

(19)日本国特許庁(JP)

(12) **公表特許公報(A)**

(11)公表番号

特表2025-520771

(P2025-520771A)

(43)公表日 令和7年7月3日(2025.7.3)

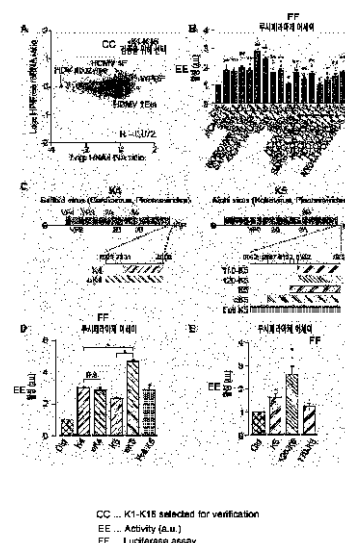
(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
		審査請求 有	予備審査請求 未請求	(全81頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-576351(P2024-576351)	(71)出願人	509329800 ソウル大学校産学協力団 SEOUL NATIONAL UNIV ERSITY R&DB FOUNDAT ION 大韓民国 0 8 8 2 6 ソウル クァナク ーク クァナクロー1	
(86)(22)出願日	令和5年6月29日(2023.6.29)	(71)出願人	519444052 インスティテュート フォー ベーシッ ク サイエンス INSTITUTE FOR BASI C SCIENCE 大韓民国, 3 4 1 2 6 テジョン, ユソ ング, エクスポート 5 5	
(85)翻訳文提出日	令和6年12月24日(2024.12.24)	(74)代理人	110001519	
(86)国際出願番号	PCT/KR2023/009154			
(87)国際公開番号	WO2024/005575			
(87)国際公開日	令和6年1月4日(2024.1.4)			
(31)優先権主張番号	10-2022-0080073			
(32)優先日	令和4年6月29日(2022.6.29)			
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)			
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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			
	最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 RNAの安定性又はmRNA翻訳増強用の新規調節エレメントおよびこれと相互作用する ZCCHC2、並びにその用途

(57) 【要約】

本発明は、RNAの安定性又はmRNA翻訳増強用の新規調節エレメントおよびこれと相互作用するZCCHC2、並びにその用途に関する。

本発明のRNAの安定性または新規mRNA翻訳増強用の調節エレメントおよびこれと相互作用するZCHC2は、標的タンパク質の発現を増加させることができるので、標的タンパク質の用途に応じて様々な分野に応用可能である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) アイチウイルス 1 (Aichi virus 1) 遺伝子 (NCBI Reference Sequence: NC_001918.1) のセグメントの塩基配列またはその RNA の塩基配列; または (ii) これと少なくとも 90% の同一性を有する塩基配列; または (iii) (i) の塩基配列と少なくとも 50% の同一性を有するコブウイルスの 3' 非翻訳領域内の塩基配列を含む、RNA 安定性又は mRNA 翻訳増強用調節エレメントであって、

前記セグメントは、アイチウイルス 1 遺伝子内の 8251 番のヌクレオチドから 5' 方向に連続する 110 個超過 250 個以下のヌクレオチドを含む、RNA 安定性又は mRNA 翻訳増強用調節エレメント。

10

【請求項 2】

前記 (i) の塩基配列は、配列番号 20、94、または 95 の塩基配列又はその RNA の塩基配列である、請求項 1 に記載の調節エレメント。

【請求項 3】

前記 (iii) の塩基配列は、コブウイルスの 3' 非翻訳領域内の少なくとも 2 つのヘアピン構造を有する塩基配列である、請求項 1 に記載の調節エレメント。

【請求項 4】

前記 (iii) の塩基配列は、配列番号 98~140 のいずれか 1 つの塩基配列またはその RNA の塩基配列である、請求項 1 に記載の調節エレメント。

20

【請求項 5】

前記 (ii) の塩基配列は、配列番号 20 の塩基配列 1~14 のいずれか 1 つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、又は両方ともを有する塩基配列またはその RNA の塩基配列である、請求項 1 に記載の調節エレメント。

【請求項 6】

前記調節エレメントは、RNA の安定性および mRNA 翻訳を増強させてタンパク質の発現を増加させる、請求項 1 に記載の調節エレメント。

【請求項 7】

前記調節エレメントは、TENT4 と相互作用する ZCHC2 と相互作用して、ポリ(A) テールの長さの増加、ポリ(A) テールの安定性の増加、又はその両方ともを誘導する、請求項 1 に記載の調節エレメント。

30

【請求項 8】

標的タンパク質の遺伝子と、その 3' 非翻訳領域に請求項 1~7 のいずれか一項に記載の調節エレメントとを含む、コンストラクト。

【請求項 9】

前記標的タンパク質がレポーター、生理活性ペプチド、抗原、または抗体またはその断片から選択される、請求項 8 に記載のコンストラクト。

【請求項 10】

前記コンストラクトは、mRNA コンストラクトである、請求項 8 に記載のコンストラクト。

40

【請求項 11】

請求項 8 に記載のコンストラクトを含む、ベクター。

【請求項 12】

請求項 8 に記載のコンストラクトまたは該コンストラクトを含むベクターを含む、組換え宿主細胞。

【請求項 13】

前記宿主細胞は、ZCHC2 またはそれをコードする遺伝子と、TENT4 またはそれをコードする遺伝子と、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 12 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 14】

50

請求項 8 に記載のコンストラクトと、前記コンストラクトを含むベクターと、若しくは前記コンストラクト又はベクターを含む組換え宿主細胞とを含む、組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、疾病の予防又は治療と、若しくは mRNA コンストラクト又は標的タンパク質を製造するためのものである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記コンストラクト又はベクターは、Z C C H C 2 をコードする遺伝子と、T E N T 4 をコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含むか、または

前記組換え宿主細胞または組成物は、Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子と、T E N T 4 又はそれをコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の調節エレメントと相互作用する Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子を含む、RNA の安定性又は mRNA 翻訳増強用組成物。

【請求項 18】

前記組成物は、ポリ (A) テールの長さの増加、ポリ (A) テールの安定性の増加又はその両方ともを誘導して、RNA の安定性または mRNA 翻訳を増強させる、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物は、T E N T 4 またはそれをコードする遺伝子をさらに含む、請求項 17 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、RNA の安定性又は mRNA 翻訳増強用の新規調節エレメントおよびこれと相互作用する Z C C H C 2、並びにその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

ウイルスは、細胞の遺伝子発現メカニズムを奪うための多様な機序を進化させたし、この分野の研究は、RNA 生物学及び生命工学の発展に大きく寄与した。例えば、7-メチルグアノシンキャップ、内部リボソーム侵入部位および RNA 三重らせんは、レオウイルス、ポリオウイルスおよびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスで最初に発見された。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、ウイルス転写および RNA 核外遊出 (export) のための細胞因子を動員させるために、それぞれ TAR (transactivation response region) および RRE (rev-response element) を活用するものと知られている (Vaishnav, et. al., New Biol., 1991, 3, 142-150; Dingwall, et. al., EMBO J., 1990, 9, 4145-4153)。B 型肝炎ウイルス (HBV) は、ウイルストランスクリプトームを安定化させる宿主ヌクレオチジル転移酵素を引き出すために PRE (posttranscriptional regulatory element) に依存する (Kim, et. al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2020, 27, 581-588; Huang, et. al., Mol. Cell. Biol., 1993, 13, 7476-7486)。

【0003】

しかしながら、このような発見は、全体のウイルスのごく一部に過ぎない病原性ウイルスに対して低いスループット (throughput) を有する分析を通じて行われた。これまで 6,828 種のウイルスが命名されており、NCBI ゲノムデータベースは、14,775 個の完全なウイルスゲノム配列を有している (O'Leary, et. al., Nucleic Acids Res., 2016, 44, D733-D

10

20

30

40

50

745)。近年、ディープシーケンシングに基づくメタゲノミクス (metagenomics) の研究は、環境および動物サンプルから数十万個の更なるウイルス配列を検出した (Neri, et. al., Cell, 2022, 185, 4023-4037)。このように使用可能な配列の数が膨大であるが、臨床的又は産業的関連性のない配列は、ほとんど未開発のまま存在している。したがって、急増するウイルス配列データは、機能的注釈について重要な課題を提示しており、ウイルス配列データを解釈するためのより効果的な戦略が求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、ウイルス配列データを用いて、RNAの安定性又はmRNA翻訳増強用の調節エレメントをスクリーニングする方法を開発して、前記方法に従って新規調節エレメントを発掘し、これと相互作用するZCCHC2の用途を開発した。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の一つの目的は、RNAの安定性および／またはmRNAの翻訳増強用の調節エレメントを提供することにある。

【0006】

本発明の他の目的は、標的タンパク質の遺伝子およびその3'非翻訳領域に前記調節エレメントを含むコンストラクト、ベクター、または組換え宿主細胞を提供することにある。

【0007】

本発明のまた他の目的は、前記コンストラクト、ベクター、または組換え宿主細胞を含む組成物を提供することにある。

【0008】

本発明の別の目的は、前記調節エレメントと相互作用するZCCHC2またはそれをコードする遺伝子を含む組成物を提供することにある。

【0009】

本発明のまた別の目的は、前記組換え宿主細胞を培養する段階と、標的タンパク質を分離する段階とを含む標的タンパク質の製造方法を提供することにある。

【0010】

本発明の更なる目的は、前記コンストラクト又はベクターを鋳型として、in vitroでコンストラクトを転写する段階と、転写されたmRNAコンストラクトを回収する段階と、を含む、mRNAコンストラクトの製造方法を提供することにある。

【0011】

本発明の更なる他の目的は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物のRNA安定性および／またはmRNAの翻訳増強のための用途を提供することにある。

【0012】

本発明の更に別の目的は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物の疾患の予防または治療のための用途を提供することにある。

【0013】

本発明のまた更なる目的は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物のmRNAコンストラクト又は標的タンパク質を製造するための用途を提供することにある。

【発明の効果】

【0014】

本発明のRNAの安定性又はmRNA翻訳増強用の新規調節エレメントおよびこれと相互作用するZCCHC2は、標的タンパク質の発現を増加させることができるので、標的タンパク質の用途に応じて様々な分野に応用可能である。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】図1A～図1Eは、RNA調節エレメントを同定するためのViromicスクリーンに関するものであって、図1Aは、ヒトを感染させることができるウイルスをスクリーニングして、種の総数および平均ゲノムサイズを示した図である。各科(family)の種の総数および平均ゲノムサイズは灰色のバーで表した。ライブラリーで扱うゲノムの種の総数および平均部分はカラーバーで表した。

【図1B】図1Bは、Viromicスクリーンのための実験構造の設計および実験手順を示した模式図である。65ntタイリング段階で130nt長さの30,367個のセグメントをそれぞれ3本の異なるバーコードと連結して、総計91,101個のオリゴを生成した。前記オリゴは、ホタルルシフェラーゼ構造の3'非翻訳領域にクローニングされた。次に、プラスミドプールをHCT116細胞内にトランスフェクトした。RNAの安定化効果を定量化のために、レポーターDNAおよびRNAを抽出してPCRで増幅した後、シーケンシングした。ポリソームプロファイリングの場合、ショ糖勾配遠心分離で5つの分画を得、レポーターRNAをシーケンシングした。

【図1C】図1Cは、RNA存在量(abundance)を順位別にアライメントしたグラフである。RNA存在量スコアは、 $\log_2$ 比(RNAのリード断片をDNAのリード断片で割った値)で計算した。陽性対照(HCMV 1E, WPRE)、陰性対照(HCMV 1Em)、肝炎デルタウイルスの自己切断リボザイムおよびウイルスmiRNAを示した。

【図1D】図1Dは、ウイルスレポーターmRNAのポリソーム(polysome)をプロファイリングした結果を示した図である。色は、各分画におけるRNAの相対的存在量を示すものである。20個のクラスタは、階層的クラスタリングを用いて生成され、重いポリソーム(heavy polysome)と遊離mRNAとの間のリードの比に応じてアライメントした。

【図1E】図1Eは、代表的なクラスタにおけるRNA分布パターンを示した図である。

【図2】図2は、ウイルス調節エレメントの検証に関するものであって、図2Aは、RNA存在量(X軸)および翻訳(Y軸)に及ぼす影響を比較したグラフである。図2Bは、選択された16個のセグメントに対する有効性を、ルシフェラーゼ活性を通じた調べたものである。K1-K16(図2Aで空色の点で表示)は、二重ルシフェラーゼレポーターで別々にクローニングした。Ctrlは、Kエレメントのないレポーターを示し、正規化に用いられた。データは、平均±平均の標準誤差(SEM)で表した(n=8回の生物学的繰り返し実験)。*pは、0.05未満を、**pは、0.01未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図2Cは、Saffoldウイルス(NC_009448.2、左)およびAichiウイルス1(NC_001918.1、右)のゲノム構造及び各ウイルスに表示されたK4及びK5エレメントのゲノム座標を示した図である。図2Dは、UTRレポーターのルシフェラーゼ活性を示した図である。*p<0.05を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図2Eは、切断されたK5レポーターのルシフェラーゼ活性を示した図であって、120-K5(8132-8251、120-nt)および110-K5(8142-8251、110-nt)は、K5の切断された形態を示している。データは、平均±SEMで表した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。

【図3A】図3A～図3Eは、K5エレメントの特性に関するものであって、図3Aは、K5変異体およびホモログを含む二次スクリーニングを示した模式図である。相同エレメントは、88個のピコルナウイルスの3'末端130ntセグメントから派生した。RNA安定性は、図1Bと同様に測定した。

【図3B】図3Bは、二次スクリーニングの結果を示した図である。DNA数(X軸)およびRNA数(Y軸)は、塩基配列分析によって測定した。K5(赤色)、K5m(濃い赤色)およびコブウイルスの相同セグメント(ピンク色)を表示した。

【図3C】図3Cは、K5の突然変異を用いた二次スクリーニングの結果であって、置換

10

20

30

40

50

変異体で測定したRNA/DNA比（上）および1つまたは2つのヌクレオチド欠失後、定量化した比（下）を示した図である。K5およびK5mの結果のRNA/DNA比は、水平線で示した。データは、置換について平均±SEMエラーバーおよび欠失について陰影で表示した（ $n=3$ ）。

【図3D】図3Dは、K5の2次構造を予測したものである。塩基識別スコア（マゼンタ色で表示）および塩基対スコア（塩基対の間の青色線の幅で表示）は二次スクリーニングで測定した。

【図3E】図3Eは、スクリーニングに用いられたピコルナウイルス科（Picornaviridae）3'UTR配列のクラドグラムを示した図である。コブウイルス属は、赤い陰影で強調して表示している。エレメント保存スコア（赤色の箱）は、ヒトアイチウイルスのK5エレメントに対する配列相同性の程度を示す。RNAの安定化効果は緑色の箱で示した。

【図4】図4は、K5がAAVベクターおよび合成mRNAからの遺伝子発現を向上させることを示しており、図4Aは、K5エレメントまたはWPREを含むAAVコンストラクトを示した簡略図である。K5活動を阻害するG-突出部の欠失は、アスタリスクで示した。

図4Bは、10,000moiのHeLa細胞に形質導入されたK5またはWPREを含むrAAVコンストラクトからのGFP発現を示した図である。データは、シミュレーション値で正規化し、平均±SEMで表した（ $n=3$ ）。*pは0.05未満を示し、両側学生t検定を実施した。

図4Cは、rAAVに感染されたHeLa細胞のGFPの発現をフローサイトメトリーで確認した図である。

図4Dは、eK5及びその変異（上）およびαグロビンUTR（GBA）および／またはK5（下）を含むd2EGFP IVT mRNAコンストラクトを含むか、または含まないホタルルシフェラーゼエンコードIVT mRNAを示した概略図である。

図4Eは、HeLa細胞に伝達された合成mRNAからのルシフェラーゼ発現を示した図である。データは、Ctrl（24hpt）値で正規化し、平均±SEMで表した（ $n=3$ ）。*pは0.05未満を示し、両側学生t検定を実施した。

図4Fは、トランスフェクション後72時間後にd2EGFP mRNAレポーターでトランスフェクトされたHeLa細胞にウェスタンブロットを行った結果である。

【図5】図5は、K5がTENT4により混合テーリングを誘導することを示しており、図5Aは、Hire-PATで測定したポリ（A）テールの長さ分布を示した図である。正規化された強度（任意の単位、a.u.）は、リード（read）のパーセンタイル順位であり、これを次のような全てHire-PAT分析に適用した。HeLa細胞を対照、K5レポーター、またはその変異体、K5mプラスミドでトランスフェクトさせた。サイズマーカーの役割をするPCRの副産物は、アスタリスクで示した。

図5Bは、対照およびK5レポーターのルシフェラーゼ発現により測定した末端ヌクレオチジル転移酵素がK5活性に及ぼすノックダウン効果を示した図である。密接に関連したパラログは、TENT3（TENT3A/TUT4/ZCCHC11およびTENT3B/TUT7/ZCCHC6）、TENT4（TENT4A/PAPD7/TRF4-1/TUT5およびTENT4B/PAPD5/TRF4-2/TUT3）およびTENT5（TENT5A、TENT5B、TENT5CおよびTENT5D）とともに減少したことに留意されたい。データは、各レポーター構造について対照siRNA（siCont）値に正規化し、平均±SEMで表した（ $n=3$ ）。*pは0.05未満を示し、両側学生t検定を実施した。

図5Cは、Hire-PATにより測定されたK5レポーターmRNAのポリ（A）テールの長さ分布を示した図である。HeLa細胞をTENT4阻害剤RG7834またはR-異性体RO0321で処理した。PCRの副産物は、アスタリスクで示した。

図5Dは、HeLa細胞において、K5を含むレポーターのポリ（A）テールの3'末端部位内における非アデノシン残基を計算するための遺伝子特異的TAIL-seqを示した図である。各部位の混合テーリングの割合は、3'末端からの距離で表示した。

図5Eは、RO0321またはRG7834の存在下、K5及びeK5プラスミドでトランスフェクトされたHeLa細胞のルシフェラーゼ活性を示した図であ

10

20

30

40

50

る。データは、各条件下でK5エレメント (Ctrl) なしにレポーターについて正規化し、平均±SEMで表した (n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図5Fは、RO0321またはRG7834の存在下、K5及びeK5プラスミドでトランスフェクトされたHeLa細胞のRT-qPCRの結果を示した図である。データは、各条件下でK5エレメント (Ctrl) なしにレポーターについて正規化し、平均±SEMで表した (n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図5Gは、HCT116細胞およびZCCHC14のKO細胞におけるK5レポーターのルシフェラーゼアッセイの結果を示した図である。データは、各条件下でK5エレメント (Ctrl) なしにレポーターで正規化し、平均±SEMで表した (n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図5Hは、eK5を用いたRAPID (RNA-タンパク質相互作用の検出) 実験に引き続いて質量分析を行った結果を示した図である。eK5エレメントのない3xBoxB配列は陰性対照として使用した。空色の点は、2回以上の繰返し実験 (Log₂FC>1) における濃縮されたタンパク質を示すものである。100,000個の近似値は、漏れたLFQ値に追加した。DNAJC21およびZCCHC2は、細胞質局在化及び核酸GO用語を有するタンパク質を示すものである。図5Iは、eK5を用いたRAPID (RNA-タンパク質相互作用の検出) 実験に引き続いてウェスタンブロットを行った結果を示した図である。eK5エレメントのない3xBoxB配列は陰性対照として使用した。100,000個の近似値は、漏れたLFQ値に追加した。DNAJC21およびZCCHC2は、細胞質局在化及び核酸GO用語を有するタンパク質を示すものである。

10

20

【図6】図6は、K5の宿主因子としてのZCCHC2の機能を示しており、図6Aは、ZCCHC14およびC.elegans gls-1と比較したZCCHC2のドメイン構造を示した図である。3つのタンパク質として計算されたアミノ酸類似性スコアは、各ドメイン構造上に表示した。前記タンパク質の中で最も高い類似性領域は赤色の括弧で示した。図6I、図6K、及び図6Lに用いられたZCCHC2変異体、ΔC (1-375 a.a)、ΔN (201-1,178 a.a) およびZnF2変異体をZCCHC2構造の下に示した。図6Bは、HeLa親細胞およびTENT4二重KO細胞の溶解物を用いてRNase Aの存在下で抗TENT4Aおよび抗TENT4Bとの共免疫沈降でZCCHC2とTENT4との間の相互作用を示した図である。タンパク質は、ウェスタンブロットにより可視化した。ZCCHC14およびTENT4Aは同量のサンプルを有する他のゲルで分析した。交差反応バンドはアスタリスクで示した。図6Cは、当該抗体を用いたウェスタンブロットに引き続いて亜細胞アッセイにて検査されたZCCHC2の局在化を示した図である。GM130は、同量のサンプルを有する他のゲルで分析した。図6Dは、3'非翻訳領域内でeK5にてEGFP mRNAを安定に発現するHeLa細胞において抗ZCCHC2抗体で免疫沈降した後、RT-qPCRを行った結果を示した図である。正常ウサギIgGを用いた免疫沈降を対照および正規化に使用した。EGFP-eK5 mRNAは、他のRNA (GAPDH、U1 snRNAおよび18S rRNA) と異なり、抗ZCCHC2抗体として特異的に沈殿した。データは、EGFP-eK5 (IgG) qPCR値に正規化し、平均±SEMで表した (n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図6Eは、HeLa親細胞およびHeLa ZCCHC2 KO細胞においてHire-PAT分析で測定したK5及びK5mレポーターmRNAのポリ (A) テールの長さ分布を示した図である。サイズマーカーの役割をするPCRの副産物は、アスタリスクで示した。図6Fは、HeLa親細胞およびZCCHC2 KO細胞において、遺伝子特異的TAIL-seqにより測定されたK5レポーターmRNAの3'ポリ (A) テールの最後の3つの部位における非アデノシン (Non-adenosine) の頻度を示した図である。図6Gは、K5レポーターでトランスフェクトしたHeLa親細胞およびZCCHC2 KO細胞におけるルシフェラーゼの発現を示した図である。細胞をTENT4阻害剤RG7834またはそのR-異性体RO0321で処理した。データは、各条件下でK5エレメント (Ctrl) のないレポーターによって正規化し、平均±SEMで表した (n

30

40

50

＝3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図6Hは、野生型ZCCHC2の異所性の発現を有するHeLa ZCCHC2 KO細胞の構造を示した図である。データは、各条件下でK5エレメント(Ctrl)のないレポーターによって正規化し、平均値±SEMとして表示した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図6Iは、野生型ZCCHC2、ZCCHC2ジンクフィンガー突然変異およびZCCHC2 ΔN構造を示した図である。データは、各条件下でK5エレメント(Ctrl)のないレポーターによって正規化し、平均±SEMで表した(n=4(左)、n=3(右))。図6Jは、テザリング分析結果であって、λNタグ付きまたはタグなしのZCCHC2タンパク質をHeLa細胞において3xBoxBルシフェラーゼレポーターmRNAと共発現した結果を示した図である。TNRC6Bタンパク質のC末端サイレンシング(silencing)ドメイン(716～1,028番目のアミノ酸)を対照として使用した。データは、野生型のサンプルの値に正規化し、平均±SEMで表した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図6Kは、テザリング分析結果であって、ZCCHC2ジンクフィンガー突然変異レポーターmRNAに人為的に結合して活性化された結果を示した図である。ZCCHC2ジンクフィンガー突然変異は、レポーターmRNAに人為的に結合されるときに活性化された。データは、野生型のサンプルの値に正規化し、平均±SEMで表した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図6Lは、FLAGタグ付きZCCHC2タンパク質(F-ZCCHC2)を、HeLa ZCCHC2 KO細胞で一過的に発現し、抗FLAG抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロッティングにより分析した結果を示した図である。全長または切断された突然変異(ΔC, ΔN)ZCCHC2タンパク質をTENT4タンパク質と相互作用する能力について比較した。TENT4AとGAPDHは、同じゲルで検出し、他のタンパク質は、同量のサンプルのある別途のゲルで分析した。交差反応バンドはアスタリスクで示した。

【図7】図7は、調節RNAがウイルス圏(virosphere)に広く広がっていることを示しており、図7Aは、RO0321またはRG7834を含むHCT116細胞のK1～K16エレメントに対するルシフェラーゼのレポーター分析を示した図である。図7Bは、K3、K4、K5レポーターでトランスフェクトされたHCT116親細胞およびZCCHC14 KO細胞をルシフェラーゼ分析した結果である。データは、各条件下でK5(Ctrl)のないレポーターによって正規化し、平均±SEMで表した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図7Cは、K3、K4、K5レポーターでトランスフェクトしたHeLa親細胞およびZCCHC2 KO細胞をルシフェラーゼ分析した結果である。データは、各条件下でのK5(Ctrl)のないレポーターによって正規化し、平均±SEMで表した(n=3)。*pは0.05未満を示し、両側スチューデントt検定を実施した。図7Dは、混合テザリングを利用するウイルスを概略的に示す模式図である。RE、1EおよびK3は、それぞれHBV、CMVおよびノロウイルスに由来し、TENT4を動員(recruit)するためZCCHC2 14に依存していた。SaffoldウイルスのK4はTENT4に依存するが、ZCCHC14及びZCCHC2には依存しなかった。図7Eは、RNA存在量(左)、翻訳(中央)、および細胞内局在化(右)を制御するウイルス科におけるRNAエレメントの広範な分布を示した図である。

【図8】図8は、HCMV 1Eエレメントおよびループ変異を含むタイル(tiles)を示した図である。

【図9】図9は、TENT4-ZCCHC14複合体を動員するSL2.7 RNAを餌として用いてRNAプルダウン後に質量分析計による分析を行った結果である。SL2.7突然変異(X軸)および「ビード専用」対照群(Y軸)を正規化に使用した。青色点はSL2.7サンプルにおいてかなり豊富なタンパク質を示す(Log₂FC>0.8およびFDR<0.1)。漏れたLFQ値に擬似値(pseudovalue)10,000が追加されている。HEK-293T細胞溶解物をRNAプルダウンに使用した(n=2)

10

20

30

40

50

。SAMD4タンパク質は、当該SAMDメインを介してRNAに結合するが、SL2.7 11に対する増強活性はない。K0355は、SAMD4Bと相互作用するものと知られている。

【図10】図10は、K5がレンチウイルスベクターおよび合成mRNAからの遺伝子発現を向上させることを示しており、図10Aは、K5エレメントまたはWP REを含むレンチウイルスコンストラクトを示す概略図である。K5活動を阻害するG-突出部の欠失は、アスタリスクで示した。図10Bは、レンチウイルスに感染されたHeLa細胞のGFPの発現をフローサイトメトリーで確認したものである。

【図11】図11は、ポリソーム分画法(Polysome fractionation)によるグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明に開示のそれぞれの説明及び実施の形態は、それぞれの他の説明及び実施形態に適用されてもよい。すなわち、本発明に開示の様々な要素のすべての組み合わせが、本発明の範疇に属する。また、下記具体的な説明によって本発明の範囲が限定されるものではない。また、当該技術分野における通常の知識を有する者は、通常の実験のみを用いて本明細書に記載された本発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識または確認することができる。また、このような均等物は、本発明に包含されるものと意図される。

【0017】

本発明の他の一つの態様は、RNAの安定性および／またはmRNA翻訳増強用調節エレメントである。前記調節エレメントは、RNAの安定性および／またはmRNA翻訳を増強させてタンパク質の発現を増加させることができる。具体的に、本発明の調節エレメントは、(i) アイチウイルス1(Aichi virus 1) 遺伝子(NCBI Reference Sequence: NC_001918.1) のセグメントの塩基配列またはそのRNAの塩基配列；または(ii) これと少なくとも90%の同一性を有する塩基配列；または(iii) (i) の塩基配列と少なくとも50%の相同性を有するコブウイルスの3' 非翻訳領域内の塩基配列を含むことができる。

20

【0018】

本発明における前記セグメントは、アイチウイルス1 遺伝子内における8251番のヌクレオチドから5' 方向に連続する110個超過250個以下のヌクレオチドを含むことができるが、これに限定されない。

30

【0019】

一実施の形態として、前記セグメントは、アイチウイルス1 遺伝子内における8251番のヌクレオチドから5' 方向に連続する120個～240個(例えば120個、130個、185個、240個) のヌクレオチドを含むことができるが、これに限定されない。

【0020】

前記(i) の塩基配列は、配列番号20、94または95の塩基配列またはそのRNAの塩基配列を含むことができるが、これに限定されない。

【0021】

前記(ii) の塩基配列は、(i) の塩基配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する塩基配列を含むことができるが、これに限定されない。具体的には、前記(ii) の塩基配列は、配列番号20の塩基配列において1番～14番のヌクレオチドの1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、又は両方ともを有する塩基配列またはそのRNAの塩基配列を含むことができるが、これに限定されない。

40

【0022】

前記(iii) の塩基配列は、コブウイルスの3' 非翻訳領域内の塩基配列であり、かつ、(i) の塩基配列と少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性を有する塩基配列を含むことができる。具体的に、前記(iii) の塩基配列は、コブウイルスの3' 非翻訳領域内における少なくとも2つのヘアピン構造を有する塩基配列を含むこと

50

ができるが、これに限定されない。また、前記 (i i i) の塩基配列は、配列番号 98 ~ 140 のいずれかの塩基配列またはその RNA の塩基配列、又はこれと少なくとも 90 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有する塩基配列を含むことができるが、これに限定されない。

【0023】

本発明において使用されるウイルスの塩基配列は、公知のデータベース（例えば、NCBI など）から得られる。

【0024】

一方、本発明において、「特定の配列番号の塩基配列を含む調節エレメント」又は「特定の配列番号の塩基配列を有する調節エレメント」とされているとしても、当該配列番号の塩基配列で構成された調節エレメントと同一又は相当する機能を有する場合であれば、いくつかの配列が欠失、修飾、置換または付加された塩基配列を有する調節エレメントも、本発明で使用されてもよいことは自明である。

【0025】

例えば、前記調節エレメントと同一又は相当する機能を有する場合であれば、当該配列番号の調節エレメントの配列の内部又は末端に無意味な配列が付加されたものであるか、あるいは当該配列番号の調節エレメントの配列の内部又は末端の一部の配列が欠失した調節エレメントも、本発明の範囲内に属することが明らかである。

【0026】

相同性 (h o m o l o g y) および同一性 (i d e n t i t y) は、2つの与えられた塩基配列に関連する程度を意味し、百分率で表示することができる。用語の相同性および同一性は、しばしば、互換的に用いられることができる。

【0027】

任意の2つの配列が相同性、類似性または同一性を有するか否かは、例えば、Pearson et al. (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85] : 2444 でのようなデフォルトのパラメータを用いて「FASTA」プログラムなどの既知のコンピュータアルゴリズムを用いて決定できる。または、EMBOSS パッケージのニードルマンプログラム (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277) (バージョン 5.0.0 又はその以降のバージョン) で実行されるように、ニードルマン-ブンシュ (Needleman-Wunsch) アルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) を用いて決定できる (GCG プログラムパッケージ (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]:403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994、および [CARILLO ETA/.] (1988) SIAM J Applied Math 48:1073 を含む)。例えば、米国立バイオテクノロジー情報センターのデータベースの BLAST、ClustalW を用いて配列の相同性、類似性または同一性を決定することができる。

【0028】

本発明の調節エレメントは、TENT4 と相互作用する ZCCHC2 と相互作用して、ポリ (A) テールの長さの増加、混合テーリングによるポリ (A) テールの安定性の増加、又はその両方ともを誘導することができる。

【0029】

本発明の別の態様は、標的タンパク質の遺伝子およびその 3' 非翻訳領域に本発明の調節エレメントを含むコンストラクトである。具体的に、前記コンストラクトは、DNA コ

10

20

30

40

50

ンストラクトまたはRNAコンストラクトであり得る。

【0030】

本発明における標的タンパク質は、本発明の調節エレメントによってRNA安定性および／またはmRNAの翻訳を増強させることができる限り、特に制限されないが、レポーター、生理活性ペプチド、抗原、又は抗体又はその断片から選択されることができる。

【0031】

本発明におけるレポーターは、ルシフェラーゼ、蛍光タンパク質、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール・アセチル転移酵素、またはエクオリン (aequorin) であり得るが、これに限定されない。

【0032】

本発明における生理活性ポリペプチドは、ホルモン、サイトカイン、サイトカイン結合タンパク質、酵素、成長因子、またはインスリンであるが、これらに限定されない。

【0033】

本発明において、抗原は、ワクチン抗原、癌関連抗原、アレルギー抗原であり得るが、これらに限定されない。

【0034】

一実施の形態として、本発明のコンストラクトは、少なくとも1つのバーコード配列、正方向のアダプター配列、逆方向のアダプター配列、ポリ(A)テールの配列、またはこれらの組み合わせをさらに含むことができるが、これらに限定されない。

【0035】

一実施の形態として、本発明のコンストラクトは、プロモーター配列をさらに含んでもよく、この場合、標的タンパク質は、プロモーター配列に作動可能に連結されているが、これに限定されない。

【0036】

一実施の形態として、本発明のコンストラクトは、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、アルファウイルス、レトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス、及びレンチウイルス）、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、およびSV40からなる群から選択されるウイルスの5'側反復配列および3'側反復配列を含むことができるが、これらに限定されない。

【0037】

一実施の形態として、本発明のmRNAコンストラクトは、5'非翻訳領域、3'非翻訳領域、ポリ(A)テールの配列、またはこれらの組み合わせをさらに含むことができるが、これに限定されない。

【0038】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクトを含むベクターまたは該ベクターのプール(pool)である。

【0039】

本発明で使用された用語「ベクター」は、適切な宿主内で標的タンパク質を発現させることができるように適切な調節配列に作動可能に連結されている標的タンパク質をコードする塩基配列を含む遺伝子産物を意味する。前記調節配列は、転写を開始できるプロモーター、そのような転写を調節するための任意のオペレーター配列、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、及び転写及び解読の終結を調節する配列などの構成を含み得るが、これらに限定されない。前記ベクターは、適当な宿主細胞内に導入された後、宿主ゲノムとは関係なく複製するかまたは機能することができるか、またはゲノムそれ自体に統合されることができる。

【0040】

本発明で使用されるベクターは、宿主細胞内で発現できるものであれば特に制限されず、当業界に知られた任意のベクターを用いて宿主細胞に導入させることができる。通用されるベクターの例としては、天然状態または組み換え状態のプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0041】

また、前記用語「作動可能に連結される」とは、標的タンパク質の遺伝子の転写を開始および媒介するプロモーター配列と前記遺伝子配列が機能的に連結されていることを意味する。

【0042】

本発明のまた他の態様は、前記コンストラクト又はベクターを含む組換え宿主細胞である。

【0043】

本発明における宿主細胞とは、標的タンパク質を発現することができる細胞をすべて含み、自然的または人為的に遺伝的改変が生じた細胞を包括する。また、前記宿主細胞は、真核細胞および原核細胞を含み、具体的には、真核細胞または哺乳動物（例えば、ヒト）由来の細胞であってもよいが、これらに限定されない。

10

【0044】

本発明において、コンストラクトまたはベクターを細胞内に導入させる方法は、核酸を細胞内に導入するいずれの方法（例えば、トランスフェクションまたは形質転換）も含まれ、細胞に応じて、当分野における公知の適切な標準技術を選択して行うことができる。例えば、エレクトロポレーション（electroporation）、リン酸カルシウム（ CaPO_4 ）の沈殿、塩化カルシウム（ CaCl_2 ）の沈殿、マイクロインジェクション（microinjection）、ポリエチレングリコール（PEG）法、DEAE-デキストラン法、陽イオンリポソーム法、および酢酸リチウム-DMSO法などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0045】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクト、ベクター、または組換え宿主細胞を含む組成物である。本発明のコンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞またはこれらを含む組成物は、インビトロ（in vitro）、生体内（in vivo）または生体外（ex vivo）で標的タンパク質を発現させることができる。

【0046】

一実施の形態として、前記組成物が個体に投与される場合、前記コンストラクト、ベクター、または組換え宿主細胞によって標的タンパク質を個体に提供することができるので、提供された標的タンパク質の用途に応じて、疾病（例えば、感染症）の予防又は治療効果を奏することができる。したがって、組成物は医薬組成物であってもよいが、これに限定されない。

30

【0047】

また、一実施の形態として、前記コンストラクト、ベクター、または組換え宿主細胞を用いて、in vitro又はex vivoで本発明のRNAコンストラクト又は標的タンパク質を産生することができる。従って、前記組成物は、本発明のmRNAコンストラクト又は標的タンパク質を製造するための組成物であってもよいが、これに限定されない。

【0048】

例えば、標的タンパク質がワクチン抗原である場合、前記コンストラクト、ベクター、組み換え宿主細胞又は組成物それ自体がワクチンとして用いられるか、またはこれらを用いてワクチン抗原を調製することができる。

40

【0049】

一実施の形態として、本発明のコンストラクトまたはベクターは、ZCHC2をコードする遺伝子と、TENT4をコードする遺伝子と、またはこれらの組み合わせとをさらに含むか、または本発明の組換え宿主細胞又は組成物がZCHC2またはそれをコードする遺伝子と、TENT4またはそれをコードする遺伝子と、またはこれらの組み合わせとをさらに含み、ZCHC2と調節エレメントとの相互作用およびZCHC2とTENT4との相互作用を通じて、ポリ（A）テールの長さの増加、ポリ（A）テールの安定性の増加、又はその両方を誘導して、RNA安定性、又はmRNA翻訳を増強させること

50

ができるが、これらに限定されない。

【0050】

本発明の他の一態様は、前記調節エレメントと相互作用するZCCHC2またはそれをコードする遺伝子を含む組成物である。具体的には、前記組成物は、RNAの安定性又はmRNA翻訳増強用組成物であってよい。

【0051】

前記ZCCHC2は、調節エレメントおよびTENT4との相互作用を通じて、ポリ(A)テールの長さの増加、混合テリングによるポリ(A)テールの安定性の増加、又はその両方ともを誘導して、RNA安定性、又はmRNA翻訳を増強させることができる。したがって、前記組成物は、インビトロ(in vitro)、生体内(in vivo)または生体外(ex vivo)で本発明の標的タンパク質の発現を増加させることができる。

10

【0052】

一実施の形態として、標的タンパク質の発現のために、前記組成物は本発明のコンストラクト、ベクター、および／または組換え宿主細胞を更に含むか、ZCCHC2またはそれをコードする遺伝子が本発明のコンストラクト、ベクター、および／または組換え宿主細胞に含まれてもよい。

【0053】

一実施の形態として、前記組成物はTENT4またはそれをコードする遺伝子をさらに含むことができる。

20

【0054】

一実施の形態として、前記組成物によりインビボ発現が増加される標的タンパク質の用途に応じて、前記組成物は、疾病の予防又は治療効果を奏することができる。したがって、前記組成物は医薬組成物であってもよいが、これに限定されない。

【0055】

また、一実施の形態として、前記組成物を用いて、in vitro又はex vivoで本発明のRNAコンストラクト又は標的タンパク質を産生することができる。従って、前記組成物は、本発明のRNAコンストラクト又は標的タンパク質を製造するための組成物であってもよいが、これに限定されない。

【0056】

30

例えば、標的タンパク質がワクチン抗原である場合、前記組成物によりin vivoでワクチン抗原の発現が増加することができるため、前記組成物をワクチン組成物として用いるか、または前記組成物を用いてin vitroまたはex vivoでワクチン抗原を調製することができる。

【0057】

本発明の他の一態様は、前記組換え宿主細胞を培養する段階と、標的タンパク質を回収する段階とを含む標的タンパク質の製造方法である。

【0058】

本発明で前記組換え宿主細胞を用いて標的タンパク質を産生する方法は、当業界によく知られている方法を用いて行うことができる。具体的には、前記培養は、バッチプロセス、フェッドバッチまたは繰り返しフェッドバッチプロセス(fed batch or repeated fed batch process)で連続的に培養することができるが、これに限定されるものではない。培養に用いられる培地は、宿主細胞に応じて当業者が適宜選択することができる。具体的には、本発明の組換え宿主細胞を適当な炭素源、窒素源、リン源、無機化合物、アミノ酸および／またはビタミンなどを含有する通常の培地内で、好気性または嫌気性条件下で、温度、pHなどを調節しながら培養することができる。

40

【0059】

前記標的タンパク質の製造方法は、前記培養段階後に、更なる工程をさらに含むことができる。前記更なる工程は、標的タンパク質の用途に応じて適宜選択することができる。

50

【0060】

具体的に、前記標的タンパク質の製造方法は、前記培養段階以後、前記組換え宿主細胞、組換え宿主細胞の乾燥物、組換え宿主細胞の抽出物、組換え宿主細胞の培養物、前記培養物の上清液は、組換え宿主細胞の破砕物の中から選択された一つ以上の物質から標的タンパク質を回収する段階を含むことができる。

【0061】

前記方法は、前記回収段階の以前若しくは同時に組み換え宿主細胞を溶解させる段階をさらに含むことができる。組み換え宿主細胞の溶解は、本発明の属する技術分野で通用される方法、例えば、溶解用緩衝液、ソニケーター、熱処理およびフレンチプレッサーなどにより実施することができる。なお、前記溶解段階は、細胞壁／細胞膜分解酵素、核酸分解酵素、核酸転移酵素、および／またはタンパク質分解酵素などの酵素反応を含むことができるが、これらに限定されない。

10

【0062】

本発明では、組換え宿主細胞の乾燥物は、目的物質を蓄積した細胞を乾燥させて製造することができるが、これに限定されない。

【0063】

本発明において、組換え宿主細胞の抽出物は、前記細胞において細胞壁／細胞膜を分離して残った材料を意味することができる。より具体的には、細胞を溶解させて得た成分において細胞壁／細胞膜を除いた残りの成分を意味することができる。前記細胞抽出物は、標的タンパク質を含み、標的タンパク質以外の成分としては、細胞のタンパク質、炭水化物、核酸、繊維の少なくとも1つの成分が含まれていてもよいが、これに限定されない。

20

【0064】

本発明における回収段階は、当該技術分野に既知の好適な方法（例えば、遠心分離、ろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー、結晶化およびHPLCなど）を用いて、標的タンパク質を回収することができる。

【0065】

本発明において回収段階は、精製工程を含むことができる。前記精製工程は、細胞から標的タンパク質のみを分離して純粋精製するものであってもよい。前記精製工程を通じて、純粋精製された標的タンパク質を製造することができる。

【0066】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクト又はベクターを *in vitro* で転写する段階と、転写されたmRNAコンストラクトを回収する段階とを含む、mRNAコンストラクトの作製方法である。

30

【0067】

前記転写方法及び回収方法は、当技術分野に既知の好適な方法を用いることができる。

【0068】

一実施の形態として、前記方法は、転写後DNase Iを処理して鋳型として使われたコンストラクトまたはベクターのDNAを除去する段階、および／または洗浄する段階とをさらに含むことができるが、これに限定されない。

【0069】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物のRNA安定性および／またはmRNAの翻訳を増強させるための用途である。

40

【0070】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物の疾患の予防または治療のための用途である。

【0071】

本発明の他の一態様は、前記コンストラクト、ベクター、組換え宿主細胞、又は組成物の標的タンパク質の調製のための用途である。

【0072】

以下、実験例及び実施例により本発明をより詳しく説明する。ただし、これらは本発明

50

を例示するためのものに過ぎず、本発明の範囲がこれらの実験例および実施例により限定されるものと解釈されてはならない。

【実施例】

【0073】

<実験例>

【0074】

1. 細胞株の培養

【0075】

本発明で使用する全ての細胞株は、マイコプラズマ否定試験を経た。HeLa細胞（ソウル大学のC. H. Chunの寄託、ATCC（STRプロファイリング）により認証済み）、Lenti-X 293T細胞（Clontech社製、632180）および293AV細胞（Cell Biolabs社製、AAV-100）を10%のFBS（Wetgene社製、S001-01）含有DMEM培地で培養した。HCT116細胞（ATCC社製、CCL-247）は、10%のFBSを含むMcCoy's 5A（Wetgene社製、LM 005-01）で培養した。

【0076】

2. Viromicスクリーン（viromic screen）のためのオリゴ（oligo）のデザイン

【0077】

ヒトを感染させることができるウイルスのゲノム配列をNCBIウイルスゲノムブラウザ（2020年1月10日検索、804個の配列、504個のウイルス）で検索した。各ウイルスに関する追加情報については、NCBIヌクレオチドのGenBankファイルにて検索した。配列類似性およびウイルス分類に基づいて、143個の代表的なウイルス種を選定し、ウッドチャック肝炎ウイルスを対照として追加した。RNAウイルスのタイリング（tiling）のために、ポジティブセンス方向である配列の全ゲノムをタイリングに使用した。DNAウイルスの場合、コードトランスクリプトームの3'非翻訳領域の配列および非コードRNA配列の全ての配列をオリゴ（oligo）のデザインに使用した。UTRの注釈がない場合、UTRはポリアデニル化シグナル（PAS）の注釈に基づいて予測された。PASの注釈がない場合、PASは、終止コドンから800bpの範囲内でDragon PolyA Spotter ver. 1.2を用いて予測した。PASが予測できない場合、タイリングのための終止コドンの下流（downstream）に存在する390bp領域を使用した。タイリングのためのゲノム領域を決定した後、65ntシフト（shift）の大きさに130ntのスライディングウィンドウを有するオリゴ（oligo）を設計した。その後、複製に用いられたSacIまたはNotI制限部位（restriction sites）のあるウィンドウが含まれた場合、制限部位でウィンドウを終止して、より短いセグメント（segment）を製造した。次のセグメントは制限部位から開始してプラスミド作製中にSacIまたはNotIによるセグメントの切断を防止した。したがって、前記スクリーニングは、制限部位配列を含むいくつかのウイルスの要素を見逃す恐れがある。また、前記設計は、65ntよりも長い一部の要素を見逃す恐れがある。例えば、大きさが100ntであるエ

【0078】

少なくとも3のハミング距離（hamming distance）を有する7bpのランダム配列の3つのバーコードを各オリゴ配列に追加した。対照として、1Eセグメント及びそのステムループ変異をライブラリーに追加した。さらに、ヒトB型肝炎ウイルスPRE及びそれに対応するステムループ変異を対照として含んでいた。陽性対照および陰性対照をそれぞれタイリングした。合計30,367個のセグメントと91,101個のオリゴを設計した。

【0079】

2次スクリーニングのために、5つのクラスのK5変異をデザインした。1）単一ヌク

レオチド置換の場合、K5全体にわたって各部位の塩基が異なる3つの塩基型に変換された。2) 単一ヌクレオチド欠損の場合、各部位の塩基が除去された。3) 2つのヌクレオチド欠失の場合、全ての部位で2つの連続したヌクレオチドが欠失した。4) 塩基対の有意性を調べるために、2次構造は、6つの他のRNA二次構造予測ソフトウェアで予測し、38個の予測された塩基対は、塩基対を収集および保存するやり方で突然変異された(AT/TA/GC/CG/GU/UG/del)。5) 予測ループでランダムに選択された2つの塩基は、他の組み合わせを生成するために変異された。また、他のピコルナウイルス(コブウイルス属の45個を含む)の88個の相同エレメントを含むK5のホモログ(homolog)をスクリーニングした。相同性が曖昧な場合、オリゴのデザインのために3'-最大130ntを使用した。総合して、2次スクリーニングのためのライブラリーは、3つのバーコードのそれぞれに対して1,288個のエレメントを含めて、合計3,864つのオリゴが生成された。

10

【0080】

3. プラスミドプール(pool)の生成

【0081】

170nt長のオリゴ(16ntの順方向アダプター配列、17ntの逆方向アダプター配列および7ntのバーコード配列を含む)を、Synbio Technologiesで合成した。NotI及びSacI制限部位は、Q5 High-Fidelity 2X Master Mix(NEB社製、M0492)およびSacI-univ-FおよびNotI-univ-Rプライマーを用いた6サイクルのPCRにより追加された。増幅産物は、6%のNative PAGE gel、SYBRgold(Invitrogen社製、S11494)染色を用いて精製した。精製された増幅産物およびpmirGLO-3Xmir-1ベクターは、SacI-HF(NEB社製、R3156S)およびNotI-HF(NEB社製、R3189S)で切断し、DNAリガーゼ(NEB社製、M0202M)をT4によってホタルルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子の3'非翻訳領域にクローニングした。結合産物をZymo Oligo Clean & Concentrator kit(Zymo Research社製、#D4061)で精製し、Lucigen Endura ElectroCompetent cell(Lucigen社製、LU60242-2)で形質転換した。形質転換された細菌は、37℃で1時間再生した後30℃で14時間振とう培養した。コロニーの数は、およそ1E7であることが確認された。使用したプライマー配列を下記表1に示した。

20

30

【0082】

40

50

【表 1 A】

表 1

qPCR プライマー		配列番号
qPCR-FireflyLuc-F	CCCATCTTCGGCAACCAGAT	141
qPCR-FireflyLuc-R	GTACATGAGCACGACCCGAA	142
qPCR-RenillaLuc-F	CTGGACGAAGAGCATCAGG	143
qPCR-RenillaLuc-R	TGATATTCGGCAAGCAGGCA	144
qPCR-EGFP-F	AAG CAG AAG AAC GGC ATC AA	145
qPCR-EGFP-R	GGG GGT GTT CTG CTG GTA GT	146
qPCR-TENT1-F	GTAACCTACGCCCTGACCTTGCT	147
qPCR-TENT1-R	AGCCATCGACTTCCACCTGTTC	148
qPCR-TENT2-F	AGTTCGTCCGTTAGTGCTGGTG	149
qPCR-TENT2-R	GAGGGATGGAAGGATGGGTTCA	150
qPCR-TENT3B-F	AGGCACCAAGAGAAACGCCGAT	151
qPCR-TENT3B-R	CATAGAACCGCAGCAATTCCACC	152
qPCR-TENT4A-F	CCCACCACTTCCAGAACACT	153
qPCR-TENT4A-R	GCTTTCAAAGACGCAGTTCC	154
qPCR-TENT4B-F	TCGCAGATGAGGATTCG	155
qPCR-TENT4B-R	CTGCTCTCACGCCATTCT	156
qPCR-TENT5C-F	CCTTGAACAGCAGAGGAAGTTGG	157
qPCR-TENT5C-R	GGAGATGAGGTTCCAGAGTCTGC	158
qPCR-GAPDH-F	CTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	159
qPCR-GAPDH-R	TGAGCGATGTGGCTCGGCT	160
qPCR-U1-F	CCA TGA TCA CGA AGG TGG TTT	161
qPCR-U1-R	ATG CAG TCG AGT TTC CCA CAT	162
qPCR-18S-F	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	163
qPCR-18R-R	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	164
qPCR-ZCCHC2-F	GCACCCGGCTTTCTCCTTCCAC	165
qPCR-ZCCHC2-R	TGCACGGCTCTACCTCCACCTC	166
qPCR-TNRC6B-F	AAGGCCCAAACCTGCACTGCACA	167
qPCR-TNRC6B-R	CACCTTGGGGTTGCTGCAGGTGT	168

【表 1 B】

MPRA プラスミドプールの生成プライマー		配列番号
SacI-univ-F	tgataagcaGAGCTCACTGGCCGCTTCAC TG	169
NotI-univ-R	tcgtgcttGCGGCCGCGACGCTCTTCCG ATCT	170

10

20

30

40

50

【表 1 C】

MPRA ライブラリー構築プライマー		配列番号
MPRALib_NN_R	GTT CAG AGT TCT ACA GTC CGA CGA TCN NCG ACG CTC TTC CGA TCT	171
MPRALib_NNN_R	GTT CAG AGT TCT ACA GTC CGA CGA TCN NNCG ACG CTC TTC CGA TCT	172
MPRALib_N_R	GTT CAG AGT TCT ACA GTC CGA CGA TCN CG ACG CTC TTC CGA TCT	173
MPRALib_NN_F	GCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC ANNgcaagatcgccgtgtaattc	174
MPRALib_NNN_F	GCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC ANNNgcaagatcgccgtgtaattc	175
MPRALib_N_F	GCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC ANgcaagatcgccgtgtaattc	176

10

【表 1 D】

インビトロ RNA 転写(ルシフェラーゼ)		配列番号
T7promoter+gene_specific_F(Luciferase)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GGC CTT TCG ACC TGC AGC CCA AGC	177
T120+gene_specific_R	mUmU[T*118]ATCAATGTATCTTATCAT GTCTG	178
T7promoter+gene_specific_F(d2EGFP)	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGG AAATAAGAGAGAAAAGAAGA	179

20

【表 1 E】

Hire-PAT PCR プライマー		配列番号
Hire-PAT-FireflyLuc-F	GGACAAACCACAACCTAGAATG	180

30

【表 1 F】

遺伝子特異的 TAIL-seq プライマー		配列番号
GS-TAIL-seq-FireflyLuc-F	GTT CAG AGT TCT ACA GTC CGA CGA TCG GAC AAA CCA CAA CTA GAA TG	181

40

50

【表 1 G】

プラスミド		
pAAV-CAG-GFP	AAV generation	addgene 37825
pAdDeltaF6	AAV generation	addgene 112867
pAAV-DJ	AAV generation	cell biolabs, VPK-420-DJ
pAAV-CAG-GFP control	AAV generation	
pAAV-CAG-GFP K5	AAV generation	
pAAV-CAG-GFP eK5	AAV generation	
pAAV-CAG-GFP K5m	AAV generation	
pAAV-CAG-GFP eK5m	AAV generation	
pmirGLO-3Xmir-1	control	NSMB, 2020
pmirGLO-3Xmir-1_K1	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K2	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K3	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K4	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K6	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K7	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K8	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K9	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K10	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K11	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K12	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K13	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K14	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K15	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K16	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_K5	validation, luciferase, GS TAIL-seq, Hire-PAT	
pmirGLO-3Xmir-1_K5m	luciferase, Hire-PAT	
pmirGLO-3Xmir-1_eK5	luciferase, Hire-PAT, ivt RNA binding assay	
pmirGLO-3Xmir-1_eK5m	luciferase, Hire-PAT, ivt RNA binding assay	
pmirGLO-3Xmir-1_wPRE	luciferase	NSMB, 2020
pmirGLO-3Xmir-1_full UTR	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_120-K5	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_110-K5	validation	
pmirGLO-3Xmir-1_eK4	validation	

10

20

30

40

50

【表 1 H】

pmirGLO-d2EGFP-GBA	IVT mRNA generation	
pmirGLO-d2EGFP-eK5-GBA	IVT mRNA generation	
pmirGLO-d2EGFP-GBA-eK5	IVT mRNA generation	
pmirGLO-3xBoxB	Tethering	
pCK-MCS	Rescue	
pGK-MCS	Rescue	
pCK-TNRC6B-Cterm	Tethering	
pCK-lambdaN-HA-TEV-TNRC6b-Cterm	Tethering	
pGK-ZCCHC2	Rescue, Tethering	
pGK-lambdaN-HA-TEV-ZCCHC2	Tethering	
pGK-ZCCHC2 (Zinc-finger mutant)	Rescue, Tethering	
pGK-lambdaN-HA-TEV-ZCCHC2 (Zinc-finger mutant)	Tethering	
pCK-Flag-ZCCHC2	Rescue, Co-immunoprecipitation	
pCK-Flag-ZCCHC2 (201-1178)	Rescue, Co-immunoprecipitation	
pCK-Flag-ZCCHC2 (1-375)	Rescue, Co-immunoprecipitation	
pSpCas9(BB)-2A-GFP-px458	KO generation	addgene 48138
BASU RaPID	RaPID	addgene 107250
pCK-EGFP-3xBoxB	RaPID	
pCK-EGFP-3xBoxB-eK5-3xBoxB	RaPID	

【表 1 I】

siRNAs	
siTENT1	ON-TARGETplus SMART pool (Dharmacon)
siTENT2	ON-TARGETplus SMART pool (Dharmacon)
siTENT3 A/B	ON-TARGETplus SMART pool (Dharmacon)
siTENT4 A/B	ON-TARGETplus SMART pool (Dharmacon)
siTENT5 A/B/C/D	ON-TARGETplus SMART pool (Dharmacon)

10

20

30

40

50

【表 1 J】

HeLa 細胞の ZCCHC2 および ZCCHC14 ノックアウト HCT116 細胞のゲノム配列		配列番号
親株	ACCTCAGGACGGACTTACCG	182
ZCCHC2 KO allele 1	ACCTCAGGACGGACT-ACCG	183
ZCCHC2 KO allele 2	ACCTCAGGACGGACTtacgggataaggccg gcttcataagagacagctggtgaaacccggcagat cacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatg aacactaagtacgacgagaatgacaagttgatccggg aagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtcc gattccggaaggattccagttttacaaagtgcgcgag atcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgcccctgatcaaaaagtaccct aagctggaagcgagttcgtgtacggcgactacaagg gtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagca ggaaatcggaaggctaccgccaagtacttcttctaca gcaacatcatgaacttttcaagaccgagaTACCG	184
ZCCHC2 KO allele 3	ACCTCAGGACGGACTtacgggataaggccg gcttcataagagacagctggtgaaacccggcagat cacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatg aacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccggg aagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtcc gattccggaaggattccagttttacaaagtgcgcgag atcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctga acgccgtcgtgggaaccgcccctgatcaaaaagtacccta agctggaagcgagttcgtgtacggcgactacaagg gtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagca ggaaatcggaaggctaccgccaagtacttcttctaca gcaacatcatgaacttttcaagaccgagaTACCG	185
親株	CAAGTGGGCAGCGCGCCGCC	186
ZCCHC14 KO	CAA-----	

【0083】

4. ライブラリーの構築

【0084】

RNA 安定性スクリーニングのために、4E5 HCT116 細胞を、トランスフェクションの1日前に接種 (seeding) した。1.5 μ g のプラスミドプール (pool) を Lipofectamine 3000 (Invitrogen 社製、L300001) および p3000 を用いてトランスフェクトさせた。RNA および DNA は、Allprep RNA/DNA Mini Kit (Qiagen 社製、80004) を用いて、トランスフェクション後8時間後に抽出し、RNA に組み換え DNase I (RNase-free) (TAKARA 社製、2270A) を処理して残ったプラスミド DNA を除去した。RNA は、SSIV reverse transcriptase (Invitrogen 社製、18090010) を用いて逆転写した。抽出された DNA、RNA から得られた cDNA および元のプラスミドプール (pool) は、14 サイクルの PCR で増幅され、混合されたプライマー MPRALib_N/NN/NNN_F および MPRALib_N/NN/NNN_R が用いられた (表1)。2 番目の PCR の6 サイクルは、Illumina index primer を用いて行われた。PCR 増幅物は、Illumina Novaseq 6000 プラットフォームを用いて次世代シーケンシングによりシーケンシングされた。

【0085】

核/細胞質分画をスクリーニングするために、細胞質は、細胞溶解バッファー (0.15 μ g/ μ l のジギトニン [Merck 社製、D141]、150mM の NaCl、50

10

20

30

40

50

mMのHEPES [pH 7.0~7.6]、20 U/mlのRNase阻害剤 [Ambion社製、AM2696]、1Xプロテアーゼ阻害剤 [Calbiochem社製、535140]、1Xホスファターゼ阻害剤 [Merck社製、P0044])で得られる。ライブラリーの製造段階は、RNA安定性スクリーニングと同様に行われた。

【0086】

ポリソーム (polysome) 分画のスクリーニングのために、Gradient MasterTM (Biocomp社製、B108-2)を用いて10~50%のショ糖勾配を用意した。RNA安定性スクリーニングの3倍の規模を持つHCT116細胞を37℃で1分間、100 µg/mlシクロヘキシミド (cycloheximide)で処理し、150 µlのPEB (20 mMのTris-Cl、pH 7.5、100 mMのKCl、5 mMのMgCl₂、0.5%のNP-40 [Merck社製、74385])と100 U/mlのRNase阻害剤、1Xプロテアーゼ阻害剤及び1Xホスファターゼ阻害剤で氷上にて10分間溶解した後、遠心分離した。上清液をショ糖勾配に積層し、SW41 TiローターとBeckman Coulter Ultracentrifuge Optima XEを用いて4℃で2時間の間36,000 rpmで遠心分離した。サンプルは、Model 2110 fraction collector (Bio-Rad社製、7318303)およびModel EM-1 Econo UV detector (Bio-Rad社製)に結合されたBioLogic LP systemを用いて0.25 mlの分画として得られた。0.75 mlのTRIzolTM LS Reagent (Life Technologies社製)を各分画に添加した。図11のグラフに示すように、ポリソーム分画法 (polysome fractionation)に従って遊離mRNA (free mRNA)、モノソーム (monosome)、軽いポリソーム (Light polysome; LP; 2~3個のリボソーム)、中間ポリソーム (Medium polysome; MP; 4~8個のリボソーム)、および重いポリソーム (Heavy polysome; HP; 9個以上のリボソーム)は、254 nmでの吸光度の傾向を利用して区分し、Direct-Zol RNA Mini prep kit (Zymo Research社製、R2052)を用いて抽出した。

【0087】

次に、ライブラリー製造段階は、RNA安定性スクリーニングと同様の方法で行った。シーケンシングデータは、下記識別子DOIでZenodoデータベースにおいて利用可能である [DOI: 10.5281/zenodo.6777910 (安定性)、10.5281/zenodo.6717932 (ポリソーム)、10.5281/zenodo.6696870 (2次スクリーニング)、10.5281/zenodo.7773943 (核/細胞質分画)]。

【0088】

5. データの分析

【0089】

全てのサンプルについてreadをパラメーターlocalと共にbowtie 2.2.6を用いてオリゴに対してアライメントした。アライメントされたreadをバーコードと正確に一致する固有のアライメントでフィルタリングした。統計テストは、mpral関数を用いてMPRAnalyzeで実行した。scipyモジュール及びヒストグラムプロットのスピアマンの相関係数を用いて技術性能を評価した。正規化されたカウントを可視化のために使用した。ポリソーム分析の場合、DESeq2を用いた分散安定化を変換した後、5つの分画の平均を差し引いた後、前記各分画の相対距離を計算した。前記各分画の相対距離はscipyモジュールで階層的クラスタリングを実施するのに用いた。別の翻訳の定量化のために、下記式で平均リボソームローディング (Mean ribosome load; MRL)を計算した。

【0090】

$$1 \times p(\text{Monosome}) + 2.5 \times p(\text{Light polysome}) + 6 \times p(\text{Medium polysome}) + 11 \times p(\text{Heavy polysome})$$

【0091】

$p(X)$: X (各分画) のシーケンシングリード (read) の比率

【0092】

mRNA 安定性のカットオフの場合、負の調節エレメントについて $\log_2(RNA/DNA) < -1$ および p 値 < 0.001 を使用し、正の調節エレメントについて $\log_2(RNA/DNA) > 0.5$ 及び p 値 < 0.05 を使用した。翻訳活性化エレメントのカットオフには、 $\log_2(\text{重いポリソーム}/\text{遊離 mRNA}) > 0.2$ および／または $MRL > 4.5$ を使用し、翻訳下向き調節エレメントのカットオフには $\log_2(\text{重いポリソーム}/\text{遊離 mRNA}) < -0.2$ および／または $MRL < 3.5$ を使用した。

【0093】

2 番目のスクリーニング置換データの場合、置換および欠失の塩基同一性スコア (Base-identity score) を下記式により計算した。

【0094】

$A/\text{mean}(\text{Stability}_x, \text{Stability}_y, \text{Stability}_z)$ (for substitution, x, y, z : substituted nucleotides)

$A/\text{Stability for deletion}$ (for deletion)

A : 野生型 K5 の安定性

【0095】

置換データに対する塩基対スコア (Base-pairing score) を下記式により計算した。

【0096】

$\text{mean}(\text{Stability of substitutions maintaining base pair}) - \text{mean}(\text{Stability of substitutions disrupting base pair})$

【0097】

欠失データに対する塩基対欠スコア (Pair-deletion score) を下記式により計算した。

【0098】

$A/\text{Stability for pairwise deletion}$

【0099】

ピコルナウイルスツリーを構成するために、NCBI で検索されたウイルス配列を Cluster Omega によってアライメントし、FigTree v1.4.4 を用いて可視化した。保存スコア (conservation score) は、上位 33 種に亘って多重配列をアライメントした後、K5 エLEMENT と同じヌクレオチドの数として計算した。RNA 構造の可視化のために、RNA fold を用いて構造を予測し forna を用いて可視化した。

【0100】

6. プラスミドの構築

【0101】

検証実験のために選択されたエレメントは、プラスミドライブラリープールにて PCR で増幅され、pmirGLO-3Xmir-1 ベクターにおけるホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 非翻訳領域にクローニングした。ルシフェラーゼ構造の場合、K5 エLEMENT (8122-8251: NC_001918.1) をプラスミドプールライブラリーから増幅し、PCR 増幅によってさらに 55 bp および 110 bp を加えて eK5 エLEMENT (8067-8251: NC_001918.1) および全ての非翻訳領域 (8012-8251: NC_001918.1) を作製した。120-K5 エLEMENT (8132-8251: NC_001918.1)、110-K5 エLEMENT (8142-8251: NC_001918.1) および、K5m エLEMENT (8122-8251, 8185 AG: NC_001918.1) は、pmirGLO-3Xmir-1 K5 プラスミドが

10

20

30

40

50

ら増幅し、eK5mエレメント（8067-8251：NC__001918.1）は、pmirGLO-3Xmir-1 eK5プラスミドから増幅した。K4エレメント（7931-8060：NC__009448.2）プラスミドプールライブラリーから増幅し、PCR増幅によって50bpをさらに含めてeK4エレメントを作製した（7881-8060：NC__009448.2）。1Eエレメント（414-463：RNA2.7）は、pmirGLO-3Xmir-1 1Eベクターから増幅した。

【0102】

AAV産生のために、pAAV-CAG-GFP（Addgene社製、Plasmid #37825）プラスミドを鋳型として用いた。K5エレメント（8122-8251：NC__001918.1）、K5mエレメント（8122-8251, 8185ΔG：NC__001918.1）、eK5エレメント（8067-8251：NC__001918.1）、およびeK5mエレメント（8067-8251, 8185ΔG：NC__001918.1）をpmirGLO-3Xmir-1 eK5およびeK5mプラスミドから増幅したし、GibsonアセンブリによってpAAV-CAG-GFPプラスミド内のWPRE配列を代替した。対照プラスミドの場合、pAAV-CAG-GFPにおけるGFP遺伝子の3'非翻訳領域のWPRE配列をPCRベース増幅で除去した。

10

【0103】

d2EGFPプラスミドの構築のために、pmirGLO-3Xmir-1ベクターからのホタルルシフェラーゼ遺伝子をGBA 5'非翻訳領域、d2EGFP CDSおよびGBA 3'非翻訳領域で代替して、対照プラスミドを作製した。ルシフェラーゼコンストラクトからのUTRを増幅させ、前記d2EGFP対照ベクターに挿入した。

20

【0104】

テザリングおよびコンストラクトの構築のため、pmirGLO-3xmir1-5xBoxBベクターからpmirGLO-3xBoxBを生成し、pGK-ZCCHC2コンストラクトの場合HCT116 cDNAから増幅されたZCCHC2をpGKベクター内にサブクロニングした。ZCCHC2ΔC（1-375 a.a）およびZCCHC2ΔN（201 aa-1, 178 a.a）構造を含むテザリング構造は、pGK-TEV-HA-λNでZCCHC2のサブクロニングすることにより生成した。ZCCHC2ジंकフィンガーの突然変異バージョンを調製するために、mutagenesis PCRでジंकフィンガー（CX2CX3GHX4C）の第1および第2のシステインをセリンで代替した。TNRC6B C-term構造の場合、TNRC6B遺伝子のC-term領域（716-1, 028 a.a）をHCT116 cDNAで増幅し、Gibsonアセンブリを用いてpGKおよびpGK-TEV-HA-λNベクターにサブクロニングした。

30

【0105】

RaPID実験のために、d2EGFP, pmirGLO-3xBoxB、およびpmirGLO-3xmir-1-eK5プラスミドからEGFP CDS、3xBoxB配列およびeK5配列をそれぞれ増幅し、Gibsonアセンブリを用いてpCKベクター内にサブクロニングした。

40

【0106】

前記方法で得られたプラスミドのリストを表1に示した。

【0107】

7. ルシフェラーゼアッセイおよびトランスフェクション (transfection)

【0108】

ルシフェラーゼアッセイは、次のような方法で行った。Lipofectamine 3000によるルシフェラーゼレポーターアッセイのために、0日目に24ウェルプレート上のHeLaまたはHCT116細胞の2E5を100ng pmirGLO-3Xmir-1プラスミドでトランスフェクトさせ、2日目に得た。ノックダウン実験のために、各標的遺伝子に対して100ng pmirGLO-3Xmir-1 K5プラスミド

50

および40nM siRNA (Dharmacon siRNA smartpool) をLipofectamine 3000で共トランスフェクトした。ZCCHC2構造実験のために、50ngのpmirGLO-3XmiR-1プラスミドおよび60ngのpGK-nullまたはpGK-ZCCHC2またはpGK-ZCCHC2ジンクフィンガー突然変異構造を共トランスフェクトした。デザリング実験のために、50ngのpmirGLO-3xBoxBプラスミドおよび60ngのpGK-ZCCHC2野生型／変異型コンストラクトをλN-HA-TEVのフラグありまたはフラグなしのように共トランスフェクトした。ルシフェラーゼアッセイのために、製造会社の説明書に従ってDual-luciferase reporter assay system (Promega社製) で細胞を溶解し、分析した。

10

【0109】

8. RT-qPCR

【0110】

RNeasy Mini Kit (Qiagen社製、74106) でRNAを抽出し、DNase (Qiagen社製、79254) を処理し、Primescript RTmix (Takara社製、RR036A) で逆転写した。mRNAレベルは、SYBR Green assays (Life Technologies社製、4367659) およびStepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems社製) またはQuantStudio 3 (Applied Biosystems社製) で測定した。RT-qPCRプライマーのリストは表1に示されている。

20

【0111】

9. AAV生成および精製

【0112】

AAV生成および精製は次のような方法で行った。293AAV細胞株 (Cell Biolabs社製、#AAV-100) を10%のFBS、0.1mMのMEM Non-essential Amino Acids (NEAA) 及び2mMのL-グルタミンを含むDMEM中で培養した。GFPタンパク質を運搬するAAVを産生するように、293 AAV細胞株を、150mmのペトリ皿に一晩かけて分注し、70%程度成長すればpAAV-CAG-GFPプラスミド変異体 (Addgene社製、37825) をpAddelta6F6 (Addgene社製、112867) およびpAAVDJ (Cell Biolabs社製、VPK-420-DJ) プラスミドと共にLipofectamine 3000およびp3000で共トランスフェクトした。72時間の間トランスフェクションした後、細胞を得て、2.5mlの無血清DMEMに再懸濁した。その後、細胞溶解は、4回の凍結／解凍 (アルコール／ドライアイス中で30分間凍結および37℃の水槽で15分間、毎周期ごとに解凍) を行うことによって行われた。AAV上清液は、4℃で10分間10,000Xgで遠心分離することにより得られた。Virabind™ AAV Purification Kit (Cell Biolabs社製) でAAVを精製した後、製造会社の説明書に従ってQuickTiter™ AAV Quantitation Kit (Cell Biolabs社製) でウイルスカ

30

40

【0113】

10. インビトロ転写されたRNAの製造

【0114】

インビトロ転写されたRNAの場合、DNA鋳型は、フォワードプライマー (T7プロモーター+gene__specific__F) およびリバースプライマー (T120+gene__specific__R、5'末端の2'-O-メチル化デオキシウリジンの2つヌ

50

クレオチド)を使用したPCRを行うことにより調製した。250 ngのDNA鋳型は、mMESSAGE mMACHINE™ T7転写キット(Invitrogen社製、AM1344)および成分(それぞれ7.5 mMのATP/CTP/UTP[NEB社製、N0450S]、1.5 mMのGTPおよび6 mMのCleanCap(登録商標)(Reagent AG(3' OMe)[TriLink Biotechnologies社製、N-7413-10])を用いてインビトロで転写した。前記DNA鋳型は、組換えDNase I(RNase-free)を用いて除去し、RNeasy MiniElute Cleanup Kit(Qiagen社製、74204)を用いて洗浄した。in vitro転写の鋳型の製造に用いたプライマーは表1に示した。

【0115】

10

11. mRNAトランスフェクトされたサンプルの調製および分析

【0116】

12ウェルプレート上の2E5 HeLa細胞をLipofectamine MessengerMaxを用いてインビトロ転写されたRNAでトランスフェクトした。ルシフェラーゼmRNAでトランスフェクトされたサンプルの場合は、細胞を溶解し、製造会社の説明書に従ってDual-luciferase reporter assay systemで分析した。d2EGFPサンプルの場合、細胞を1Xプロテアーゼ阻害剤および1Xホスファターゼ阻害剤を含んでなるRIPA lysis and extraction buffer(Thermo社製、89901)で10分間氷上にて溶解した後、遠心分離した。前記サンプルを5X SDS緩衝液中で煮沸後、ladder(Thermo社製、26616)を用いてNovex SDS-PAGE gel(10~20%)にロードした。ゲルをメタノールで活性化したPVDFメンブレン(Millipore社製)に移した後、メンブレンを5%のスキムミルクを含むPBSTによってブロックした後、一次抗体でプローブして、PBSTで3回洗浄した。前記一次抗体は、一次抗体としてanti-EGFP(1:3,000、CAB4211、Invitrogen社製)およびanti-alpha-TUBULIN(1:300、Abcam社製、ab52866)を使用した。抗マウスまたは抗ウサギのHRP共役二次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories社製)を1時間の間培養し、PBSTで3回洗浄した。化学発光は、West Pico又はFemto Luminol試薬(Thermo社製)を使用し、シグナルは、Chemidoc XRS+ System(Bio-Rad社製)で検出した。d2EGFPサンプルの場合、GFPシグナルをフローサイトメトリー(BD Accuri C6 Plus)で検出した。

20

30

【0117】

12. Hire-PAT分析

【0118】

Hire-PAT分析およびキャピラリー電気泳動データのシグナル処理を、文献(Kim et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2020, 27, 581-588)に説明されたように実施した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子のポリ(A)部位を前記文献でサンガーシーケンシング(Sanger sequencing)で確認したように利用し、ポリ(A)部位に対するフォワードPCRプライマーは表1に示されている。

40

【0119】

13. 遺伝子特異的TAIL-seq

【0120】

RG7834処理時、ポリ(A)テールの長さ分布を測定するために、HeLa細胞をRO0321(Gliss Laboratories Inc社製、GLXC-11004)またはRG7834(Gliss Laboratories Inc社製、GLXC-221188)が処理されたホタルルシフェラーゼの3'非翻訳領域にK5エレメントを含むpmirGLO-3XmiR-1プラスミドでトランスフェクトさせて、2日

50

以内に得た。親細胞とZCCHC2ノックアウト細胞との間のポリ(A)テールの長さ分布を比較するために、親細胞およびZCCHC2ノックアウト細胞をRG7834処理されたサンプルと同様に製造した。遺伝子特異的TAIL-seqを行うために、rRNAが枯渇した全RNA(Truseq Strnd Total RNA LP Gold、Illumina社製、20020599)を3'アダプターにライゲーションし、RNase T1(Ambion社製)で部分的に断片化した。Urea-PAGE gel(300-1500 nt)で精製した後、RNAを逆転写し、PCRで増幅した。ホタルルシフェラーゼPCR増幅のために、GS-TAIL-seq-FireflyLuc-Fをフォワードプライマーとして用いた。ライブラリーは、spike-in mixtureを含むPhiX control library v.2(Illumina社製)でIllumina platform(Miseq)でpaired-end run(51X251 cycles)でシーケンシングした。TAIL-seqシーケンシングデータは、DOI:10.5281/zenodo.6786179.の識別子を持つZenodoデータベースに保存した。

10

20

【0121】

TAIL-seqは、Tailseeker v.3.1.5で分析した。各々のトランスクリプトームについて、遺伝子はbowtie2.2.6を用いてホタルルシフェラーゼの構成配列及びヒトトランスクリプトームにリード1をマッピングして確認した。次に、当該ポリ(A)テールの長さおよび3'末端の修飾をリード2で抽出した。混合テリングの割合は、ポリ(A)テールの長さが50ntよりも長いトランスクリプトームから計算した。

【0122】

14. TENT4、ZCCHC2およびZCCHC14ノックアウト(KO)細胞の調製

【0123】

TENT4 dKO細胞は、前記Kimらの文献と同様な方法で調製された。また、ZCCHC2およびZCCHC14ノックアウト細胞株も前記Kimらの文献の説明に従って調製された。6ウェルプレート上の4E5HeLa細胞および24ウェルプレート上の1E5 HCT116細胞をZCCHC2に対するsgRNA(ACCTCAGGACGGACTTACCG(配列番号96)、PAM配列は、TGG)およびZCCHC14に対するsgRNA(CAAGTGGGCAGCGCGCGCCGCC(配列番号97)、PAM配列はCGG)を含む300ngのpSpCas9(BB)-2A-GFP-px458プラスミド(Addgene社製、#48138)を用いてMetafectene(Biontex社製、T020)にそれぞれトランスフェクトした。単一細胞スクリーニング後、Sangerシーケンシングおよびウェスタンブロット分析を行ってノックアウトされた菌株を同定した。親細胞および改変ゲノム配列は、表1に示し、挿入された配列は赤色で表示した。

30

【0124】

15. RNA近接依存性標識法による分析

【0125】

RaPID(RNA-protein interaction detection)アッセイは、次のような方法で行った。具体的に、Lenti-X 293T(Clonetech社製、632180)およびBASU RaPIDプラスミド(Addgene社製、#107250)から生成されたレンチウイルス輸送コンストラクトを形質導入してBASU発現HeLa安定細胞株を生成した。150piプレートからの1E7細胞をLipofectamine mMAX(Life Technologies社製、LMRNA015)を用いて前記合成された40μgのRNAでトランスフェクトした。16時間後、前記細胞に200μMのビオチン(Sigma社製、B4639)を1時間の間処理した。処理された細胞を氷上で1Xプロテアーゼ阻害剤および1Xホスファターゼ阻害剤を含んでなるRIPA lysis and extraction buff

40

50

er (Thermo社製、89901)で10分間溶解し、遠心分離した。前記溶融物は、Pierce streptavidin beads (Thermo社製、88816)と共に一晚4℃で回転しながら培養した。ビーズは洗浄バッファー1 (1mMのDTT、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含む1%のSDS)で3回洗浄し、洗浄バッファー (0.1%のNa-DOC、1%のトリトンX-100、0.5MのNaCl、50mMのHEPES [pH 7.5]、1mMのDTT、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含む1μMのEDTA)で1回洗浄した後、洗浄バッファー3 (0.5%のNa-DOC、150mMのNaCl、0.5%のNP-40、10mMのTris-HCl、1mMのDTT、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテルを含む1μMのEDTA)で1回洗浄した。

10

【0126】

ウェスタンブロットの場合、タンパク質をElution buffer (1.5x Laemmli sample buffer、0.02mMのDTT、4mMのピオチン)で溶出後、抗ZCCHC2 (1:250、Atlas Antibodies社製、HPA040943)、抗TENT4A (1:500、Atlas Antibodies社製、HPA045487)、anti-α-TUBULIN (1:300、Abcam社製、ab52866)およびanti-HA (1:2000、Invitrogen社製、715500)の一次抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。LC-MS/MSの場合、試料を37℃で1分間消化バッファー (50mMのTris [pH 8.0])で6回洗浄した。洗浄後、タンパク質結合ビーズを37℃で1時間の間1MのDTTを2μL含む180μLの消化バッファーで培養し、ついで0.5MのIAAを16μL追加して37℃で1時間の間培養した。その後、0.1g/Lのトリプシンを2μL追加して37℃で一晩培養した。残りの分解物はHiPPR (Thermo社製、88305)を用いて除去し、LC-MS/MS分析の前にZipTip C18樹脂 (Millipore社製、ZTC18S960)で洗浄した。

20

【0127】

LC-MS/MS分析は、nanoAcquityシステム (Waters社製)と組み合わせたOrbitrap Eclipse Tribrid (Thermo社製)を用いて実施した。キャピラリーアッセイ (内径75μm×100cm)およびトラップ (内径150μm×3cm)カラムを3μm Jupiter C18 particle (Phenomenex社製)で充填した。LCフローは、95%の溶媒A (0.1%のギ酸 (Merck社製))で35%の溶媒B (100%のアセトニトリル、0.1%のギ酸)範囲の60分の線形勾配で300nL/分に設定した。全MSスキャン (m/z 300-1,800)は、120k解像度 (m/z 200)で取得した。高エネルギー衝突解離 (HCD)断片化は、1.4番目の前駆体隔離ウィンドウを含む30%の正規化衝突エネルギー (NCE)で発生した。MS2スキャンは、30kの解像度で取得した。

30

【0128】

MS/MS rawデータ、FragPipe (v18.0)に組み込まれたMSFragger1 (v3.7)、IonQuant2 (v1.8.10)およびPhilosopher3 (v4.8.1)を用いて分析した。標識されていないタンパク質の同定及び定量化のために、トリプシンと指定された酵素と共にbuilt-in FragPipe workflow (LFQ-MBR)を使用した。標的誘導データベース (汚染物質を含む)は、Swiss-Prot human database4 (2022年10月)でFragpipeで生成した。combined__protein.tsvファイルは、追加分析に使用した。濃縮カットオフの場合、少なくとも2回の繰り返し実験によって1を超えるLog₂FCが使用された。

40

【0129】

16. 共免疫沈降 (co-IP) 及びウェスタンブロット法

【0130】

co-IP実験のために、1mMのDL-ジチオレイトール (DTT)、1Xプロテア

50

ーゼ阻害剤およびRNase A (Thermo社製、EN0531)を含むバッファA (100mMのKCl、0.1mMのEDTA、20mMのHEPES [pH 7.5]、0.4%のNP-40、10%のグリセロール)を用いて氷上で150 μ lプレートの親細胞およびTENT4 dKO細胞を20分間溶解し、次いで遠心分離した。プロテインAおよびGセファロースビーズ (1:1混合物、合計20 μ l)がコンジュゲートされた12.5 μ gの抗体 (NMG社製、抗TENT4Aおよび抗TENT4B)を、1mgの前記溶解物と共に免疫沈降に使用した。4℃で2時間の間培養した後、ビーズを洗浄し、20 μ lの2XSDS緩衝液で煮沸し、ladder (Thermo社製、26616および26619)と共に4~12%のSDS-PAGEゲル (Novex社製)にロードした。ドメインc o - I P実験のために、全長ZCCHC2、切断されたZCCHC2コンストラクト及びフラグタグ付き陰性コンストラクトをZCCHC2 KO細胞にトランスフェクションし、該細胞を2日以内に溶解した。前記溶解物1mgにANTI-FLAG (登録商標) M2 Affinity Gel (Merck社製、A2220-10ML) 10 μ lを加えた後、4℃で2時間の間培養して、免疫沈降を実施した。入力サンプルの場合、50 μ gの細胞溶解物を使用した。ゲルをメタノール活性化PVDFメンブレン (Millipore社製)に移した後、メンブレンを5%のスキムミルクを含むPBSTでブロッキングし、一次抗体でプローブした後、PBSTで3回洗浄した。抗ZCCHC2 (1:250、Atlas社製、HPA040943)、抗ZCCHC14 (1:1,000、Bethyl Laboratories社製、A303-096A)、抗TENT4A (1:500、Atlas Antibodies社製、HPA045487)、抗TENT4B (1:500、lab-made社製)、抗GAPDH (1:1,000、Santa Cruz社製、sc-32233)および抗FLAG (1:1,000、abcam社製、ab1162)を前記一次抗体として使用した。抗マウスまたは抗ウサギのHRPコンジュゲート二次抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories社製)を用いて1時間の間培養し、PBSTで3回洗浄した。化学発光は、West Pico又はFemto Luminol試薬 (Thermo社製、34580および34095)で実施されたし、シグナルはChemidoc XRS+System (Bio-Rad社製)で検出した。

10

20

30

40

50

【0131】

17. RNAプルダウン - LC-MS/MSデータの再解析

【0132】

MS/MSデータは、ヒトSwiss-Protデータベースv. 12/5/2018基本設定を用いてMaxQuant v. 1.5.3.30で処理されており、タンパク質レベル0.8%のFDRカットオフを適用した。

【0133】

MaxQuant出力ファイルの中から、MaxLFQ強度値はprotein groups.txtファイルから抽出した。MaxLFQ強度値に10,000の近似値を追加した後、Limmaを実行し、有意な遺伝子を $\log_2FC < 0.8$ および $FDR > 0.1$ でフィルタリングした。

【0134】

18. ドメイン保存分析

【0135】

UniProt Alignツールを用いてZCCHC2 (Q9C0B9)、ZCCHC14 (A0A590UJW6)およびGLS-1 (Q8I4M5)をアライメントし、3つのタンパク質の保存スコアを計算した。

【0136】

19. RNA免疫沈降

【0137】

ZCCHC2の免疫沈降のため、Lenti-X 293T (Clontech社製、632180)細胞から生成されたコンストラクトによるレンチウイルス輸送体を形質導

入して、3'非翻訳領域においてK5エレメントを有するEGFPを発現するHeLa安定細胞株を生成した。また、溶解バッファー(20mMのHEPES(pH7.6)[Ambion社製、AM9851およびAM9856]、0.4%のNP-40、100mMのKCl、0.1mMのEDTA、10%のグリセロール、1mMのDTT、1Xプロテアーゼ阻害剤[Calbiochem社製、535140])で前記細胞を氷上で30分間処理して溶解し、遠心分離して細胞溶解物を得た。陰性対照としては、10μgの正常ウサギIgG(Cell Signaling社製、2729S)を使用し、ZCCHC2免疫沈降のために10μgのZCCHC2抗体(atlas社製、HPA040943)を使用した。抗体が、プロテインA磁気ビーズ(Life Technologies社製、10002D)に付着した後、1mgの細胞溶解物を抗体結合ビーズと共に2時間の間培養し、次いで洗浄緩衝液(前記と同じ溶解バッファーであって、0.2%のNP-40を含む)で洗浄した。正規化のために用いられた5ngのホタルルシフェラーゼmRNAをspike-inにて各サンプルに追加した後、RNAをTRIzol試薬(Life Technologies社製)で精製してRT-qPCRに使用した。RT-qPCRプライマーは表1に示した。

10

【0138】

20. 亜細胞分画

【0139】

亜細胞分画は次の方法で行った。具体的には、細胞質分画を得るために、細胞を200μlの細胞溶解バッファー(0.2μg/μlのdigitonin[Merck社製、D141]、150mMのNaCl、50mMのHEPES[pH7.0~7.6]、0.1mMのEDTA、1mMのDTT、20U/mlのRNase阻害剤、1Xプロテアーゼ阻害剤、1Xホスファターゼ阻害剤)で溶解した。細胞膜および核分画の場合、製造会社の説明書に従って細胞内タンパク質分画キット(Thermo Scientific社製、78840)を用いて分画した。一次抗体としては、抗GM130(1:500、BD Bioscience社製、610822)および抗ヒストン(1:2000、cell signaling社製、4499)を使用した。

20

【0140】

本発明の実験例で用いられた試薬および材料を下記表2に示した。

【0141】

30

40

50

【表 2 A】

表 2

試薬又はリソース	出処(SOURCE)	識別子
抗体		
マウスポリクローナル抗 GAPDH 抗体	Santa Cruz	Cat#sc-32233; RRID: AB_627679
ウサギポリクローナル抗 ZCCHC2 抗体	Atlas	Cat#HPA040943; RRID: AB_10795496
ウサギポリクローナル抗 ZCCHC14 抗体	Bethyl Laboratories	Mouse30-5096A; RRID: AB_10895018
マウスモノクローナル抗 GM130 抗体	BD Bioscience	Cat#610822; RRID: AB_398141
ウサギモノクローナル抗ヒストン抗体(H3)	cell signalling	Cat#4499; RRID: AB_10544537
ウサギポリクローナル抗 FLAG 抗体	abcam	Cat#ab1162; RRID: AB_298215
ウサギポリクローナル抗 TENT4A 抗体	Atlas	Cat#HPA045487; RRID: AB_2679346
マウスポリクローナル抗 TENT4B 抗体	Kim et al	N/A
ウサギポリクローナル抗 eGFP 抗体	Invitrogen	Cat#CAB4211; RRID: AB_10709851
ウサギモノクローナル抗 α -チューブリン抗体	abcam	Cat#ab52866; RRID: AB_869989
ウサギポリクローナル抗 HA 抗体	Invitrogen	Cat#71-5500; RRID: AB_87935
細菌株及びウイルス株		
pAAV-CAG-GFP	Addgene	Cat#37825
pAAV-CAG-GFP (no WPRE)	本研究	N/A
pAAV-CAG-GFP-K5	本研究	N/A
pAAV-CAG-GFP-K5m	本研究	N/A
pAAV-CAG-GFP-eK5	本研究	N/A
pAAV-CAG-GFP-eK5m	本研究	N/A
pVVV-DJ	Addgene	Cat#104963
pAdDeltaF6	Addgene	Cat#112867
psPAX	本研究	N/A
pMD2.G	本研究	N/A
pLENTI EGFP K5	本研究	N/A
Endura Electrocompetent cell	Lucigen	Cat#LU60242-2
化学物質、ペプチド、及び組換えタンパク質		
RO0321	Glix Laboratories Inc	Cat#GLXC-11004
RG7834	Glix Laboratories Inc	Cat#GLXC-221188
Cycloheximide	Sigma-Aldrich	Cat#C4859-1ML

10

20

30

40

50

【表 2 B】

重要な商用アクセシ		
DMEM	WELGENE	Cat#LM001-05
マッコイ 5A 培地	WELGENE	Cat#LM005-1
FBS	WELGENE	Cat#S001-01
Q5®ハイフィデリティ 2X マスターミックス	NEB	Cat#M0492
NotI-HF	NEB	Cat#R3189S
SacI-HF	NEB	Cat#R3156S
T4 DNA リガーゼ	NEB	Cat#M0202M
ザイモオリゴ クリーン&コンセントレーターキット	Zymo Research	Cat#D4061
SYBRgold	Invitrogen	Cat#S11494
リポフェクタミン 3000 トランスフェクション試薬	-	Cat#L3000001
Allprep RNA/DNA ミニキット	Qiagen	Cat#80004
組換え DNase I	TAKARA	Cat#2270A
SSIV 逆転写酵素	Invitrogen	Cat#18090010
ジギトニン	Merck	Cat#D141
SUPERas In RNase インヒビター	Ambion	Cat#AM2696
プロテアーゼ阻害剤	Calbiochem	Cat#535140
ホスファターゼ阻害剤	Merck	Cat#P0044
D(+)-スクロース	Acros Organics	Cat#AC197600050
グラジエントマスター™	Biocomp	Cat#106-2
SW41Ti ロータ	Beckman coulter	Cat#331362
ベックマン・コールター 超遠心機 Optima XE	Beckman coulter	Cat#A94471
バイオリジック LP システム (モデル 2110 フラクションコレクター付き)	Bio-Rad	Cat#7318303
M-1 エコノ UV検出器	Bio-Rad	Cat#7318162
TRIzol™ LS 試薬	Life Technologies	Cat#10296-028
TRIzol	Life Technologies	Cat#15596-018
Direct-zol RNA Miniprep キット	Zymo Research	Cat#R2052
デュアルルシフェラーゼレポーターアクセシシステム	Promega	Cat#E4550
Rneasy ミニキット	Qiagen	Cat#74106
DNase	Qiagen	Cat#79254
プライムスクリプト RT ミックス	Takara	Cat#RR036A
SYBR Green	Life Technologies	Cat#4367659
StepOnePlus リアルタイム PCR システム	Applied Biosystems	Cat#4376599
QuantStudio 3	Applied Biosystems	Cat#A28132
MiSeq Reagent Kit v2 (300 サイクル)	Illumina	Cat#15033412
TruSeq ストランドトータル RNA LP ゴールド	Illumina	Cat#20020599
PhiX コントロール v3 キット	Illumina	Cat#FC-110-3001
AAV クオンティテーションキット	cell biolabs	Cat#VPL-145

10

20

30

40

50

【表 2 C】

AAV 構築キット	cell biolabs	Cat#VPK-140
BD Accuri C6 Plus フローサイトメーター	BD	Cat#660517
mMESSAGE mMACHINE™ T7 転写キット	Invitrogen	Cat#AM1344
CleanCap(R) Reagent AG (3'OMe)	TriLink Biotechnologies	Cat#N-7413-1C
NTPs	NEB	Cat#N0450S
RNeasy MiniElute クリーンアップキット	Qiagen	Cat#74204
RIPA 溶解および抽出バッファー	Thermo	Cat#89901
Novex WedgeWell 10-20%Tris-Glycine ミニゲル	Invitrogen	Cat#XP10202BOX
Novex WedgeWell 4-12% Tris-Glycine ミニゲル	Invitrogen	Cat#SP04122BOX
プロテインラダー	Thermo	Cat#26616
プロテインラダー	Thermo	Cat#26619
PVDF	Millipore	Cat#88518
ポリ(A)テール長測定キット	Affymetrix	Cat#76455
T4 RNA リガーゼ 2, 切断型 KQ	NEB	Cat#M0373L
リボヌクレアーゼ T1	Thermo Scientific	Cat#EN0541
Dynabead M-280	Thermo Scientific	Cat#11204D
ポリ(A)ポリメラーゼ、酵母	Thermo Scientific	Cat#74225Z25KU
メタフェクテン		Cat#T020
Lipofectamine mMAX	Life Technologies	Cat#LMRNA015
ビオチン	Sigma	Cat#B4639
Pierce ストレプトアビジン磁気ビーズ	Thermo	Cat#88816
HiPPR	Thermo	Cat#88305
ZipTip C18 樹脂	Millipore	Cat#ZTC18S960
Orbitrap Eclipse Tribrid	Thermo	Cat#FSN04-10000
リボヌクレアーゼ A	Thermo	Cat#EN0531
ANTI-FLAG® M2 アフィニティーゲル	Merck	Cat#A2220-10ML; RRID: AB_10704031
HEPES	Ambion	Cat#AM9851
HEPES	Ambion	Cat#AM9856
正常ウサギ IgG	Cell Signaling	Cat#2729S
プロテイン A 磁気ビーズ	Life Technologies	Cat#10002D
細胞内タンパク質分画キット	Thermo Scientific	Cat#78840
SuperSignal West Pico PLUS 化学発光基質	Thermo Scientific	Cat#34580
SuperSignal West Pico femto 化学発光基質	Thermo Scientific	Cat#34905
ChemiDoc XRS+システム	Bio-Rad	Cat#1708265

10

20

30

40

50

【表 2 D】

寄託データ		
Analysis code	本研究	https://github.com/Jen2Seo/viromics-screen-MPRA
MPRA - RNA abundance	本研究	10.5281/zenodo.6777910
MPRA - polysome fractionation	本研究	10.5281/zenodo.6717932
MPRA - Secondary mutagenesis	本研究	10.5281/zenodo.6696870
MPRA - Nucleocytoplasmic fractionation	本研究	10.5281/zenodo.7773943
Gene-specific TAIL-seq	本研究	10.5281/zenodo.6786179
RaPID mass spectrometry	本研究	PXD041296
RNA pull-down Mass spectrometry	Kim et al.	PXD018061
実験モデル及び細胞株		
人間/HCT116	ATCC	Cat#CCL-247
人間/293AAV	Cell biolabs	Cat#AAV-100
人間/Lenti-X293T	Clontech	Cat#632180
オリゴヌクレオチド		
表 S5 に記載の本研究に用いられたオリゴヌクレオチド	本研究	N/A
MPRA screening oligos	Synbio Technologies	http://github.com/Jen2Seo/viromics-screen-MPRA/
組換え DNA		
表 S5 に記載の本研究に用いられたプラスミド	本研究	N/A

10

20

30

40

50

【表 2 E】

ソフトウェア及びアルゴリズム		
Bowtie2 2.6	Langmead and Salzberg	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/
mpira-package (MPRAnalyze)	Ashuaauach et al.	http://rdrr.io/bioc/mpira-package.html
SciPy 1.4.1	Virtanen et al.	http://scipy.org/PRID_SCR_008058
Tailseeker 3.1.5	Chang et al.	http://github.com/hyes-hik/tailseeker
Dragon PolyA spotter ver. 1.2	Kalkatawi et al.	https://mybiosoftware.com/dragon-polya-spotter-1-1-predictor-polya-motifs-human-genomic-dna-sequences.html
RNAFold	Gruber et al.	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=9LRleG16z&r=57
IPKnot	Sato et al.	http://github.com/satoken/ipknot
RNAstructure	Reuter et al.	https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html
CENTROIDFOLD	Sato et al.	http://ncma.org/centroidfold/
CONTRAFold	Do et al.	http://bio.tools/contrafold
Contextfold	Zakov et al.	http://cs.bgu.ac.il/~neg-evcb/contextfold/
DESeq2	Love et al.	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html
ClustalOmega	Sievers et al.	http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
FigTree v1.4.4	Rambaut and Drummond	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
forna	Kerpedjiev et al.	http://bio.tools/forna
MaxQuant v.1.5.3.30	Cox and Mann	http://maxquant.org
Limma	Smyth, G.K.	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html
UniProt Align tool	UniProt	http://uniprot.org/align
MSFragger1 v3.7	Kong et al.	http://fragpipe.nesvilab.org/
IonQuant2 v1.8.10	Yu et al.	http://fragpipe.nesvilab.org/
Philosopher3 v4.8.1	da Veiga et al.	http://fragpipe.nesvilab.org/
その他		
ウイルスゲノム配列	NCBI	http://ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/
Swiss-Prot human database4	Swiss-prot Group	http://uniprot.org/downloads

【0142】

【実施例】

【0143】

1. 調節RNAエレメントを同定するためのViromicスクリーン

【0144】

ウイルスRNAエレメントのライブラリーを構築するため、オリゴ合成の技術的限界のため、ヒトウイルスで初期の選別を行い、他の関連種を含むように2次スクリーンを拡張する2段階のアプローチを行った。ヒトに感染させることができるウイルスを同定するために、現在、114個の属および40個の科に属する502種のヒトウイルスに注釈を付

けているNCBIデータベースを使用した。

【0145】

図1Aおよび表3に示すように、手作業で検査した後、96個の属と37個の科を代表する143種を選定し、配列類似性が近い種、および、曖昧に分類されるかまたはヒト感染に関する明確な証拠が足りない種を除いた。本発明のカタログは、ボルティモア分類システムの7つのグループをいずれも含んでいる。RNAウイルスの場合、全ゲノム配列を使用した。一般に、より大きなゲノムを持つDNAの場合、非翻訳領域(UTR)および暗号化されていない遺伝子が含まれている。

【0146】

【表3A】

表3

ゲノム型	科	属	名称	セグメント	RefSeq ID
DS-DNA	アデノウイルス	マストアデノウイルス	ヒトマストアデノウイルス A	ゲノム	NC_001460.1
	ヘルペスウイルス	サイトメガロウイルス	ヒトベータヘルペスウイルス 5 (HHV-5; HCMV)	ゲノム	NC_006273.2
		リンパクリプトウイルス	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型 (エプスタイン・バール・ウイルス)	ゲノム	NC_007605.1
		ラディノウイルス	ヒトガンマヘルペスウイルス 8 型 (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス)	ゲノム	NC_009333.1
		ロゼオロウイルス	ヒトベータヘルペスウイルス 6B (HHV-6B)	ゲノム	NC_000898.1
		シンプレックスウイルス	ヒトアルファヘルペスウイルス 1 型 (単純ヘルペスウイルス 1 型)	ゲノム	NC_001806.2
			ヒトアルファヘルペスウイルス 2 型 (単純ヘルペスウイルス 2 型)	ゲノム	NC_001798.2
		バリセロウイルス	ヒトアルファヘルペスウイルス 3 型 (HHV-3)	ゲノム	NC_001348.1
	イリドウイルス科	メガロサイチウイルス	伝染性脾臓腎臓壊死症ウイルス (ISKNV)	ゲノム	NC_003494.1
	パピローマウイルス科	アルファパピローマウイルス	ヒトパピローマウイルス 16 型	ゲノム	NC_001526.4
		ベータパピローマウイルス	ヒトパピローマウイルス 5 型	ゲノム	NC_001531.1
		ガンマパピローマウイルス	ヒトパピローマウイルス 5 型	ゲノム	NC_001457.1
		ムーパピローマウイルス	ヒトパピローマウイルス 63 型	ゲノム	NC_001458.1
		ヌーパピローマウイルス	ヒトパピローマウイルス 41 型	ゲノム	NC_001354.1
	ポリオーマウイルス	アルファポリオーマウイルス	メルケル細胞ポリオーマウイルス	ゲノム	NC_010277.2
		ベータポリオーマウイルス	JC ポリオーマウイルス (JCPYV)	ゲノム	NC_001699.1
		デルタポリオーマウイルス	ヒトポリオーマウイルス 6 型	ゲノム	NC_014406.1
	ボックスウイルス	センタボックスウイルス	NY_014 ボックスウイルス	ゲノム	NC_035469.1
		モラシボックスウイルス	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	ゲノム	NC_001731.1
		オルソボックスウイルス	牛痘ウイルス	ゲノム	NC_003663.2
			ワクシニアウイルス	ゲノム	NC_006998.1
			天然痘ウイルス	ゲノム	NC_001611.1
		パラボックスウイルス	オルフウイルス	ゲノム	NC_005336.1
		ヤタボックスウイルス	ヤバ類似疾患ウイルス	ゲノム	NC_002642.1

10

20

30

40

50

【表 3 B】

SS-DNA	スマコウイルス	フチスマコウイルス	ヒト関連フチスマコウイルス 1 型	ゲノム	NC_039061.1
		ポープリスマコウイルス	ヒト糞便スマコウイルス 2 型	ゲノム	NC_039070.1
	アネロウイルス	アルファトルクウイルス	トルクテノウイルス 1 型	ゲノム	NC_002076.2
		ベータトルクウイルス	トルクテノミニウイルス 1 型	ゲノム	NC_014097.1
		ガンマトルクウイルス	トルクテノミディウイルス 1 型	ゲノム	NC_009225.1
		ジャイロウイルス属	トリジャイロウイルス 2	ゲノム	NC_015396.1
	サーコウイルス	サーコウイルス	ブタサーコウイルス 2 型	ゲノム	NC_005148.1
		サイクロウイルス	ヒトサイクロウイルス VS5700009	ゲノム	NC_021568.1
	類双生病毒	ジェミーサーキュラーウイルス	ジェミーサーキュラーウイルス HV-GcV1	ゲノム	NC_030447.1
	バルボウイルス	ボカバルボウイルス	サル・ボカバルボウイルス 1 型	ゲノム	NC_007455.1
		ディベンドバルボウイルス	アデノ随伴ウイルス 1 型	ゲノム	NC_002077.1
		エリスロバルボウイルス	ヒトバルボウイルス B19	ゲノム	NC_000883.2
		未分類バルボウイルス亜科	バルボウイルス NIH-CQV	ゲノム (PARTIAL)	NC_022089.1
		プロトバルボウイルス	クタウイルス	ゲノム (PARTIAL)	NC_039050.1
		テトラバルボウイルス	ヒトバルボウイルス 4 G1 型	ゲノム	NC_007018.1
DS-RNA	ピコビルナウイルス	ピコビルナウイルス	ヒトピコビルナウイルス	セグメント 1	NC_007026.1
				セグメント 2	NC_007027.1
	レオウイルス	オルビウイルス	グレートアイランドウイルス (GIV)	セグメント 1	NC_014522.1
				セグメント 10	NC_014531.1
				セグメント 2	NC_014523.1
				セグメント 3	NC_014524.1
				セグメント 4	NC_014525.1
				セグメント 5	NC_014526.1
				セグメント 6	NC_014527.1
				セグメント 7	NC_014528.1
				セグメント 8	NC_014529.1
				セグメント 9	NC_014530.1

10

20

30

40

50

【表 3 C】

		オルソレオウイルス	哺乳類オルソレオウイルス 3型	セグメント L1	NC_013225.1
				セグメント L2	NC_013226.1
				セグメント L3	NC_013229.1
				セグメント M1	NC_013227.1
				セグメント M2	NC_013228.1
				セグメント M3	NC_013230.1
				セグメント S1	NC_013231.1
				セグメント S2	NC_013232.1
				セグメント S3	NC_013233.1
				セグメント S4	NC_013234.1
		ロタウイルス	A群ロタウイルス	セグメント 1	NC_011507.2
				セグメント 10	NC_011504.2
				セグメント 11	NC_011505.2
				セグメント 2	NC_011506.2
				セグメント 3	NC_011508.2
				セグメント 4	NC_011510.2
				セグメント 5	NC_011500.2
				セグメント 6	NC_011509.2
				セグメント 7	NC_011501.2
				セグメント 8	NC_011502.2
				セグメント 9	NC_011503.2
		シードルナウイルス	パンナウイルス JKT-6423 株	セグメント 1	NC_004211.1
				セグメント 10	NC_004201.1
				セグメント 11	NC_004200.1
				セグメント 12	NC_004198.1
				セグメント 2	NC_004217.1
				セグメント 3	NC_004218.1
				セグメント 4	NC_004219.1
				セグメント 5	NC_004220.1

10

20

30

40

50

【表 3 D】

				セグメント 6	NC_004221.1
				セグメント 7	NC_004204.1
				セグメント 8	NC_004203.1
				セグメント 9	NC_004202.1
	トディウイルス	未分類トディウイルス	腫トリコモナスウイルス	ゲノム	NC_003824.1
SS- POS- RNA	アストロウイルス	マムアストロウイルス	アストロウイルス MLB1	ゲノム	NC_011400.1
		未分類アストロウイルス	HUMAN ASTROVIRUS	ゲノム	NC_001943.1
	カリシウイルス	ノロウイルス	ノロウイルス GI 型	ゲノム	NC_001959.2
			ノロウイルス GII 型	ゲノム	NC_039477.1
			ノロウイルス GV 型	ゲノム	NC_008311.1
		サボウイルス	サボウイルス Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE 株	ゲノム	NC_006269.1
		ベシウイルス	ブタ水疱疹ウイルス	ゲノム	NC_002551.1
	コロナウイルス	アルファコロナウイルス	ヒトコロナウイルス 229E	ゲノム	NC_002645.1
			ヒトコロナウイルス NL63 (HCoV-NL63)	ゲノム	NC_005831.2
		ベータコロナウイルス	ヒトコロナウイルス HKU1 (HCoV-HKU1)	ゲノム	NC_006577.2
			ヒトコロナウイルス OC43 (HCoV-OC43)	ゲノム	NC_006213.1
			中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS-COV)	ゲノム	NC_019843.3
			SARS コロナウイルス TOR2 株	ゲノム	NC_004718.3
			重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-COV-2)	ゲノム	NC_045512.2
	フラビウイルス	フラビウイルス	デングウイルス 1 型	ゲノム	NC_001477.1
			デングウイルス 2 型	ゲノム	NC_001474.2
			デングウイルス 3 型	ゲノム	NC_001475.2
			デングウイルス 4 型	ゲノム	NC_002640.1
			日本脳炎ウイルス	ゲノム	NC_001437.1
			セントルイス脳炎ウイルス	ゲノム	NC_007580.2
			ダニ媒介脳炎ウイルス	ゲノム	NC_001672.1
			ウエストナイルウイルス (WNV)	ゲノム	NC_001563.2
		ヘパシウイルス	黄熱ウイルス (YFV)	ゲノム	NC_002031.1
			ジカウイルス	ゲノム	NC_012532.1
		ベスチウイルス	C 型肝炎ウイルス遺伝子型 1	ゲノム	NC_004102.1
			GB ウイルス B	ゲノム	NC_001655.1
		ベスチウイルス	GB ウイルス C (GBV-HGV)	ゲノム	NC_001710.1
			ベギウイルス A	ゲノム	NC_001837.1
		ベスチウイルス	牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型 (BVDV-1)	ゲノム	NC_001461.1
	ヘベウイルス	オルソヘベウイルス	E 型肝炎ウイルス	ゲノム	NC_001434.1
	マトナウイルス	ルビウイルス	風疹ウイルス	ゲノム	NC_001545.2

10

20

30

40

50

【表 3 E】

SS- NEG- RNA	該当なし	フサウイルス	フサウイルス	ゲノム	NC_032480.1
	ピコルナウイルス	カルジオウイルス	脳心筋炎ウイルス	ゲノム	NC_001479.1
			サフォールドウイルス	ゲノム	NC_009448.2
		コサウイルス	コサウイルス A	ゲノム	NC_012800.1
		エンテロウイルス	エンテロウイルス A	ゲノム	NC_001612.1
			エンテロウイルス B	ゲノム	NC_001472.1
			エンテロウイルス C	ゲノム	NC_002058.3
			エンテロウイルス D	ゲノム	NC_001430.1
			ヒトライノウイルス A1 (HRV-A1)	ゲノム	NC_038311.1
			ライノウイルス B14	ゲノム	NC_001490.1
		ヘパトウイルス	A型肝炎ウイルス	ゲノム	NC_001489.1
		コブウイルス	アイチウイルス 1	ゲノム	NC_001918.1
		パレコウイルス	パレコウイルス A	ゲノム	NC_001897.1
		ロサウイルス	ロサウイルス A2	ゲノム	NC_024070.1
		サリウイルス	サリウイルス A	ゲノム	NC_012986.1
	トバニウイルス	トロウイルス	ブレダウイルス	ゲノム	NC_007447.1
	トガウイルス	アルファウイルス	バーマフォレストウイルス	ゲノム	NC_001786.1
			チクングニアウイルス	ゲノム	NC_004162.2
			東部ウマ脳炎ウイルス	ゲノム	NC_003899.1
			セムリキフォレストウイルス	ゲノム	NC_003215.1
			ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)	ゲノム	NC_001449.1
			西部ウマ脳炎ウイルス	ゲノム	NC_003908.1
	アレナウイルス	マンマレナウイルス	アルゼンチンマンマレナウイルス	セグメント L	NC_005080.1
				セグメント S	NC_005081.1
			リンパ球性脈絡髄膜炎マンマレナウイルス (LCMV)	セグメント L	NC_004291.1
				セグメント S	NC_004294.1
	ボルナウイルス	オルソボルナウイルス	ボルナ病ウイルス 1 (BODV-1)	ゲノム	NC_001607.1
	フィロウイルス	エボラウイルス	ザイールエボラウイルス	ゲノム	NC_002549.1
		マールブルグウイルス	マールブルグマールブルグウイルス	ゲノム	NC_001608.3
	ハンタウイルス	オルソハンタウイルス	アンデスオルソハンタウイルス	セグメント L	NC_003468.2
				セグメント M	NC_003467.2
				セグメント S	NC_003466.1
			ハンターンオルソハンタウイルス	セグメント L	NC_005222.1
				セグメント M	NC_005219.1
				セグメント S	NC_005218.1
			ソウルオルソハンタウイルス	セグメント L	NC_005238.1
				セグメント M	NC_005237.1

10

20

30

40

50

【表 3 F】

			シンノンブレオルソハンタウイルス	セグメント S	NC_005236.1
				セグメント L	NC_005217.1
				セグメント M	NC_005215.1
				セグメント S	NC_005216.1
	コルミオウイルス	デルタウイルス	D 型肝炎ウイルス	ゲノム	NC_001653.2
	ナイロウイルス	オルソナイロウイルス	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	セグメント L	NC_005301.3
				セグメント M	NC_005300.2
				セグメント S	NC_005302.1
			ナイロビ羊病ウイルス (NSDV)	セグメント L	NC_034387.1
				セグメント M	NC_034391.1
				セグメント S	NC_034386.1
	オルトミクソウイルス	アルファインフルエンザウイルス	A 型インフルエンザウイルス (A/ニューヨーク/392/2004(H3N2))	セグメント 1	NC_007373.1
				セグメント 2	NC_007372.1
				セグメント 3	NC_007371.1
				セグメント 4	NC_007366.1
				セグメント 5	NC_007369.1
				セグメント 6	NC_007368.1
				セグメント 7	NC_007367.1
				セグメント 8	NC_007370.1
			A 型インフルエンザウイルス (A/プエルトリコ/8/1934(H1N1))	セグメント 1	NC_002023.1
				セグメント 2	NC_002021.1
				セグメント 3	NC_002022.1
				セグメント 4	NC_002017.1
				セグメント 5	NC_002019.1
				セグメント 6	NC_002018.1
				セグメント 7	NC_002016.1
				セグメント 8	NC_002020.1
		ベータインフルエンザウイルス	B 型インフルエンザウイルス (B/Lee/1940)	セグメント 1	NC_002204.1
				セグメント 2	NC_002205.1

10

20

30

40

50

【表 3 G】

				セグメント 3	NC_002206.1
				セグメント 4	NC_002207.1
				セグメント 5	NC_002208.1
				セグメント 6	NC_002209.1
				セグメント 7	NC_002210.1
				セグメント 8	NC_002211.1
		ガンマインフルエンザウイルス	C型インフルエンザウイルス (C/アナーバー/1/50)	セグメント 1	NC_006307.2
				セグメント 2	NC_006308.2
				セグメント 3	NC_006309.2
				セグメント 4	NC_006310.2
				セグメント 5	NC_006311.1
				セグメント 6	NC_006312.2
				セグメント 7	NC_006306.2
		トゴトウイルス	ドーリトゴトウイルス	セグメント 1	NC_034261.1
				セグメント 2	NC_034263.1
				セグメント 3	NC_034254.1
				セグメント 4	NC_034255.1
				セグメント 5	NC_034262.1
				セグメント 6	NC_034256.1
	パラミクソウイルス	ヘニバウイルス	ヘンドラヘニバウイルス	ゲノム	NC_001906.3
		モルビリウイルス	麻疹モルビリウイルス	ゲノム	NC_001498.1
		オルソソルブラウイルス	ヒトオルソソルブラウイルス 2型	ゲノム	NC_003443.1
			ヒトパラインフルエンザウイルス 4A型	ゲノム	NC_021928.1
			ムンブスオルソソルブラウイルス	ゲノム	NC_002200.1
		バラルブラウイルス	ソスガウイルス	ゲノム	NC_025343.1
		レスピロウイルス	ヒトレスピロウイルス 1型	ゲノム	NC_003461.1
			ヒトレスピロウイルス 3型	ゲノム	NC_001796.2
	ベリブニャウイルス	オルソブニャウイルス	ブニャムウエラウイルス	セグメント L	NC_001925.1
				セグメント M	NC_001926.1
				セグメント S	NC_001927.1

10

20

30

40

50

【表 3 H】

			ラクトウイルス	セグメント L	NC_004108.1
				セグメント M	NC_004109.1
				セグメント S	NC_004110.1
			オロブーシェウイルス	セグメント L	NC_005776.1
				セグメント M	NC_005775.1
				セグメント S	NC_005777.1
	フェヌウイルス	バンダウイルス	重症熱性血小板減少症候群ウイルス	セグメント L	NC_043450.1
				セグメント M	NC_043451.1
				セグメント S	NC_043452.1
		フレボウイルス	リフトバレー熱ウイルス	セグメント L	NC_014397.1
				セグメント M	NC_014396.1
				セグメント S	NC_014395.1
	ニューモウイルス	メタニューモウイルス	ヒトメタニューモウイルス (HMPV)	ゲノム	NC_039199.1
		オルソニューモウイルス	ヒトオルソニューモウイルス (HRSV)	ゲノム	NC_001781.1
	ラブドウイルス	レダントウイルス	ルダントウイルス	ゲノム (PARTIAL)	NC_034443.1
		リッサウイルス	狂犬病ウイルス	ゲノム	NC_001542.1
		チプロウイルス	バスコンゴチプロウイルス	ゲノム (PARTIAL)	NC_043067.1
		ベシクロウイルス	チャンディブラウイルス	ゲノム	NC_020805.1
RT-RNA	レトロウイルス	ベータレトロウイルス	マウス乳癌ウイルス	ゲノム	NC_001503.1
		デルタレトロウイルス	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型	ゲノム	NC_001436.1
			ヒト T リンパ球向性ウイルス 2 型	ゲノム	NC_001488.1
		ガンマレトロウイルス	モロニーマウス白血病ウイルス (MOMLV)	ゲノム	NC_001501.1
		レンチウイルス	ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)	ゲノム	NC_001802.1
			ヒト免疫不全ウイルス 2 型 (HIV-2)	ゲノム	NC_001722.1
		未分類レトロウイルス	ヒト内在性レトロウイルス K113	ゲノム	NC_022518.1
		スプマウイルス	サル泡沫状ウイルス	ゲノム	NC_001364.1
RT-DNA	ヘパドナウイルス	オルソヘパドナウイルス	B 型肝炎ウイルス	ゲノム	NC_003977.2
			ウッドチャック肝炎ウイルス	ゲノム	NC_004107.1

【 0 1 4 7 】

図 1 B に示すように、スライディングウィンドウのサイズが 130 nt であり、65 n の段階サイズにウイルスゲノムをタイリング (tile) して合計 30,367 個のセグメントを生成してスクリーン用オリゴを設計した。各セグメントは、信頼可能な検出のための 3 種の異なるバーコードを有するように製造した。陽性対照として、HCMV (human cytomegalovirus) の lncRNA 2.7 からの「1E」エレメントを含む 4 つのセグメント (図 8) および遺伝子発現を向上させることが知られているウッドチャック肝炎ウイルスの WPRE (woodchuck posttranscriptional regulatory element) を含む 1 つのセグメントを

含めた。非機能的対照として、本発明者らは1 Eのループで不活性化変異を含む変異(1 Em)を使用した。前記設計されたオリゴを合成した後、PCRによって増幅し、ルシフェラーゼレポータープラスミドの3'非翻訳領域に挿入した。前記構築されたライブラリーには、合計91,101個のレポータープラスミドが含まれており、143個のヒトウイルスおよびイヌのウッドチャック肝炎ウイルスで30,367個のセグメントが含まれていた。

【0148】

機能的評価のために、プラスミドプールを、ヒト結腸癌細胞株(HCT-116)にトランスフェクトさせて、遺伝子発現に対する各エレメントの影響を定量化した(図1B)。RNA存在量(abundance)に及ぼす効果をモニタリングすべく、プラスミドおよびmRNAを全て抽出し、増幅し、シーケンシングして、mRNAのリードの比とトランスファクトされたDNAのリードの比との間の割合を計算した(「RNA/DNA」)。翻訳調節エレメントを探索するために、ショ糖勾配の遠心分離を用いて、細胞質抽出物を5つの分画(遊離mRNA、モノソーム、軽いポリソーム(LP)、中間ポリソーム(MP)、および重いポリソーム(HP))に分離し、前記抽出物を、RNA抽出及びシーケンシングに用いて各UTRについて翻訳効率を予測した。

10

【0149】

2. 調節RNAエレメントの同定

【0150】

mRNA存在量(abundance)に対する30,302個のウイルスセグメント(3つのバーコードが全て感知されたセグメント30,190個)に及ぼす影響を確認するために次のような実験を行った。実験結果は、4回の繰り返し実験とバーコードとの間で再現可能であった。具体的には、1 EおよびWPREにわたる陽性対照は、1 E変異に比してmRNAレベルが増加された(図1C)。245個の上向き調節セグメントと628個の下向き調節セグメントを同定した。mRNAの存在量を増加させたセグメントは、mRNAの安定性を向上させると知られているPREの一部であるヒトB型肝炎ウイルスのステムループαを含んでいた。ネガティブエレメントは、D型肝炎ウイルス(HDV)の自己切断リボザイムのような核酸分解酵素により切断されたRNA、およびDROSHAによって切断される可能性のあるヒトサイトメガロウイルス(ヒトβ-ヘルペスウイルス5とも知られている)、およびエプスタイン・バーウイルスのマイクロRNA遺伝子座を含めて、レポーターmRNAの分解をもたらした(図1C)。

20

30

【0151】

したがって、前記実験でRNAを安定化するセグメント($\log_2(\text{RNA/DNA}) > 0.5$, p 値 < 0.05)または不安定化するセグメント($\log_2(\text{RNA/DNA}) < -1$, p 値 < 0.001)を効果的に同定した(表4および表5)。表4の50個のセグメントは、陽性対照WPREまたはHCMV1Eと類似するか、またはそれより高い $\log_2(\text{RNA/DNA})$ 値を有し、優れたRNA存在量を示していることを確認した(図1C)。

【0152】

RNAを安定化するセグメント

40

【0153】

【表 4 A】

表 4

順位	ウイルス名	NCBI ID	開始位置	終了位置	log2 RNA/DNA 比	タイル ID	配列番号
1	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型 (エプスタイン・バーウイルス)	NC_007605.1	88961	88832	1.7565	TILE_ID_138-00443	1
2	脳心筋炎ウイルス	NC_001479.1	196	325	1.7179	TILE_ID_066-00004	2
3	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型 (HHV-5、ヒトサイトメガロウイルス)	NC_006273.2	96273	96402	1.1516	TILE_ID_143-00201	3
4	オルフウイルス	NC_005336.1	1E+05	1E+05	1.1381	TILE_ID_133-00301	4
5	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001731.1	2E+05	2E+05	1.1065	TILE_ID_140-00299	5
6	ボルナ病ウイルス 1(BODV-1)	NC_001607.1	3368	3497	1.0742	TILE_ID_076-00050	6
7	フサウイルス	NC_032480.1	6695	6824	1.0331	TILE_ID_075-00103	7
8	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型 (エプスタイン・バーウイルス)	NC_007605.1	89026	88897	1.0057	TILE_ID_138-00442	8
9	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	110	240	0.9327	TILE_ID_144-00012	9
10	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	100	230	0.894	TILE_ID_144-00011	10
11	セントルイス脳炎ウイルス	NC_007580.2	10613	10742	0.8586	TILE_ID_093-00163	11
12	ブレダウイルス	NC_007447.1	7510	7639	0.857	TILE_ID_123-00116	12
13	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	90	220	0.8544	TILE_ID_144-00010	13
14	ヒトコロナウイルス OC43(HCOV-OC43)	NC_006213.1	7281	7410	0.8456	TILE_ID_128-00113	14
15	シンノンブレオルソハンタウイルス	NC_005216.1	1561	1690	0.8431	TILE_ID_024-00025	15
16	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001731.1	2E+05	2E+05	0.8089	TILE_ID_140-00298	16
17	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型 (HHV-5 HCMV)	NC_006273.2	4579	4450	0.7902	TILE_ID_143-00440	17
18	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	15809	15938	0.7896	TILE_ID_126-00243	18
19	マールブルグマールブルグウイルス	NC_001608.3	18484	18613	0.7854	TILE_ID_120-00285	19
20	アイチウイルス 1	NC_001918.1	8122	8251	0.7599	TILE_ID_070-00126	20
21	ウエストナイルウイルス(WNV)	NC_001563.2	8132	8261	0.7515	TILE_ID_094-00124	21

10

20

30

40

50

【表 4 B】

22	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	7411	7540	0.75	TILE_ID_126-00115	22
23	サル泡沫状ウイルス	NC_001364.1	2272	2401	0.7461	TILE_ID_108-00035	23
24	プニヤムウェラウイルス	NC_001925.1	5851	5980	0.7443	TILE_ID_008-00173	24
25	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001731.1	72311	72182	0.7443	TILE_ID_140-00585	25
26	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型 (HHV-5 HCMV)	NC_006273.2	4644	4515	0.7434	TILE_ID_143-00439	26
27	牛痘ウイルス	NC_003663.2	29398	29269	0.7319	TILE_ID_142-00551	27
28	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	60	190	0.7278	TILE_ID_144-00007	28
29	A グループロタウイルス	NC_011500.2	1366	1495	0.716	TILE_ID_001-00110	29
30	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	80	210	0.7121	TILE_ID_144-00009	30
31	ブレダウイルス	NC_007447.1	2375	2504	0.7104	TILE_ID_123-00037	31
32	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	21139	21268	0.6988	TILE_ID_126-00325	32
33	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	15744	15873	0.6912	TILE_ID_126-00242	33
34	ヒトオルソニューモウイルス(HRSV)	NC_001781.1	14950	15079	0.6905	TILE_ID_110-00230	34
35	天然痘ウイルス	NC_001611.1	1E+05	1E+05	0.6873	TILE_ID_139-00782	35
36	牛痘ウイルス	NC_003663.2	2E+05	2E+05	0.6851	TILE_ID_142-00982	36
37	牛痘ウイルス	NC_003663.2	2E+05	2E+05	0.6775	TILE_ID_142-00298	37
38	日本脳炎ウイルス	NC_001437.1	10648	10777	0.6713	TILE_ID_095-00164	38
39	陽性対照 (SL27)	GU937742.2	50	180	0.6702	TILE_ID_144-00006	39
40	NY 014 ボックスウイルス	NC_035469.1	54907	54778	0.6645	TILE_ID_141-00618	40
41	ハンタールソハンタウイルス	NC_005219.1	3381	3510	0.658	TILE_ID_018-00079	41
42	ヒトコロナウイルス NL63(HCOV-NL63)	NC_005831.2	17641	17770	0.6571	TILE_ID_122-00272	42
43	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2(SARS-COV-2)	NC_045512.2	5851	5980	0.6529	TILE_ID_125-00091	43
44	NY 014 ボックスウイルス	NC_035469.1	2E+05	2E+05	0.6523	TILE_ID_141-00868	44
45	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	29054	29183	0.6522	TILE_ID_126-00446	45
46	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	7671	7800	0.6517	TILE_ID_126-00119	46

10

20

30

40

50

【表 4 C】

47	ヒトコロナウイルス NL63(HCOV-NL63)	NC_005831.2	4551	4680	0.6468	TILE_ID_122-00071	47
48	ヒトライノウイルス A1(HRV-A1)	NC_038311.1	6626	6755	0.6459	TILE_ID_048-00102	48
49	ウッドチャック肝炎ウイルス	NC_004107.1	1366	1495	0.6448	TILE_ID_032-00022	49
50	ヒトコロナウイルス HKU1(HCOV-HKU1)	NC_006577.2	7476	7605	0.6418	TILE_ID_126-00116	50

10

【 0 1 5 4 】

RNAを不安定化するセグメント

【 0 1 5 5 】

20

30

40

50

【表 5】

順位	ウイルス名	NCBI ID	開始位置	終了位置	log2 RNA/DNA 比
1	ヒトベータヘルペスウイルス 6B 型 (HHV-6B)	NC_000898.1	8715	8586	-3.9227
2	ヒトベータヘルペスウイルス 6B 型 (HHV-6B)	NC_000898.1	8650	8521	-3.8904
3	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型 (EPSTEIN-BARR VIRUS)	NC_007605.1	96564	96693	-3.8478
4	ヒトアルファヘルペスウイルス 2 型(単純ヘルペスウイルス 2 型)	NC_001798.2	2443	2572	-3.6327
5	オルフウイルス	NC_005336.1	7275	7146	-3.5236
6	アイチウイルス 1	NC_001918.1	6696	6825	-3.4538
7	サリウイルス A	NC_012986.1	6233	6362	-3.4187
8	D 型肝炎ウイルス	NC_001653.2	651	780	-3.415
9	ヒトガンマヘルペスウイルス 8 型	NC_009333.1	91041	90912	-3.4138
10	ヒトアルファヘルペスウイルス 2 型	NC_001798.2	138425	138554	-3.3986
11	ルフウイルス	NC_005336.1	117429	117558	-3.3572
12	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型	NC_007605.1	273	402	-3.3583
13	重症熱性血小板減少症候群ウイルス	NC_043452.1	511	382	-3.3294
14	GB ウイルス B	NC_001655.1	1301	1430	-3.3131
15	ヒトアルファヘルペスウイルス 1 型	NC_001806.2	124112	124241	-3.3043
16	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型	NC_007605.1	923	1052	-3.2867
17	ヒトガンマヘルペスウイルス 8 型	NC_009333.1	38265	38394	-3.2081
18	ヒトガンマヘルペスウイルス 4 型	NC_007605.1	134293	134422	-3.1646
19	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型	NC_006273.2	168811	168782	-3.1588
20	オルフウイルス	NC_005336.1	132605	132734	-3.1438
21	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001731.1	140576	140447	-3.1427
22	グレートアイランドウイルス	NC_014524.1	1303	1432	-3.1262
23	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型	NC_006273.2	29277	29148	-3.0852
24	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001731.1	99789	99660	-3.057
25	ベギウイルス A	NC_001837.1	3706	3835	-3.0548

【0156】

また、ポリソームプロファイリングシーケンシングデータ（図 1 D）を用いて、30, 155 個のセグメント（3つのバーコードが全て感知されたセグメント 29, 786 個）の翻訳作用を評価した。非突然変異 WPRE と 1 E は、翻訳に対するポジティブな影響と一致する重いポリソーム分画で豊富に存在した（図 1 E）。535 個の上向き調節セグメントおよび 66 個の下向き調節セグメントを識別して、重いポリソームと遊離 mRNA 分画との間のリード比（ $\log_2 (HP / \text{遊離 mRNA}) > 0.2$ ）を用いて翻訳効率を推定した（表 6）。下記表 6 の 30 個のセグメントは、陽性対照 WPRE および HCMV 1 E と同様に、重いポリソーム分画で豊富に存在するので、mRNA 翻訳を増強させること

ができることを確認した（図 1 E）。

【 0 1 5 7 】

【表 6 A】

表 6

順位	ウイルス名	NCBI ID	開始位置	終了位置	log2 HP/フリー RNA 比	タイル ID	配列 番号
1	風疹ウイルス	NC_001 545.2	6626	6755	0.99	TILE_ID_08 5-00096	51
2	風疹ウイルス	NC_001 545.2	6691	6820	0.9414	TILE_ID_08 5-00097	52
3	ヒトアルファヘルペスウイルス 2 型 (単純ヘルペスウイルス 2 型)	NC_001 798.2	1E+05	1E+05	0.8569	TILE_ID_13 6-00311	53
4	黄熱ウイルス(YFV)	NC_002 031.1	9011	9140	0.733	TILE_ID_09 2-00138	54
5	ヒトガンマヘルペスウイルス 8 型 (カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス)	NC_009 333.1	90911	90782	0.6046	TILE_ID_13 2-00719	55
6	セントルイス脳炎ウイルス	NC_007 580.2	2492	2621	0.5745	TILE_ID_09 3-00039	56
7	NY 014 ボックスウイルス	NC_035 469.1	1E+05	1E+05	0.5405	TILE_ID_14 1-00766	57
8	GB ウイルス C(GBV-HGV)	NC_001 710.1	2633	2762	0.5389	TILE_ID_08 0-00041	58
9	中東呼吸器症候群関連コロナウイルス(MERS-COV)	NC_019 843.3	13911	14040	0.5353	TILE_ID_12 7-00215	59
10	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型(HHV-5 HCMV)	NC_006 273.2	4579	4450	0.5305	TILE_ID_14 3-00440	17
11	哺乳類オルソレオウイルス 3 型	NC_013 233.1	66	195	0.5258	TILE_ID_01 2-00018	60
12	ヒトベータヘルペスウイルス 5 型(HHV-5 HCMV)	NC_006 273.2	49953	49824	0.525	TILE_ID_14 3-00553	61
13	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001 731.1	80070	80199	0.5206	TILE_ID_14 0-00076	62
14	伝染性脾臓腎臓壊死症ウイルス(ISKNV)	NC_003 494.1	12399	12528	0.5117	TILE_ID_13 0-00025	63
15	デングウイルス 1 型	NC_001 477.1	10548	10677	0.5086	TILE_ID_09 0-00162	64
16	アイチウイルス 1	NC_001 918.1	8122	8251	0.5007	TILE_ID_07 0-00126	20
17	ヒトアストロウイルス	NC_001 943.1	3938	4067	0.4892	TILE_ID_04 7-00061	65
18	ノロウイルス GII 群	NC_039 477.1	7208	7337	0.4867	TILE_ID_06 1-00110	66
19	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2((SARS-CoV-2)	NC_045 512.2	17051	17180	0.4841	TILE_ID_12 5-00263	67
20	セントルイス脳炎ウイルス	NC_007 580.2	2947	3076	0.482	TILE_ID_09 3-00046	68
21	ヒトアストロウイルス	NC_001 943.1	6018	6147	0.4713	TILE_ID_04 7-00093	69
22	ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1)	NC_001 802.1	2558	2429	0.4658	TILE_ID_07 9-00238	70
23	伝染性軟属腫ウイルス 1 型	NC_001 731.1	2E+05	2E+05	0.4643	TILE_ID_14 0-00263	71

10

20

30

40

50

【表 6 B】

24	ヒトコロナウイルス HKU1 (HCoV-HKU1)	NC_006577.2	5071	5200	0.4545	TILE_ID_126-00079	72
25	GREAT_ISLAND_VIRUS (GIV)	NC_014524.1	131	260	0.4473	TILE_ID_002-00135	73
26	グレートアイランドウイルス (GIV)	NC_014524.1	261	390	0.4422	TILE_ID_002-00137	74
27	C型インフルエンザウイルス (C/アナーバー/1/50)	NC_006310.2	456	585	0.4402	TILE_ID_007-00067	75
28	トベータヘルペスウイルス 5型 (HHV-5, HCMV)	NC_006273.2	2E+05	2E+05	0.4344	TILE_ID_143-00424	76
29	アストロウイルス MLB1	NC_011400.1	2341	2470	0.4313	TILE_ID_046-00037	77
30	重症熱性血小板減少症候群ウイルス	NC_043451.1	753	882	0.4303	TILE_ID_015-00062	78

10

【0158】

3. 調節エレメントの検証

【0159】

推定された mRNA 存在量と翻訳効率との間の非常に弱い相関関係は、ほとんどのウイルスエレメントが mRNA 存在量または翻訳に影響を及ぼすことを示唆した。それにもかかわらず、いくつかのセグメントは、両方ともに影響を及ぼすことが確認された。これを検証するために、RNA 存在量と翻訳をいずれも向上させた、従前に研究されていない 16 個の候補を選択した (図 2 A、表 7 ; $\text{Log}_2 (\text{HP} / \text{遊離 mRNA}) > 0.2$ および $\text{MRL} > 4.5$ を満たす)。3' 非翻訳領域レポーターおよび個々のルシフェラーゼアッセイを用いて、16 個の候補のうち 15 個が、統計的有意性 ($p < 0.05$) をもってルシフェラーゼ発現が増加したことを確認した (図 2 B)。

20

【0160】

30

40

50

【表 7】

名称	ID	log2 (HP/フリー)	MRL	配列 番号
K1	TILE_ID_024-00023 SIN_NOMBRE_ORTHOMANTAVIRUS	0.3991	5.1267	79
K2	TILE_ID_024-00025 SIN_NOMBRE_ORTHOMANTAVIRUS	0.2156	4.5407	80
K3	TILE_ID_061-00109 NOROVIRUS_GII	0.3133	4.7404	81
K4	TILE_ID_069-00123 SAFFOLD_VIRUS	0.4081	5.0198	82
K5	TILE_ID_070-00126 AICHI_VIRUS_1	0.5007	4.8105	20
K6	TILE_ID_071-00125 VESICULAR_EXANTHEMA_OF_SWINE_VIRUS	0.4166	5.0304	83
K7	TILE_ID_095-00164 JAPANESE_ENCEPHALITIS_VIRUS	0.3283	4.6157	84
K8	TILE_ID_097-00038 TICK-BORNE_ENCEPHALITIS_VIRUS	0.3959	4.6477	85
K9	TILE_ID_121-00135 HUMAN_CORONAVIRUS_229E	0.2846	4.6149	86
K10	TILE_ID_122-00243 HUMAN_CORONAVIRUS_NL63_(HCOV-NL63)	0.3013	4.8697	87
K11	TILE_ID_123-00130 BREDA_VIRUS	0.3171	4.5876	88
K12	TILE_ID_124-00267 SARS_CORONAVIRUS_TOR2	0.2225	4.5144	89
K13	TILE_ID_126-00030 HUMAN_CORONAVIRUS_HKU1_(HCOV-HKU1)	0.2366	4.7599	90
K14	TILE_ID_126-00421 HUMAN_CORONAVIRUS_HKU1_(HCOV-HKU1)	0.2586	4.5642	91
K15	TILE_ID_128-00362 HUMAN_CORONAVIRUS_OC43_(HCOV-OC43)	0.2393	4.5485	92
K16	TILE_ID_141-00071 NY_014_POXVIRUS	0.2049	4.5646	93

【0161】

Saffoldウイルスの3'UTR(7931-8060 NC_009448.2)におけるK4エレメントおよびアイチ(Aichi)ウイルス1(AiV-1)の3'UTR(8122-8251:NC_001918.1)でK5エレメントをさらに調べた(図2C)。前記2つのウイルスは、いずれも単一ポリペプチドをコードする1本鎖の陽性RNAゲノムを有するピコルナウイルス(Picornaviridae)科に属し、該ウイルスはタンパク質分解に起因して複数の断片に加工された。SaffoldウイルスおよびAiV-1は、それぞれカルジオウイルス(Cardiovirus)属とコブウイルス(Kobuvirus)属に属し、そして、胃腸炎をはじめとする比較的軽微な症状を引き起こすウイルスに広範に分布しており、未だ調査が行われていないことが確認された。

【0162】

エレメントの境界をマッピングするために、K4及びK5の拡張又は切断されたセグメントを調べた。Saffoldウイルスの全3'非翻訳領域を含むK4の拡張された180ntセグメント(「eK4」、7881-8060)は、既存のK4セグメントと類似した効果を示しており、これによって、3'末端の130ntがK4の活性を伝達するの

に十分であることが確認された。しかし、K 5 の拡張された形態（「e K 5」、8 0 6 7 - 8 2 5 1、1 8 5 n t、配列番号 9 4）は、ルシフェラーゼ発現をさらに向上させ、既存の K 5、K 4、及び拡張された K 4（e K 4）を含む他のエレメントを凌いだ（図 2 D）。また、K 5 よりも短い 1 2 0 n t（8 1 3 2 - 8 2 5 1、配列番号 9 5）のセグメントは、K 5 よりも高い活性を示した。注目すべき点は、K 5 が m R N A 存在量および翻訳スクリーニングの両方ともにおいて上位 2 5 個の候補のうちの 1 つとして選定されたということであり、これは K 5 が特に有力なエレメントであることを示唆した。K 5 に対する切断実験は、3' 末端の 1 1 0 n t（8 1 4 2 - 8 2 5 1）超過のエレメントが少なくとも K 5 エレメントを構成することができることを示した（図 2 E）。K 5 含有セグメントは、m R N A レベルを増加させ、一層重要なことは、タンパク質のレベルがスクリーニングデータと一致した。

10

【0 1 6 3】

4. K 5 エレメントの特徴付け

【0 1 6 4】

K 5 を詳細に特徴付けるために、K 5 変異体およびホモログ（h o m o l o g）に対する 2 次ハイスループットスクリーニングアッセイを実施した（図 3 A および図 3 B）。突然変異の誘導のために 1 3 0 n t の K 5 エレメントの全ての部位に単一ヌクレオチドの置換、単一ヌクレオチドの欠失および 2 連続ヌクレオチドの欠失を実施した（図 3 C）。また、配列を変更したが、予測された二重構造（d u p l e x s t r u c t u r e）を保存する補償変異を導入した。さらに、ループは、異なる組み合わせでランダムに選択された最大 2 つの塩基が置換された。3 つのバーコードで、合計 1, 2 0 1 個の変異体を合成した。クローニング及びトランスフェクション後、m R N A 存在量に対する突然変異の効果を評価するために、トランスフェクトされた D N A レベルに相対的な m R N A レベルを測定した（図 3 B）。

20

【0 1 6 5】

図 3 D に示すように、特定のヌクレオチド配列の寄与度を定量化するために、単一塩基置換データを用いて「塩基同一性スコア」を計算した。また、ステム領域の塩基対に対する要求事項を示す補償変異データに基づいて「塩基対スコア」を計算した。その結果、いくつかの変異、特に最初の 1 4 つのヌクレオチドの変異が m R N A レベルをわずかに増加させたが（図 3 C）、これは自己阻害活性を示し、このような結果は切断実験（図 2 E）と一致した。また、他の変異体の場合、K 5 に類似するか又はそれよりも高い m R N A レベルを増加させた（図 3 C）。対照的に、第 1 のヘアピン（ピリミジンリッチ末端ループを含む）および第 2 のヘアピン（G 突出部（b u l g e）を含む）に対する変異は、m R N A レベルを実質的に減少させ、これにより、前記これらのヘアピンが K 5 活性において肝心なことを確認した（図 3 D）。前記結果は、欠失および補償変異の結果と一致した。

30

【0 1 6 6】

K 5 の系統発生的分布を調べるために、8 8 個のピコルナウイルス種（K 5 および 8 7 個の異なるピコルナウイルスエレメント）の 3' 非翻訳領域セグメントを 2 次スクリーニングに含めた。このピコルナウイルスの中で 4 3 個のコブウイルスセグメント（表 8；K 5 と少なくとも 5 9 % の相同性を有する）は、第 2 のヘアピンの G 突出部に欠失を有する非機能的対照 K 5 m よりも m R N A レベルを遥かに多く上向き調節した（図 3 D および図 3 E、表 8）、K 5 に類似するか、またはそれよりも高く m R N A レベルを上向き調節した。前記結果から K 5 がコブウイルス属に保存されていることを確認した。保存された 3' 配列が欠失しているいくつかのコブウイルスセグメントは、分析の結果、活性が低かった。かかる 3' 配列の欠失は、データベースの注釈が不完全であることに起因する場合もある。

40

【0 1 6 7】

50

【表 8 A】

表 8

順位	説明	NC_ID	RNA/DNA 比	配列 番号
1	イタコブウイルス US-PC0082 株、全ゲノム	JN088541.1	1.5851	98
2	イタコブウイルス分離株 CaKoV AH-1/CHN/2019、全ゲノム	MN449341.1	1.5312	99
3	Kobuvirus sp. strain 16317x87 polyprotein コブウイルス属株 16317x87 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MF947441.1	1.5149	100
4	下水由来アイチウイルス Y12/2004 株 ポリタンパク質遺伝子、部分コード配列	AB861494.1	1.5131	101
5	ネココブウイルス分離株 12D240、全ゲノム	KJ958930.1	1.4917	102
6	アイチウイルス A 型 Wencheng-Rt386-2 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MF352432.1	1.4696	103
7	コブウイルス SZAL6-KoV/2011/HUN 株、全ゲノム	KJ934637.1	1.4508	104
8	イタコブウイルス CH-1 株、全ゲノム	JQ911763.1	1.4502	105
9	コブウイルス属株 20724x43 ポリタンパク質遺伝子、部分コード配列	MF947446.1	1.4467	106
10	Aichivirus A ラット 08/rAiA/HUN 株、全ゲノム	MN116647.1	1.4388	107
11	マウスコブウイルス M-5/USA/2010 株、全ゲノム	JF755427.1	1.4276	108
12	イタコブウイルス S272/16 株、全ゲノム	MN337880.1	1.4176	109
13	ネココブウイルス FKV/18CC0718 分離株、全ゲノム	MK671315.1	1.4173	110
14	下水由来コブウイルス カトマンズ KoV-SewKTM 分離株、全ゲノム	JQ898342.1	1.4148	111
15	ネココブウイルス FeKoV/TE/52/IT/13 株、全ゲノム	KM091960.1	1.4074	112
16	アイチウイルス 1 型 PAK585 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MK372823.1	1.3919	113
17	イタコブウイルス UK003 株、全ゲノム	KC161964.1	1.3886	114
18	イタコブウイルス AN211D/USA/2009 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	JN387133.1	1.3842	115
19	Aichivirus A FSS693 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MG200054.1	1.3822	116
20	コブウイルス属 20724x41 株 ポリタンパク質遺伝子、部分コード配列	MF947445.1	1.3768	117
21	Aichivirus A7 RtMruf-PicoV/JL2014-2 分離株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	KY432931.1	1.3722	118
22	ネココブウイルス FKV/18CC0503 分離株、全ゲノム	MK671314.1	1.3677	119
23	イタコブウイルス CaKoV-26 株、全ゲノム	MH747478.1	1.3646	120
24	ネココブウイルス FK-13 株、全ゲノム	KF831027.1	1.3581	121
25	アイチウイルス D/VI2244/2004 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	GQ927712.2	1.3519	122
26	アイチウイルス D/VI2244/2004 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	FJ890523.1	1.3312	123
27	アイチウイルス分離株 Goiania/GO/03/01/Brazil、全ゲノム	DQ028632.1	1.3282	124
28	アイチウイルス D/VI2321/2004 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	GQ927706.2	1.3236	125
29	イタコブウイルス 1 型 82 分離株 ポリタンパク質 mRNA、全コード配列	KM068049.1	1.3129	126

10

20

30

40

50

【表 8 B】

30	アイチウイルス kvgh99012632/2010 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	JX564249.1	1.2940	127
31	イヌコブウイルス 1 型 75 分離株 ポリタンパク質 mRNA、全コード配列	KM068050.1	1.2922	128
32	アイチウイルス D/VI2287/2004 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	GQ927711.2	1.2717	129
33	アイチウイルス分離株 BAY/1/03/DEU (ドイツ由来) ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	AY747174.1	1.2121	130
34	イヌコブウイルス分離株 CaCoV_CE9_AUS_2012 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MH052678.1	1.1030	131
35	イヌコブウイルス 1 型 B103 分離株 ポリタンパク質 mRNA、全コード配列	KM068051.1	1.0241	132
36	イヌコブウイルス 1 型 12D049 分離株、全ゲノム	KF924623.1	0.9982	133
37	ネココブウイルス WHJ-1 株、全ゲノム	MF598159.1	0.9554	134
38	マーモットコブウイルス HT9 株、全ゲノム	KY855436.1	0.9545	135
39	イヌコブウイルス CU_101 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MK201777.1	0.9292	136
40	イヌコブウイルス CU_716 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MK201779.1	0.9197	137
41	イヌコブウイルス CU_53 株 ポリタンパク質遺伝子、全コード配列	MK201776.1	0.8912	138
42	マウスコブウイルス TF5WM 株 ポリタンパク質 mRNA、部分コード配列	JQ408726.1	0.8689	139
43	イヌコブウイルス SMCD-59 分離株、全ゲノム	MF062158.1	0.8616	140

-K5 : RNA/DNA 比=1.072033

【0168】

コブウイルス属を除いた大部分のピコルナウイルス 3' 非翻訳領域は、mRNA 存在量を増加させなかった (図 3 E)。しかしながら、いくつかの例外があったが、特に K4 陽性エレメント (RNA/DNA 比=1.514) を含む Saffold ウイルスに関連するブーンカルジオウイルス 1 (Boone cardiorvirus 1; NC_038305.1) のセグメント (配列番号 187; RNA/DNA 比=1.2433) がこれに該当する。これらの 2 つのウイルスはカルジオウイルスに属する。したがって、カルジオウイルスの K4 およびその相同エレメントは、別個の保存された調節エレメントグループの構成が可能である。具体的に、下記 K4 の塩基配列のうち、下線を引いた塩基配列 (NC_009448.2 の 7952 番~7988 番) は、ホモログであるブーンカルジオウイルス 1 のセグメント内における対応する配列 (下記下線を引いた塩基配列) と 78.38% の同一性を有する。したがって、カルジオウイルスの 3' 非翻訳領域内の塩基配列であり、かつ、Saffold ウイルス遺伝子内における 7952~7988 番の塩基配列と少なくとも 70% の同一性を有する塩基配列を含むホモログは、K4 のように mRNA 存在量を増加させることができることが分かる。

【0169】

K4

【0170】

【数 1】

10

20

30

40

50

AACATCCTCTCGATCGGATCGCAACGTGTTACCCAGGAAT
CCACTTGGGTGTACGCGGCCGTTCTGACGTTGGAATTCTG
TAGATGAAAGTTAGCTAGGAGCTTTTAATTGGAAATGAGA
ACAAAAAAAAA

(配列番号 82)

【0171】

下線：NC__009448.2の7952-7988

【0172】

Boone cardiovirus 1

【0173】

TTCGGTTTGAGCCCCCACCCGGTACAACGCTTTACCTTAG
AAGCCACTAAGGTGTACGCGGTCATCGGGGACCCCTCCTG
GCCTTTTGTTTTATTGGTGAATTACTAGTTTCAGTTAGGTTT
TGTTAGTTAGG (配列番号 187)

【0174】

5. K5によるベクターおよび合成mRNAからの遺伝子発現の増強

【0175】

K5が他の分子的背景においても機能することができるかどうかをテストするために、ヒト遺伝子治療に対して低毒性で有効な遺伝子導入を可能にするパルボウイルス系統に属する一本鎖DNAウイルスであるアデノ関連ウイルス(AAV)ベースのベクター系を使用した。図4に示すように、WPREは、AAV35において遺伝子発現を増強したが、大きなサイズ(～600nt)およびAVの制限されたパッケージング容量(1.7～3kb)のためAAVでの用途が制限された。

【0176】

最小K5(120nt)またはeK5(185nt)配列及び不活性変異体(K5mとeK5m)及びWPREを対照として評価した。AAVベクター内にEGFPコード配列の下流に、そのようなセグメントを挿入し、遺伝子発現に及ぼす影響を測定した(図4A)。図4Bおよび図4Cに示すように、K5とeK5によって2つとも異なる形質導入条件でAAVベクターからのGFP発現が増加した。特に、eK5の効果(～3倍)は、WPREの効果(～2倍)よりも優れていることが確認された。これにより、eK5がパッケージングスペースを節約しながらAAVベクターを大きく改善することができることを確認した。

【0177】

また、レンチウイルスベクターを用いて前記実験を繰り返した。その結果、レンチウイルスベクターを用いてもAAVベクターと同様にeK5によりGFP発現が増加することを確認した(図10)。

【0178】

インビトロ転写(IVT)mRNAは、COVID-19ワクチンによって例示されるように、遺伝子送達のための別の重要なプラットフォームを示した。IVTmRNAに対するK5の効果进行测试するために、図4Dに示すように、機能性eK5の有無によるルシフェラーゼコードmRNAを合成した。前記mRNAはcap-1ホモログ、pmirGLOベクター由来の3'非翻訳領域配列、および120塩基のポリ(A)テールを含んでいた。前記mRNAをHeLa細胞にトランスフェクトさせ、最大72時間の間培養した。図4Eに示すように、機能的eK5がない場合、ルシフェラーゼレベルが時間の経過に伴って急激に減少して、形質導入されたmRNAの寿命が短いことを確認した。しかし、eK5が含まれているときに、発現の持続時間が急激に増加することを確認した。

【0179】

mRNAの安定化のために広く用いられるGFPコード配列(EGFP)とα-グロビ

10

20

30

40

50

ン 3' UTR (GBA) を含むまた別の I V T m R N A セットからも同様な観察が確認された。図 4 D および図 4 F に示すように、3' 非翻訳領域内における位置と関係なく、e K 5 を含むことで、前記 α -グロビン 3' UTR 含有 m R N A からタンパク質産生が実質的に増加した。以上の結果から、K 5 はプラスミド、A A V ベクター、および合成 m R N A を含めてテストしたすべての態様で活性化され、これによって、広範な調節活性および治療可能性を確認した。

【0180】

6. K 5 の T E N T 4 による混合テーリングの誘導

【0181】

合成 m R N A トランスフェクションを用いた経時実験における伸長されたタンパク質の発現 (図 4 E) は、K 5 が少なくとも細胞質で m R N A の安定性を増加させることによって作用することを確認した。真核生物の m R N A 安定性は、主にデアデニレーション (d e a d e n y l a t i o n) 段階で決定される。したがって、K 5 のメカニズムを理解するために高分解能ポリ (A) テール分析 (H i r e - P A T) を通じて、ポリ (A) テールの長さをモニタリングした。H i r e - P A T は、G / I テーリングに引き続き、遺伝子特異的フォワードプライマーとポリ (A) および G / I 配列との間のコンジュゲート部に結合するリバースプライマーとともに R T - P C R を使用した。図 5 A に示すように、K 5 がレポーター m R N A の定常状態のポリ (A) テールの長さを増加させることを確認した。これはデアデニレーションの抑制、ポリ (A) テールの拡張又は両方による、ポリ (A) テール調節関連メカニズムを意味する。

【0182】

前記変化が末端ヌクレオチジル転移酵素 (t e r m i n a l n u c l e o t i d y l t r a n s f e r a s e s ; T E N T) により触媒されるテールの拡張に関連する可能性をテストするために、T E N T を枯渇させるとともに、K 5 レポーターコンストラクトでルシフェラーゼアッセイを行った。図 5 B に示すように、T E N T 4 二重特異性抗体 (ダイアボディ) (p a r a l o g) (T E N T 4 A および T E N T 4 B) のノックダウンは、特に K 5 レポーター発現を減少させたことに対し、他の T E N T (T E N T 1、T E N T 2、T E N T 3 A / B (T U T 4 および T U T 7 と呼ぶ) 及び T E N T 5 A / B / C / D) は K 5 活動に及ぼす有意な影響が認められなかった。T E N T 4 の関与をさらに検証するために、T E N T 4 酵素の化学的阻害剤である R G 7 8 3 4 および不活性対照 R - 異性体 R O 0 3 2 1 を使用した。図 5 C に示すように、K 5 レポーター m R N A のポリ (A) テールは、R G 7 8 3 4 によって特異的に短縮されて T E N T 4 が実際に K 5 機能に必要なであることを確認した。

【0183】

T E N T 4 A (P A P D 7、T R F 4 - 1 および T U T 5 としても知られている) および T E N T 4 B (P A P D 5、T R F 4 - 2 および T U T 3 としても知られている) は、非アデノシン残基の間欠的な混合と共に、ポリ (A) テールを延長する (「混合テーリング (m i x e d t a i l i n g) 」として知られたプロセス)。得られた混合テールは、主な脱アデニル化酵素複合体である C C R 4 N O T でアデノシン残基を好むので、脱アデニル化を効果的に阻害して、トランスクリプトームを安定化する。混合されたテールの頻度を測定して混合テールの直接的な関与を調べるために、本発明者らは T A I L - s e q の修正されたバージョン (これを「遺伝子特異的 T A I L - s e q (G S - T A I L - s e q) 」と命名する) を開発した。具体的には、R N A は、ビオチンとコンジュゲートされ、部分的に断片化された 3' アダプターにライゲーションされた。3' 末端断片は、ストレプトアビジンビーズを用いて濃縮し、アダプターに結合するプライマーで逆転写し、次いで P C R によって遺伝子特異的フォワードプライマーで増幅した。前記シーケンシングデータは、K 5 レポーター m R N A が混合テールについて予想されるように、主に、末端および最後から 2 番目の位置に非アデノシン残基を有することを確認した。図 5 D に示すように、混合されたテーリングの頻度は、R G 7 8 3 4 処理後に減少し、K 5 が T E N T 4 を介して混合テーリングを誘導することを確認した。図 5 F に示すように、G S - T

A I L - s e q データは、さらに、R G 7 8 3 4 処理されたセルで K 5 レポーターのポリ (A) テールが短くなることを確認して、図 5 C に示す H i r e - P A T データを確かめた。

【 0 1 8 4 】

また、図 5 E ~ 図 5 G に示すように、H e L a および H C T 1 1 6 細胞に R G 7 8 3 4 を処理したとき、K 5 及び e K 5 レポーターのルシフェラーゼ活性および m R N A 存在量は減少した。単一 G 欠失 (K 5 m と e K 5 m) を含む K 5 及び e K 5 の不活化変異は、R G 7 8 3 4 によって有意な影響を受けず、特異性が立証された。これらの結果は、一緒に、T E N T 4 により触媒される混合テーリングを介して K 5 が作用するメカニズムを支持する。

10

【 0 1 8 5 】

しかしながら、不思議にもウイルス RNA に T E N T 4 を動員することが知られているアダプタータンパク質である Z C C H C 1 4 が不在とき、K 5 が完全に活性化された状態を維持することを確認した。図 5 G に示すように、Z C C H C 1 4 がレポーター発現およびテール伸長性の両方ともにおいて K 5 活性に不要であることを確認した。このような Z C C H C 1 4 の依存性の欠如は、K 5 を認識する他の因子が存在し得ることを示唆した。

【 0 1 8 6 】

7. K 5 に対する宿主因子 (Z C C H C 2) の同定

【 0 1 8 7 】

潜在的な K 5 アダプターを同定するために、「RNA-タンパク質相互作用検出 (R N A - p r o t e i n i n t e r a c t i o n d e t e c t i o n ; R a P I D) 法を実施した。図 5 H に示すように、e K 5 および B o x B エlementを含む I V T m R N A を λ N ペプチド融合ビオチンリガーゼである B A S U を安定的に発現する細胞にトランスフェクトした。16 時間後、細胞を 1 時間の間、ビオチンで処理して B A S U が餌に関連するタンパク質をビオチン化し、次いで、細胞溶解、ストレプトアビジン捕捉およびビオチン化タンパク質の質量分析を実施した。図 5 H に示すように、e K 5 を欠いた対照 R N A に比べて e K 5 含有 m R N A に濃縮されたタンパク質において核酸結合 G O 用語の Z C C H C 2 および D N A J C 2 1 を有する 2 つの細胞質タンパク質を確認した (図 5、表 9)。

20

【 0 1 8 8 】

30

40

50

【表 9 A】

表 9

ID	エントリ	遺伝子名	遺伝子オントロジー (分子機能)
ARHGI_HUMAN	Q6ZSZ5	ARHGEF18 KIAA0521	グアニルヌクレオチド交換因子活性 [GO:0005085]; 金属イオン結合 [GO:0046872]
CALL5_HUMAN	Q9NZT1	CALML5 CLSP	カルシウムイオン結合 [GO:0005509]; 酵素調節活性 [GO:0030234]
CDC16_HUMAN	Q13042	CDC16 ANAPC6	
CPNE3_HUMAN	O75131	CPNE3 CPN3 KIAA0636	カルシウム依存性リン脂質結合 [GO:0005544]; カルシウム依存性タンパク質結合 [GO:0048306]; 金属イオン結合 [GO:0046872]; タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性 [GO:0004674]; 受容体チロシンキナーゼ結合 [GO:0030971]; RNA 結合 [GO:0003723]
DCD_HUMAN	P81605	DCD AIDD DSEP	アニオンチャネル活性 [GO:0005253]; 金属イオン結合 [GO:0046872]; ペプチダーゼ活性 [GO:0008233]; RNA 結合 [GO:0003723]
DIP2B_HUMAN	Q9P265	DIP2B KIAA1463	α チューブリン結合 [GO:0043014]
HTSF1_HUMAN	O43719	HTATSF1	RNA 結合 [GO:0003723]
IRS2_HUMAN	Q9Y4H2	IRS2	1-ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ調節活性 [GO:0046935]; 14-3-3 タンパク質結合 [GO:0071889]; インスリン受容体結合 [GO:0005158]; ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ結合 [GO:0043548]; タンパク質ドメイン特異的結合 [GO:0019904]; タンパク質ホスファターゼ結合 [GO:0019903]; タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性化因子活性 [GO:0043539]; 膜貫通型受容体タンパク質チロシンキナーゼアダプター活性 [GO:0005068]
NPA1P_HUMAN	O60287	URB1 C21orf108 KIAA0539 NOP254 NPA1	RNA 結合 [GO:0003723]
PRP8_HUMAN	Q6P2Q9	PRPF8 PRPC8	K63 連結ポリユビキチン修飾依存性タンパク質結合 [GO:0070530]; pre-mRNA イントロン結合 [GO:0097157]; RNA 結合 [GO:0003723]; U1 snRNA 結合 [GO:0030619]; U2 snRNA 結合 [GO:0030620]; U5 snRNA 結合 [GO:0030623]; U6 snRNA 結合 [GO:0017070]
SSF1_HUMAN	Q9NQ55	PPAN BXDC3 SSF1	RNA 結合 [GO:0003723]; rRNA 結合 [GO:0019843]
T2EB_HUMAN	P29084	GTF2E2 TF2E2	DNA 結合 [GO:0003677]; RNA 結合 [GO:0003723]; RNA ポリメラーゼ II 一般転写開始因子活性 [GO:0016251]
YLPM1_HUMAN	P49750	YLPM1 C14orf170 ZAP3	RNA 結合 [GO:0003723]

10

20

30

40

50

【表 9 B】

PTMA_H UMAN	P06454	PTMA TMSA	DNA 結合転写因子結合 [GO:0140297]; ヒストン結合 [GO:0042393]; イオン結合 [GO:0043167]
ARPIN_H UMAN	Q7Z6K5	ARPIN C15orf38	
CCD50_H UMAN	Q8IVM0	CCDC50 C3orf6	ユビキチンタンパク質リガーゼ結合 [GO:0031625]
GSDME_ HUMAN	O60443	GSDME DFNA5 ICERE1	カルジオリピン結合 [GO:1901612]; ホスファ チジルイノシトール-4,5-ビスリン酸結合 [GO:0005546]; 広孔チャネル活性 [GO:0022829]
K1C14_H UMAN	P02533	KRT14	ケラチンフィラメント結合 [GO:1990254]; 細 胞骨格の構造構成要素 [GO:0005200]
K1C16_H UMAN	P08779	KRT16 KRT16A	細胞骨格の構造構成要素 [GO:0005200]
K1C9_HU MAN	P35527	KRT9	細胞骨格の構造構成要素 [GO:0005200]
K2C1_HU MAN	P04264	KRT1 KRTA	炭水化物結合 [GO:0030246]; タンパク質ヘテロ二量体化活性 [GO:0046982]; シグナル受容体活性 [GO:0038023]; 皮膚表皮の構造構成要素 [GO:0030280]
K2C5_HU MAN	P13647	KRT5	足場タンパク質結合 [GO:0097110]; 細胞骨格の構造構成要素 [GO:0005200]; 皮膚表皮の構造構成要素 [GO:0030280]
NAV1_HU MAN	Q8NEY1	NAV1 KIAA1151 KIAA1213 POMFIL3 STEERIN1	
PDLI7_H UMAN	Q9NR12	PDLIM7 ENIGMA	アクチン結合 [GO:0003779]; 金属イオン結合 [GO:0046872]; 筋肉 α-アクチニン結合 [GO:0051371]
CA198_H UMAN	Q9H425	C1orf198	
DPH5_H UMAN	Q9H2P9	DPH5 AD- 018 CGI-30 HSPC143 NPD015	ジブチン合成酵素活性 [GO:0004164]
FABP5_H UMAN	Q01469	FABP5	脂肪酸結合 [GO:0005504]; 同一タンパク質結 合 [GO:0042802]; 脂質結合 [GO:0008289]; 長鎖脂肪酸トランスポーター活性 [GO:0005324]; レチノイン酸結合 [GO:0001972]
M3K20_H UMAN	Q9NYL2	MAP3K20 MLK7 MLTK ZAK HCCS4	ATP 結合 [GO:0005524]; JUN キナーゼキナー ゼキナーゼ活性 [GO:0004706]; マグネシウム イオン結合 [GO:0000287]; MAP キナーゼキナ ーゼキナーゼ活性 [GO:0004709]; タンパク質 キナーゼ活性化因子活性 [GO:0030295]; タン パク質セリンキナーゼ活性 [GO:0106310]; タ ンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活 性 [GO:0004674]; リボソーム結合 [GO:0043022]; RNA 結合 [GO:0003723]; 小リ ボソームサブユニット rRNA 結合 [GO:0070181]
MAGD2_ HUMAN	Q9UNF1	MAGED2 BCG1	

10

20

30

40

50

【表 9 C】

RBGP1_HUMAN	Q9Y3P9	RABGAP1 HSPC094	GTP アーゼ活性化因子活性 [GO:0005096]; 低分子量 GTP アーゼ結合 [GO:0031267]; デューブリン結合 [GO:0015631]
TXNL1_HUMAN	O43396	TXNL1 TRP32 TXL TXNL	ジスルフィド酸化還元酵素活性 [GO:0015036]; タンパク質ジスルフィド還元酵素活性 [GO:0015035]
WNK1_HUMAN	Q9H4A3	WNK1 HSN2 KDP KIAA0344 PRKWNK1	ATP 結合 [GO:0005524]; 塩化物チャネル阻害活性 [GO:0019869]; ホスファターゼ結合 [GO:0019902]; カリウムチャネル阻害活性 [GO:0019870]; タンパク質キナーゼ活性化因子活性 [GO:0030295]; タンパク質キナーゼ活性 [GO:0004672]; タンパク質キナーゼ結合 [GO:0019901]; タンパク質キナーゼ阻害活性 [GO:0004860]; タンパク質セリンキナーゼ活性 [GO:0106310]; タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性 [GO:0004674]
DJC21_HUMAN	Q5F1R6	DNAJC21 DNAJA5	RNA 結合 [GO:0003723]; 亜鉛イオン結合 [GO:0008270]
HORN_HUMAN	Q86YZ3	HRNR S100A18	カルシウムイオン結合 [GO:0005509]; 遷移金属イオン結合 [GO:0046914]
MILK1_HUMAN	Q8N3F8	MICALL1 KIAA1668 MIRAB13	カドヘリン結合 [GO:0045296]; 同一タンパク質結合 [GO:0042802]; 金属イオン結合 [GO:0046872]; ホスファチジン酸結合 [GO:0070300]; 低分子量 GTP アーゼ結合 [GO:0031267]
NUDT4_HUMAN	Q9NZJ9	NUDT4 DIP2 KIAA0487 HDCMB47P	ビス(5'-アデノシル)-ヘキサホスファターゼ活性 [GO:0034431]; ビス(5'-アデノシル)-ペンタホスファターゼ活性 [GO:0034432]; ジホスホイノシトール-ポリリン酸ジホスファターゼ活性 [GO:0008486]; エンドポリホスファターゼ活性 [GO:0000298]; イノシトール-3,5-ビスジホスフェート-2,3,4,6-テトラキスホスフェート 5-ジホスファターゼ活性 [GO:0052848]; イノシトール-5-ジホスフェート-1,2,3,4,6-ペンタキスホスフェートジホスファターゼ活性 [GO:0052845]; m7G(5')pppN ジホスファターゼ活性 [GO:0050072]; 金属イオン結合 [GO:0046872]; snoRNA 結合 [GO:0030515]
OCRL_HUMAN	Q01968	OCRL OCRL1	GTPase 活性化因子活性 [GO:0005096]; イノシトールリン酸ホスファターゼ活性 [GO:0052745]; イノシトール-1,3,4,5-四リン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0052659]; イノシトール-1,4,5-三リン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0052658]; イノシトールポリリン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0004445]; ホスファチジルイノシトールリン酸 4-ホスファターゼ活性 [GO:0034596]; ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0034485]; ホスファチジルイノシトール-3,5-ビスリン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0043813]; ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸 5-ホスファターゼ活性 [GO:0004439]; 低分子量 GTP アーゼ結合 [GO:0031267]
PIMT_HUMAN	P22061	PCMT1	カドヘリン結合 [GO:0045296]; タンパク質-L-イソアスパラギン酸(D-アスパラギン酸)O-メチルトランスフェラーゼ活性 [GO:0004719]

【表 9 D】

RGPD1_HUMAN	P0DJDO	RGPD1 RANBP2L6 RGP1	
SPR1B_HUMAN	P22528	SPRR1B	構造分子活性 [GO:0005198]
ZCHC2_HUMAN	Q9C0B9	ZCHC2 C18orf49 KIAA1744	核酸結合 [GO:0003676]; ホスファチジルイノシトール結合 [GO:0035091]; 亜鉛イオン結合 [GO:0008270]

10

20

30

40

50

【0189】

直交的に、HCMV 1E ステムループ (SL-2.7) を餌として用いるインビトロでのRNA-プルダウン実験によって得られることができるTENT4複合体を調べた。その結果、1Eと相互作用するものとして知られているTENT4A、TENT4B、ZCCHC14、SAMD4A、K0355に加えて、ZCCHC2も見出された(図9)。ZCCHC2の強度が低く1E活性に必要なではないが、ZCCHC2は前記プルダウン実験において特異的に濃縮され、ZCCHC2がTENT4複合体の未知の構成要素であり得ることが予想された。特に、ZCCHC2はRAPIDおよびRNAプルダウン実験の双方で、一般に濃縮された唯一のタンパク質であった。

【0190】

ZCCHC2とeK5との間の相互作用を検証するために、RAPID実験に引き続いてウェスタンブロット法を行い、eK5餌に関連ZCCHC2を検出した(図5I)。なお、TENT4Aは、若干であるもののリッチなので、TENT4Aの方がZCCHC2に比べてeK5との関連付けの安定性が劣ることを示している。

【0191】

8. ZCCHC2の特徴付け

【0192】

図6Aに示すように、ZCCHC2は実質的に不規則な状態で長い領域、PXドメインおよびCCHC型ジンクフィンガー(ZnF₂)ドメインを有する126kDaの特性がよく確認されていないタンパク質である。ZCCHC2は、ZCCHC14との関連付けが低い、1EおよびPREでCNGGNペンタループと相互作用することが知られているSAMドメインがないことが確認された。また、C. legansのgls-1タンパク質は、PXまたはZnFドメインを欠いている場合でも、ZCCHC2と関連付けられていると予想された。gls-1は、以前にTENT4のホモログであるGLD-4と相互作用することが確認された。

【0193】

ZCCHC2がTENT4に結合するかどうかをテストするために、共免疫沈降法(co-immunoprecipitation)を実施した。図6Bに示すように、ZCCHC2は、HeLa親細胞においてTENT4AおよびTENT4Bに対する抗体とともに共免疫沈降したが、TENT4A/B二重ノックアウト細胞では認められなかった。この相互作用は、RNaseA処理済みの条件下で検出され、TENT4とZCCHC2との間のRNA-非依存的な相互作用を示した。図6Cに示すように、細胞内分画は、ZCCHC2が細胞質に限定されることが示され、これは、ZCCHC2がTENT4と細胞質複合体を形成することを示唆した。参考までに、TENT4タンパク質は、核と細胞質の両方ともに分布し、TENT4Aは主に細胞質に、TENT4Bは主に核に分布した。また、3'非翻訳領域内のeK5でEGFPを安定に発現するHeLa細胞株を用いてRNA免疫沈降に続いてRT-qPCR(RIP-QPCR)を実施した。図6Dに示すように、ZCCHC2がeK5含有EGFPのmRNAと特異的に相互作用して、図5Hおよび図5Iに示したRAPIDおよびRNAプルダウン結果を再確認した。以上の結果から、ZCCHC2は、K5及びTENT4の両方と相互作用することを確認した。

【0194】

次に、K5媒介調節におけるZCCHC2の機能を調べるために、CRISPR-Cas9でHeLa細胞においてZCCHC2遺伝子を切除した。前記ノックアウト(KO)によってHire-PAT分析を実施し、ポリ(A)テールの長さ分布を調べた。図6Eに示すように、K5レポーターmRNAのポリ(A)テールは、親細胞に比してZCCHC2 KO細胞で減少した。対照的に、K5突然変異は、ZCCHC2 KO細胞においてそれ以上短くならず、親細胞において短いテールを有することが確認された。同様な結果が、eK5コンストラクトにおいて確認されたし、ZCCHC2がテール伸長の効果に重要であることを確認した。また、図6Fに示すように、遺伝子特異的TAIL-seq実験はZCCHC2 KOが混合テーリングの減少をもたらすことが示されており、これ

10

20

30

40

50

によって、Z C C H C 2 が K 5 レポーター m R N A の混合テーリングに必要であることを確認した。

【0195】

同じく、K 5 レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイおよび R T - q P C R は、Z C C H C 2 がいない場合、K 5 がもうレポーター発現を向上させることができないことを確認した。前記結果は、より長い e K 5 コンストラクトを用いて確認された。図 6 G に示すように、R G 7 8 3 4 親細胞と異なり、Z C C H C 2 K O 細胞において K 5 レポーター発現に有意な影響を及ぼさないことを確認した。以上の結果から、Z C C H C 2 が K 5 に重要なエレメントであり、かつ Z C C H C 2 のこの機能が T E N T 4 の活動を必要とすることを確認した。

10

【0196】

Z C C H C 2 の役割を検証するために、Z C C H C 2 - 発現プラスミドを Z C C H C 2 K O 細胞にトランスフェクトさせて回復実験を行った。図 6 H に示すように、Z C C H C 2 の異所性発現は、K 5 及び e K 5 コンストラクトにおけるルシフェラーゼ発現を増大させたが、変異体では増加しないことを確認した。したがって、Z C C H C 2 は実際に、K 5 の機能を媒介する核心要素であることを確認した。Z C C H C 2 の Z n F 2 ドメインに変異を導入した際の変異は、K O 細胞を回復させなかったし、これは、R N A 結合モチーフが重要な役割を果たすことを示した。また、図 6 A に示すように、Z C C H C 2 と関連タンパク質 Z C C H C 1 4 および g l s - 1 との間に、高い相同性領域（以下では「H S」ともいう）を含む N 末端 2 0 0 アミノ酸を欠く欠失突然変異 (Δ N) を生成した。図 6 I に示すように、前記 Δ N 突然変異は、Z C C H C 2 K O 細胞の欠陥を回復することに失敗したし、Z C C H C 2 の N 末端が重要な機能をすることを示した。

20

【0197】

標的 R N A に対する Z C C H C 2 の直接的な活性をさらに確認するために、K 5 の代わり B o x B エレメントを含むルシフェラーゼレポーターを用いて、テザリング (t e t h e r i n g) 実験を行った。図 6 J に示すように、Z C C H C 2 タンパク質が λ N タグによってテザリングされたとき、レポーターの発現は特異的に上向き調節された。対照として、T N R C 6 B タンパク質を付着したときに発現が減少した。図 6 I 及び図 6 K に示すように、回復実験において不活性状態であった Z C C H C 2 Z n F 突然変異は、λ N - B o x B システムを介してレポーター R N A にテザリングされたときに作動することを確認した。以上の結果から、Z n F 2 が R N A 結合モジュールとしてのみ作用し、活性化機能に必須ではないことを確認した。

30

【0198】

次に、Z C C H C 2 のどの部分が T E N T 4 動員を担当するかを確認した。図 6 A に示すように、F L A G - タグ付き Z C C H C 2 の 2 つの欠失突然変異を生成したが、これらの突然変異の 1 つは、C 末端欠失 (Δ C、N 末端の 1 - 3 7 5 アミノ酸を含む) を有し、もう 1 つは N 末端欠失 (Δ N、2 0 1 - 1、1 7 8 アミノ酸を含む) を有するように調製した。図 6 L に示すように、抗 F L A G 抗体は全長および Δ C Z C C H C 2 タンパク質を発現する細胞において T E N T 4 A および T E N T 4 B の両方ともを共沈降させ、T E N T 4 と Z C C H C 2 との間の相互作用が確認された。前記結果から、P X および Z n F 2 ドメインを含む C 末端部分が T E N T 4 結合に必須であることを確認した。特に、図 6 I および図 6 L に示すように、Δ N は T E N T 4 A または T E N T 4 B と相互作用できなかったが、これは、Z C C H C 2 N 末端を介して T E N T 4 を動員できることを示した。前記 N 末端部分には H S 領域が含まれており、前記 H S 領域は C . e l e g a n s (図 6 A) において Z C C H C 2 の遠いホモログである g l s - 1 の G L D 4 結合領域と配列が類似することを確認した。よって、H S 領域はタンパク質-タンパク質相互作用を媒介する、従前に定義されていない保存されたドメインを構成することができることを確認した。

40

【0199】

以上の結果から、Z C C H C 2 が N 末端および C 末端を用いてそれぞれ T E N T 4 およ

50

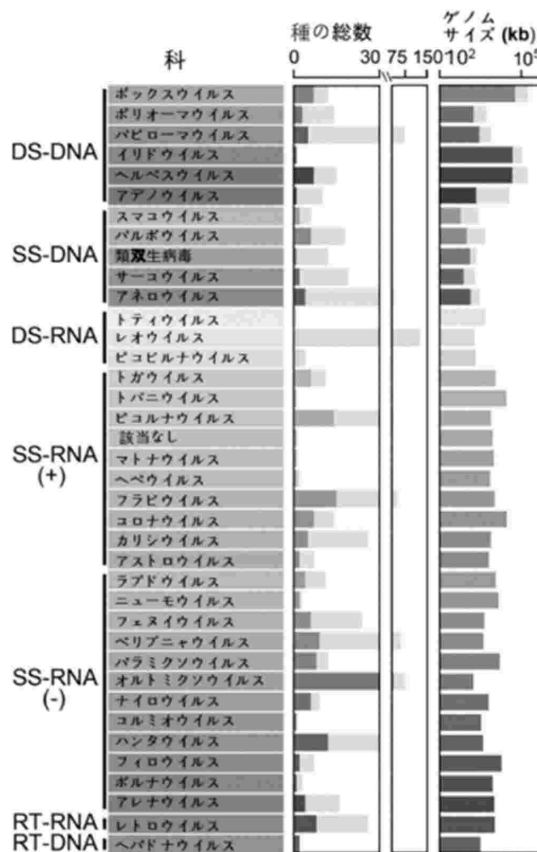
び K 5 と相互作用することを確認した。図 7 に示すように、前記相互作用は、T E N T 4 で K 5 への動員を介して混合テーリングを招くことができることを確認した。また、長いポリ (A) テールは、真核生物翻訳開始因子複合体 (e I F 4 F) の構成要素である、e I F 4 G と相互作用するように、十分に確立した細胞質ポリ (A) 結合タンパク質 (P A B P C) を動員して翻訳を促進することができることを確認した。相互排他的ではないが、未知の因子が K 5 および Z C C H C 2 によって誘導された翻訳活性化に関与することができることをさらに確認した。

【0200】

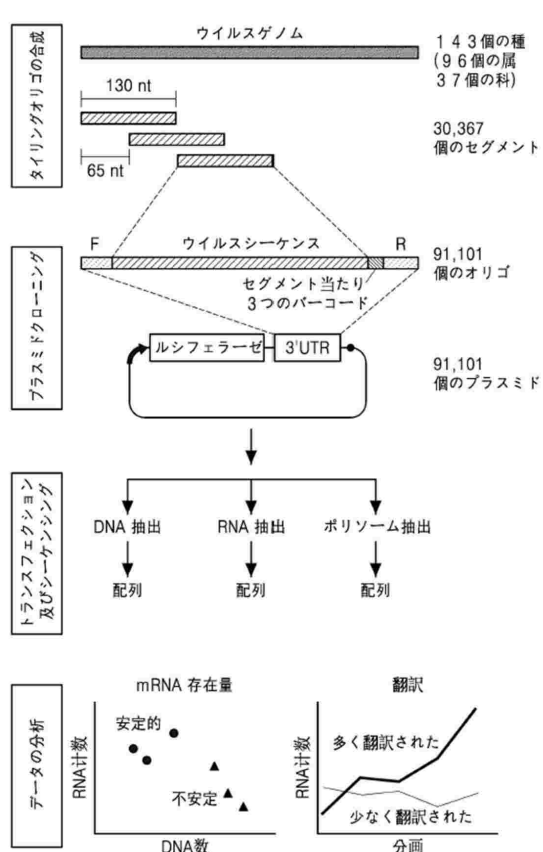
以上の説明から、本発明の属する技術分野における当業者は、本発明がその技術的思想や必須的特徴を変更することなく、他の具体例として実施できるということを理解できるだろう。これと関連して、前述した実験例および実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないと理解しなければならない。本発明の範囲は、前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味および範囲、並びにその等価概念から導出されるすべての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されなければならない。

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

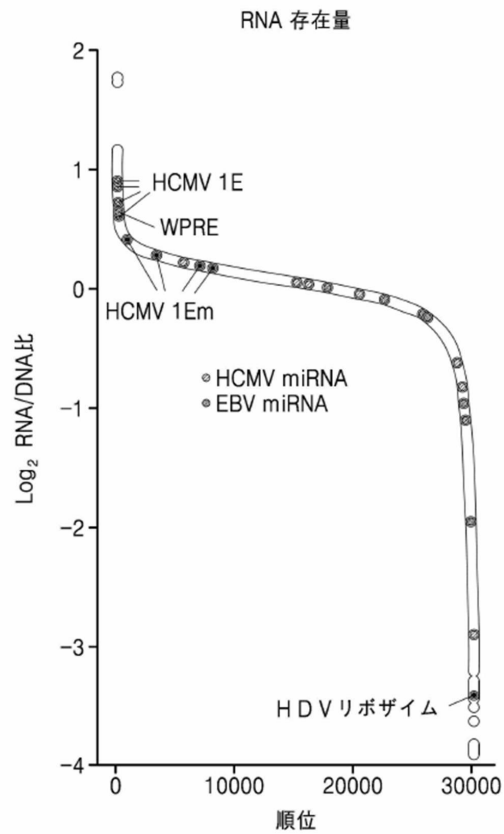
20

30

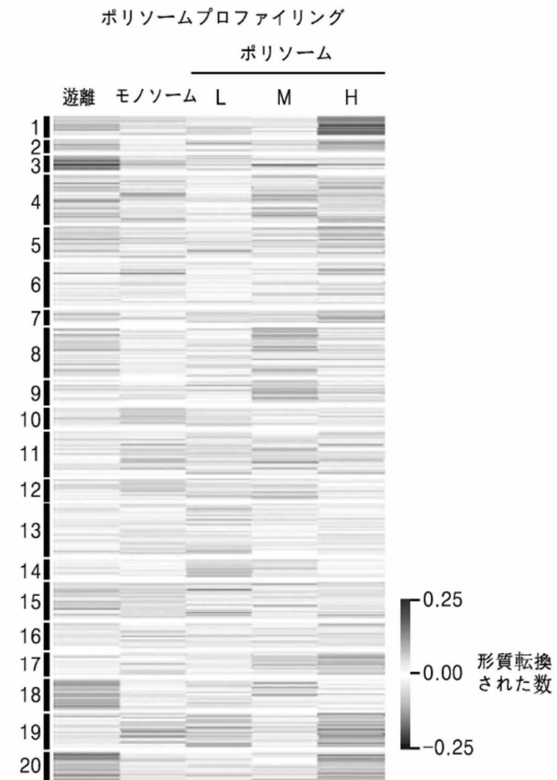
40

50

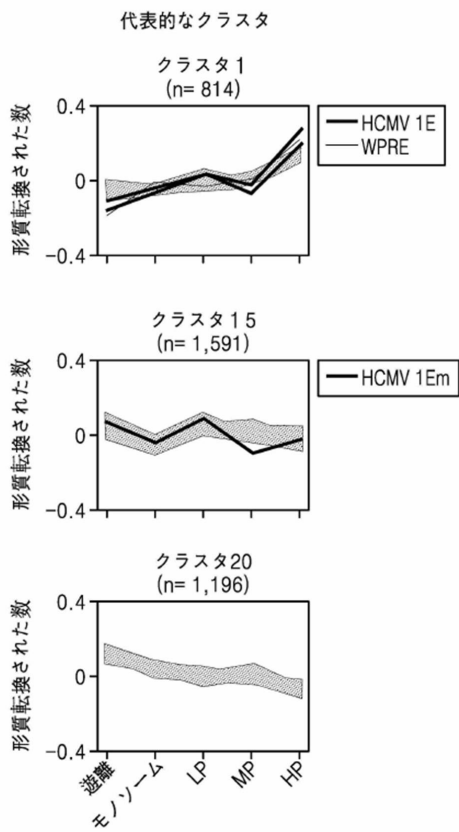
【図 1 C】



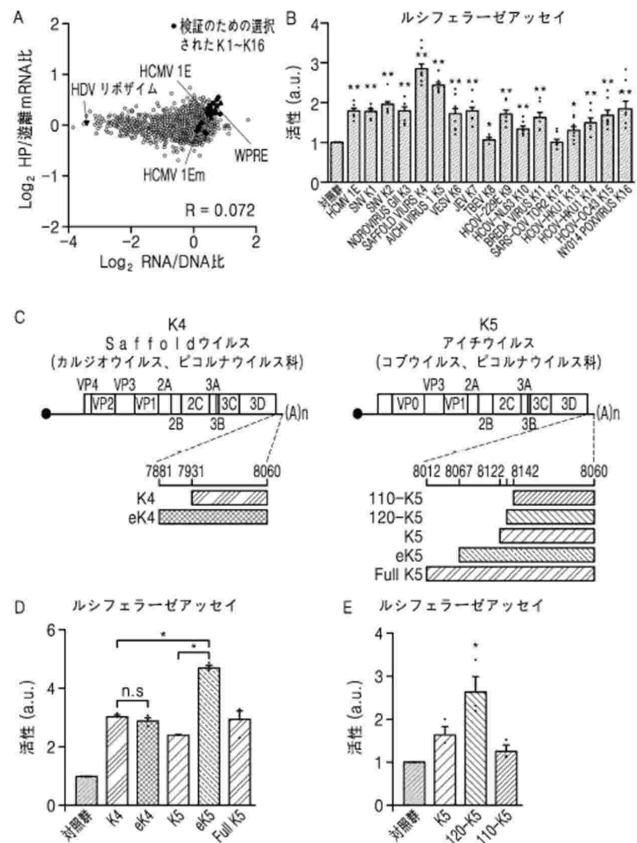
【図 1 D】



【図 1 E】



【図 2】



10

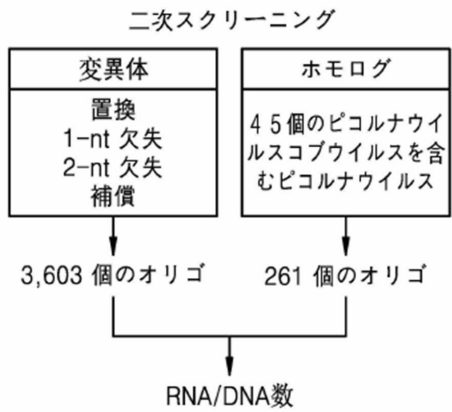
20

30

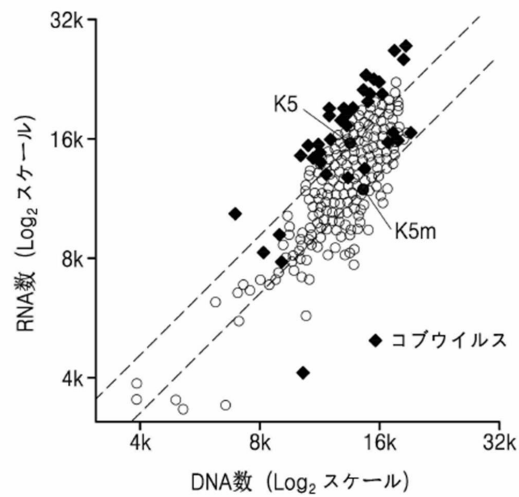
40

50

【図 3 A】

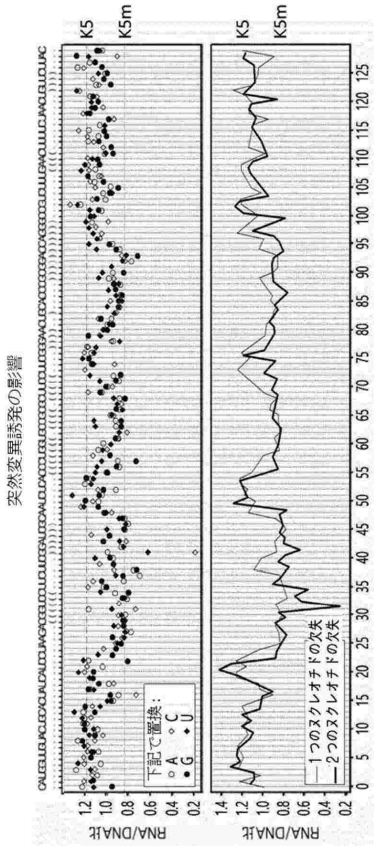


【図 3 B】

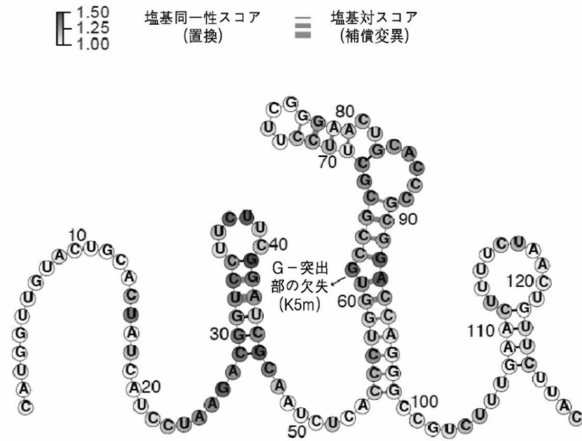


10

【図 3 C】



【図 3 D】



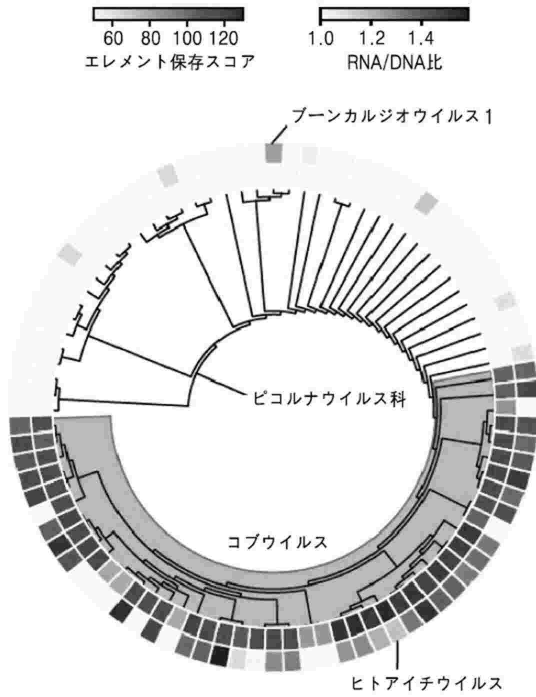
20

30

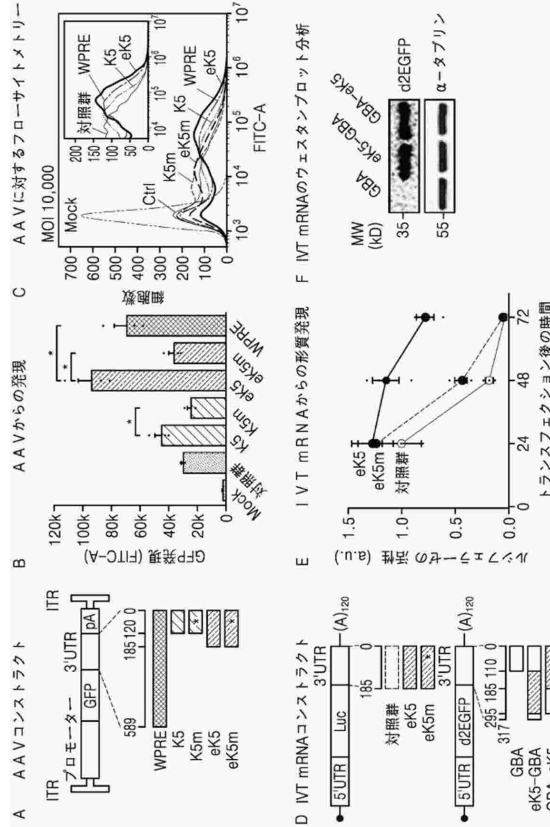
40

50

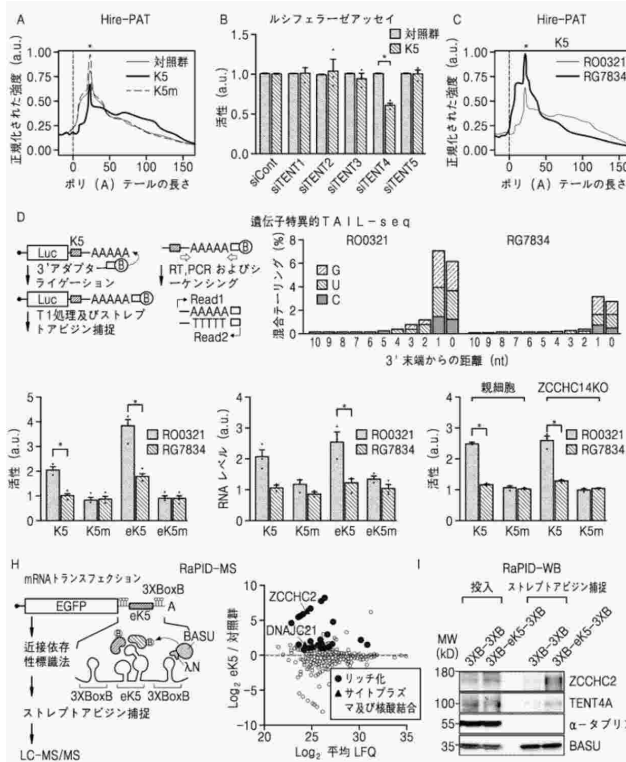
【図 3 E】



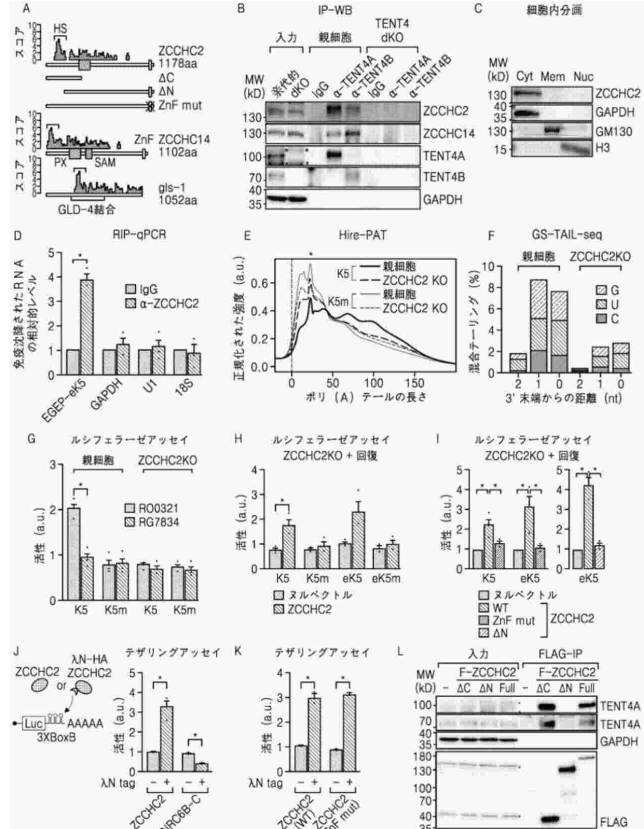
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

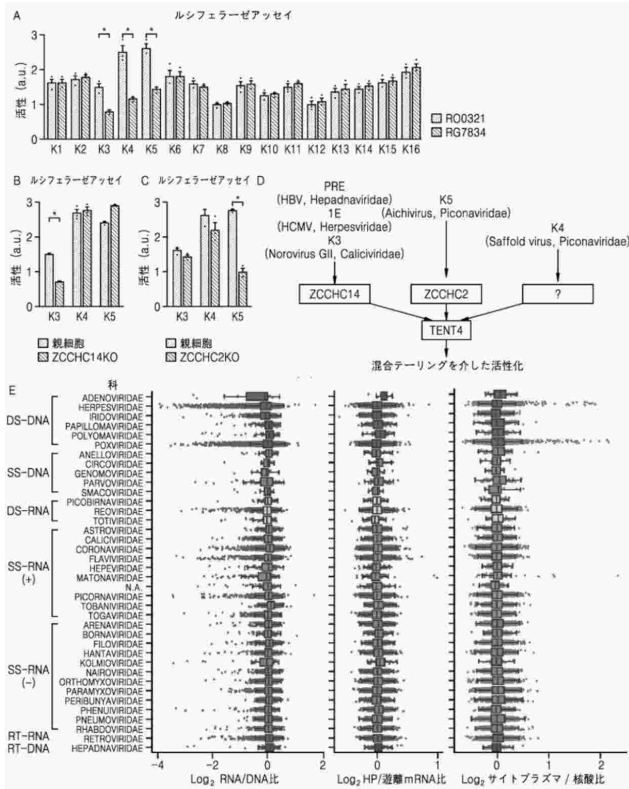
20

30

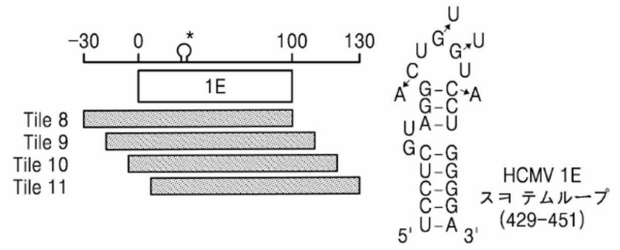
40

50

【図 7】



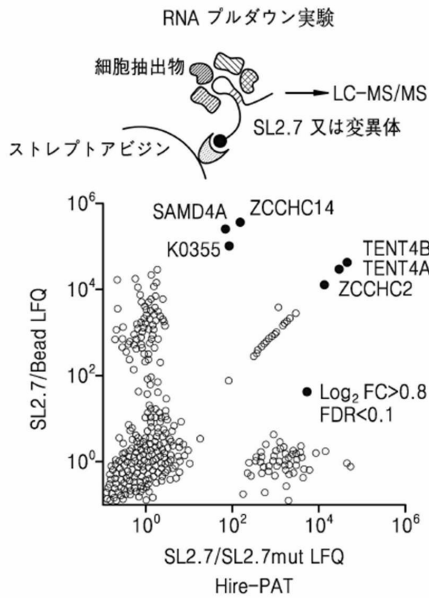
【図 8】



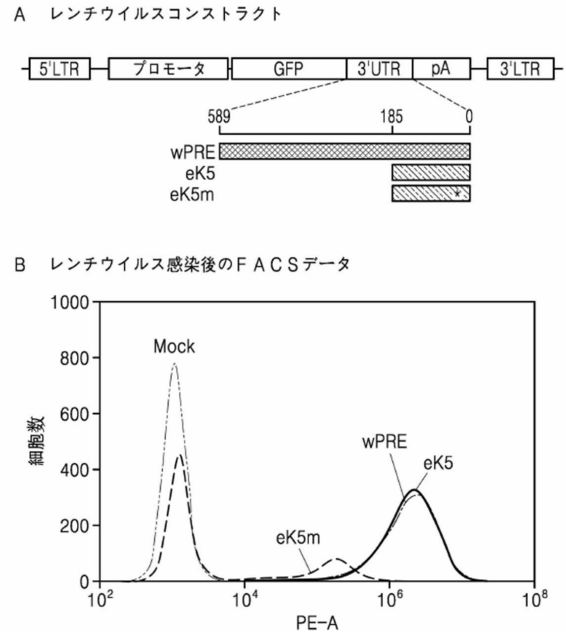
10

20

【図 9】



【図 10】

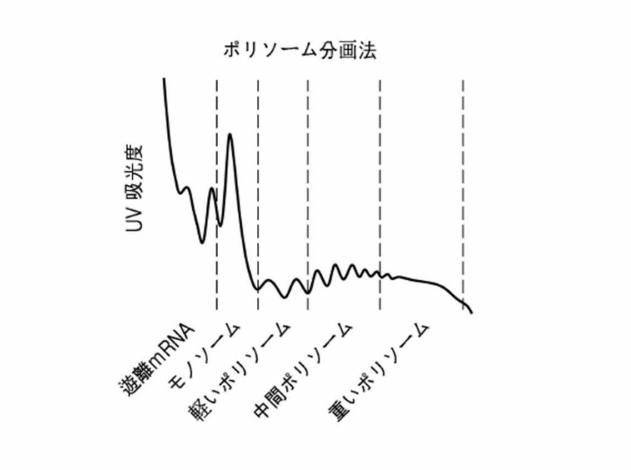


30

40

50

【図 1 1】



10

【配列表】

2025520771000001.xml

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年12月24日(2024.12.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) アイチウイルス1 (A i c h i v i r u s 1) 遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : N C _ 0 0 1 9 1 8 . 1) のセグメントの塩基配列またはそのRNAの塩基配列; または (i i) これと少なくとも90%の同一性を有する塩基配列; または (i i i) (i) の塩基配列と少なくとも50%の相同性を有するコブウイルスの3'非翻訳領域内の塩基配列を含む、RNA安定性又はmRNA翻訳増強用調節エレメントであって、

前記セグメントは、アイチウイルス1遺伝子内の8251番のヌクレオチドから5'方向に連続する110個超過250個以下のヌクレオチドを含む、RNA安定性又はmRNA翻訳増強用調節エレメント。

【請求項2】

前記(i)の塩基配列は、配列番号20、94、または95の塩基配列又はそのRNAの塩基配列である、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項3】

前記(i i i)の塩基配列は、コブウイルスの3'非翻訳領域内の少なくとも2つのヘアピン構造を有する塩基配列である、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項4】

前記(i i i)の塩基配列は、配列番号98~140のいずれか1つの塩基配列またはそのRNAの塩基配列である、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項5】

前記(i i)の塩基配列は、配列番号20の塩基配列1~14のいずれか1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、又は両方ともを有する塩基配列またはそのRNAの塩基配列である、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項6】

前記調節エレメントは、RNAの安定性およびmRNA翻訳を増強させてタンパク質の発現を増加させる、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項7】

前記調節エレメントは、T E N T 4と相互作用するZ C C H C 2と相互作用して、ポリ(A)テールの長さの増加、ポリ(A)テールの安定性の増加、又はその両方ともを誘導する、請求項1に記載の調節エレメント。

【請求項8】

標的タンパク質の遺伝子と、請求項1~7のいずれか一項に記載の調節エレメントとを含む、コンストラクト。

【請求項9】

前記標的タンパク質がレポーター、生理活性ペプチド、抗原、または抗体またはその断片から選択される、請求項8に記載のコンストラクト。

【請求項10】

前記コンストラクトは、mRNAコンストラクトである、請求項8に記載のコンストラクト。

【請求項11】

請求項8に記載のコンストラクトを含む、ベクター。

【請求項12】

10

20

30

40

50

請求項 8 に記載のコンストラクトまたは該コンストラクトを含むベクターを含む、組換え宿主細胞。

【請求項 13】

前記宿主細胞は、Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子と、T E N T 4 またはそれをコードする遺伝子と、またはこれらの組み合わせをさらに含む、請求項 12 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 14】

請求項 8 に記載のコンストラクトと、前記コンストラクトを含むベクターと、若しくは前記コンストラクト又はベクターを含む組換え宿主細胞とを含む、組成物。

【請求項 15】

前記組成物は、疾病の予防又は治療と、若しくは m R N A コンストラクト又は標的タンパク質を製造するためのものである、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記コンストラクト又はベクターは、Z C C H C 2 をコードする遺伝子と、T E N T 4 をコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含むか、または

前記組換え宿主細胞または組成物は、Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子と、T E N T 4 又はそれをコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含む、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 17】

調節エレメントと相互作用する Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子を含む、R N A の安定性又は m R N A 翻訳増強用組成物。

【請求項 18】

前記組成物は、ポリ (A) テールの長さの増加、ポリ (A) テールの安定性の増加又はその両方ともを誘導して、R N A の安定性または m R N A 翻訳を増強させる、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記組成物は、T E N T 4 またはそれをコードする遺伝子をさらに含む、請求項 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の調節エレメントを使用した、R N A の安定性又は m R N A 翻訳を増強する方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0200

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0200】

以上の説明から、本発明の属する技術分野における当業者は、本発明がその技術的思想や必須的特徴を変更することなく、他の具体例として実施できるということを理解できるだろう。これと関連して、前述した実験例および実施例は、すべての面で例示的なものであり、限定的なものではないと理解しなければならない。本発明の範囲は、前記詳細な説明よりは、後述する特許請求の範囲の意味および範囲、並びにその等価概念から導出されるすべての変更または変形された形態が本発明の範囲に含まれるものと解釈されなければならない。

(付記)

本開示は以下の態様を含む。

項目 1:

i) アイチウイルス 1 (A i c h i v i r u s 1) 遺伝子 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : N C 001918.1) のセグメントの塩基配列またはその R N A の塩基配列; または (i i) これと少なくとも 90 % の同一性を有する塩基配

列；または (i i i) (i) の塩基配列と少なくとも 50 % の相同性を有するコブウイルスの 3 ' 非翻訳領域内の塩基配列を含む、RNA 安定性又は mRNA 翻訳増強用調節エレメントであって、

前記セグメントは、アイチウイルス 1 遺伝子内の 8251 番のヌクレオチドから 5 ' 方向に連続する 110 個超過 250 個以下のヌクレオチドを含む、RNA 安定性又は mRNA 翻訳増強用調節エレメント。

項目 2：

前記 (i) の塩基配列は、配列番号 20、94、または 95 の塩基配列又はその RNA の塩基配列である、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 3：

前記 (i i i) の塩基配列は、コブウイルスの 3 ' 非翻訳領域内の少なくとも 2 つのヘアピン構造を有する塩基配列である、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 4：

前記 (i i i) の塩基配列は、配列番号 98 ~ 140 のいずれか 1 つの塩基配列またはその RNA の塩基配列である、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 5：

前記 (i i) の塩基配列は、配列番号 20 の塩基配列 1 ~ 14 のいずれか 1 つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、又は両方ともを有する塩基配列またはその RNA の塩基配列である、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 6：

前記調節エレメントは、RNA の安定性および mRNA 翻訳を増強させてタンパク質の発現を増加させる、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 7：

前記調節エレメントは、TENT4 と相互作用する ZCHC2 と相互作用して、ポリ (A) テールの長さの増加、ポリ (A) テールの安定性の増加、又はその両方ともを誘導する、項目 1 に記載の調節エレメント。

項目 8：

標的タンパク質の遺伝子と、その 3 ' 非翻訳領域に項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の調節エレメントとを含む、コンストラクト。

項目 9：

前記標的タンパク質がレポーター、生理活性ペプチド、抗原、または抗体またはその断片から選択される、項目 8 に記載のコンストラクト。

項目 10：

前記コンストラクトは、mRNA コンストラクトである、項目 8 に記載のコンストラクト。

項目 11：

項目 8 に記載のコンストラクトを含む、ベクター。

項目 12：

項目 8 に記載のコンストラクトまたは該コンストラクトを含むベクターを含む、組換え宿主細胞。

項目 13：

前記宿主細胞は、ZCHC2 またはそれをコードする遺伝子と、TENT4 またはそれをコードする遺伝子と、またはこれらの組み合わせをさらに含む、項目 12 に記載の組換え宿主細胞。

項目 14：

項目 8 に記載のコンストラクトと、前記コンストラクトを含むベクターと、若しくは前記コンストラクト又はベクターを含む組換え宿主細胞とを含む、組成物。

項目 15：

前記組成物は、疾病の予防又は治療と、若しくは mRNA コンストラクト又は標的タンパク質を製造するためのものである、項目 14 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

項目 1 6 :

前記コンストラクト又はベクターは、Z C C H C 2をコードする遺伝子と、T E N T 4をコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含むか、または

前記組換え宿主細胞または組成物は、Z C C H C 2またはそれをコードする遺伝子と、T E N T 4又はそれをコードする遺伝子と、若しくはこれらの組み合わせとをさらに含む、項目 1 4 に記載の組成物。

項目 1 7 :

項目 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の調節エレメントと相互作用する Z C C H C 2 またはそれをコードする遺伝子を含む、R N A の安定性又は m R N A 翻訳増強用組成物。

項目 1 8 :

前記組成物は、ポリ（A）テールの長さの増加、ポリ（A）テールの安定性の増加又はその両方ともを誘導して、R N A の安定性または m R N A 翻訳を増強させる、項目 1 7 に記載の組成物。

項目 1 9 :

前記組成物は、T E N T 4 またはそれをコードする遺伝子をさらに含む、項目 1 7 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2023/009154
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/70(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12N 15/10(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) C12Q 1/70(2006.01); C12N 9/12(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 아이치 바이러스 1(aichi virus 1), 세그먼트(segment), 서열(sequence), 코부바이러스(kobuvirus), RNA 안정성(RNA stability), mRNA 번역 증가(mRNA transcription increase), 조절 엘리먼트(control element), 컨스트럭트(construct), 벡터(vector), 숙주세포(host cell), ZCCHC2, TENT4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NCBI. Genbank accession no. NC_001918.1 (13 August 2018). See entire document.	1-19
A	NCBI. Genbank accession no. JN088541.1 (03 February 2012). See entire document.	1-19
A	LEE, S. et al. Development of reverse transcription semi-nested PCR primer pairs for the specific and highly sensitive detection of human aichivirus A1. Biomedical Science Letters. 2019, vol. 25, no. 4, pp. 331-338. See entire document.	1-19
A	KR 10-2020-0138094 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 09 December 2020 (2020-12-09) See entire document.	1-19
A	KIM, D. et al. Viral hijacking of the TENT4-ZCCHC14 complex protects viral RNAs via mixed tailing. Nature Structure & Molecular Biology. 2020, vol. 27, pp. 581-588. See entire document.	1-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 October 2023		Date of mailing of the international search report 05 October 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

International application No.

PCT/KR2023/009154

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-175898 A1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 03 September 2020 (2020-09-03) See entire document.	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2023/009154
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/009154

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0138094	A	09 December 2020	CN	113874042	A	31 December 2021
				EP	3984558	A1	20 April 2022
				JP	2022-534526	A	01 August 2022
				JP	2023-058674	A	25 April 2023
				JP	2023-058675	A	25 April 2023
				US	2022-0220483	A1	14 July 2022
				WO	2020-242278	A1	03 December 2020
WO	2020-175898	A1	03 September 2020	CN	113498437	A	12 October 2021
				EP	3904518	A1	03 November 2021
				JP	2022-522660	A	20 April 2022
				JP	2023-098926	A	11 July 2023
				KR	10-2020-0104249	A	03 September 2020
				KR	10-2021-0042291	A	19 April 2021
				KR	10-2021-0042292	A	19 April 2021
				KR	10-2022-0124112	A	13 September 2022
				KR	10-2336743	B1	08 December 2021
				KR	10-2336744	B1	08 December 2021
				KR	10-2336745	B1	08 December 2021
				KR	10-2424454	B1	22 July 2022
				KR	10-2547432	B1	23 June 2023
				KR	20210042290	A	19 April 2021
				US	2021-0363527	A1	25 November 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/009154

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/70(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12N 15/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/70(2006.01); C12N 9/12(2006.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드 : 아이치 바이러스 1(aichi virus 1), 세그먼트(segment), 서열(sequence), 코부바이러스(kobuvirus), RNA 안정성(RNA stability), mRNA 번역 증가(mRNA transcription increase), 조절 엘리먼트(control element), 컨스트럭트(construct), 벡터(vector), 숙주세포(host cell), ZCCHC2, TENT4		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NCBI, Genbank accession no. NC_001918.1 (2018.08.13) 전체 문헌	1-19
A	NCBI, Genbank accession no. JN088541.1 (2012.02.03) 전체 문헌	1-19
A	LEE, S. 등, "Development of reverse transcription semi-nested PCR primer pairs for the specific and highly sensitive detection of human aichivirus AI", Biomedical Science Letters, 2019, 제25권, 제4호, 페이지 331-338 전체 문헌	1-19
A	KR 10-2020-0138094 A (서울대학교산학협력단 등) 2020.12.09 전체 문헌	1-19
A	KIM, D. 등, "Viral hijacking of the TENT4-ZCCHC14 complex protects viral RNAs via mixed tailing", Nature Structure & Molecular Biology, 2020, 제27권, 페이지 581-588 전체 문헌	1-19
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년10월04일(04.10.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년10월05일(05.10.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 권용경 전화번호 +82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2022년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2023/009154

제1기 재관 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
- ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

10

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

20

30

40

50

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2023/009154

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0138094 A	2020/12/09	CN 113874042 A	2021/12/31
		EP 3984558 A1	2022/04/20
		JP 2022-534526 A	2022/08/01
		JP 2023-058674 A	2023/04/25
		JP 2023-058675 A	2023/04/25
		US 2022-0220483 A1	2022/07/14
		WO 2020-242278 A1	2020/12/03
WO 2020-175898 A1	2020/09/03	CN 113498437 A	2021/10/12
		EP 3904518 A1	2021/11/03
		JP 2022-522660 A	2022/04/20
		JP 2023-098926 A	2023/07/11
		KR 10-2020-0104249 A	2020/09/03
		KR 10-2021-0042291 A	2021/04/19
		KR 10-2021-0042292 A	2021/04/19
		KR 10-2022-0124112 A	2022/09/13
		KR 10-2336743 B1	2021/12/08
		KR 10-2336744 B1	2021/12/08
		KR 10-2336745 B1	2021/12/08
		KR 10-2424454 B1	2022/07/22
		KR 10-2547432 B1	2023/06/23
		KR 20210042290 A	2021/04/19
		US 2021-0363527 A1	2021/11/25

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2022년 7월)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/00 (2006.01)	C 1 2 N	15/00

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

弁理士法人太陽国際特許事務所

- (72)発明者 キム、ヴィック ナリー
大韓民国 0 8 8 2 6 ソウル クァナク－グ、クァナク－ロ 1、2 0 3－5 2 3
- (72)発明者 ソ、ジェニー
大韓民国 0 5 5 0 1 ソウル ソンパ－グ、オリンピク－ロ 9 9、1 2 4－1 0 0 2
- (72)発明者 ジュン、ソージン
大韓民国 0 5 2 6 8 ソウル カンドン－グ、コドク－ロ 6 2－ギル 1 2 6、1 3 0 3－ホ
- F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA25
CA44