

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-514921

(P2014-514921A)

(43) 公表日 平成26年6月26日(2014.6.26)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 12 N 15/113 (2010.01)	C 12 N 15/00	G 4 B 0 6 4
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02	C 4 C 0 8 4
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 C 0 8 6
A 61 K 31/7105 (2006.01)	A 61 K 31/7105	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-501947 (P2014-501947)	(71) 出願人	503359821 独立行政法人理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号
(86) (22) 出願日	平成24年3月30日 (2012.3.30)	(71) 出願人	513245912 インターナショナル スクール フォー アドバンスド スタディーズ
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月2日 (2013.12.2)	(71) 出願人	イタリア国 トリエステ バイア ボノメ ア 2 6 5
(86) 國際出願番号	PCT/JP2012/059430	(74) 代理人	110000338 特許業務法人HARAKENZO WOR LD PATENT & TRADEMA RK
(87) 國際公開番号	W02012/133947		
(87) 國際公開日	平成24年10月4日 (2012.10.4)		
(31) 優先権主張番号	61/469,399		
(32) 優先日	平成23年3月30日 (2011.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】機能性核酸分子、及びその利用

(57) 【要約】

本発明は、(a) タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列:とタンパク質合成効率向上の活性を有する制御配列を含む機能性核酸分子、および(b)当該機能性核酸分子の利用、を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と；

(b) 上記タンパク質合成効率を向上させる活性を有する制御配列と、
を含む、機能性核酸分子。

【請求項 2】

上記制御配列はSINE (Short Interspersed Element) 由来の配列を含んでいる、請求項1に記載の機能性核酸分子。

【請求項 3】

上記SINE由来の配列が、SINE-B2由来の配列である、請求項2に記載の機能性核酸分子。

【請求項 4】

上記制御配列が以下の(1)～(5)からなる群より選択される、請求項1に記載の機能性核酸分子。

(1) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA

(2) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA

(3) 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA

(4) (i) 配列番号1、2または3に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNAと少なくとも25%の類似性を有し、かつ、(ii)タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸、および

(5) (i) 配列番号1、2または3に示される塩基配列において、1以上で200以下の塩基が欠失、置換、付加、および/または挿入されたDNAによってコードされ、かつ、(ii)タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸。

【請求項 5】

上記ターゲット決定配列が当該機能性核酸分子における5'末端と制御配列との間に配置されている、請求項1～4の何れか一項に記載の機能性核酸分子。

【請求項 6】

上記ターゲット決定配列が7塩基以上で250塩基以下の長さを有している、請求項1～5の何れか一項に記載の機能性核酸分子。

【請求項 7】

上記ターゲット決定配列がタンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列、またはタンパク質合成効率を向上させる対象であるタンパク質をコードするRNAにおける始めの開始子コドン付近の配列に対して、少なくとも60%の類似性を有する、請求項1～6の何れか一項に記載の機能性核酸分子。

【請求項 8】

上記機能性核酸分子の上記制御配列が翻訳の方向に対して逆向きに配置されている、請求項1～7の何れか一項に記載の機能性核酸分子。

【請求項 9】

上記ターゲット決定配列がタンパク質をコードするRNAの5' - UTR (非翻訳領域) またはタンパク質をコードするRNAにおける始めの開始子コドン付近の配列にハイブリダイズするように設計された、請求項1～8の何れか一項に記載の機能性核酸分子。

【請求項 10】

(a) タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と；

(b) 上記タンパク質合成効率を向上させる活性を有する制御配列と、
を含むRNA分子を調製する工程を含む、機能性核酸分子の製造方法。

【請求項 11】

請求項1～9の何れか一項に記載の機能性核酸分子をコードするDNA分子。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の機能性核酸分子、または請求項 1 1 に記載の DNA 分子を含む、発現ベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の機能性核酸分子、請求項 1 1 に記載の DNA 分子または請求項 1 2 に記載の発現ベクターを含む、タンパク質合成効率を向上させる組成物。

【請求項 1 4】

(a) 請求項 1 ~ 9 の何れか一項に記載の機能性核酸分子を、タンパク質をコードする RNA の一部が機能性 RNA 分子の標的決定配列と類似性を有する当該タンパク質をコードする RNA と共に存させる工程、を含むタンパク質合成効率向上方法。

【請求項 1 5】

上記工程 (a) において機能性核酸分子または請求項 1 1 に騎士あの DNA 分子を細胞にトランスフェクトすることを含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 または 1 5 に記載のタンパク質合成効率向上方法によってタンパク質合成効率を向上させる工程を含む、タンパク質の製造方法。

【請求項 1 7】

タンパク質の量的現象によって引き起こされる疾患の治療方法であって、請求項 1 4 または 1 5 に記載のタンパク質合成効率向上方法によって、当該疾患または当該疾患の疾患素因を持つ被験者においてタンパク質合成効率を向上させる工程を含む、方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、(a) タンパク質合成効率を向上させる機能性核酸分子と、(b) 当該機能性核酸分子の利用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

現在、各種の機能性 RNA 分子群が知られており、代表的な機能性 RNA 分子の一例は、アンチセンス RNA 等の比較的長い機能性 RNA 分子である。代表的な機能性 RNA 分子の他の例は、sh (short hairpin) RNA 、 si (small interfering) RNA 、 mi (micro interfering) RNA 等の比較的短い機能性 RNA 分子である。これら機能性 RNA 分子は何れも遺伝子発現のダウンレギュレーションに寄与することが一般的によく知られている（非特許文献 1 ）。

30

【0 0 0 3】

アンチセンス RNA 技術は、ターゲット特異性に優れる。しかし、抗ウイルス応答を活性化するという欠点を有する。一方、sh RNA 等の比較的短い機能性 RNA 分子は、抗ウイルス応答を実質的に活性化しない。その代わりに、対象配列に対する高い特異性を維持することが難しいためオフターゲット効果を生じる可能性を持っている。したがって、比較的短鎖の機能性 RNA 分子は、アンチセンス RNA 手法に比べて低いターゲット特異性を示す傾向がある。

40

【0 0 0 4】

特許文献 1 では、ターゲット配列の発現抑制のための相補的な配列 ; Pol III タイプ III プロモーター ; と、少なくとも srp 9 と srp 14 タンパク質への結合ドメインを含む 7SL 小 RNA 由来配列（特には A1u 由来配列の断片）；を含む機能性核酸分子（DNA 分子）が開示されている。srp 9 と srp 14 のタンパク質は 7SL 複合体からの遺伝子転写において 7SL RNA に結合するタンパク質ファミリーの一員である。

特許文献 1 に開示された機能性核酸分子は、当該機能性核酸分子から転写された RNA 分子が実質的に抗ウイルス応答活性を引き起こさずに優れたターゲット特異性を持つ遺伝子発現抑制技術として利用されることが述べられている。

【0 0 0 5】

50

A l u は、S I N E s (Short Interspersed Elements)の一グループとして分類される。特許文献 1において開示されている機能性核酸分子のA l u 由来配列は特定の向きで挿入され、R N A 安定性に関係があると考えられていることに注意されたい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 6】

【特許文献 1】国際公開公報 W O 2 0 0 8 / 1 1 3 7 7 3 A 2 (国際公開日 2 0 0 8 年 9 月 2 5 日)

【非特許文献】

【0 0 0 7】

【非特許文献 1】He L, Hannon GJ. Nat Rev Genet. 2004 Jul;5(7):522-31. PMID 15211 354

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 8】

特許文献 1 やその他の文献において広く報告されているように、遺伝子発現を抑制する多くのタイプの機能性核酸分子等が報告されている。転写効率を向上させることで遺伝子発現を向上させる技術はいくつか報告されているが(Nature Chemical Biology 3, 166 - 173 (2007), B . Janowski et al. のケースのように)、転写効率の向上は、プラトー効果のためにタンパク質合成効率を直接的な割合で常に向上させる訳ではない。この点において、翻訳されるタンパク質の合成は、得られたRNAがリボソームとの効率的に接触できるかの能力を含めた、多くの他の因子に依存しているかもしれない。さらに、自然界に存在するm R N A の転写の上昇は、常に細胞や器官で可能なわけではない。即ち、直接的にタンパク質合成効率を向上させるいかなる機能性核酸分子も報告されていなかった。

20

【0 0 0 9】

本発明者らは、翻訳のみに機能することが求められる多くの場面があると考えた。例えば、細胞核内でのm R N A 転写リプログラミングは不要であることから、転写に干渉しないで治療目的のための動物のタンパク質の翻訳を増強することが強く望まれるだろう。

【0 0 1 0】

本発明は、上記の課題を解決するためになされたものである。本発明の目的は、タンパク質合成効率を向上させる機能性核酸分子と、当該機能性核酸分子の利用を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 1】

本発明者らの現在の知見から、タンパク質の翻訳はm R N A の翻訳画分の上流に位置するm R N A の領域の構造を含む因子によって制御されていると考えられる。この領域は、5' UTR(5' 非翻訳領域)として知られている。本発明の目的のためには、5' UTRは自然界に存在するもの(自然界において発見されたRNA、転写開始点から開始コドン)であっても良く、またはクローニングベクターやその他のリコンビナント配列などの人工物であってもよい。

40

【0 0 1 2】

上記の課題を解決するために、本願発明者らは鋭意検討を行なった。その結果、ノンコードィングR N A として知られるR N A 分子の機能の解析を通じて、そのようなR N A 分子のある特定の構造がタンパク質合成効率を向上させる機能を有するという驚くべき事実を本発明者らは見出した。当該機能性核酸分子は、ターゲット配列のアンチセンス配列を通じて特定の標的となるタンパク質に対して効果を示した。当該知見に基づき、本発明者らは、本発明を完成させた。

【0 0 1 3】

すなわち、本発明に係る機能性核酸分子は、

(a) タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするR N A にお

50

けるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と；
 (b) 上記タンパク質合成効率を向上させる活性を有する制御配列と、を備える。

【0014】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記制御配列は SINE (Short Interspersed Element) 由来の配列を含んでいる。具体的には、SINE 由来の配列は、tRNA 由来の SINE、例えば、SINE B2、IDエレメント、MEN、4.5S1、DIP 由来の配列、または、これらの配列もしくは類似の配列の複数個を別々のエレメントとして連結したものを含む配列であってもよい。SINE 由来の配列は、例えば、SINE 配列の一部によって形成された、実質的に可能性のある予測構造を含む配列であってもよい。

【0015】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記制御配列は以下の(1)～(5)からなる群より選択されるものであってもよい：

(1) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA によってコードされる RNA (AS_Uch11 における SINE / B2)

(2) 配列番号 2 に示される塩基配列からなる DNA によってコードされる RNA (AS_Uch11 における、SINE / B2、下線で示した 39nt のスペーサー、および SINE / Alu)

(3) 配列番号 3 に示される塩基配列からなる DNA によってコードされる RNA (AS_Uxt における SINE / B2)

(4) (i) 配列番号 1、2 または 3 に示される塩基配列からなる DNA によってコードされる RNA と少なくとも 25% の類似性を有し、かつ、(ii) タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸

(5) (i) 配列番号 1、2 または 3 に示される塩基配列において、1 以上で 200 以下の塩基が欠失、置換、付加、および / または挿入された DNA によってコードされ、かつ、(ii) タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸。

【0016】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記ターゲット決定配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA におけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含む。

【0017】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記ターゲット決定配列は、当該機能性核酸分子における 5' 末端と制御配列との間に配置されていてもよい。

【0018】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、7 塩基以上で 250 塩基以下の長さを有していることが好ましい。

【0019】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、タンパク質をコードする RNA におけるターゲット配列に対して、または、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA における ATG の上流のプラスミド配列に対して、少なくとも 60% の類似性を有することが好ましい。

【0020】

本発明に係る機能性核酸分子では、制御配列の方向を正とした場合での SINE 由来の配列の方向は、当該方向（上記で定義される正の方向）に対して逆方向に配向されており、SINE 由来の配列は、SINE のコンセンサス配列と同じ方向に配向されている。すなわち、上記機能性核酸分子の制御配列は、翻訳の方向に対して正方向に配向しており、かつ、アンチセンス核酸分子の転写の方向に対して逆方向に配向している。

【0021】

5' 3' 方向を正方向と定義すると、本発明における上記 SINE 由来の配列は、その 5' 3' 方向は上記 SINE のコンセンサス配列と一致しているが、本発明における機能性核酸分子の逆方向に埋め込まれている。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明に係る機能性核酸分子では、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAの5' - UTRにおけるターゲット配列とハイブリダイズするように設計されていてもよい。あるいは、上記ターゲット決定配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAのコード領域におけるターゲット配列とハイブリダイズするように設計されていてもよい。さらに、上記ターゲット決定配列は、タンパク質をコードするRNAのターゲット配列における開始コドン上流のプラスミド配列とオーバーラップしていてもよいし、タンパク質をコードするRNAのターゲット配列における開始コドンを含んでいてもよい。本発明に係る機能性核酸分子は、タンパク質をコードするRNAの5'末端における、または、当該分子の他の部分における特定のスプライシング変異体をターゲットとし得る。

10

【 0 0 2 3 】

本発明に係る機能性核酸分子は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と、タンパク質合成効率を向上させる活性を有する制御配列と、を備える限りにおいて、当業者によって、適宜、設計されて製造され得る。合成中または合成後のあらゆる修飾が、RNA療法学などの知識／方法に従って、当業者によって機能性核酸分子に適用され得る。

20

【 0 0 2 4 】

本発明に係るDNA分子は、上述の機能性核酸分子として、何れか1つの上記RNA分子をコードする。

【 0 0 2 5 】

本発明に係る発現ベクターは、上述の機能性核酸分子として、何れか1つの上記RNA分子または上記DNA分子を含む。

【 0 0 2 6 】

本発明に係るタンパク質合成効率を向上させる組成物は、何れか1つの上述の機能性核酸分子および／または上述の発現ベクターを含む。

30

【 0 0 2 7 】

本発明に係るタンパク質合成効率向上方法は、何れか1つの上述の機能性核酸分子または上述の発現ベクターを、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAと共に存させる工程を含む。上記タンパク質をコードするRNAは、上記機能性核酸分子のターゲット決定配列におけるアンチセンスとハイブリダイズ可能である。

【 0 0 2 8 】

本発明に係るタンパク質合成効率向上方法では、細胞に対して、何れか1つの上述の機能性核酸分子または上述の発現ベクターをトランスフェクトする（または形質導入する）工程を含んでいてもよい。

【 0 0 2 9 】

本発明に係るタンパク質合成方法は、タンパク質を合成する方法であって、何れか1つの上述のタンパク質合成効率向上方法によってタンパク質合成効率を向上させる工程を含む。

40

【 0 0 3 0 】

本発明に係る疾患の治療方法は、対象において、何れか1つの上述のタンパク質合成効率向上方法によってタンパク質合成効率を向上させる工程を含み、当該疾患は所定の正常タンパク質の量的減少またはハプロ不全に起因する。

【 0 0 3 1 】

本発明に係る治療方法では、上記対象は、疾患または疾患の素因を有していてもよく、当該疾患は正常タンパク質の量的減少またはハプロ不全に起因する。さらに、上記機能性核酸分子は、所定の正常タンパク質の合成効率を向上させるものであってもよい。

【 0 0 3 2 】

50

また、上記疾患が所定の正常タンパク質の量的減少またはハプロ不全に起因し、変異タンパク質のような異常タンパク質を包含する別のタンパク質の量的増加に起因する場合、本発明の治療方法は、適宜、従来の siRNA もしくは shRNA 等による当該別のタンパク質発現を抑制させる方法、および / または、従来の抗体もしくは低分子化合物等を用いたタンパク質機能を不活性化させる方法と併用することができる。

【0033】

また、本発明に係る治療方法では、上記疾患は、例えば、神経変性疾患または癌であつてもよい。

【発明の効果】

【0034】

本発明によれば、(a) タンパク質合成効率を向上させる機能を有する機能性核酸分子、および (b) 当該機能性核酸分子の利用を見事に提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、実験1に関するものであり、Uch11 / AS Uch11 のゲノム編成の概略図である。

【図2】図2は、実験2に関するものであり、AS Uch11 のドメイン編成の概略図である。AS Uch11 のエキソンは灰色で示されており；反復エレメントは赤色 (Alu / SINEB1) および青色 (SINEB2) で示されている。イントロンは線で表されている。

20

【図3】図3は、実験3に関するものであり、AS Uch11 がUchL1タンパク質のレベルを制御することを示す図である。AS Uch11 がトランスフェクトされたMN9D細胞は、mRNA量が変化することなく、空のベクターのコントロールと比較して、内因性のUchL1タンパク質のレベルの向上を示す。

【図4】図4は、実験4に関するものであり、AS Uch11 がUchL1タンパク質のレベルを制御することを示す図である。トランスフェクトするAS Uch11 の量を増加させると、HEK細胞のにおけるUchL1タンパク質の量が漸増する。Uch11 のmRNAレベルに変化はない。

【図5】図5は、実験5に関するものであり、AS Uch11 がUchL1タンパク質のレベルを制御することを示す図である。内因性 (MN9D細胞、左パネル) および過剰発現 (HEK細胞、右パネル) のUchL1タンパク質のレベルを制御するために、全長 (FL) のAS Uch11 が必要である。5'または3'欠失変異体の構成が示されている。

30

【図6】図6は、実験6に関するものであり、AS Uch11 が、埋め込まれたSINEB2を介して、UchL1タンパク質のレベルを制御することを示す図である。反転したSINEB2はUchL1タンパク質のレベルを調節するのに充分である。変異体の構成が示されている。

【図7】図7は、実験7に関するものであり、SINEB2が埋め込まれたAS転写物のファミリーを示す図である。タンパク質をコードする遺伝子のAS (アンチセンス) であり、反転した向きに埋め込まれたSINEB2を含む、FANTOM3ノンコーディングクローンのファミリー。

40

【図8】図8は、実験8に関するものであり、SINEB2が埋め込まれたAS転写物のファミリーを示す図である。Uxt / AS Uxt のゲノム編成の概略図。AS Uxt は、トランスフェクトしたMN9D細胞において、内因性のUxtタンパク質のレベルを向上させる (左) が、その転写に影響を与えない (右)。

【図9】図9は、実験9に関するものであり、ドーパミン作動性ニューロンの核におけるAS Uch11 の発現を示す図である。AS Uch11 (赤色) およびUch11 (緑色) の転写物は、黒質のTH陽性DAニューロンの核および細胞質において発現している (青色)。局在の詳細は拡大画像に示す。

【図10】図10は、実験10に関するものであり、MN9D細胞においてラバマイシン

50

処理後に AS Uch11 が細胞質へ移行することを示す図である。転写物の 5' オーバーラップ部または 3' 末端部に及ぶプライマーを用いて測定した mRNA レベル。データは平均 ± 標準偏差、n = 3 (3) を示す。** p < 0.01; *** p < 0.005。

【図 11】図 11 は、実験 11 に関するものであり、ラパマイシン処理が Uch11 タンパク質の発現を誘引することを示す図である。Uch11 タンパク質のレベルは、ラパマイシン処理した MN9D 細胞において向上する。

【図 12】図 12 は、実験 12 に関するものであり、AS Uch11 に埋め込まれた SINEB2 が、ラパマイシン処理後に Uch11 の翻訳を誘引することを示す図である。MN9D 細胞における AS Uch11 の転写のサイレンシング (shRNA、ターゲット配列の -15/+4 の位置を含んでいる) は、ラパマイシンに誘引された Uch11 タンパク質のレベルを抑制した。スクランブル、shRNA 制御配列。左、mRNA レベル；右、タンパク質レベル。

【図 13】図 13 は、実験 13 に関するものであり、AS Uch11 に埋め込まれた SINEB2 が、ラパマイシン処理後に Uch11 の翻訳を誘引することを示す図である。埋め込まれた SINEB2 の欠失 (SINEB2) は、ラパマイシンに誘引された Uch11 タンパク質の上方制御を抑制するのに充分である。

【図 14】図 14 は、実験 14 に関するものであり、人工的なヒト化強化緑色蛍光タンパク質 (Gfp) mRNA に対応する、SINEB2 が埋め込まれた人工的な AS 転写物 (AS Gfp) が、GFP タンパク質合成を向上させることを示す図である。図 14 の (a) は、Gfp / AS Gfp 構築物の概略図を示す。図 14 の (b) は、スクランブルのオーバーラップする配列または空のプラスミドはトランスフェクトした HEK 細胞において Gfp タンパク質のレベルを向上させない一方、AS Gfp はトランスフェクトした HEK 細胞において Gfp タンパク質のレベルをどのように向上させるかを示す。オーバーラップは 72 nt 長であり、ATG の中央にある。

【図 15】図 15 は、実験 15 に関するものであり、pHYGRO 中の人工的な組換え抗体 (pHYGRO クローン) に対応する、SINEB2 が埋め込まれた人工的な AS 転写物 (AS Fc クローン) が、pHYGRO にコードされているタンパク質の合成を向上させることを示す図である。a, pHYGRO / AS Fc 構築物の概略図。b, SV5 tag を介して検出したところ、AS Fc は、トランスフェクトした HEK 細胞においてコードされているタンパク質のレベルを向上させ、一方でスクランブルのオーバーラップする配列または空のプラスミドの場合では向上しない。

【図 16】図 16 は、実験 16 に関するものであり、人工的な緑色蛍光タンパク質 (EGFP) mRNA に対応する、SINEB2 が埋め込まれた人工的な AS 転写物が、どのように EGFP タンパク質合成を向上させるかを示す図である。

【図 17】図 17 は、SINEB2 由来の配列の、可能性のある予測構造を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0036】

以下、本発明の実施の形態について、より具体的に説明する。

【0037】

[1. 機能性 RNA 分子]

(機能性核酸分子の構成)

本発明に係る機能性核酸分子は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA におけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と；上記タンパク質合成効率を向上させる活性を有する制御配列と、を備えるという特徴を有する。本発明に係る機能性核酸分子は、本書の記載に基づいて、適宜、当業者において設計し、製造することができる。

【0038】

本発明によれば、タンパク質合成効率が向上する。一実施形態において、上記タンパク質合成効率は、翻訳効率における向上の結果として向上し、好ましくは転写効率を実質的

10

20

30

40

50

に変化させることなく向上する。それゆえ、翻訳効率が向上するにつれて、タンパク質合成効率が向上するものであってもよい。別の実施形態において、転写および翻訳の両方を、別々の方法によって向上させるができる；当然、RNAがより低い発現レベルとなり、さらにタンパク質がより高い発現レベルとなってもよい。

【0039】

(タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNA)

本発明に係る機能性核酸分子によりタンパク質合成効率が向上する、タンパク質をコードするRNAは、5'末端の開始コドンおよび3'末端の終止コドンを有している翻訳領域（コード領域）を含んでいるRNAであれば特にその配列、由来等は限定されない。具体的には、本発明に係る機能性核酸分子によりタンパク質合成効率が向上する、タンパク質をコードするRNA（ターゲットとなるRNA）は、5'キャップ構造、5'非翻訳領域（5'-UTR）および/または3'非翻訳領域をさらに含んでいてもよい。これらの領域は、細胞における内因性配列に由来してもよいし、人工的に合成した配列に由来してもよい。発現ベクターに遺伝子のオープンリーディングフレーム（コード配列）が位置しているORF eomeは、その一例である。

10

【0040】

また、3'非翻訳領域には、そのさらに3'末端にポリア配列が付加され得るための配列（ポリア付加シグナル）が含まれていることが好ましい。ポリア付加シグナルは、例えば、AAUAAAからなる塩基配列、2つのAAUAAA配列を含んでいるSV40 early polyA signal、またはSV40 early polyAシグナルがタンデムに並んでいる配列などであってもよい。ポリア付加シグナルはこれらに限定されない。例として、それ以外の様々なポリアデニル化部位が文献に記載されており、いくつかのmRNAでは従来のポリアデニル化シグナルすら保持していない（Carninci et al, Genome Res. 2003 Jun;13(6B):1273-89. PMID: 12819125）。

20

【0041】

本発明に係るタンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAは、その3'末端にポリア配列を有していてもよい。3'末端にポリア配列を有しているRNAは、翻訳ドメインからのタンパク質合成効率およびRNA自身の安定性に優れている。そのようなRNAは、例えば、Uchl1、Uxt、GFPに示される何れかのRNA、またはこれらの何れかのRNAのホモログであってもよいが、これらに制限されない。

30

マウス（Mus musculus）ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1（Uchl1）RefSeq: NM_011670.2

Uchl1 RNAをコードするUchl1 DNAの配列を配列番号4に示す。

マウス（Mus musculus）ubiquitously expressed transcript（Uxt）RefSeq: NM_013840.3

Uxt RNAをコードするUxt DNAの配列を配列番号5に示す。

GFP（pEGFPベクター由来の配列）

GFP RNAの配列をコードするGFP DNAの配列を配列番号6に示す。

40

【0042】

タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAは、生物由来の内因性RNA（例えば、mRNA）であってもよいし、人工的に合成されたものであってもよい。また、真核生物に由来するmRNAの範疇には、いわゆるプロセシングを受けた成熟mRNA、およびプロセシングを受ける前の前駆体mRNAも含まれる。

【0043】

(ターゲット決定配列)

上記ターゲット決定配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAにおけるターゲット配列に対するアンチセンス配列を含む配列である。ターゲット配列は、本発明においてタンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードするRNAの部分配列から任意に選択される。ターゲット配列は、タンパ

50

ク質をコードする cDNA が挿入されかつ最初の 5' 末端の開始コドンを囲むプラスミド DNA から転写される RNA 配列に由来してもよい。アンチセンス配列の長さは特に限定されない。しかしながら、異なる RNAs が含まれる系において、ターゲットとなる RNA に対する特異性を向上させる観点では、アンチセンス配列の長さは、7 塩基より長いことが好ましく、10 塩基より長いことがより好ましく、15 塩基より長いことがより好ましい場合がある。さらに、アンチセンス配列の長さは、250 塩基より短いことが好ましく、200 塩基より短いことがより好ましく、150 塩基より短いことがより好ましく、100 塩基より短いことがより好ましく、90 塩基より短いことがより好ましく、80 塩基より短いことがより好ましく、77 塩基より短いことがより好ましく、70 塩基より短いことがより好ましく、60 塩基より短いことがより好ましく、50 塩基より短いことがより好ましく、40 塩基より短いことがより好ましく、30 塩基より短いことがより好ましい場合がある。
10

【0044】

一実施形態において、ターゲット決定配列中に 2 以上の異なるアンチセンス配列が含まれていてもよい。例えば、複数のタンパク質をターゲットとするために、これらの複数のアンチセンス配列を適用することができる。あるいは、同一のタンパク質をコードする RNA とハイブリダイズ可能である複数のアンチセンス配列を、当該タンパク質をコードする RNA に対する特異性を向上させるために適用することができる。一実施形態において、長い二本鎖 RNA のような長い二本鎖核酸分子の存在により細胞中で起こり得る インターフェロンの反応を回避するために、本発明のターゲット決定配列は、ターゲットとなる RNA に対してミスマッチを含んでいてもよい。
20

【0045】

また、本発明の機能性核酸分子とターゲットとなる RNA との特異性を向上させる観点では、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA におけるターゲット配列および / または当該ターゲット配列を含むプラスミド由来 RNA とハイブリダイズが可能な限りにおいて、上記タンパク質をコードする RNA における対応ターゲット配列との間で、好ましくは少なくとも 60 % の相同性、より好ましくは少なくとも 70 % の相同性、より好ましくは少なくとも 75 % の相同性、より好ましくは少なくとも 80 % の相同性、より好ましくは少なくとも 85 % の相同性、より好ましくは少なくとも 90 % の相同性、より好ましくは少なくとも 95 % の相同性を有するように設計される。特に好ましくは、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列と、上記ターゲット配列の対応配列とが、完全に一致するように設計することである。
30

【0046】

また、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA の 5' - UTR にハイブリダイズするように設計することができる。この設計は、全長がコードされているタンパク質の合成に適用することができる。5' - UTR は、細胞における内因性の配列に由来してもよいし、人工的な配列に由来してもよい。上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、ターゲットとなる RNA のコード領域等の、上記ターゲット RNA の 5' - UTR 以外の領域にハイブリダイズ可能に設計してもよい。例えば、当該ターゲットとなる RNA のコード領域の所定の部分に、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列がハイブリダイズ可能に設計することができる。この設計は、RNA がコードするタンパク質が非常に大きく、かつそれ自体で生理活性を示すドメインを有する、ジストロフィン遺伝子等に有効である。
40

【0047】

さらに、上記ターゲット決定配列におけるアンチセンス配列は、5' UTR と、コード配列または上記タンパク質をコードする mRNA の 3' UTR のような、配列の他の機能性部分の一部との両方にハイブリダイズするように設計することができる。

【0048】

(制御配列)

本発明に係る機能性核酸分子では、上記制御配列が上記タンパク質合成効率を向上する活性を有している。

【0049】

本発明の一実施形態において、上記制御配列はSINE由来の配列を含んでいてもよい。具体的には、SINE由来の配列は、tRNA由来のSINE、例えば、SINE-B2、IDエレメント、MEN、4.5S1、DIP由来の配列であってもよい。さらに、Alu等の7SL-RNA由来の配列が上記制御配列に含まれていてもよい。

【0050】

一実施形態において、複数のSINE由来の配列が上記制御配列に含まれ得る。これらの複数のSINE由来の配列は、異なる配列と組み合わされていてもよく、例えば、SINE-B2由来の配列とAlu由来の配列との組み合わせ、または、異なるSINE-B2由来の配列の組み合わせであってもよい。

10

【0051】

SINE由来の配列は、全体的にまたは部分的に各種のSINEのコンセンサス配列と同一または類似の配列を指す。例えば、SINE-B2由来の配列は、全体的にまたは部分的にSINE-B2のコンセンサス配列と同一または類似の配列を指す。SINEのコンセンサス配列に対して切り詰めたSINE由来の配列であっても、タンパク質合成効率を向上させる機能を保持する限りにおいて本発明ではSINE由来の配列として使用することができる。SINE由来の配列は、例えば、SINE配列の一部によって形成された実質的に可能性のある予測構造を含む配列であってもよい。SINE-B2由来の配列の可能性のある予測構造の例は、図16の(a)および(b)に示されるとおりである。

20

【0052】

類似の配列とは、SINEのコンセンサス配列に対して、少なくとも25%の類似性、好ましくは少なくとも50%の類似性、より好ましくは少なくとも55%の類似性、より好ましくは少なくとも60%の類似性、より好ましくは少なくとも65%の類似性、より好ましくは少なくとも70%の類似性、より好ましくは少なくとも75%の類似性、より好ましくは少なくとも80%の類似性、より好ましくは少なくとも85%の類似性、より好ましくは少なくとも90%の類似性、より好ましくは少なくとも95%の類似性を有する配列を指す。

30

【0053】

SINEの配列は、上記のこれら保存されたコンセンサスに由来してもよい。例えば、配列番号1のSINE-B2断片、配列番号3、および文献(参照:Espinosa et al, <http://rnajournal.cshlp.org/content/13/4/583.full>)から無作為に取ってきた別のSINE-B2という3つの配列のみの間でのSINE-B2間のコンセンサス類似性の分析では、SINE-B2断片間のみで36塩基中少なくとも9塩基、わずか25%の類似性で共通し得ることを明白に示す。

30

【0054】

さらに、分岐しているにもかかわらず、これらはやはり、公知(Bioinformatics. 2000 Nov;16(11):1040-1. MaskerAid: a performance enhancement to RepeatMasker. Bedell JA, Korf I, Gish W.)のRepeatMaskのようなプログラムを用いてSINE-B2エレメントとして認識可能である。

40

【0055】

一実施形態において、上記長さは、タンパク質合成効率の向上を引き起こすことが可能な、SINEエレメントとの類似性を有する最も短い配列に限定することができる。

【0056】

一実施形態において、本発明で説明されるSINEエレメントと部分的な類似性を有し、かつ合成されたタンパク質のレベルを向上するよう作用する、人工的な核酸配列を合成することが可能である。

【0057】

50

また、本発明に係る機能性核酸分子は、タンパク質合成効率をさらに助長する目的で、タンデムに並んでいる複数の制御配列を含んでいてもよい。

【0058】

本発明の明細書において、「SINE」とは、非LTR (long terminal repeat)型のレトロトランスポゾンのうち、(a)逆転写活性およびエンドヌクレアーゼ活性等を有しないタンパク質をコードするものであって、かつ(b)生物のゲノム中に完全なまたは不完全なコピーが大量に存在する、散在性反復配列を広く指す。すなわち、SINEは、RNAからcDNAに逆転写され、ゲノムに組み込まれるDNA配列であるが、これらのプロセスを他の宿主の因子に依存したDNA配列である。SINEの長さは特に限定されないが、通常は、20bp以上、好ましくは30bp以上、より好ましくは50bp以上、より好ましくは50bp以上であり、700bp以下、好ましくは600bp以下、より好ましくは500bp以下、より好ましくは400bp以下の範囲内である。また、SINEの由来も限定されないが、通常はtRNA由来であってその5'末端側にtRNAに対応する配列を有する配列である。また、SINEは、Alu等の7SL RNA由来の配列、およびSINE3等の5SrRNA由来の配列であってもよい。SINE3に関しては、Kapitonovらによる文献 (Vladimir V. Kapitonov and Jerzy Jurka: Molecular Biology AND Evolution 20(5): p694-702, 2003) 等が参考される。

10

【0059】

上記制御配列は、例えば、以下の(1)～(5)から選択されてもよい：

- (1) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA
- (2) 配列番号2に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA
- (3) 配列番号3に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNA
- (4) (i) 配列番号1、2または3に示される塩基配列からなるDNAによってコードされるRNAと少なくとも25%の類似性を有し、かつ、(ii)タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸
- (5) (i) 配列番号1、2または3に示される塩基配列において、1以上で200以下の塩基が欠失、置換、付加、および/または挿入されたDNAによってコードされ、かつ、(ii)タンパク質合成効率を向上させる機能を有する核酸。

20

【0060】

欠失、置換、付加、および/または挿入される塩基の数は、好ましくは1以上で175以下であり、より好ましくは1以上で150以下であり、より好ましくは1以上で125以下であり、より好ましくは1以上で100以下であり、より好ましくは1以上で75以下であり、より好ましくは1以上で50以下であり、より好ましくは1以上で30以下であり、より好ましくは1以上で20以下である。

30

【0061】

(ターゲット決定配列と制御配列との位置的関係)

本発明では、ターゲットとなるタンパク質が翻訳される方向（センス鎖方向）を「正方向」と定義し、正方向と反対の方向を「逆方向」と定義する。本発明に係る機能性核酸分子では、ターゲット決定配列と制御配列との位置的関係は特に限定されない。しかしながら、上記ターゲット決定配列が、上記制御配列よりも、上記機能性核酸分子における正方向側に近接して配置されるものが好ましい。上記ターゲット決定配列と上記制御配列とは直結してもよい。あるいは、上記ターゲット決定配列と上記制御配列との間に、両者を連結するリンカー配列および/またはそのような配列が挿入されていてもよい。

40

【0062】

本発明に係る機能性核酸分子では、制御配列において正方向となるSINE由来の配列の方向が、当該方向（上記定義では正方向）に関して逆方向に向いており、SINE由来の配列がSINEのコンセンサス配列と同じ方向に向いていることが好ましい。すなわち、機能性核酸分子の制御配列は、翻訳の方向に関して正方向に向いている。

【0063】

5' 3' 方向を正方向と定義する場合、本発明におけるSINE由来の配列では、そ

50

の 5' 3' 方向が SINE のコンセンサス配列に一致しており、本発明における機能性核酸分子に逆方向で埋め込まれている。例えば、SINE B2 由来の配列のうちの 1つの場合において、SINE B2 由来の配列の A ボックス部位は、SINE B2 由来の配列の B ボックス部位よりも、機能性核酸分子の 3' 側に位置している。

【 0 0 6 4 】

(機能性核酸分子の製造)

本発明に係る機能性核酸分子の製造方法は、上述の RNA 分子を調製する工程を含む。機能性核酸分子は、公知の核酸合成法によって調製されてもよいし、あるいは、例えば、(i) 当該機能性 RNA 分子をコードする DNA 分子を作成し、(ii) 当該 DNA 分子を当該機能性 RNA 分子へと転写する方法によって調製してもよい。機能性核酸分子のサイズは特に限定されないが、例えば、核酸合成法で製造するという観点では、200 塩基以下のサイズが好ましく、250 塩基以下のサイズがより好ましい。

10

【 0 0 6 5 】

[2 . DNA 分子、発現ベクター、タンパク質合成効率向上させる組成物]

本発明に係る DNA 分子は、何れか 1 つの上述の本発明に係る機能性核酸分子をコードする。また、本発明に係る発現ベクターは、何れか 1 つの上述の本発明の機能性 RNA 分子を含む RNA ベクター、または、本発明に係る上記 DNA 分子を含む DNA ベクターである。また、本発明に係るタンパク質合成効率向上させる組成物は、何れか 1 つの上述の機能性核酸分子または上述の発現ベクターを含む。

20

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、本発明に係る上記組成物は、例えば、インビトロでタンパク質を製造するための網状赤血球抽出物；または、工業利用、研究目的、もしくはあらゆる他のスクリーニングのためのタンパク質を発現している哺乳動物細胞においてインビボでタンパク質を製造するための網状赤血球抽出物のような、インビトロ系をベースとした翻訳剤を含んでいてもよい。

【 0 0 6 7 】

本発明に係る上記発現ベクターのバックボーンは、特定の種類に特に限定されず、プラスミドベクターから適宜選択すればよい。プラスミドベクターは、用いる宿主細胞の種類および用途に応じて、哺乳動物、酵母、昆虫の発現ベクター、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスまたはレトロウイルス発現ベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター）、ファージベクター、コスミドベクター等であってもよい。例えば、本発明を、ヒトを含む哺乳動物の遺伝子治療に用いる場合には、アデノウイルスもしくはアデノ随伴ベクター、またはレンチウイルスベクター等のウイルスベクターを構築して調製すればよい。

30

【 0 0 6 8 】

あるいは、上記発現ベクターは、最終的に、ターゲットとなる発現細胞または生物のゲノムに組み込まれてもよい。

【 0 0 6 9 】

[3 . タンパク質合成効率向上方法]

(タンパク質合成効率向上方法)

本発明に係るタンパク質合成効率向上方法は、本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA とを共存させる工程を含む。この工程は、インビボで行うこともできるし、タンパク質無細胞合成系を用いたインビトロで行うこともできる。本発明において、「インビボ」は具体的には細胞培養または動物全体を用いる系を意味し、「インビトロ」は具体的には無細胞アッセイを用いる系を意味する。上記工程をインビボで行う場合は、単離した細胞または組織において、上記機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、タンパク質合成効率を向上させる対象である、タンパク質をコードする RNA とを共存させてよい。あるいは、生体において、上記機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、タンパク質合成効率を向上させる対象である RNA とを共存させてよい。

40

50

【0070】

本発明に係るタンパク質合成効率向上方法は、細胞に対して、上記機能性核酸分子をコードする上述の発現ベクター、または上記機能性核酸分子自体をトランスフェクトする工程を含み、このトランスフェクトする工程によって上記機能性核酸分子と上記タンパク質をコードするRNAとを共存をさせる方法であってもよい。「細胞」とは、単離した細胞のみならず、個体を構成している細胞も指す。上記タンパク質合成効率を向上させる対象であるRNAは、細胞における内因性の配列に由来してもよいし、人工的に合成したタンパク質をコードするRNAに由来してもよい。細胞へ核酸分子をトランスフェクト(遺伝子導入)する方法は、例えば、ベクターによる自律的な感染、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、ウイルス導入等、従来の方法で適宜行えばよい。上記ベクターは、宿主のゲノムに永続的に組み込まれてもよいし、組み込まれなくてもよい。

10

【0071】

上記細胞は、動物および植物を含むあらゆる生物からの細胞の何れかに由来してもよいし、樹立された細胞株から選択される細胞の何れかに由来してもよい。

【0072】

本発明において、動物としては脊椎動物が挙げられ、好ましくはヒトを含む動物であるが、これらの例に限定されない。

【0073】

本発明において、植物としては单子葉植物および双子葉植物の両方が挙げられる。一実施形態において、上記植物は、農作物(例えば、穀物および豆類、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、タピオカ、コメ、モロコシ、雑穀類、カッサバ、オオムギ、またはエンゴウ)、または他のマメ科植物である。別の実施形態において、上記植物は、野菜または観賞植物であってもよい。本発明の植物は:トウモロコシ(*Zea mays*)、カノーラ(*Brassica napus*、*Brassica rapa* spp.)、アマ(*Linum usitatissimum*)、アルファルファ(*Medicago sativa*)、コメ(*Oryza sativa*)、ライムギ(*Secale cereale*)、モロコシ(*Sorghum bicolor*、*Sorghum vulgare*)、ヒマワリ(*Helianthus annus*)、コムギ(*Triticum aestivum*)、ダイズ(*Glycine max*)、タバコ(*Nicotiana tabacum*)、ジャガイモ(*Solanum tuberosum*)、ピーナツ(*Arachis hypogaea*)、ワタ(*Gossypium hirsutum*)、サツマイモ(*Lopmoea batatas*)、カッサバ(*Manihot esculenta*)、コーヒー(*Coffea* spp.)、ココナツ(*Cocos nucifera*)、パイナップル(*Anana comosus*)、カンキツ属の木(*Citrus* spp.)、ココア(*Theobroma cacao*)、チャ(*Camellia senensis*)、バナナ(*Musa* spp.)、アボカド(*Persea americana*)、イチジク(*Ficus casica*)、グアバ(*Psidium guajava*)、マンゴー(*Mangifer indica*)、オリーブ(*Olea europaea*)、パパイヤ(*Carica papaya*)、カシュー(*Anacardium occidentale*)、マカダミア(*Macadamia intergrifolia*)、アーモンド(*Prunus amygdalus*)、テンサイ(*Beta vulgaris*)、オートムギ、またはオオムギであってもよいが、これらの例に限定されない。

20

30

【0074】

本発明において、上記樹立された細胞株としては、COS-1(ATCC No.CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、ヒト胎児腎細胞株293(ATCC NO.CRL 1573)、PerC6(Crucell)、仔ハムスター腎細胞(BHK)(ATCC CRL.1632)、BHK570(ATCC NO: CRL 10314)、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO(例えば、CHO-K1、ATCC NO: CCL 61、DG44等のDHFR minus CHO細胞株、特に懸濁培養に適応したCHO細胞株、マウスセルトリ細胞、サル腎細胞、アフリカミドリザル腎細胞(ATCC CRL-1587)、HeLa細胞、SH-Y5Y細胞、イヌ腎細胞(ATCC CC-L 34)、ヒト肺細胞(ATCC CCL 75)、Hep G2および骨髄腫またはリンパ腫細胞(例えばN SO(US 5,807,715を参照))、Sp2/0、YO、他の動物由来細胞(Sf9細胞、DT40等)が挙げられるが、これらの例に限定されない。さらに、上記樹立された細胞株は、ハイブリドマ、または遺伝子導入、核移植および/もしくは化合物処理によって特定の特徴を与えた細胞でもよく、例えば、核移植した胚性幹細胞またはiPS細胞(国際公開第WO 2007/069666号、特開2010-273680、特開2010-284088、

40

50

特開2011-50379、特開2011-4674等)、ニューロン幹細胞もしくはiPS細胞等から分化したニューロン細胞、または再プログラミングされた線維芽細胞等に由来するニューロン細胞が挙げられるが、これらの例に限定されない。

【0075】

本発明に係るタンパク質合成効率方法は、RNAからの翻訳効率の向上を最適にもたらす。タンパク質合成効率の向上とは、本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターをターゲットとなるRNAと系内で共存させない場合と比較して、タンパク質合成効率が向上することを指す。タンパク質合成効率の向上の程度は特に限定されないが、上記タンパク質合成効率方法によって合成されるタンパク質量は、上記機能性RNA分子をターゲットとなるRNAと系内で共存させない場合に產生されるタンパク質量と比較して、少なくとも1.5倍になることが好ましく、少なくとも2倍になることがより好ましい。10

【0076】

上記機能性核酸分子または上述の発現ベクターをターゲットとなるRNAと系内で共存させる場合、当該機能性核酸分子(または当該発現ベクター)と、当該ターゲットRNAとの量比は特に限定されないが、例えば、1:1~1:10の範囲内にすればよい。

【0077】

(タンパク質合成方法)20

上述の本発明に係るタンパク質合成効率向上方法は、タンパク質合成方法として用いることができる。すなわち、本発明に係るタンパク質の合成方法は、ターゲットとなるタンパク質の製造方法であって、上記何れかのタンパク質合成効率向上方法によってタンパク質合成効率を向上する工程を含む製造方法である。好ましくは、上記ターゲットとなるRNAからのタンパク質翻訳効率の向上によって、上記ターゲットとなるタンパク質を効率的に合成する。

【0078】

本発明に係るタンパク質合成方法において、合成されるタンパク質の一例は抗体であり、具体的には、抗体の軽鎖もしくは重鎖または両方、または抗体の単鎖組換え体の合成である。抗体の合成は、好ましくは、インビトロ系または単離した細胞系を用いて行い、当該系中に、本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、タンパク質合成効率を向上させるターゲットとなるRNAとを共存させる。

【0079】

(疾患の治療方法)30

本発明に係るタンパク質合成効率向上方法は、例えば、所定の正常タンパク質の量的減少に起因する疾患の治療に利用可能である。当該疾患は特に限定されないが、例えば、筋ジストロフィー等の筋変性疾患；アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、およびタンパク質のコードのレベルにおける三塩基反復性疾患(すなわち、ハンチントン病)またはDNA/RNAレベルにおける三塩基反復性疾患(すなわち、脆弱X)等の神経変性疾患；等が挙げられる。

【0080】

さらに、本発明は、アポトーシス促進タンパク質の発現または腫瘍の治療における腫瘍抑制タンパク質(例えば、p53ファミリーメンバー)の発現を向上させることを通じて、腫瘍の治療に適用可能である。40

【0081】

そのような腫瘍としては癌が挙げられ、そのような腫瘍は、癌腫、メラノーマおよび肉腫、膀胱癌腫、脳腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸腫瘍、食道腫瘍、子宮内膜腫瘍、肝細胞癌、胃腸間質性腫瘍、喉頭腫瘍、肺腫瘍、骨肉腫、卵巣腫瘍、膵臓腫瘍、前立腺腫瘍、腎細胞癌、皮膚腫瘍、または甲状腺腫瘍を含む腫瘍の何れかであってもよいが、これらに限定されない。

【0082】

上記治療方法は、対象の体内において、本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、ターゲットとなるRNAとを共存させる工程を含む上述のタンパク質合成効

10

20

30

40

50

率向上方法によって、タンパク質合成功率を向上させる工程を含む。この工程では、上記機能性核酸分子自体、または上述の発現ベクターを、上記対象の細胞に対してトランスフェクトする。上記ターゲットとなるRNAは、上記対象の細胞における内因性のRNA(mRNA等)であってもよいし、人工的に合成したRNAであってもよい。あるいは、上記ターゲットとなるRNAまたは当該RNAをコードするDNAを、上記対象の細胞に対してトランスフェクトしてもよい。

【0083】

また、本発明に係るタンパク質合成功率向上方法は、疾患を抑制するタンパク質性の因子(例えば、インターフェロン、またはアポトーシス誘導因子等)を対象の体内で増産させることを通じて、疾患の治療に適用可能である。例えば、本発明を用いて増産したアポトーシス誘導因子を、腫瘍等の治療に効果的に用いることができる。10

【0084】

上記治療方法は、対象の体内において、本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、疾患を改善するタンパク質をコードするターゲットとなるRNAであって、当該機能性核酸分子のターゲット決定配列におけるアンチセンス配列にハイブリダイズするものとを共存させる工程を含んでもよい。この工程では、上記機能性核酸分子自体または上述の発現ベクターを、対象の細胞に対してトランスフェクトする。上記疾患を改善するタンパク質をコードするRNAは、上記対象の細胞における内因性のRNAであってもよい。あるいは、上記疾患を改善するタンパク質をコードするRNAまたは当該RNAをコードするDNA分子を、対象の細胞に対してトランスフェクトしてもよい。20

【0085】

上述の治療方法は何れも、対象の体内に移植されることを前提とした単離細胞に対する前処理として行うこともできる。当該細胞は、治療および移植の前に対象の体内から単離してもよい。上述の治療方法は、(a)本発明に係る機能性核酸分子または上述の発現ベクターと、ターゲットとなるRNAとを単離細胞内において共存させる工程と；(b)工程(a)後に当該細胞を対象の体内に移植する工程とを含む治療方法であってもよい。単離細胞は、分化能を有する細胞であってもよく、例えば、胚性幹細胞(ES細胞)、胚性生殖細胞(EG細胞)、体性幹細胞、特に多能性の成人の前駆細胞、幹細胞、造血幹細胞、血管内皮幹細胞、間葉系幹細胞、肝臓幹細胞、神経系幹細胞、内皮幹細胞、脾臓幹細胞、始原生殖細胞、Muse細胞のような多系統に分化する細胞(Kuroda et al., 2010, PNAS)が挙げられる。また、単離細胞は、人工的な未分化細胞であってもよく、例えば、核移植胚性幹細胞、または、誘導性多能性幹細胞(iPS細胞(国際公開第WO2007/069666号、特開2010-273680、特開2010-284088、特開2011-50379、特開2011-4674等))のような遺伝子導入および/もしくは化合物処理により多能性を獲得した細胞が挙げられる。また、単離細胞は、線維芽細胞または再プログラミング後に別の体細胞になる能力を獲得した成人体細胞であってもよい。また、(a)の後で(b)の前に、上記単離細胞を未分化増殖させてもよい。あるいは、(a)の後で(b)の前に、上記単離細胞を分化させて分化細胞または分化細胞群(細胞シート等)を得て、当該分化細胞または分化細胞群を上記体内に移植してもよい。30

【0086】

上記対象とは、ヒトを含む動物を指し、好ましくはヒトを含む哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。また、上記対象とは、概して、(a)既に疾患の症状を示している者、および(b)遺伝子上に疾患の素因はあるが疾患の症状をまだ示していない者を含む概念である。この観点から、本発明において、「治療」の概念には、疾患の治療的処置および予防的処置が含まれる。40

【実施例】

【0087】

本発明について、以下の実施例、及び比較例等に基づいてより具体的に説明する。本発明はこれに限定されないことに注意されたい。

【0088】

10

20

30

40

50

実施の態様と具体的な実施例は、本発明の技術的詳細を例示するものであり、それらの実施様態や具体的実施例に限定され狭く解釈されるものではなく、むしろ本発明の精神により多くの変形形態に適用され、それらの変形形態は以下に記載される特許請求項の範囲を超えない。

【0089】

(合成PARK5/Uchl1遺伝子座におけるアンチセンス転写)

FANNTOM2クローンRik6430596G22は、推定のスプライスされたアンチセンス(AS)ノンコーディングRNA(ユビキチンC末端水素化酵素1(UCHL1) 遺伝子7のncRNA9)として特定された(実験1)。Uchl1は脱ユビキチン化酵素、ユビキチンライゲース、もしくはモノユビキチンスタビライザーとして働く神経特異的タンパク質である(参照1; Liu, Y., Fallon, L., Lashue1, H.A., Liu, Z. & Lansbury, P.T., Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111, 209-218 (2002)..、参照2; Osaka, H., et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 12, 1945-1958 (2003).)。これは、パーキンソン病(PARK5)の常染色体優位性の変異である(参照3; Leroy, E., et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451-452 (1998))。散発性の死後脳の黒質(SN)においてUchl1の発現は減少しており、aSYN凝集体の形成と相關していることが発見された。またUchl1活性の欠失はレビー小体型認知症(DLB)とアルツハイマー病(AD)とも関連している。Uchl1の異所性発現はマウスマルクスモデルにおけるアミロイドに起因するシナプス機能の損失と文脈依存記憶を回復するため、Uchl1発現の増加はADへの治療戦略として提唱されている(参照1、参照4; Butterfield, D.A., et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 22, 223-232 (2006)..、参照5; Castegna, A., et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82, 1524-1532 (2002)..、参照6; Choi, J., et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chern* 279, 13256-13264 (2004).)。

10

20

30

【0090】

Rik6430596G22は、Uchl1の2番目のイントロン中で開始してAUGコドンを含むセンス(S)mRNAのはじめの72塩基と一致する、典型的な5'末端で直接対応する転写物である。転写物のうち一致していない部分には、Repeatmaskerにより特定された2つの埋め込まれた繰り返し配列、SINEB2とAluが含まれている。FANTOM2 cDNAクローンは70kbのゲノム領域にわたっており、伝統的なGT-AG則に従いイントロンジャンクションする、4つのエクソンからなるスプライスされた転写物である(実験2)。開示の残りの部分においては、Rik6430596G22は、自然界のUchl1のアンチセンス転写物(AS Uchl1)として言及される。

【0091】

AS Uchl1は、埋め込まれた逆向きSINE2リピートを必要とするメカニズムによりUchl1タンパク質レベルを増加する。

40

【0092】

次に、S(センス)とAS(アンチセンス)転写物の相互作用を調べた。5' rapid amplification of cDNA ends(RACE)法を用いてMN9D細胞からAS Uchl1の完全長cDNAのクローニングを行った後、CMVで動くAS Uchl1をドーパミン作動性MN9D細胞にて一過性で過剰発現し、内在性Uchl1 mRNAとタンパク質レベルをqRT-PCRとウェスタンプロットティングにて測定した。Uchl1 mRNAの内在性レベルには有意な変化は観察されなかったが、Uchl1タンパク質産物の強力で再現性のある発現上昇が24時間以内に検出された(実験3)。本発明者は、いずれの転写物も発現しないHEK細胞に両方のcDNAを共トランスクレクトさせることで、MN9D細胞で観察された結果が再現しうるかの検証を行った。マウスマルクスと共トランスクレクトさせることで、MN9D細胞で観察された結果が再現しうるかの検証を行った。

50

ンスフェクトするAS Uchl1の量を増加させると、外来性のAS Uchl1 mRNAレベルに優位な変化がないままにAS Uchl1の用量依存的にUchl1タンパク質の発現上昇が認められた(実験4)。この特異的な効果は、GFPのような関係のない対照では観察されなかった。Uchl1タンパク質に対しての機能性を付与するAS Uchl1 mRNAの配列および/または構造要素を特定するため、欠失変異体を作製し、HEK細胞での共トランスフェクトと同様にとMN9D細胞にて検証した。5'末端側の第一エクソンを欠失したAS Uchl1欠失コンストラクト(AS Uchl1 3')、もしくは最後の3つのエクソンを欠失したコンストラクト(AS Uchl1 3')は、MN9DとHEK細胞のいずれにおいてもUchl1タンパク質レベルを発現させることができず、AS Uchl1の機能において5'末端、3'末端の両方の部分が重要であることが示唆された(実験5)。

10

【0093】

次に、埋め込まれた繰り返し配列、AluとSINEB2のUchl1タンパク質の発現上昇における役割を評価するため更なる欠失変異体が合成された。

【0094】

SINEB2とAluの両方のリピートエレメントを含む領域の標的欠失(AS Uchl1 SINEB2+ALU)はUchl1タンパク質の発現を阻害した。単一のリピートエレメントの欠失(-SINE B2(764-934)と-ALU(1000-1045))により、SINEB2がUchl1タンパク質増加に必要な転写物の機能領域であることが明らかにした(実験6)。すべての実験において、野生型AS Uchl1と欠失コンストラクトのトランスフェクションによってUchl1 mRNAレベルの変化が検出されることはなかった。

20

【0095】

さらに、-SINEB2変異体は完全長AS Uchl1に対してドミナントネガティブ活性を持っている。

【0096】

-SINEB2欠失変異体は、AS Uchl1 RNAの二次構造を潜在的に損なうことになる170塩基を欠いているため、764-934塩基の間で反転されたSINEB2配列を持つ変異体を作成した。興味深いことに、反転したSINEB2はUchl1タンパク質レベルを上昇させることができず、AS Uchl1に埋め込まれたSINEB2ドメインは方向依存性で活性を持つことを証明した(実験6)。

30

【0097】

AS転写物に埋め込まれた反転したSINEB2繰り返し配列を持つS/AS(センス/アンチセンス)対はノンコーディングRNAの新規機能のクラスが同定された:

ノンコーディングcDNAのFANTOM3コレクションから、正方向でのSINEB2エレメント(B3サブクラスと、タンパク質をコードする遺伝子と5'末端で直接対応でのオーバーラップ)を含む、自然界のAS転写産物の他の例を生物情報学的に探索した。これにより、Uchl1/AS Uchl1の構造と同様な31のS/AS対を特定した(実験7)。

【0098】

Uchl1/AS Uchl1での観測が他の例に一般化されるか検証するため、Uxt(ubiquitously-expressed transcript)のASオーバーラップ転写物、As Uxt(Rik4833404H03)をクローニングして強制発現させた。ドーパミン作動性MN9D細胞にAS Uxtをトランスフェクトしたことにより、総mRNAレベルの変化はないままにUxtタンパク質は発現上昇し、より一般的なメカニズムが働いていることを確認した(実験8)。

40

【0099】

AS Uchl1はドーパミン作動性神経において発現して、細胞核に拡充する転写物である。

:

マウス成体組織パネルと肉眼で切り取った脳領域と神経細胞株におけるマルチプレックスRT-PCTにより、AS Uchl1発現は中脳腹側部、皮質とMN9Dドーパミン作動性細胞に限られ、神経組織でない組織、細胞株では見られないことが分かった。Uchl1のオーバーラップ領域ではない部分を標的としたリボプロープでのダブルインサイチューハイブリダイゼーションにより、mRNAは、脊椎や中脳腹側部と同様に、海馬、皮質、皮質下領域の細胞の細

50

胞質に多く分布していることが示された。抗チロシンヒドロキシラーゼの免疫組織蛍光染色とダブルインサイチューハイブリダイゼーションの組み合わせにより、Uchl1とASのmRNAはSNの同じDA神経において発現していることが示された。興味深いことに、S/AS対の転写物は、二つの異なる細胞小器官に広く局在化していた。成熟Uchl1 mRNAは主に細胞質で観察されたが、AS RNAは細胞核、特に核内領域に凝集していた（実験9）。近年、50%の細胞の転写物は細胞核内に拡充し、おもに機能の不明なノンコーディングRNAからなることが発見された。細胞核に留まっているRNAは、paraspeckleと呼ばれる領域に凝集する傾向があり、AS Uchl1の局在部位や関連性が埋め込まれたSINEによって制御されている点において、きわめて似通っている。（参照7；Chen, L.L., DeCerbo, J.N. & Carmichael, G.G. Alu element-mediated gene silencing. *Embo J* 27, 1694-1705 (2008).）

10

RACEの優位性により、AS Uchl1遺伝子の正確な転写開始点（TSS）をMN9D細胞においてマッピングした。実験2に示すように、TSSはこれまでに注釈付けされた配列の上流250bp、Uchl1の2番目のイントロンの中に位置している。

【0100】

AS Uchl1はパーキンソン病神経化学モデルやヒト死後脳において発現が抑制されている。
。：

次に、マウスゲノム網羅的なAS Uchl1遺伝子座における70-kb領域を、Genome Vista alignment(<http://genome.lbl.gov/cgi-bin/GenmeVista>)を使ってヒトゲノム配列と比較した。CSTピークと対応するヒト配列上にデザインされたプライマーを用いて、1.6kbのノンコーディングRNA転写物、ヒトUCHL1遺伝子に5'末端で直接対応するアンチセンスを、ヒト脳RNAからクローニングした。ヒトAS Uchl1遺伝子の解剖学的構成は、埋め込まれたリピートエレメントの存在と同様にS/AS対のオーバーラップ領域を含むマウスのそのカウンターパートと酷似していた。ヒトAS Uchl1の発現は、マウスで確認されたように神経組織では高度に制限されていた。

20

【0101】

UCH-L1タンパク質の合成は、ラパマイシン処理により、細胞核-細胞質間輸送、AS Uchl1 RNAとAS依存的なUchl1 mRNAの活性ポリソームへの輸送を通して上昇した。

【0102】

今までのところ、AS ncRNAはS mRNAの量の変化を伴わずSタンパク質レベルを上昇させる。生理学的状態においてS mRNAとAS ncRNAは異なる細胞内器官に局在していると考えられることから、細胞核内のAS ncRNAを、翻訳が行われる場となる細胞質へ再輸送する能力においてPDの病理において関係あるとされているいくつかのストレス因子について試験した。MN9D細胞を、1mM過酸化水素水、血清飢餓状態、1 μg/mlラパマイシン、20nMツニカマイシン、20nM TNFで45分間さらし、細胞質および細胞核のAS Uchl1 mRNA量をqRT-PCRによりそれぞれ測定した。処理のほとんどは効果を示さなかったが、ラパマイシンは細胞質のAS Uchl1 mRNAの量を大幅に発現上昇させた（実験10）。

30

【0103】

ラパマイシンは、mTORCへの効果とその結果起くるS6Kと4E-BP1活性の抑制を通じてのCAP依存型の翻訳阻害剤としてよく知られている。現在、抗がん剤として試験中であり、神経変性疾患での臨床試験も提案されている。ラパマイシンによる翻訳開始の阻害は、LRRK2の優性なパーキンソン病関連の変異の過剰発現の場合と同様に、parkinとpink1をノックアウトされたハエで観察されるドーパミン作動性神経細胞の欠失を回復することができる（参照8；Tain, L.S., et al. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci* 12, 1129-1135 (2009).）。さらに、ラパマイシンはインビトロおよびマウスの実験において哺乳動物ドーパミン作動性神経細胞を神経化学中毒から保護する（参照9；Malagelada, C., Jin, Z.H., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. & Greene, L.A. Rapamycin protects against neuron death in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 30, 1166-1175 (2010).）、参照10；Malagelada, C., Ryu, E.J., Biswas, S.C., Jackson-Lewis, V. & Greene, L.A. R TP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigra neurons and mediates dea

40

50

th In cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. J Neurosci 26, 9996-10005 (2006)。近年、ラパマイシンは、パーキンソン病治療の一般的な重篤な運動副作用であるL-DOPA誘導型の運動障害の予防も示されている(参照11; Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E. & Fisone, G. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. Sci Signal 2, ra36 (2009))。

【0104】

細胞質内アンチセンスUchl1量に対するラパマイシンの効果は、併せて起こる細胞核の定常状態でのレベルの減少と、AS Uchl1のデノボ転写物がないことから確認された(実験10)。これらの転写物の細胞内の総量は一定であった。Uchl1 mRNAの細胞内分布、デノボ転写、または細胞内総量には変化がなかった。

【0105】

CAP 依存型の翻訳における阻害にも関わらず、ラパマイシン処理においてUchl1タンパク質レベルは数倍上昇した(実験11)。

【0106】

本発明者らは、AS Uchl1がUchl1の発現に必要なか確認した。RACEにより特定されたTSS周辺のアンチセンスUchl1プロモーター領域-4から+15塩基を標的とした、AS Uchl1に対するshRNAを恒常に発現するMN9D安定細胞株を構築した(参照12; Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V. & Morris, K.V. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. Nucleic Acids Res 37, 2984-2995 (2009))。予想通り、スクランブルの細胞では、MN9D親細胞株と比べてUchl1タンパク質の発現上昇が示されたが、一方でAS Uchl1に対するshRNAを発現する細胞ではUchl1タンパク質レベルは変化していない、これは、ラパマイシンによるUchl1タンパク質の発現とAS Uchl1 ncRNAに因果関係のある関連性があることを証明している(実験12)。独立した実験モデルとして、AS Uchl1(-SINEB2)のドミナントネガティブ変異を発現する安定細胞株を構築した。空ベクターの対照MN9D安定細胞株をラパマイシン処理したところ、Uchl1 タンパク質レベルは上昇した。AS Uchl1 のドミナントネガティブフォームの存在下では、この発現上昇はまったく観察されなかった(実験13)。

【0107】

ラパマイシン処理によるS コーディングタンパク質レベルにおけるAS依存性の上昇のためのモデル :

成長中の細胞において、mTORC1シグナルは、増殖と下流の基質である4E-BPとS6Kのリン酸化を介したCAP依存型翻訳機構の制御に必要である。細胞増殖抑制剤であるラパマイシンはmTORC1活性を阻害し、CAP依存型の翻訳の阻害を引き起こす。ここで、本発明者らはこれらの条件でAS 転写物は選択されたmRNAのタンパク質合成において必要であることを示す。ラパマイシン添加において、細胞核に拡充したncRNA AS Uchl1は、Sタンパク質をコードするmRNAを翻訳のためポリソームとパートナーを組ませる場である細胞質に輸送される。

【0108】

従って、AS Uchl1は哺乳ゲノム内でのS/AS対に関連し、2つのドメインからなるncRNAの新規な機能を持つクラスのメンバーの代表である。5'でのオーバーラップ領域は、相補鎖から転写されるタンパク質をコードするmRNAパートナーに対して特異性を提供する。3'の反転したSINEB2エレメントは翻訳活性化の為に必要で、細胞質において埋め込まれたSINEB2の新しい機能を示す。

【0109】

インビボにおけるUchl1発現の操作は、PDとADを含む神経変性疾患の治療が提案されてきた。埋め込まれたりピートエレメントを持つ自然界のAS 転写物は、選択されたmRNAのタンパク質合成を上昇させる内在性分子ツールを代表しているかもしれない、新しいクラスのRNA医療を示唆している。

【0110】

10

20

30

40

50

現在、ラパマイシンは神経変性疾患用の神経保護薬として、そして抗がん剤として、集中的に精査が行われている。マウスにおいて、ラパマイシンは、PD治療における一般的な重篤な副作用であるL-DOPA誘導型運動障害を予防する。さらにショウジョウバエ遺伝学モデルにおいてアポトーシスやホルムラ類における神経化学中毒からニューロンを保護し、抗パーキンソン治療の魅力的な分子となっている(参照11; Santini, E., Heiman, M., Enggard, P., Valjent, E. & Fisone, G. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. Sci Signal 2, ra36 (2009).)。したがってインビオでの作用機序と、PDでよく知られた症例に関連した経路での相互作用をより理解することが、ここでUchl1で示したように重要である。ラパマイシン誘導型タンパク質合成におけるAS転写物の役割は、予想外の活性化スイッチとなる。

10

【0111】

EGFP発現あるいは抗体発現を増加させる人工合成ASは細胞内における各標的の発現を上昇させる。:

本発明者らは、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)に対する72塩基長のターゲット決定配列アンチセンスをAS Uchl1における適切な配列位置に挿入した合成RNAで、タンパク質合成が達成されるか否かを検証した。実験14の通りに、EGFPを発現上昇させる人工ASの発現を設計した。人工ASをコードする断片をpcDNA3.1ベクター(Invitrogen)にクローニングした。これにより、ターゲット決定配列と制御配列を持つ機能性核酸分子はいかなる目的遺伝子のタンパク質合成効率を向上できることを証明した。本発明について、以下の実施例、及び比較例等に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

20

【0112】

同様にして、実験15に示すように抗体に対しても適用した。組換え抗体を発現上昇させる人工ASは、組換え抗体のリーダー配列を標的にするように設計され(オーバーラップはATG周辺72bp)、ベクター(AS Fc)へ埋め込んだ。対照としてターゲット決定配列がスクランブル配列からなる人工ASも作製した(スクランブル)。抗体のターゲット配列はpHYGROベクター(pHYGRO)に含まれていた。pHYGROおよびAS Fcまたは対象をHEK細胞に共トランスフェクトした。HEK細胞での一過性のトランスフェクションにより、細胞抽出液においてAS Fc特異的な組換え抗体の発現上昇が示された。SVタグで検出した結果、AS FcはHEK細胞におけるコードされたタンパク質のレベルを上昇させたが、配列にオーバーラップするスクランブルまたは空ベクターでは示さなかった。本発明について、以下の実施例、及び比較例等に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

30

【0113】

さらなる検証のため(実験16)、製造元指示書に従いリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いてEGFP発現ベクターであるpECFP-C2(Clontech)をHEK細胞株にトランスフェクトした。その後、EGFP発現を弱く発現する形質転換体を選択した。AS GFPはEGFPに対するターゲット決定領域を含み、EGFPタンパク質合成効率を向上させるよう人工的に設計した(図16)。安定形質転換体に、さらにAS GFPをコードするベクターもしくは対照ベクターをトランスフェクトした。アンチセンスGFPもしくは対照ベクターのトランスフェクションから24時間後もしくは48時間後に細胞を回収し溶解した。細胞抽出液中のGFPレベルはウェスタンプロテティングで測定した。形質転換体におけるEGFPの低発現は、AS GFPコンストラクトをトランスフェクションすることで上昇した(図16)。

40

【0114】

さらなる実験において、EGFPのATGコドンまでのプラスミドバックボーン44塩基にオーバーラップする標的決定配列を持つコンストラクトを合成した。このコンストラクト(SIN Eup005)は標的遺伝子のタンパク質合成を非常に効果的に上昇させた(10倍以上)。

【0115】

したがって、これは本発明者らが見出したASの新しいタイプは、タンパク質合成効率を上昇させる対象となるタンパク質をコードするRNA中の標的配列に対するアンチセンス配列を含むターゲット決定配列と、タンパク質合成効率を上昇させる活性を有する制御配列を含む機能性核酸分子として人工的に設計されうることの一つの証拠である。

50

【 0 1 1 6 】

(方法)

プラスミド

RACE フラグメント : Uchl1の5' UTRをRACE PCR(GeneRacer, Invitrogen)によりNM9Dの総RNAから増幅し、pGEM(登録商標)-T Easyベクター(Promega)にクローニングした。

完全長AS Uchl1 : ASの完全長DNAを、RACEフラグメントとFANTOMクローンRik6430596G22から、以下のプライマーを用いてのプライマーセットを用いてフージョンPCRを行い増幅した。

mAS Uchl1fI 5' - ACAAGCTCAGCCCACACGT-3' (SEQ ID No:13) およびRev mAS Uchl1 fI 5' - CATAGGGTTTCATT-3' (SEQ ID No:14)

10

Uchl1: マウスUchl1 mRNAを、以下のプライマーセットによりFANTOMクローン2900059022からクローニングした：

mUchl1用 5' - TTAAGCTGCTTGAGAGAGC-3' (SEQ ID No:15) およびRev mUchl1 5' - TTAAGCTGCTTGAGAGAGC-3' (SEQ ID No:16)

AS Uchl1 shRNA : As Uchl1のTSS周辺の -14/+4 の配列を含むオリゴCGCGCAGTGACACAGCAC AAA (SEQ ID No:17) をpSUPER.retro.puroベクターにクローニングし、スクランブル配列をコントロールとして使用した。

【 0 1 1 7 】

欠失変異体：

5' : mAS Uchl1 fI およびRev 用 5' AS Uchl1 5' TACCATTCTGTGCGGTGCA-3' (SEQ ID No:18)

20

3' : mAS Uchl1 およびRev mAS Uchl1 fI 用 GACCTCCTCTAGCACTGCACA-3' (SEQ ID No:19)

明確な欠失変異体のため、PCRフラグメントIをpcDNA3.1-のNheI-EcoRI位置およびPCRフラグメントIIを続くEcoRI-HindII位置にクローニングした。

AS Uchl1 (Alu+SINEB2) :

PCRフラグメントI : mAS Uchl1 fI およびRev pre-SINE B2 用 5' - CAATGGATTCCATGT-3' (SEQ ID No:20)。PCRフラグメントII : For post-ALU 用 5' - GATATAAGGAGAATCTG-3' (SEQ ID No:21) およびRev mAS fI。

AS Uchl1 (Alu) :

30

PCRフラグメントI: mAS Uchl1 fI およびRev pre-Alu 5' - TTATAGTATGTGTTGTC-3' (SEQ ID No:22)。PCRフラグメントII: post-ALU用 5' - GATATAAGGAGAATCTG-3' (SEQ ID No:23) およびRev mAS fIをEcoRI-HindII位置にクローニングした。

AS Uchl1 (SINEB2) :

PCRフラグメントI : mAS Uchl1 fI およびRev pre-SINE B2用 5' - CAATGGATTCCATGT-3' (SEQ ID No:24)。PCRフラグメントII: post-SINE B2用 5' - GAATTCCCTCCAGTCTCTTA -3' (SEQ ID No:25) およびRev mAS fI。

AS uchl1 (Alu+SINEB2) フリップ : PCRフラグメントI: SINE B2 内部用 5' - TGCTAGAGGAGG-3' (SEQ ID No:26) およびRev Alu flip 5' - GTCAGGCAATCC -3' (SEQ ID No:27) をAS Uchl1 (Alu+SINEB2)の単一のEcoRI位置にクローニングした。

40

AS uchl1 SINEB2フリップ : PCRフラグメントをSINE B2内部用 5' - TGCTAGAGGAGG-3' (SEQ ID No:28) およびRev SINE フリップ 5' - AAAGAGATGGC-3' (SEQ ID No:29) をAS Uchl1 (SINEB2)の単一のEcoRI位置へクローニングした。

【 0 1 1 8 】

細胞

MN9D細胞を10mmペトリ皿に、10% ウシ胎仔血清FBSペニシリン(50 units/ml)および、ペニシリン(50ユニット / ml)、ストレプトマイシン(50ユニット / ml)を含むダルベッコ変法イーグル培地に播種した。処理は、ラバマイシン(R0395, Sigma)を最終濃度1 μg/mlにて新鮮な培地に45分添加することにより行った。

MN9D安定細胞株(siRNA -15/+4、スクランブルsiRNA、pcDNA3.1- および SINE B2)を樹立

50

するため、MN9D細胞を100mmペトリ皿に播種し、製造元提供の取扱説明書に従ってリポフェクタミン2000(Invitrogen)を用いてトランスフェクトし、翌日に細胞を500 μMのネオマイシン(#N1142, Sigma)により選択した。

HEK-293T細胞は、10%ウシ胎仔血清(Sigma-Aldrich)、100 ユニット / mLペニシリン、そして100 μM / mLストレプトマイシン(Sigma)を含むDMEM(GIBCO)にて37 ℃で湿式CO₂培養器にて増殖させた。

【0119】

PCR

PCR分析：総RNAをTrizol試薬(Invitrogen)を用いて製造元説明書に従い抽出した。DNase I(Ambion)処理された後、1 μgをiScript cDNA synthesis Kit(BioRad)を用いて逆転写した。リアルタイムqRT-PCRをSybr 緑色蛍光色素(2x iQ5 SYBR Green supermix, BioRad)を用いて行った。アクチンとGAPDHを内部標準として用いた。相対定量は比較Ct法を用いて行った。

アクチン：センス 5'-CACACCCGCCACCAGTTC-3' (SEQ ID No:30)、アンチセンス 5'-CCCA TTCCCCACCACATCACACC-3' (配列番号 31)

Gapdh：センス 5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3' (配列番号 32)、アンチセンス 5'-GCAGAAGG GGCAGGAGATGAT-3' (配列番号 33)。

AS Uchl1 オーバーラップ：センス 5'-GCACCTGCAGACACAAACC-3' (配列番号 34)、アンチセンス 5'-TCTCTCAGCTGCTGGAATCA-3' (配列番号 35)

AS Uchl1 : 5'CTGGTGTGTATCTCTTATGC (配列番号 36)、アンチセンス 5'CTCCCGAGTCTCTGTA GC (配列番号 37)

Uchl1 : センス 5'-CCCGCCGATAGAGCCAAG (配列番号 38)、アンチセンス 5'-ATGGTTCAC TGAAAGGG-3' (配列番号 39)

AS Uchl1 プレRNA : 5'-CCATGCACCGCACAGAACATG-3' (配列番号 40)、アンチセンス 5'-GAA AGCTCCCTCAAATAGGC-3' (配列番号 41)

プレA0ribosomal RNA : センス 5'-TGTGGTGTCCAAGTGTTCATGC-3' (配列番号 42)、アンチセンス 5'-CGGAGCACCACATCGATCTAAG-3' (配列番号 43)

AS_Uxt : センス 5'-CAACGTTGGGGATGACTTCT (配列番号 44)、アンチセンス 5'-TCGATTCCC ATTACCCACAT (配列番号 45)

Uxt : センス 5'-TTGAGCGACTCCAGGAACT-3' (配列番号 46)、アンチセンス (配列番号 47)

マルチプレックスRT-PCTは、Platinum (登録商標) Taq DNAポリメラーゼとSuperScript (登録商標)

III One-Step RT-PCR(Invitrogen)システムを用いて行った。DNase処理された 500mgの総RNAをGapdh、Uchl1、As Uchl1のリバースプライマーとともにインキュベートした。

反応は、60 ℃、60分にて行った。

それを3つに分注し、フォワードプライマーを最終濃度200nMになるように加えた。PCR反応は、95 ℃ 15秒、続いて60 ℃ 45秒、最後に68 ℃ 30秒のサイクルを40サイクル行った。

【0120】

ウェスタンプロット

細胞は、SDSサンプルバッファー 2x 中で溶解した。タンパク質は15%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離され、ニトロセルロース膜へ転写した。イムノブロッティングは一次抗体：抗Uchl1 (#3524 Cell Signaling) 1 : 300 希釀、抗b-actin(A5441, Sigma) 1 : 500 希釀を用いて行った。

Uchl1の検出は、推奨のホースラディッシュペルオキシダーゼで標識された二次抗体を用いた改良型の化学発光とECL検出試薬(RPN2105、GE Healthcare)で行った(#WBKLS0500 ImmobilionWesternChemiluminescent HRP 基質)。

【0121】

細胞分取

10

20

30

40

50

核原形質の分画は、核原形質分離キット (Norgen) を製造元説明書に従って使用して行った。RNAを抽出してDNaseI処理をされた。細胞質分画の純度は、プレリボソームRNAでのリアルタイムqRT-PCRによって確認した。

【0122】

二色インサイチューハイブリダイゼーション (ISH)

試薬：抗DIG抗体 D8156(Sigma)；ストレプトアビシン HRP RPN1231-100UL (Amersham Bioscience)；DIG ラベリングミックス#11 277 073 910(Roche)、B10ラベリングミックス#11 685 597 910(Roche)、リボ核酸トランスファーパン酵母由来 R8759(Sigma)、デオキシリボ核酸一本鎖サケ精巣由来 D7656(Sigma)、プロッキング試薬 #11 096 176 001(Roche)、TSA Cy3システム (Perkin Elmer, Heidelberg, Germany)。
10

4%ホルムアルdehydによる灌流の後、マウスの脳を一晩30%スクロースにて凍結保護をした。インサイチューハイブリダイゼーションを凍結切片(16 μm)で行った。

センスとアンチセンスプローブは、マウスUchl1 cDNAの末端600bpとマウスAS Uchl1の最後の1000bpをコードするcDNAからインビトロ転写にて作製した。Uchl1のプローブはジゴキシゲニンで標識し、AS Uchl1のプローブはビオチンで標識した。ビオチンとジゴキシゲニンの取り込みは、ノーザンプロットにて確認した。切片は3%過酸化水素水で30分にて前処理した。ハイブリダイゼーションは、1 mg/ml(Uchl1)およびAS Uchl1ための3 mg/mlの濃度でのプローブを用いて、60 、16時間で行った。ビオチン化RNAの検出の検出には、ストレプトアビシン-HRPを1:250希釈、2時間、TNBバッファー(Tris HCl pH 7.5 100mM, NaCl 150mM, 0.5%プロッキング試薬)で行い、TNTバッファー(Tris HCl pH 7.5、100mM、NaCl 150mM、0.05% tween)中での洗浄後にTSA Cy3システムを用いて可視化した。
20

DIG標識プローブでのISHは、TSA反応の後、抗DIGモノクローナル抗体を用いて切片をインキュベートすることで行った。RNA ISHと免疫蛍光染色を組み合わせるため、切片を抗TH(#AB152 Chemicon) 1 : 1 0 0 0 希釈とともにインキュベートした。シグナルは、次いで蛍光色素が結合されたヤギ抗ウサギ二次抗体405とヤギ抗マウス抗体488を用いて検出した。切片はその後洗浄し、Vectashield (Vector lab)マウント培地でマウントして共焦点顕微鏡(Leica)にて観察した。

【0123】

ヒト検死脳サンプル

脳サンプルは、Institute of Neuropathology, Bellvitge Hospital (バルセロナ大学、スペイン)の脳バンクより入手した。サンプルは患者もしくはその家族のインフォームドコンセントとバルセロナ大学の倫理委員会の許可のもと、検死時に解剖された。脳は病理学的にPDの症例と確認され、対照群(Navarro et al., 2009)と年齢が一致したコーカサス人から得られた。簡潔に言えば、すべてPD症例は、典型的なPDを煩っており、認知障害をもった症例はなく、神経病理的な診断は確立された基準に従って行われた。健康な対照群は神経、代謝、循環器疾病の症状はなく、神経病理学研究によりアルツハイマー病やその他病理などを含む異常は見られないことが明らかにされている。死亡から組織標本の間は3時間から5時間の範囲である。
30

【0124】

生物情報学的解析

AS Uchl1のヒトホルトログ候補を特定するため、ヒトとマウスのAS Uchl1相同領域の保存性をVISTA genome browserを用いて行った。本発明者らは、ヒトとマウスゲノム最小75%同一性をもつCTS (Conserved sequence tags) のパラメータを選択した。それぞれの保存エレメントに対して、ヒト相同領域の上にプライマーを設計した。

追加の翻訳アクチベーター候補の特定のために、本発明者らはノンコーディングRNAであって5'末端コーディング転写物と直接対応でオーバーラップするFANTOM3完全長cDNAから検索した[PMID: 1614072]。Nordstrom et al 2009 (Nordstrom, K.J.'J et al. Critical evaluation of the FANTOM3 non-coding RNA transcripts. Genomics 94, 169-176 (2009).)に記載された8535のFANTOM3 ncRNA転写物nの選別セットをスタート地点として使用した。これらのncRNA転写物のゲノム上の位置とREFSEQ (Maglott, D.R., Katz, K.S., Sico
40

tte, H. & Pruitt, K.D. NCBI's LocusLink and Ref Seq. Nucleic Acids Res 28, 126-128 (2000) のコーディング転写物をUCSCのゲノムブラウザ (Kent, W.J., et al. The human genome browser at UCSC. Genome Res 12, 996-1006 (2002)) で抽出し、788のコーディングセンス：ノンコーディングアンチセンス対を特定した。その後ncRNAをrepeat maskerを用いて確認し、SINEB2関連の配列を特定した(Smit, AFA, Hubley, R & Green, P. RepeatMasker Open-3.0.1996-2010 <<http://www.repeatmasker.org>>)。これによりタンパク質コーディング転写物と5'末端のオーバーラップのペアは127まで減少した(うち60はリピートのセンス鎖のバージョンを持ち、53はアンチセンスのバージョンを持ち、14はセンスとアンチセンスの両方のバージョンを持つ)。

その後、SINEB2関連エレメントのアライメントを行った(<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/index.html>)。この解析により、UchI1-ASと同様の方向性を持ったりピートを持つ転写物とオーバーラップするアンチセンスが実験試行(Uxt1-AS)に選択された。

【0125】

配列

例として、以下のものがタンパク質コーディングmRNAと相補的な配列のリストである。これらは対象を決定する配列を提供する断片[水色でハイライトしたnow]と制御配列[赤でハイライトhow]の例を含む。この例では自然界のアンチセンスのリスト中の制御配列は89塩基の短さである。アンチセンスRNAの抜粋リスト中の結合配列は44塩基の短さである。下のそれぞれの配列は、Repeatmaskプログラムにより決定されたレトロトランスポゾンエレメントについてのアライメントの要約である。

【0126】

10

20

【表1】

10

In Bold overlap region (UchL1) Italic is 72 bp

The boxed nucleotide CAT is complementary to the CDS starting ATG

20

ANNOTATION EVIDENCE:

701 19.671.1816.26 AK078321.1 521 690 995 C B3 SINE/B2 1
156 60 0

AK078321.1 569 GGAGTTATACGGTARACCTCGTGGTGGTTGTGAAACCAACCATGTTGGATGGAT 618
i ----- i i i i ---

AK078321.1 619 ATTGAGTTCCAAACACTGGTCCTGTGCAGAGACATCCAGTGCCTTGTAGT 658

-i i vvii i v v - v v v v vi

AK079321.1 669 GCTGAGCCATCTCTTAGCTCC 690

C-B3#SINE/B3 2.2 GCTGAGGCCATCTCTCC^aGCCCCC 1

1 - 2018-01-01 2018-12-31 2019-01-01 2019-12-31 2

Matrix = 25p43g.matrix
Transitions / Transitions = 0.53 (0.1 / 1.1)

Gap_init rate = 0.02 {

30

[0 1 2 7 1]

AK029359.1 (AS_Uxt) (SEQ_ID_No:8)

10

In Bold overlap region (UchL1)

position in repeat	score	perc	perc	perc	query	position in query			matching repeat
						begin	end	(left)	
begin	end	(left)	ID						
617	19.5	0.8	2.3	UnnamedSequence	160	290	(855)	C B3	<u>SINE/B2</u>
(79)	137	9	1						
683	19.9	12.3	0.5	UnnamedSequence	774	960	(185)	C B3	<u>SINE/B2</u>
(7)	209	1	2						
327	27.5	6.1	4.3	UnnamedSequence	977	1090	(55)	C PB1D10	<u>SINE/Alt.</u>
(9)	117	2	3						

ANNOTATION EVIDENCE:

617 19.54 0.76 2.33 UnnamedSequence 160 290 556 C B3 SINE/B2
9 137 79 2

20

AK029359.1	160	GCCAGAAGAGAGTGTGGCATTCCTGGAACTGGAGCAACCAACAGTTGT	209
		i vi v i iv vi ii -	
C B3#SINE/B2	137	GCCAGAAGAGAGGGCGTCGGATCCCCTGGAACTGGAGTTACAGATGGTT-GT	89
AK029359.1	210	GTGC-ACCAGTGCGGTAATGGGAATCGAACCTGGTCCCTCTATARGACTG	258
	v -i	iv i iv vii	
C B3#SINE/B2	88	GAGCCGCCATGTGGGTGCTGGGAATCGAACCCGGTCCCTGGAAAGAGCA	39
AK029359.1	259	GCCAGTGTCTTAACATACTGGAGGTGCATTCT	290
		ii v-- i	
C B3#SINE/B2	38	GCCAGTGTCTTAAACGGCTGAGC--CATCTCT	9

Matrix = 25p43q.matrix

Transitions / transversions = 1.78 (16 / 9)

Gap_init rate = 0.02 (3 / 130), avg. gap size = 1.33 (4 / 3)

ANNOTATION EVIDENCE:

883 19.89 12.30 0.48 UnnamedSequence 774 960 72 C B3 SINE/B2

30

AK029359.1	774 TTATTTTAAATAATGAGTATTCACCTGCATAG-----GCGCAC---- 913 vi i i ii iv---- i ----
C B3#SINE/B2	209 TTATTTTATGTGTATGAGTGTGCTGCATGATGTCGACACG 160
AK029359.1	814 -----AGTACCCACAGAGACTAGAAGAGGGTGGCAGATCTCTGLG 854 -----i i i i i v i i ii
C B3#SINE/B2	159 TGC GTGCCTGGTGC CCGUGGGAGGGCAGAAGAGGGCGTCGGATCCCCCTGGA 110
AK029359.1	855 ACTGGAGTTA--ATGCTTGTGAGCTGCCATGTGGATGCTGGAAATCAA 901 --- v i i i i i
C B3#SINE/B2	109 ACTGGAGTTACAGATGGTGTGAGCCCCCATGTGGGTGCTGGAAATCGAA 60
AK029359.1	902 CCCAGGTCTTGGAAAG-GCAGGCAGGTGCTCTTAATCATGGAAAGCATCT 950 i i - v - i ii v iv
C B3#SINE/B2	59 CCCGGGTCTCTGGAAAGAGCRGCCAG-TGCTCTTAACCGTGA GGCATCT 11
AK029359.1	951 CTTCAGCTCC 960 i i
C B3#SINE/B2	10 CTCCAGCCCC 1

10

[0 1 2 8]

Other sequences in the study:

B2#SINE/B2 (SEQ ID No:9)

>B3#SINE/B2 216 bp (SEQ ID No:10)

GGGGCTGGAGAGATACTCAGCGGTTAAGAGCAGTGGCTCTTCAGAGGCCGGGTCGGTCCCCAGCACCCACAT
GGCGGCTCACAAACCGCTGTAACTCTAGTTCCAGGGGATCTRAACNCCTCTCTGACCTCCACGGGCACCAGGCACGCAC
GTGGTACACAGACGTACATGCARGAAAAACTCATACACATAAAAATAAATTTTWAAAAAA

10

Uch11 cloned into Pme-blunt site of pcDNA 3.1-(SEQ ID No:11)

CGGCTCCTGGGTTGTCTGCAGGTGCCATCCCGAAGATGCAGCTGAAGCCATGGAGATTAAACCCGAGATGCTGA
ACAAAGTGTGGCCAAGCTGGGGTGCAGCTGGCCTTCGCCAGTGCCTAGGGCTGGAGGAGGAGACTCTGGGC
TCAGTGCATCCCTGCCCTGCCTGCCTCTGTCTTCCCTCACGGCCAGCATGAAAACCTCAGGAAAAAGCAAAT
TGAGGAAGTGAAGGGACAGGAAGTTAGCCCTAAAGTTACTTCACTGAAGCAGACCATCGGAAACTCTGTGGTACCATCG
GGTTGATCCACGCAGTGGCAACAACCAAGACAAGCTGGAATTGAGGATGGATCGCTCTGAAACAGTTCTGTCTGAA
ACGGAGAACGCTGTCCCCGAGATAGGCCAAGTGTTCGAGAAGAACGAGGCCATCCAGGGCCATGACTCCGTGGC
CCAGGAGGGCCAGTGTGGTAGATGACAAGTGAATTCCATTTCATTCTGTTCAACAACTGTTGAGGCCATCTGTACG
AGCTCGATGGCGAATGCCCTTCCAGTGAACCATGGGCCAGCTCAGAGGACTCTCTGCTGCAGGATGCTGCCAAGGTC
TGCAGAGAATTCACTGAGCGAGAGCAGGGGGAGGTCCCTCTGCGCTGGCTCTCTGCAAAGCAGCTTAAGTCTGGGG
AGAGAGAACCCAGCGATCCCCCTCCCTGGCAGGTGCAGGCCCTGGTTGAGCTTAACTGACTTAAAC
ACAGCTGTTCTTGCCTACAGCCCCATCCCTCCACCCACCCAGGCCACCCAGGGGGCTCTGTCACAGCCACACCA
GGCTGAGCACTTCCCTCCTGTGTCTCGTACCTGCTCTACGGTCTCTGGTTCTGTCTGTAAGTTACGGCCCT
GGATGTGGTTGTCTAGTCCTAACAGGAAGATAAAACTTGTGCTGGTGAAG

20

AS Uchii full length cloned into Xba-HindIII site in pcDNA3.1-(SEQ ID No:12)

ACAAAGCTAGCCCCACAGTGGCTCGGCGAAGCCCTCGGACTAGAGTCGGGGCGTCGCCACGGCGTAGAGCTGC
TCCCCGGCGCTCGTGTGTCGGGTCATCCTCCGCCACCTCCCGTGATCGATCTCTAGTCAGTCCTCCAAACCCCTAGA
TAACTCAGGGCAGAGACGACAACCGACTGGGCGGCCAGCCACCTCCATTGACAGGGCGGGCGGCTGGCGT
CTCCAAACGATGCTTGGAGGATAGGGACAGAGACTGCGGCGCGCCTACTCACTTTGTTCAAGCATCTGAAAGGAAA
GCAAAGAGGAAAATGATAATAAACTAAATGATTCAAGCTACCGAGCTGAAGCTAAGGGTCAGCCTTATTCTCCCGAACG
GACCCAGCAGCTATGCTTACCTGGGTTAATCTCCATCGGCTTCAGCTGCATCTCGGGATGGCACCTGCAGACACAA
ACCCGGAGGAGCCGAAAAAAACAGCGGTGGAGCCGCCAGGCTGCTTTAAAGCGCCGGCTCGCTACTGGGAAAGCC
TGAGGAGGGAGACGGAGCAGAAAACAGCAGAGGGAGGAAGGCCAAGAGGGCTCGAACCTCCCCATGCACCGCACAGAAT
GGTACAAGCCAAGCCCCAACCTTGCACTGCTCACTCGCCGAAGTGTCCCCGGACTGGGATGGTAGCACGCACOTGTG
ATTCCAGCAGCTGAGAGAGAGGCCAGCCACATGGAATCCATTGCACTGCTAGAGGAGGTCAAGAAGAGGGATTGG
TCCCCCGAGAACTGGAGTTATCGGTAAACCTCGTGGTGTGTGAACCACCATGTGGATGGATATTGAGTTCAAAACACTG
GTCTGTGCAAGGAGATCCAGTGTCTTAAGTGTGAGCCATCTCTTAGCTCCAGTCCTTAAACAAACAAACGAA
CGAACAGCAAGGGAGCTGGTATGACAACACATACTATAATTCTAGTACTCAGGATGTGAAACAGGAGGATTGCCGTGAC
TGGGAGATATAAGGAGAAATCTGTTGCACCCCCACCCTCCCTAAAGGCAGAATAAAAGAACGTCTATAAAACAAATA
AACAAACAAACCAATAAAACAAAACAGATCTCTCACCTTTCTTGTCTTTCAAGACTTTGTAATAAGGCCCTTGG
AGTGCAGGATATTGGCAGGACAAGCAGAGAGGGAGACCATCAGTTCTTGTGATCAAGAACATATGTTCTTAGCA
AACTGGTGTGATTATCTTATGCAATGAGCCTGGAAAGAGGGCAGCCACGAGGATGGTACAGCATGGATGGATGG
TACGCTACAGAGACTCGGGAGCCCACTGTGAGTGGCTGACTGGCATGGTAGGTTCAAGGAAGAATTGGCCTGTGAAGAA
AATGTTCTGAAAAGTGAACAAGGTGCAAGGAGGTAGGAGTAGGAGTGGGTCTGGGCAAAGCAGGGGTGCATCCCACGCTCAGGG
AATAGCACAGCAGAGGTCTGATGCGATGCCAGTGCATGACCTGCTGGCAAATAGACGATCAAGAATGGCAAAAGCATC
ATGGGTGATGAGTGGGAGAGGGGATGAGACATTCTTCTCCCTGCTGAGACTTCATTGAAACCGATGAGTTCTGAATAG
AAGATGCCCCCCCACCACCCACCGATGAGAATCTGAAGGGAGGATATAATTACCCATATTACTCTGTTGGCGGCG
AGCTATCTGACAGCCAACCTCCCATACATTCTATTGAGGATACACTAATGACAGGAAGTCTTGTCTTGTATGCAAG
AGATGGCTCACACGATGGAGAATTAACTTGTAGTTGTTATTGTGCTAAATTGTTCAATAAAATGAAAC
ACTCCATG

30

40

【表2】

The examples of SINE B2 embedded in cDNA clones

sequence are as following, but is limited to them.

Gene with AS_refseq	start B2	end B2	strand	subtype					Legend; cDNA cloneID_alignment Start position_Alignent end_type of Repeat element
NM_177_182	973	1013	-2766	+	B2_M_m2	SINE/B2	2	42	>AK032380_973_1_013+_B2_Mm2
NM_009_351	859	1044	-1470	+	B2_M_m1t	SINE/B2	2	185	>AK033525_859_1_044+_B2_Mm1t
NM_144_515	1564	1718	-761	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	158	>AK033993_1564_1718+_B2_Mm2
NM_198_300	520	712	-1160	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	188	>AK039361_520_7_12+_B2_Mm2
NM_028_428	1801	1997	-245	+	B2_M_m1t	SINE/B2	1	193	>AK042841_1801_1997+_B2_Mm1t
NM_010_661	946	1111	-1515	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	195	>AK043817_946_1_111+_B2_Mm2
NM_007_485	722	912	-417	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	194	>AK044205_722_9_12+_B2_Mm2
NM_010_633	971	1164	-67	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	195	>AK047213_971_1_164+_B2_Mm2
NM_030_207	714	787	-446	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	88	>AK079217_714_7_87+_B2_Mm2
NM_145_470	1498	1697	-1057	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	193	>AK081722_1498_1697+_B2_Mm2
NM_024_282	1379	1555	-2	+	B2_M_m2	SINE/B2	2	187	>AK132990_1379_1555+_B2_Mm2
NM_133_994	1001	1057	-86	+	B2_M_m2	SINE/B2	2	58	>AK133457_1001_1057+_B2_Mm2
NM_133_994	1057	1137	-6	+	B2_M_m2	SINE/B2	91	171	>AK133457_1057_1137+_B2_Mm2
NM_178_244	2323	2513	-45	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	195	>AK133632_2323_2513+_B2_Mm2
NM_008_997	734	923	-3	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	186	>AK133808_734_9_23+_B2_Mm2
NM_080_555	286	382	-4	+	B2_M_m1t	SINE/B2	75	171	>AK134674_286_3_82+_B2_Mm1t
NM_010_332	2428	2606	-1	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	183	>AK135599_2428_2606+_B2_Mm2
NM_172_467	2948	3108	-3	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	162	>AK137583_2948_3108+_B2_Mm2
NM_175_115	81	274	-2006	+	B2_M_m2	SINE/B2	2	195	>AK138675_81_27_4+_B2_Mm2
NM_010_071	3150	3339	-54	+	B2_M_m2	SINE/B2	1	195	>AK155102_3150_3339+_B2_Mm2
NM_183_014	288	442	-20	+	B3A	SINE/B2	48	198	>AK015655_288_4_42+_B3A
NM_026_555	277	435	-24	+	B3A	SINE/B2	40	198	>AK021299_277_4_35+_B3A
NM_033_077	1109	1295	-1732	+	B3A	SINE/B2	5	189	>AK029689_1109_1295+_B3A
NM_019_789	1052	1211	-1195	+	B3	SINE/B2	33	196	>AK030353_1052_1211+_B3
NM_178_891	2403	2558	-3	+	B3	SINE/B2	20	176	>AK030551_2403_2558+_B3
NM_145_579	2546	2719	-346	+	B3	SINE/B2	2	206	>AK031007_2546_2719+_B3

10

20

30

40

【0 1 3 0】

NM_008 510	2255	2404	-429	+	B3A	SINE/ B2	57	198	0	>AK034030_2255_ 2404+_B3A
NM_153 579	1071	1262	-798	+	B3	SINE/ B2	1	214	-2	>AK035406_1071_ 1262+_B3
NM_145 942	1006	1219	-681	+	B3	SINE/ B2	2	216	0	>AK037188_1006_ 1219+_B3
NM_025 788	1871	2045	-757	+	B3	SINE/ B2	1	215	-1	>AK039409_1871_ 2045+_B3
NM_008 019	877	1044	-1057	+	B3	SINE/ B2	2	211	-5	>AK040162_877_1 044+_B3
NM_001 081475	1431	1582	-6	+	B3	SINE/ B2	69	216	0	>AK040401_1431_ 1582+_B3
NM_001 081475	1586	1745	-2	+	B3	SINE/ B2	3	206	-10	>AK040401_1586_ 1745+_B3
NM_007 485	722	810	-519	+	B3	SINE/ B2	1	89	-127	>AK044205_722_8 10+_B3
NM_007 485	835	912	-417	+	B3	SINE/ B2	13	215	-1	>AK044205_835_9 12+_B3
NM_178 794	826	959	-986	+	B3A	SINE/ B2	2	129	-69	>AK045196_826_9 59+_B3A
NM_008 915	737	940	-298	+	B3	SINE/ B2	8	201	-15	>AK046652_737_9 40+_B3
NM_010 633	971	1096	-135	+	B3	SINE/ B2	1	129	-87	>AK047213_971_1 096+_B3
NM_199 476	3267	3405	-1039	+	B3	SINE/ B2	2	149	-67	>AK047540_3267_ 3405+_B3
NM_144 795	2052	2248	-546	+	B3	SINE/ B2	2	210	-6	>AK048854_2052_ 2248+_B3
#N/A	1858	2028	-5	+	B3A	SINE/ B2	1	176	-22	>AK049524_1858_ 2028+_B3A
NM_001 038621	1207	1363	-359	+	B3A	SINE/ B2	2	160	-38	>AK053130_1207_ 1363+_B3A
NM_181 423	1666	1733	-71	+	B3A	SINE/ B2	2	72	-126	>AK054359_1666_ 1733+_B3A
NM_153 515	1403	1520	-470	+	B3A	SINE/ B2	63	183	-15	>AK078013_1403_ 1520+_B3A
NM_198 415	403	623	-1212	+	B3	SINE/ B2	1	216	0	>AK078328_403_6 23+_B3
NM_152 220	1794	1979	-561	+	B3	SINE/ B2	3	213	-3	>AK078537_1794_ 1979+_B3
NM_025 729	1	165	-203	+	B3	SINE/ B2	15	177	-39	>AK079403_1_165 +_B3
NM_016 693	1307	1517	-13	+	B3	SINE/ B2	2	216	0	>AK080235_1307_ 1517+_B3
NM_010 151	814	1024	-451	+	B3	SINE/ B2	2	216	0	>AK082108_814_1 024+_B3
NM_009 713	1690	1882	-5	+	B3	SINE/ B2	1	199	-17	>AK082325_1690_ 1882+_B3
NM_001 029985	221	280	-1179	+	B3	SINE/ B2	10	168	-48	>AK084376_221_2 80+_B3
NM_009 737	1805	2005	-406	+	B3	SINE/ B2	1	207	-9	>AK085337_1805_ 2005+_B3
NM_027 081	984	1130	-1155	+	B3	SINE/ B2	1	162	-54	>AK086470_984_1 130+_B3
NM_018 779	876	1062	-530	+	B3A	SINE/ B2	2	188	-10	>AK089148_876_1 062+_B3A
NM_027 919	1468	1667	-185	+	B3	SINE/ B2	1	213	-3	>AK090182_1468_ 1667+_B3
NM_011 034	434	608	-12	+	B3	SINE/ B2	2	216	0	>AK131819_434_6 08+_B3
NM_175 551	1802	1895	-513	+	B3A	SINE/ B2	64	176	-22	>AK132737_1802_ 1895+_B3A
NM_175 551	1829	1928	-480	+	B3	SINE/ B2	10	213	-3	>AK132737_1829_ 1928+_B3

10

20

30

40

NM_007 921	951	1134	-1650	+	B3A	SINE/ B2	3	187	-11	>AK133325_951_1 134+_B3A
NM_001 039042	1220	1315	-292	+	B3A	SINE/ B2	48	142	-56	>AK134755_1220_ 1315+_B3A
NM_177 328	1378	1504	-285	+	B3	SINE/ B2	85	216	0	>AK134874_1378_ 1504+_B3
NM_021 899	1172	1259	-140	+	B3	SINE/ B2	1	95	-121	>AK135206_1172_ 1259+_B3
NM_008 705	1521	1717	-572	+	B3A	SINE/ B2	1	197	-1	>AK136279_1521_ 1717+_B3A
NM_001 079932	2116	2299	-702	+	B3	SINE/ B2	6	208	-8	>AK137643_2116_ 2299+_B3
NM_001 079932	3059	3253	-2	+	B3	SINE/ B2	4	205	-11	>AK137643_3059_ 3253+_B3
NM_001 033286	2524	2698	-63	+	B3A	SINE/ B2	4	181	-17	>AK138296_2524_ 2698+_B3A
NM_008 962	928	1095	-375	+	B3	SINE/ B2	1	153	-63	>AK138521_928_1 095+_B3
NM_175 349	2151	2347	-181	+	B3A	SINE/ B2	11	196	-2	>AK139254_2151_ 2347+_B3A
NM_177 003	1277	1466	0	+	B3	SINE/ B2	1	200	-16	>AK139647_1277_ 1466+_B3
NM_007 965	1338	1488	-5	+	B3	SINE/ B2	51	216	0	>AK140072_1338_ 1488+_B3
NM_010 192	1808	1933	-45	+	B3	SINE/ B2	1	126	-90	>AK140346_1808_
NM_027 446	1871	1983	-2794	+	B3A	SINE/ B2	1	130	-68	>AK140616_1871_ 1983+_B3A
NM_027 446	2318	2342	-2435	+	B3A	SINE/ B2	13	156	-42	>AK140616_2318_ 2342+_B3A
NM_177 186	2061	2142	-351	+	B3	SINE/ B2	13	211	-5	>AK142359_2061_ 2142+_B3
NM_145 134	2963	3148	-1292	+	B3	SINE/ B2	28	210	-6	>AK142507_2963_ 3148+_B3
NM_009 890	2740	2968	-135	+	B3	SINE/ B2	1	216	0	>AK142879_2740_ 2968+_B3
NM_146 055	5202	5272	-94	+	B3	SINE/ B2	60	141	-75	>AK143143_5202_ 5272+_B3
NM_008 977	1344	1513	-645	+	B3	SINE/ B2	11	205	-11	>AK143279_1344_ 1513+_B3
NM_026 036	2001	2167	-272	+	B3A	SINE/ B2	1	169	-29	>AK149843_2001_ 2167+_B3A
NM_001 159519	1440	1548	-1422	+	B3A	SINE/ B2	55	163	-35	>AK157402_1440_ 1548+_B3A
NM_001 159519	2503	2556	-558	+	B3	SINE/ B2	1	56	-160	>AK157402_2503_ 2556+_B3
NM_001 159519	2544	2616	-498	+	B3	SINE/ B2	10	177	-39	>AK157402_2544_ 2616+_B3
NM_001 159519	2702	2896	-412	+	B3A	SINE/ B2	1	198	0	>AK157402_2702_ 2896+_B3A
NM_001 110504	1778	1909	-25	+	B3	SINE/ B2	58	210	-6	>AK160921_1778_ 1909+_B3
NM_030 714	2153	2335	-62	+	B3	SINE/ B2	40	216	0	>AK165234_2153_ 2335+_B3
NM_025 825	945	1052	-383	R C	B2_M m1a	SINE/ B2	-85	108	1	>AK014613_945_1 052_RC_B2_Mm1a
NM_133 756	1102	1289	-246	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-4	191	1	>AK016234_1102_ 1289_RC_B2_Mm2
NM_183 294	1565	1750	-1384	R C	B2_M m1a	SINE/ B2	-8	185	4	>AK029702_1565_ 1750_RC_B2_Mm1 a
NM_009 446	531	710	-2730	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-6	189	2	>AK030803_531_7 10_RC_B2_Mm2

10

20

30

40

NM_025 788	1687	1839	-963	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-11	184	1	>AK039409_1687_ 1839_RC_B2_Mm2
NM_177 785	1626	1682	-1130	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-4	191	137	>AK040275_1626_ 1682_RC_B2_Mm2
NM_177 785	1682	1739	-1073	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-94	101	46	>AK040275_1682_ 1739_RC_B2_Mm2
NM_177 785	1776	1952	-1036	R C	B2_M m1t	SINE/ B2	-13	180	2	>AK040275_1776_ 1952_RC_B2_Mm1t
NM_007 485	1137	1341	-192	R C	B2_M m2	SINE/ B2	0	195	2	>AK044205_1137_ 1341_RC_B2_Mm2
NM_175 273	537	714	-1793	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-5	190	1	>AK048762_537_7 14_RC_B2_Mm2
NM_029 409	1005	1172	-2204	R C	B2_M m1t	SINE/ B2	-14	179	1	>AK049449_1005_ 1172_RC_B2_Mm1t
NM_007 836	282	407	-2067	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-67	128	2	>AK054076_282_4 07_RC_B2_Mm2
NM_007 836	1764	1860	-614	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-97	98	2	>AK054076_1764_ 1860_RC_B2_Mm2
NR_0028 91	1	181	-2344	R C	B2_M m1a	SINE/ B2	-10	183	2	>AK076350_1_181 _RC_B2_Mm1a
NM_026 500	984	1157	-1501	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-14	181	1	>AK076438_984_1 157_RC_B2_Mm2
NM_052 994	2158	2323	-1225	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-4	191	8	>AK079094_2158_ 2323_RC_B2_Mm2
NM_153 100	1870	2057	-1774	R C	B2_M m2	SINE/ B2	0	195	1	>AK086953_1870_ 2057_RC_B2_Mm2
NM_175 313	2088	2261	-2958	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-9	186	14	>AK132441_2088_ 2261_RC_B2_Mm2
NM_001 114140	5305	5461	-1145	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-38	157	2	>AK133162_5305_ 5461_RC_B2_Mm2
NM_009 579	1059	1251	-2941	R C	B2_M m2	SINE/ B2	0	195	1	>AK137370_1059_ 1251_RC_B2_Mm2
NM_010 567	1613	1794	-1882	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-2	193	1	>AK138181_1613_ 1794_RC_B2_Mm2
NM_001 008423	2088	2222	-57	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-60	135	1	>AK141165_2088_ 2222_RC_B2_Mm2
NM_199 027	935	1064	-63	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-65	130	1	>AK141411_935_1 064_RC_B2_Mm2
NM_001 033316	3103	3283	-440	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-5	190	2	>AK145736_3103_ 3283_RC_B2_Mm2
NR_0034 92	748	810	-977	R C	B2_M m1a	SINE/ B2	-6	187	123	>AK147092_748_8 10_RC_B2_Mm1a
NM_010 567	935	1129	-78	R C	B2_M m2	SINE/ B2	0	195	2	>AK148373_935_1 129_RC_B2_Mm2
NM_026 115	3593	3791	-204	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-1	194	1	>AK155374_3593_ 3791_RC_B2_Mm2
NM_010 398	1080	1265	-909	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-8	187	1	>AK157261_1080_ 1265_RC_B2_Mm2
NM_007 893	764	820	-1012	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-94	101	47	>AK163105_764_8 20_RC_B2_Mm2
NM_007 893	894	1062	-938	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-13	182	1	>AK163105_894_1 062_RC_B2_Mm2
NM_007 893	1390	1436	-564	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-5	190	137	>AK163105_1390_ 1436_RC_B2_Mm2
NM_007 893	1436	1490	-510	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-94	101	47	>AK163105_1436_ 1490_RC_B2_Mm2
NM_007 893	1543	1701	-299	R C	B2_M m1t	SINE/ B2	-24	169	1	>AK163105_1543_ 1701_RC_B2_Mm1t
NM_177 186	1783	1964	-258	R C	B2_M m1t	SINE/ B2	-7	186	2	>AK163831_1783_ 1964_RC_B2_Mm1t
NM_030 714	1401	1588	-809	R C	B2_M m2	SINE/ B2	0	195	3	>AK165234_1401_ 1588_RC_B2_Mm2
NM_001 110101	1253	1420	-1139	R C	B2_M m2	SINE/ B2	-22	173	2	>AK169421_1253_ 1420_RC_B2_Mm2

【 0 1 3 3 】

NM_007 601	387	544	-1715	R C	B3A	SINE/ B2	-22	176	1	>AK016423_387_5 44_RC_B3A
NM_027 346	1459	1690	-74	R C	B3	SINE/ B2	-2	214	1	>AK019925_1459_ 1690_RC_B3
NM_138 664	1382	1411	-1334	R C	B3A	SINE/ B2	-14 8	50	21	>AK028982_1382_ 1411_RC_B3A
NM_013 840	160	290	-556	R C	B3	SINE/ B2	-79	137	9	>AK029359_160_2 90_RC_B3
NM_013 840	774	960	-72	R C	B3	SINE/ B2	-7	209	1	>AK029359_774_9 60_RC_B3
NM_153 591	769	982	-1569	R C	B3	SINE/ B2	-6	210	1	>AK032194_769_9 82_RC_B3
NM_028 794	1926	2130	-654	R C	B3	SINE/ B2	-12	204	2	>AK032215_1926_ 2130_RC_B3
NM_001 012311	1317	1437	-1013	R C	B3	SINE/ B2	-44	172	38	>AK034331_1317_ 1437_RC_B3
NM_001 012311	1335	1437	-1013	R C	B3A	SINE/ B2	-54	144	38	>AK034331_1335_ 1437_RC_B3A
NM_134 122	1094	1205	-719	R C	B3	SINE/ B2	-88	128	1	>AK035015_1094_ 1205_RC_B3
NM_153 579	1443	1617	-577	R C	B3	SINE/ B2	-2	214	45	>AK035406_1443_ 1617_RC_B3
NM_153 579	1483	1633	-561	R C	B3A	SINE/ B2	-18	180	27	>AK035406_1483_ 1633_RC_B3A
NM_001 081014	1615	1715	-218	R C	B3A	SINE/ B2	-88	110	1	>AK039704_1615_ 1715_RC_B3A
NM_018 747	432	531	-1672	R C	B3A	SINE/ B2	-31	167	49	>AK040672_432_5 31_RC_B3A
NM_176 841	1677	1886	-64	R C	B3	SINE/ B2	0	216	2	>AK041236_1677_ 1886_RC_B3
NM_133 878	1676	1882	-314	R C	B3	SINE/ B2	-7	209	1	>AK041654_1676_ 1882_RC_B3
NM_145 215	2334	2533	-484	R C	B3	SINE/ B2	0	216	3	>AK041742_2334_ 2533_RC_B3
NM_145 369	1132	1336	-593	R C	B3	SINE/ B2	-7	209	5	>AK042861_1132_ 1336_RC_B3
NM_172 691	248	442	-151	R C	B3A	SINE/ B2	-18	180	10	>AK043958_248_4 42_RC_B3A
NM_007 485	938	1127	-202	R C	B3	SINE/ B2	-37	179	2	>AK044205_938_1 127_RC_B3
NM_007 485	989	1127	-202	R C	B3A	SINE/ B2	-57	141	2	>AK044205_989_1 127_RC_B3A
NM_007 925	592	713	-719	R C	B3	SINE/ B2	-54	162	39	>AK045677_592_7 13_RC_B3
NM_177 006	3566	3620	-1104	R C	B3	SINE/ B2	-16 0	56	2	>AK046828_3566_ 3620_RC_B3
NM_010 633	431	640	-591	R C	B3	SINE/ B2	-4	212	8	>AK047213_431_6 40_RC_B3
NM_010 633	457	640	-591	R C	B3A	SINE/ B2	-7	191	8	>AK047213_457_6 40_RC_B3A
NM_008 842	1460	1636	-53	R C	B3A	SINE/ B2	-4	194	10	>AK047301_1460_ 1636_RC_B3A
NM_199 476	2716	2780	-1664	R C	B3A	SINE/ B2	-36	162	98	>AK047540_2716_ 2780_RC_B3A
NM_013 514	1203	1416	-311	R C	B3	SINE/ B2	0	216	1	>AK048309_1203_ 1416_RC_B3
NM_080 793	2342	2396	-1333	R C	B3A	SINE/ B2	-5	193	144	>AK048747_2342_ 2396_RC_B3A
NM_080 793	2430	2530	-1199	R C	B3A	SINE/ B2	-55	143	47	>AK048747_2430_ 2530_RC_B3A
NM_001 038621	159	275	-1447	R C	B3	SINE/ B2	-56	160	34	>AK053130_159_2 75_RC_B3
NM_007 836	1747	1860	-614	R C	B3	SINE/ B2	-97	119	2	>AK054076_1747_ 1860_RC_B3

10

20

30

40

NM_010 878	1134	1337	-1192	R C	B3	SINE/ B2	0	216	1	>AK078161_1134_ 1337_RC_B3
NM_011 670	521	690	-995	R C	B3	SINE/ B2	-60	156	1	>AK078321_521_6 90_RC_B3
NM_026 086	882	1046	-355	R C	B3A	SINE/ B2	-18	180	1	>AK079515_882_1 046_RC_B3A
NM_025 396	1081	1179	-370	R C	B3	SINE/ B2	-27	189	75	>AK080749_1081_ 1179_RC_B3
NM_007 923	2420	2567	-582	R C	B3A	SINE/ B2	-48	150	4	>AK086589_2420_ 2567_RC_B3A
NM_028 427	1420	1597	-495	R C	B3	SINE/ B2	-5	211	2	>AK090347_1420_ 1597_RC_B3
NM_026 157	1871	2066	-1227	R C	B3A	SINE/ B2	0	198	5	>AK132393_1871_ 2066_RC_B3A
NM_026 157	2342	2408	-885	R C	B3A	SINE/ B2	-13	67	1	>AK132393_2342_ 2408_RC_B3A
NM_026 157	2473	2606	-687	R C	B3A	SINE/ B2	-25	173	28	>AK132393_2473_ 2606_RC_B3A
NM_175 313	2113	2261	-2958	R C	B3	SINE/ B2	-40	176	14	>AK132441_2113_ 2261_RC_B3
NM_175 313	4127	4308	-948	R C	B3	SINE/ B2	-6	210	28	>AK132441_4127_ 4308_RC_B3
NM_024 282	1137	1290	-91	R C	B3A	SINE/ B2	-39	159	1	>AK132990_1137_ 1290_RC_B3A
NM_177 328	277	358	-1283	R C	B3A	SINE/ B2	-56	142	66	>AK134874_277_3 58_RC_B3A
NM_177 328	405	484	-1157	R C	B3A	SINE/ B2	-13	65	1	>AK134874_405_4 84_RC_B3A
NM_177 328	545	713	-928	R C	B3A	SINE/ B2	-4	194	14	>AK134874_545_7 13_RC_B3A
NM_177 328	787	971	-670	R C	B3A	SINE/ B2	-4	194	7	>AK134874_787_9 71_RC_B3A
NM_021 899	161	307	-1092	R C	B3A	SINE/ B2	-46	152	1	>AK135206_161_3 07_RC_B3A
NM_010 332	228	409	-1967	R C	B3	SINE/ B2	-28	188	2	>AK135599_228_4 09_RC_B3
NM_172 407	1470	1683	-74	R C	B3	SINE/ B2	-5	211	2	>AK143014_1470_ 1683_RC_B3
NM_001 009935	1389	1495	-157	R C	B3	SINE/ B2	-96	120	1	>AK143784_1389_ 1495_RC_B3
NM_019 827	2953	3143	-1064	R C	B3	SINE/ B2	-1	215	1	>AK145079_2953_ 3143_RC_B3
NM_011 212	2131	2283	-1263	R C	B3A	SINE/ B2	-47	151	2	>AK148045_2131_ 2283_RC_B3A
NM_010 567	984	1129	-78	R C	B3A	SINE/ B2	-60	138	2	>AK148373_984_1 129_RC_B3A
NM_001 110504	1406	1594	-400	R C	B3A	SINE/ B2	-10	188	2	>AK149403_1406_ 1594_RC_B3A
NM_026 036	2270	2439	0	R C	B3	SINE/ B2	-4	212	27	>AK149843_2270_ 2439_RC_B3
NM_010 398	1292	1476	-698	R C	B3A	SINE/ B2	-11	187	3	>AK157261_1292_ 1476_RC_B3A
NM_001 110504	1292	1362	-572	R C	B3A	SINE/ B2	-11	86	11	>AK160921_1292_ 1362_RC_B3A
NM_007 893	1080	1254	-746	R C	B3	SINE/ B2	0	216	21	>AK163105_1080_ 1254_RC_B3
NM_007 893	1427	1491	-509	R C	B3A	SINE/ B2	-82	116	46	>AK163105_1427_ 1491_RC_B3A
NM_030 714	1954	2064	-333	R C	B3	SINE/ B2	-95	121	2	>AK165234_1954_ 2064_RC_B3
NM_001 110101	853	1043	-1516	R C	B3	SINE/ B2	-5	211	6	>AK169421_853_1 043_RC_B3
NM_001 110101	1742	1936	-623	R C	B3	SINE/ B2	-2	214	8	>AK169421_1742_ 1936_RC_B3

【産業上の利用可能性】

【0135】

本発明に依れば、RNAからの翻訳の効率を改善する機能を有する機能性核酸分子、およびそれらの利用を提供することができる。

10

20

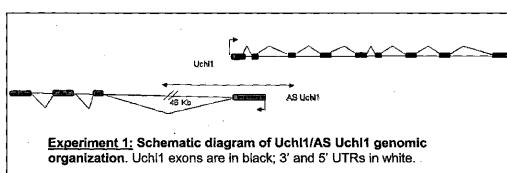
30

40

50

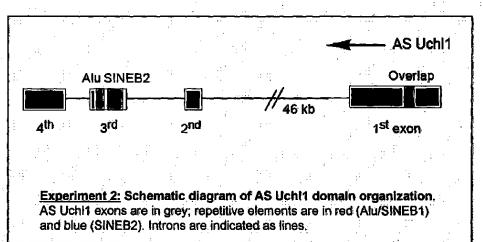
【図1】

FIG. 1



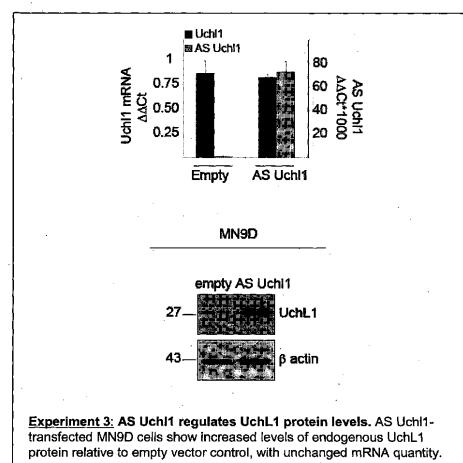
【図2】

FIG. 2



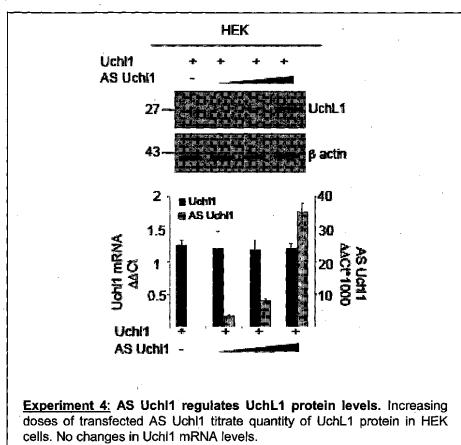
【図3】

FIG. 3



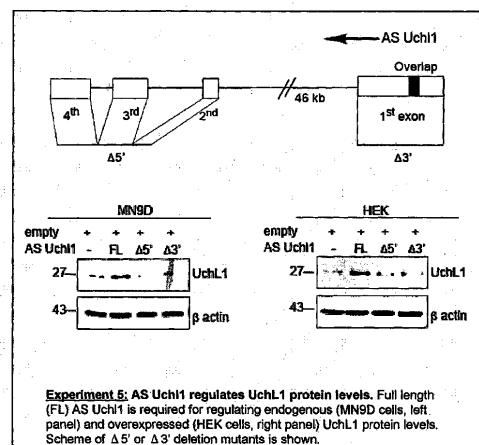
【図4】

FIG. 4



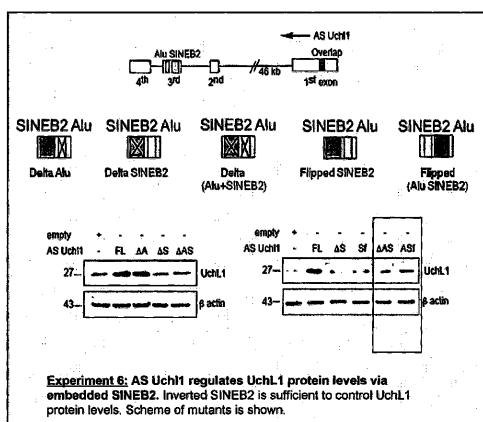
【図5】

FIG. 5



【図6】

FIG. 6



【図7】

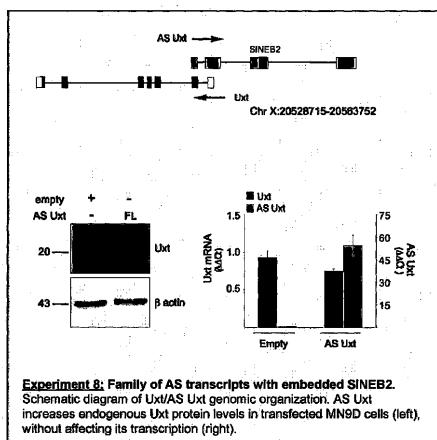
FIG. 7

Riken Acc.	AS to gene	NCBI Acc.	Orientation	Type
AK019025	Cod44	NM_027346	RC	SINEB2 #63
AK020359	Uxt	NM_013840	RC	SINEB2 #63
AK032194	Nan2	NM_153561	RC	SINEB2 #63
AK032215	Nudt9	NM_028704	RC	SINEB2 #63
AK034331	n/a	NM_001012311	RC	SINEB2 #63
AK036015	Nrm	NM_134122	RC	SINEB2 #63
AK035408	Sv2b	NM_153579	RC	SINEB2 #63
AKD41230	Code8a	NM_178841	RC	SINEB2 #63
AKD4164	Roc	NM_133878	RC	SINEB2 #63
AKD41742	Abhd11	NM_146215	RC	SINEB2 #63
AKD42881	Wifc5	NM_145389	RC	SINEB2 #63
AKD44205	Rhob	NM_007485	RC	SINEB2 #63
AKD46977	Eln	NM_007925	RC	SINEB2 #63
AKD46928	n/a	NM_177008	RC	SINEB2 #63
AKD47213	Ulmk2	NM_010653	RC	SINEB2 #63
AKD48308	Epo4.9	NM_013514	RC	SINEB2 #63
AKD51130	Rabgap1a	NM_001038821	RC	SINEB2 #63
AKD54976	Gadd45a	NM_007838	RC	SINEB2 #63
AKD78111	Nat1	NM_010178	RC	SINEB2 #63
AKD78321	Uch1	NM_014670	RC	SINEB2 #63
AKD80740	Pdr	NM_026208	RC	SINEB2 #63
AKD90347	3110005G23Rik	NM_028427	RC	SINEB2 #63
AK132441	A130222J15Rik	NM_175313	RC	SINEB2 #63
AK135500	Ednra	NM_010332	RC	SINEB2 #63
AK143014	Cdkn2aip	NM_172497	RC	SINEB2 #63
AK143784	Txnip	NM_001000935	RC	SINEB2 #63
AK145079	Gsk3b	NM_019827	RC	SINEB2 #63
AK146843	Cmtm8	NM_028038	RC	SINEB2 #63
AK153105	E4f1	NM_007893	RC	SINEB2 #63
AK165234	Dbx3	NM_030714	RC	SINEB2 #63
AK180421	n/a	NM_001110101	RC	SINEB2 #63

Experiment 7: Family of AS transcripts with embedded SINEB2.
Family of FANTOM 3 non-coding clones that are AS to protein coding genes and contain embedded SINEB2 in inverted orientation.

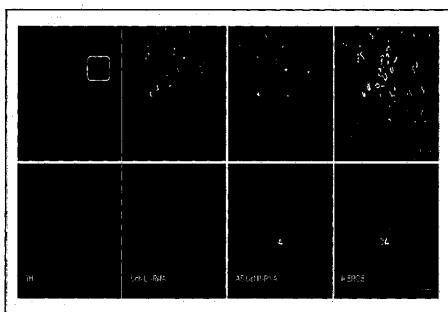
【図8】

FIG. 8



【図9】

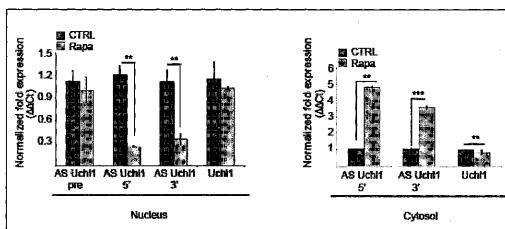
FIG. 9



Experiment 9: Expression of AS Uchl1 in the nucleus of dopaminergic neurons. AS Uchl1 (red) and Uchl1 (green) transcripts are expressed in the nucleus and cytoplasm of TH-positive DA neurons of the Substantia Nigra (blue). Details of localization are in zoom images.

【図10】

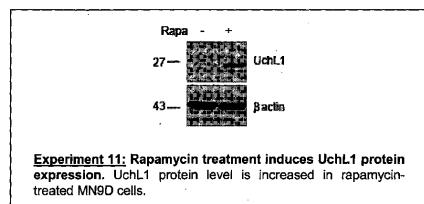
FIG. 10



Experiment 10: AS Uchl1 translocates to the cytoplasm upon rapamycin treatment in MN9D cells. mRNA levels measured with primers spanning 5' overlapping or 3' distal portions of the transcript. Data indicate mean ± s.d., n≥3 (3). **p<0.01; ***p<0.005.

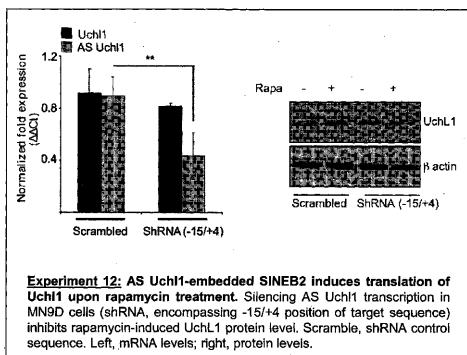
【図11】

FIG. 11



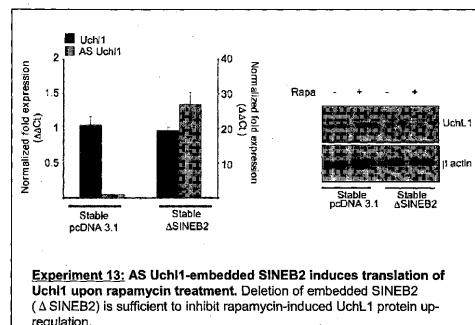
【図12】

FIG. 12



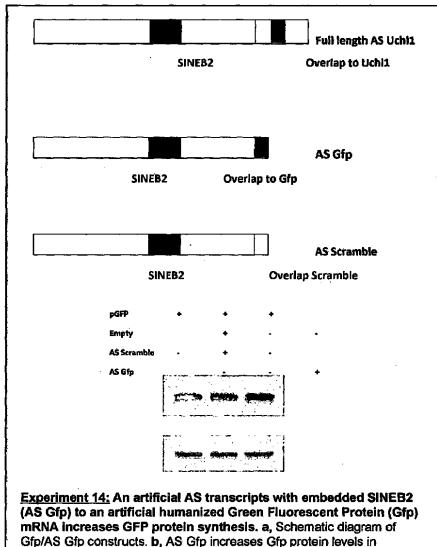
【図13】

FIG. 13



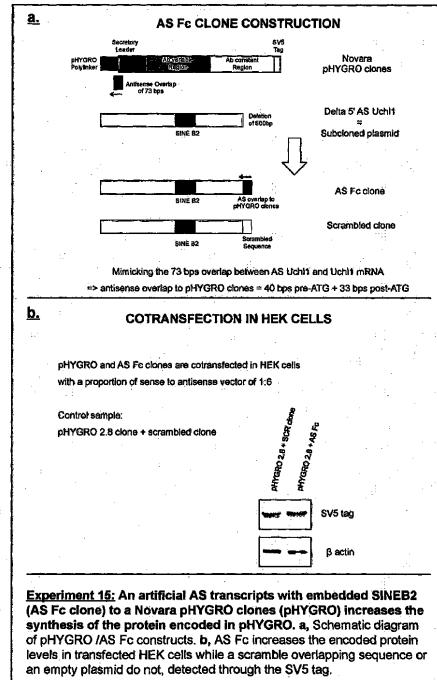
【図14】

FIG. 14



【図15】

FIG. 15



【図16】

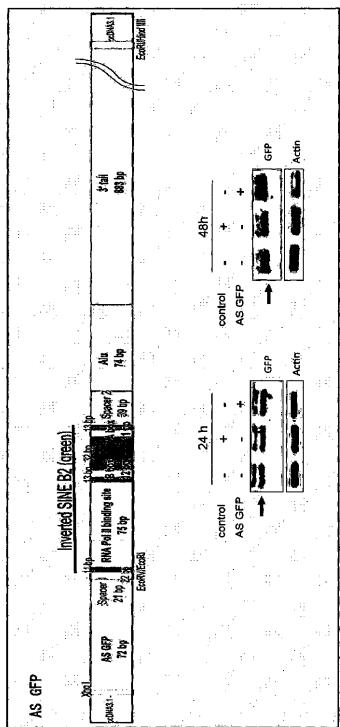
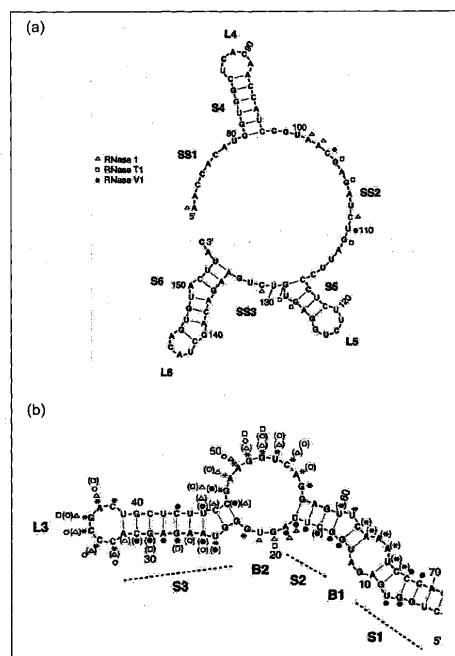


FIG. 16.

【図17】

FIG. 17



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/059430						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N15/09 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST/580 (JDreamII), WPIDS(STN), BIOSIS(DIALOG)								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;"><u>X</u></td> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> CARNINCI P. et al. 'Mus musculus adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430596G22 product:unclassifiable, full insert sequence', Medline [online], 06 Oct 2010, Medline Accession No.AK078321, [retrieved on 25 Apr 2012], Retrieved from the internet: <URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AK078321> </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;"> <u>1-13</u> <u>14-16</u> </td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	<u>X</u>	CARNINCI P. et al. 'Mus musculus adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430596G22 product:unclassifiable, full insert sequence', Medline [online], 06 Oct 2010, Medline Accession No.AK078321, [retrieved on 25 Apr 2012], Retrieved from the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AK078321 >	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
<u>X</u>	CARNINCI P. et al. 'Mus musculus adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430596G22 product:unclassifiable, full insert sequence', Medline [online], 06 Oct 2010, Medline Accession No.AK078321, [retrieved on 25 Apr 2012], Retrieved from the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AK078321 >	<u>1-13</u> <u>14-16</u>						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" 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 25.04.2012	Date of mailing of the international search report 15.05.2012							
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Yoshiko MATSUDA 4B 3126 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/059430

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	CARNINCI P. et al. 'Mus musculus 0 day neonate head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4833404H03 product:unclassifiable, full insert sequence', Medline [online], 06 Oct 2010, Medline Accession No.AK029359, [retrieved on 25 Apr 2012], Retrieved from the internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AK029359 >	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	OKAZAKI Y. et al., Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs, Nature, 2002, vol.420, p.563-73	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	SHIBATA K. et al., RIKEN integrated sequence analysis (RISA) system--384-format sequencing pipeline with 384 multicapillary sequencer, Genome Res., 2000, vol.10, p.1757-71	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	CARNINCI P. et al., Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes, Genome Res., 2000, vol.10, p.1617-30	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	KAWAI J. et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection, Nature, 2001, vol.409, p.685-90	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	CARNINCI P. et al., The transcriptional landscape of the mammalian genome, Science, 2005, vol.309, p.1559-63	<u>1-13</u> <u>14-16</u>
X A	KATAYAMA S. et al., Antisense transcription in the mammalian transcriptome, Science, 2005, vol.309, p.1564-6	<u>1-13</u> <u>14-16</u>

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2012/059430

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2008/113773 A2 (BIORIGEN S.R.I.) 2008.09.25, & EP 2152873 A	<u>1, 5-13</u> <u>2-4, 14-16</u>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/059430

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.: 1 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claim 17 relates to a method for treatment of the human body.
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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/059430

'A regulatory sequence having an activity of increasing of the protein synthesis efficiency' in Claim 1 and 10 includes every sequences having a 'regulatory' function.

However, only a few sequences are disclosed in the description.

Therefore, claim 1-16 are not supported by the description as required by Article 6 PCT as their scope is broader than justified by the description and drawings.

Furthermore, the relative term 'A regulatory sequence having an activity of increasing of the protein synthesis efficiency', used in claim 1 and 10 is vague and unclear, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear.

Therefore, claim 1-16 are not clear as required by Article 6 PCT.

Accordingly, this report has been established only about the invention concerning 'A functional nucleic acid molecule comprising: (a) a target determinant sequence comprising antisense sequence to a target sequence in the protein-encoding RNA for which protein synthesis efficiency is to be increased; and (b) SINE derived sequence or 7SL-RNA-derived sequence'.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(72) 発明者 カルニンチ ピエロ

日本国神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 フォレスト アリステア

日本国神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72) 発明者 ゲスティンチック ステファノ

イタリア国 トリエステ バイア パノラマ 8

(72) 発明者 カッリエーリ クラウディア

イタリア国 ローマ モンテロントド バイア デル フランシーズ 21

(72) 発明者 ズックリ シルヴィア

イタリア国 トリエステ バイア ギルランダイオ 30

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA21 BA80 CA01 CA11 DA02 EA04 GA11 HA17

4B064 AG01 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01

4C084 AA13 NA14 ZA022 ZA152 ZB212 ZB262

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA15 ZB21

ZB26