

【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 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/22 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 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 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、D 9 4 R 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、D 9 4 R 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、

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、

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、

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、

5' G A C C U H G 3'

3' C U G G A D C 5'、

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' G A C C U C G 3'

3' C U G G A G C 5'、

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、

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、

5' G A C C U C G 3'

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60mMの塩化ナトリウム濃度で、1乃至2.5mM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置換ライブラリーの切断。

「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			47-88
A			A	A	A	a	a	A	-	-	-	A	a	A	A	A			
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。