

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年3月17日(2016.3.17)

【公表番号】特表2014-518641(P2014-518641A)

【公表日】平成26年8月7日(2014.8.7)

【年通号数】公開・登録公報2014-042

【出願番号】特願2014-514835(P2014-514835)

【国際特許分類】

C 12N 15/09 (2006.01)

C 12N 9/22 (2006.01)

【F I】

C 12N 15/00 Z N A A

C 12N 9/22

【誤訳訂正書】

【提出日】平成28年1月29日(2016.1.29)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

二本鎖RNA基質の配列特異的な切断のための二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼの使用であって、

前記エンドリボヌクレアーゼは、SEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含み、および、二本鎖RNAと複合したエンドリボヌクレアーゼMinim IIIの構造のモデル中の二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互に作用するループに一致する、二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互作用しているループを有し、

前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、以下の共通配列(H=AまたはCまたはU; D=AまたはGまたはU)内で二本鎖RNAの配列特異的な活性を示し、

5' G A C C U H G 3'
3' C U G G A D C 5'

あるいは、

前記エンドリボヌクレアーゼは、D94R変異を含むSEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含み、および、二本鎖RNAと複合したエンドリボヌクレアーゼMinim IIIの構造のモデル中の二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互に作用するループに一致する、二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互作用しているループを有し、

前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、以下の共通配列内で二本鎖RNAの配列特異的な活性を示し、

5' G A C C U C G 3'
3' C U G G A G C 5'

および、SEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含む前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖RNA基質中の特異的な配列は、以下の共通配列(H=AまたはCまたはU; D=AまたはGまたはU)であり、

5' G A C C U H G 3'
3' C U G G A D C 5'

あるいは、D94R変異を含むSEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含む前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖RNA基質中の特異的な配列は、

以下の共通配列であり、



および、前記二本鎖RNA基質は、認識配列を含み、前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって認識配列内で切断され、

前記二本鎖RNA基質は、22以上の長さの塩基対を含むことを特徴とする使用。

【請求項2】

前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、以下の共通配列内で二本鎖RNAの配列特異的な活性を示し、



前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖RNA基質中の特異的な配列は、以下の共通配列である、



、ことを特徴とする請求項1記載の使用。

【請求項3】

二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによる、特異的に認識される共通配列内における二本鎖RNA基質の配列特異的な切断方法であって、

前記方法は、

a) 混合物中の二本鎖RNA基質と、二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼを組み合わせる工程、及び

b) 二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって、特異的に認識される共通配列における前記二本鎖RNA基質を切断する工程を含み、

前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、SEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含み、および、二本鎖RNAと複合したエンドリボヌクレアーゼMin I IIIの構造のモデル中の二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互に作用するループに一致する、二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互作用しているループを有し、

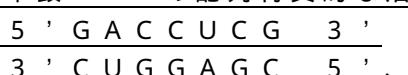
前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、以下の特異的に認識される共通配列(H = AまたはCまたはU; D = AまたはGまたはU)内で二本鎖RNAの配列特異的な活性を示し、



あるいは、

前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、D94R変異を含むSEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含み、および、二本鎖RNAと複合したエンドリボヌクレアーゼMin I IIIの構造のモデル中の二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互に作用するループに一致する、二本鎖RNAの主溝にあって主溝に相互作用しているループを有し、

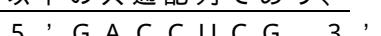
前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼは、以下の特異的に認識される共通配列内で二本鎖RNAの配列特異的な活性を示し、



および、二本鎖RNA基質は特異的に認識される共通配列を含み、特異的に認識される共通配列(H = AまたはCまたはU; D = AまたはGまたはU)は以下の通りであり、



あるいは、D94R変異を含むSEQ ID NO 1のアミノ酸配列を含む前記二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖RNA基質中の特異的な配列は、以下の共通配列であり、



3' C U G G A G C 5'、

二本鎖 RNA 基質が 22 以上の長さの塩基対を含む、ことを特徴とする方法。

【請求項 4】

前記二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼは、以下の特異的に認識される共通配列内で二本鎖 RNA の配列特異的な活性を示し、

5' C G A C C U C G A G G 3'

3' G C U G G A G C U C C 5'、

前記二本鎖 RNA 基質は特異的に認識される共通配列を含み、特異的に認識される共通配列は以下の通りである、

5' C G A C C U C G A G G 3'

3' G C U G G A G C U C C 5'、

ことを特徴とする、請求項 3 記載の二本鎖 RNA 基質の配列特異的な切断方法。

【請求項 5】

二本鎖 RNA の切断は、35°C から 45°Cまでの温度で、および / または、5 乃至 60 mM の塩化ナトリウム濃度で、1 乃至 2.5 mM の Mg²⁺ 濃度で、行われる、ことを特徴とする、請求項 3 又は 4 に記載の二本鎖 RNA 基質の配列特異的な切断方法。

【請求項 6】

二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼであって、

前記二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼは、D94R 変異を含む SEQ ID NO 1 のアミノ酸配列を含み、および、二本鎖 RNA と複合したエンドリボヌクレアーゼ Mini III の構造のモデル中の二本鎖 RNA の主溝にあって主溝に相互に作用するループに一致する、二本鎖 RNA の主溝にあって主溝に相互作用しているループを有し、

前記二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖 RNA 基質中の特異的な配列は、以下の共通配列であり、

5' G A C C U C G 3'

3' C U G G A G C 5'、

および、前記二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼは、前記共通配列内で二本鎖 RNA の配列特異的な活性を示す、ことを特徴とする二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼ。

【請求項 7】

前記二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼによって認識される二本鎖 RNA 基質中の特異的な配列が、以下の共通配列である、

5' C G A C C U C G A G G 3'

3' G C U G G A G C U C C 5'、

ことを特徴とする請求項 6 記載の二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼ。

【請求項 8】

二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼを生成するための方法であって、

前記方法は、

請求項 6 又は 7 の二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼを発現させる工程を含む、ことを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 6 又は 7 の二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

【請求項 10】

請求項 9 の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 6 又は 7 の二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼを含むキット。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0077

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0077】

【表4】

位置83から96までの234bp二本鎖RNA置換ライブリーの切断。

「大文字」—当初の基質に関する二本鎖RNA切断効率、

「小文字」—低下した二本鎖RNA切断、

「-」は切断されていない

No	- - 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 - -	SEQ ID NO
当初の基質の配列	C G U C G A C C U C G A G G	30
G	G G G g G - - - - G G G G	
A	A A A a a A - - - A a A A A	47-88
U	U U U U u - - - U U u U U U	
C	C C C C - - C C - C - C C C	
優先配列	N N N Y G A C C U C G N N G	

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0090

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0090】

【表8】

エンドリボヌクレアーゼ BSUのアラニン置換変異体のエンドリボヌクレアーゼ活性。「+」—野生型エンドリボヌクレアーゼ BSU (BSU^{WT})に関する二本鎖RNA切断; 「+/-」—低下した二本鎖RNA切断; 「+/-」—低下した二本鎖RNA切断; 「-」—切断なし

エンドリボヌクレアーゼBSU ^{WT} 中のアミノ酸残基の置換	変異体のエンドリボヌクレアーゼ活性
K79A	+
R80A	+/-
R82A	+/-
N83A	+
K85A	-
S86A	+
T88A	+/-
K91A	-
N92A	+/-
D94A	+/-

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0091

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0091】

位置番号94(D94R)のアルギニンに対する置換変異体を作成した。タンパク質を工程3のように精製し、そのエンドリボヌクレアーゼ活性を2つの基質：バクテリオファージ6ゲノム、および、234bpの二本鎖RNAで試験した。好ましい切断部位を有している234bpの二本鎖RNAは、野生型酵素およびD94R変異体によって同様に切断された。38の共通な切断部位を有する6二本鎖RNAは、両方の酵素によって同じ効率では切断されなかった。D94R変異体による切断は、野生型の酵素と比較して、低下した。得られた結果を図5に示す。変異体D94Rは二本鎖RNAの優先配列に対する選択性を増加させていることがわかる。酵素の選択性の増加は、二本鎖RNAの配列認識および切断を狭める結果を招くことになる。上記の結果によって、二本鎖RNAの主溝にあるループは、二本鎖RNAの配列によってのみ決定されるとともに不規則な螺旋構造および/または他のタンパク質との協働からは独立している、二本鎖RNA切断時の配列特異性を決定することが明らかになった。該方法は、二本鎖RNA切断における配列特異性の増加を示す二本鎖RNAエンドリボヌクレアーゼの誘導体および/または変異体につながる選択も実証しており、好ましくは、二本鎖RNAの配列特異的な切断を含む誘導体および/または変異体を得る上記のような方法で、エンドリボヌクレアーゼ誘導体および/または変異体は、好ましくは、二本鎖RNAの切断における特異的な配列に対する感受性の変化、増大を伴って生成される。