Mm_miR-128	TCACAGTGAACCGTCTCTTTT
Ce_mir-43	TATCACAGTTTACTTGCTGTGCG
Hs_miR-23a	ATCACATTGCCAGGGATTTCCA
Hs_miR-23b	ATCACATTGCCAGGGATTTCC
Mm_miR-23a	ATCACATTGCCAGGGATTTCC
Mm_miR-23b	ATCACATTGCCAGGGATTACCAC

5' **tATCACACA** 3'

共通配列:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/00, C12N15/09, A61K31/711

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)

Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90

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)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUS FILE (JOIS),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	WO 01/62973 A1 (ISIS PHARM INC.), 30 August, 2001 (30.08.01), & US 6165791 A & EP 1257669 A1 & JP 2003-523753 A	<u>12-14</u> <u>12-14</u> <u>9,10</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	JENKINS Z.A. et al.; Human EIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue- specific expression. Genomics, 2001, Vol.71, pages 101 to 109	<u>12-14</u> <u>9,10</u>

☒ 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
26 October, 2004 (26.10.04)

Date of mailing of the international search report
09 November, 2004 (09.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011624

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> <u>A</u>	BINGLE C.D. et al., Molecular cloning of the forkhead transcription factor HNF-3 α from a human pulmonary adenocarcinoma cell line. Biochim.Biophys.Acta. 1996, Vol.1307, pages 17 to 20	<u>12-14</u> <u>9,10</u>
Y	MARTINEZ L.A. et al., Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2002, Vol.99, pages 14849 to 14854	12-14
<u>Y</u> <u>A</u>	RHOADES M.W. et al., Prediction of plant microRNA targets. Cell, 2002, Vol.110, pages 513 to 520	<u>12-14</u> <u>1-8</u>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011624

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011624

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 11 pertains to a method of regulating gene expression which involves methods for treatment of the human body by therapy. Thus, it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011624

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Independent claims 1 and 4 (invention group A) relate to methods of presuming or identifying a gene under regulation the expression of which is regulated by a functional RNA molecule with a definite base length having a function of regulating gene function.

Independent claim 9 (invention group B) relates to a gene expression regulator or a drug using, as the active ingredient, a nucleic acid having a definite sequence for inhibiting the expression of a definite gene.

As the results of the search, however, it is found out that regulation of gene expression with the use of such a nucleic acid with a definite base length as described above is not novel because of having been disclosed by Nelson C. Lau et al., "An Abundant Class of Tiny RNAs With Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*", SCIENCE, Vol.294, NO.5543, 2001, pp. 858-862.

As a result, regulation of gene expression with the use of such a nucleic acid having a definite base length as described above falls within the category of prior art and, therefore, this common matter is not considered as a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2.

Since there is no other matter common to the invention group A and the invention group B which is seemingly a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found out between these invention groups in the meaning in accordance with PCT Rule 13.

Thus, there is no matter common to the invention group A and the invention group B.

Such being the case, it is obvious that independent claims 1 and 4 and independent claim 9 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/00, C12N15/09, A61K31/711

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))
Int. Cl⁷ 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

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)
CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JSTPLUSファイル (JOIS)
Genbank/EMBL/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 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	WO 01/62973 A1 (ISIS PHARM INC) 2001.08.30 & US 6165791 A & EP 1257669 A1 & JP 2003-523753 A	12-14 12-14 9, 10
<u>Y</u> A	JENKINS Z.A. et al., Human EIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. Genomics, 2001, Vol.71, p.101-109	12-14 9, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 10. 2004

国際調査報告の発送日

09.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/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)

佐久 敬

4 B

3 0 3 7

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 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	BINGLE C.D. et al., Molecular cloning of the forkhead transcription factor HNF-3 α from a human pulmonary adenocarcinoma cell line. Biochim.Biophys.Acta. 1996, Vol.1307, p.17-20	<u>12-14</u> 9, 10
Y	MARTINEZ L.A. et al., Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2002, Vol. 99, p.14849-14854	12-14
<u>Y</u> A	RHOADES M.W. et al., Prediction of plant microRNA targets. Cell, 2002, Vol.110, p.513-520	<u>12-14</u> 1-8

第I欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲11に記載された発明は、遺伝子の発現を制御する方法に係るものであり、これはヒトの身体の治療による処置方法を包含しているから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照のこと

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

「第Ⅲ欄」の補充

独立した請求の範囲1, 4(発明群A)は、遺伝子発現制御機能を持つ所定の塩基長の機能性RNA分子により発現が制御される被制御遺伝子を予測又は同定する方法に関するものである。

独立した請求の範囲9(発明群B)は、所定の遺伝子の発現を抑制するために、所定の配列からなる核酸を有効成分として用いる遺伝子発現制御剤又は医薬に関するものである。

しかしながら、調査の結果、当該所定の塩基長の核酸を用いて遺伝子発現を制御することは、Nelson C. Lau et al., "An Abundant Class of Tiny RNAs With Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*", SCIENCE, Vol. 294, No. 5543, 2001, pp858-862に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

結果として、当該所定の塩基長の核酸を用いて遺伝子発現を制御することは先行技術の域を出ていないから、PCT規則13.2の第2文の意味においてこの共通事項は特別な技術的特徴ではない。

また、発明群Aと発明群Bとの間において、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、当該発明群の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことができない。

よって、発明群Aと発明群Bにおいて共通の事項はない。

したがって、独立した請求の範囲1, 4と独立した請求の範囲9とは、発明の単一性の要件を満たしていないことが明らかである。