(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-508685
(P2006-508685A)
(43)公表日　平成18年3月16日(2006.3.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
C12Q 1/04	(2006.01)	C12Q	1/04		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 73 頁）

(21)出願番号　特願2004-562251 (P2004-562251)
(86)(22)出願日　平成15年12月4日 (2003.12.4)
(85)翻訳文提出日　平成17年7月29日 (2005.7.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/038475
(87)国際公開番号　WO2004/057032
(87)国際公開日　平成16年7月8日 (2004.7.8)
(31)優先権主張番号　10/309,788
(32)優先日　平成14年12月4日 (2002.12.4)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505211433
リボノミックス，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ノースカロライナ　２７７０３，　ダーハム，　パトリオット　ドライブ　３９０８
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　キーン，　ジャック　ディー.
アメリカ合衆国　ノースカロライナ　２７７０７，　ダーハム，　ギャレット　ロード　６３００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能的に関連する遺伝子および薬物標的を同定するための方法

(57)【要約】
ｍＲＮＡ複合体に関連し、共通生理経路に関与するタンパクの発現に関わるｍＲＮＡおよびタンパク標的の特定と評価が記載される。効果的標的は、生理的経路と関連する疾患、状態、または障害の処置に有用である。本発明は、細胞の代謝状態を評価するための方法であって、以下、ａ）少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質、および少なくとも一つのｍＲＮＡまたは少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を含む少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程；ならびに、ｂ）該少なくとも一つのｍＲＮＡ、または該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現レベルを定量する工程であって、該少なくとも一つのｍＲＮＡ、または該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現レベルが、細胞の代謝状態を示す工程を包含する方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞の代謝状態を評価するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質、および少なくとも一つのｍＲＮＡまたは少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を含む少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程；ならびに、
ｂ）該少なくとも一つのｍＲＮＡ、または該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現レベルを定量する工程であって、該少なくとも一つのｍＲＮＡ、または該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現レベルが、細胞の代謝状態を示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項２】
前記細胞が、病原体に感染している、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記細胞が、化合物によって処理される、請求項１の方法。
【請求項４】
前記化合物が、前記少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質および前記少なくとも一つのｍＲＮＡの間の結合、該少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質および前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の間の結合、または、該少なくとも一つのｍＲＮＡおよび該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の間の結合を阻害する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質、前記少なくとも一つのｍＲＮＡ、または前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現を変化させる工程をさらに包含する、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記変化させる工程は、タンパク質、核酸、抗体、抗体断片、ペプチド核酸、およびペプチドからなる群より選択される分子と細胞サンプルを接触させる工程を包含する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記変化させる工程が、遺伝的変化を含む、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記変化させる工程が、アンチセンス核酸、リボザイム、ＲＮＡｉ、デコイ核酸、または、競合核酸を含む核酸と細胞サンプルを接触させる工程を包含する、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体が、支持体上に結合するリガンドによって単離される、請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体が、免疫沈降によって単離される、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
機能的に関係する遺伝子産物を同定し、特徴づけするための方法であって、該方法は、以下：
ａ）少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質、および少なくとも一つのｍＲＮＡまたは少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を含む少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程；ならびに、
ｂ）それぞれ、機能的関連遺伝子産物として少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク質に関連する、少なくとも一つのｍＲＮＡ、または少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を同定する工程、

を包含する、前記方法。
【請求項１２】
前記機能的関連遺伝子産物が、酵素経路に関与する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記機能的関連遺伝子産物は、病因、腫瘍成長、アポトーシス、分化、加齢、または細胞毒性に関与する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
前記遺伝子産物をコードする遺伝子を同定する工程をさらに包含する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体は、支持体上に結合するリガンドによって単離される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１６】
前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体は、免疫沈降によって単離される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＲＮＡ結合タンパク質、前記少なくとも一つのｍＲＮＡ、または前記少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現を変化させる工程をさらに包含する、請求項１１に記載の方法。
【請求項１８】
前記変化させる工程は、タンパク質、核酸、抗体、抗体断片、ペプチド核酸、およびペプチドからなる群より選択される分子と細胞サンプルを接触させる工程を包含する、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記変化させる工程が、遺伝的変化を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
前記変化させる工程が、アンチセンス核酸、リボザイム、ＲＮＡｉ、デコイ核酸、または、競合核酸を含む核酸と細胞サンプルを接触させる工程を包含する、請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体の少なくとも一つの構成要素の発現を含むリボノームプロフィールであって、該少なくとも一つの構成要素は、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される、リボノームプロフィール。
【請求項２２】
一構成要素より多い構成要素の発現を含み、該構成要素が機能的に関連する、請求項２１に記載のリボノームプロフィール。
【請求項２３】
治療標的を同定するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）細胞サンプルを試験化合物と接触させる工程；
ｂ）該細胞サンプルのリボノームプロフィールを作製する工程であって、ここで、該リボノームプロフィールは、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体の少なくとも一つの構成要素の発現を含み、該少なくとも一つの構成要素は、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される、工程；ならびに、
ｃ）該細胞サンプルにおける該少なくとも一つの構成要素の発現を、コントロールサンプルにおける該少なくとも一つの構成要素の発現と比較する工程であって、該少なくとも一つの構成要素の発現における差は、該少なくとも一つの構成要素が治療標的であることを示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項２４】

前記コントロールサンプルは、前記試験化合物で処理されていない細胞を含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記細胞サンプルは腫瘍細胞を含み、前記コントロールサンプルは正常細胞を含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記細胞サンプルは、成長周期の特定の段階にある細胞を含み、前記コントロールサンプルは、成長周期の異なる段階にある細胞を含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２７】
前記治療標的は、ＲＮＡ結合タンパク質、該ＲＮＡ結合タンパク質をコードするｍＲＮＡ、該ＲＮＡ結合タンパク質をコードする遺伝子、該ＲＮＡ結合タンパク質を含むｍＲＮＰ複合体、該ｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡ、該ｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡをコードする遺伝子、ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質、該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質をコードするｍＲＮＡ、および、該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質をコードする遺伝子からなる群より選択される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２８】
治療剤としての試験化合物の効力を評価するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）細胞サンプルを試験化合物と接触させる工程；
ｂ）該細胞サンプルのリボノームプロフィールを作製する工程であって、ここで、該リボノームプロフィールは、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体と関連する少なくとも一つの遺伝子産物の発現を含み、該遺伝子産物は、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される、工程；ならびに、
ｃ）該細胞サンプルにおける該遺伝子産物の発現レベルを、コントロールサンプルにおける該遺伝子産物の発現レベルと比較する工程であって、該遺伝子産物の発現における差は、該試験化合物が治療的であることを示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項２９】
前記治療剤は、前記ｍＲＮＡ、または前記ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を安定化する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記治療剤は、前記ｍＲＮＡ、または前記ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質を不安定化する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
前記治療剤は、前記ｍＲＮＡの翻訳を抑制するか、該ｍＲＮＡまたは前記ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の輸送を阻害するか、前記ＲＮＡ結合タンパク質の該ｍＲＮＡに対する結合を阻害するか、該ＲＮＡ結合タンパク質の該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質に対する結合を抑制するか、または、該ｍＲＮＡの該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質に対する結合を阻害する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
前記治療剤が、抗体、抗体断片、タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド核酸、および低分子からなる群より選択される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３３】
前記比較工程は、前記細胞サンプルにおける、前記ＲＮＡ結合タンパク質、前記ｍＲＮＡ、前記ｍＲＮＡによってコードされるタンパク質、該ＲＮＡ結合タンパク質をコードするｍＲＮＡ、前記ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質をコードするｍＲＮＡ、または、該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の少なくとも一つの相対量を、前記コントロールサンプルにおける同一物の相対量と比較する工程を包含する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３４】
前記試験化合物の毒性または特異性を決定する工程をさらに包含する、請求項２８に記載の方法。

【請求項３５】
前記試験化合物の作用機構を決定する工程をさらに包含する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞サンプルを前記試験化合物と接触させる前に、前記ＲＮＡ結合タンパク質、前記ｍＲＮＡ、または前記ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質の発現を変化させる工程をさらに包含する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３７】
前記変化させる工程は、タンパク質、核酸、抗体、抗体断片、酵素、ペプチド核酸、およびペプチドからなる群より選択される分子と前記細胞サンプルを接触させる工程を包含する、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記核酸は、アンチセンス核酸、リボザイム、ＲＮＡｉ、デコイ核酸、または、競合核酸を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記変化させる工程は、遺伝的変化を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
被験体における病態をモニタリングする方法であって、該方法は、以下：
ａ）疾患を有する被験体由来の細胞サンプルから少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程であって、該少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体は、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子産物を含み、ここで、該遺伝子産物の発現の変化は、該疾患と関連する、工程；ならびに、
ｂ）該細胞サンプルにおける該遺伝子産物の発現を、コントロールサンプルにおける該遺伝子産物の発現と比較する工程であって、該コントロールサンプルにおける該遺伝子産物の発現と比較した、該細胞サンプルにおける該遺伝子産物の発現における差は、該被験体における病態の変化を示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項４１】
前記コントロールサンプルが、正常細胞を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記コントロールサンプルが、前記被験体由来の第２細胞サンプルを含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
前記被験体由来の前記第２細胞サンプルは、該被験体が疾患の一つ以上の症状を有さない場合に得られる、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
被験体において治療剤の効力をモニタリングするための方法であって、該方法は、以下：
ａ）被験体に有効量の治療剤を投与する工程；
ｂ）該被験体由来の細胞サンプルから少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程であって、該ｍＲＮＰ複合体は、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子産物を含み、ここで、該遺伝子産物の発現の変化が疾患と関連する、工程；ならびに、
ｃ）該治療剤投与後の該細胞サンプルにおける遺伝子産物の発現を、該治療剤の投与前に得られたコントロールサンプルにおける該遺伝子産物の発現と比較する工程であって、該発現における差は、該治療剤の効力を示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項４５】
前記コントロールサンプルが、正常細胞を含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記コントロールサンプルが、前記被験体由来の第２細胞サンプルを含む、請求項４４に

記載の方法。
【請求項４７】
被験体における疾患または疾患の危険度を診断するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）被験体由来の細胞サンプルからリボノームプロフィールを作製する工程であって、該リボノームプロフィールは、ＲＮＡ結合タンパク質、ｍＲＮＡ、およびｍＲＮＰ複合体関連タンパク質からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子産物を含む少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を含む、工程；
ｂ）該細胞サンプルにおける該遺伝子産物の発現を、コントロールサンプルにおける該遺伝子産物の発現と比較する工程；ならびに、
ｃ）該コントロールサンプルにおける遺伝子産物の発現と比較した、該細胞サンプルにおける該遺伝子産物の発現レベルに基づいて疾患の存在または疾患の危険度を決定する工程であって、ここで、該遺伝子産物の発現の変化は、疾患または疾患の危険度を示す、工程、
を包含する、方法。
【請求項４８】
前記コントロールサンプルが、正常細胞を含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記コントロールサンプルが、前記被験体由来の第２細胞サンプルを含む、請求項４７に記載の方法。
【請求項５０】
細胞の集団に存在する細胞型を評価するための方法であって、該方法は、以下：
ａ）細胞の集団から少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離する工程；および、
ｂ）該ｍＲＮＰ複合体の少なくとも一つの構成要素の発現を検出する工程を包含し、ここで、該少なくとも一つの構成要素は、特定の細胞型に対して特異的であり、該少なくとも一つの構成要素の発現は、該特定の細胞型が、細胞集団の中に存在することを示す、方法。
【請求項５１】
前記細胞集団は、腫瘍、組織、培養細胞、体液、器官、細胞抽出物、または細胞溶解物を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記検出工程は、ｍＲＮＡ、ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質、ＲＮＡ結合タンパク質、ＲＮＡ結合タンパク質をコードするｍＲＮＡ、および該ｍＲＮＰ複合体関連タンパク質をコードするｍＲＮＡからなる群より選択される遺伝子産物の発現を検出する工程を包含する、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
請求項２３の方法によって同定された物質の単離組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願）
本出願は、１９９９年１２月２８日出願米国出願第６０／１７３，３３８号の利益を主張する、２０００年１２月２８日出願米国出願第０９／７５０，４０１号の一部継続出願である。両方を参照することによりその全体を本出願に含める。
【０００２】
（政府援助）
本発明は、国立衛生研究所により贈与された研究補助金第ＲＯ１　ＣＡ７９９０７号による政府援助によって為されたものである。政府は本発明においていくつかの権利を有する可能性がある。
【０００３】

（発明の分野）
本発明は、ｍＲＮＡタンパク（ｍＲＮＰ）複合体に関連する、機能的に連関する遺伝子産物を特定して特性を解明し、細胞の遺伝子発現を解明するための方法および組成物を提供する。本発明はまた、治療標的および治療剤の特定・解明するための方法および組成物を提供する。
【背景技術】
【０００４】
（発明の背景）
多くの遺伝子は、複雑な一連の相互作用によって調整され、固有の遺伝子発現パターンを実現する。このような遺伝子発現パターンは、細胞タイプの違いによって、細胞の発達段階または分化状態の違いによって、シグナル分子、ストレス、感染、その他の細胞状態または障害に細胞が曝されているのかによって変動する。変動する遺伝子発現パターンを制御する過程を理解しようとする努力は、従来、転写制御事象および翻訳を取り巻く事象に専ら集中していた。一方、ｍＲＮＡの安定性、配置、および翻訳効率の制御等、転写後調整過程におけるｍＲＮＡタンパク複合体（ｍＲＮＰ複合体）の役割についてはほとんど注意が払われて来なかった。まして、機能的関連遺伝子（例えば、ある機能または経路を分担する、または関与する複数の遺伝子）を調和的に関連づける転写後過程についてはさらに知られていない。これら機能的関連遺伝子は、特定のｍＲＮＰ複合体に共存し、また同じＲＮＡ結合タンパク（ＲＢＰ）に結合することが多い。
【０００５】
いくつかのｍＲＮＡの転写後遺伝子制御は、ｍＲＮＡ前駆物質のイントロンおよびエキソンに存在している調製要素または配列、ならびに、成熟転写物のコードおよび非コード領域に存在する調整要素または配列によって仲介される。このような調整要素の一つの例として、初期反応遺伝子ｍＲＮＡの３′未翻訳領域（ＵＴＲ）に存在するＡＵリッチの不安定要素（ＡＲＥ）がある。この初期反応遺伝子の多くは、成長と分化にとって必須なタンパクをコードする。ｍＲＮＰ複合体と関連するＲＮＡ結合タンパクは、インビトロでＡＲＥに結合するが、インビボでは、転写後ｍＲＮＡの安定性と翻訳を仲介する。一方、ＲＮＡ結合タンパクと結合する必ずしも全てのｍＲＮＡが、ＡＲＥまたは他の共通の調整要素を有しているわけではない。さらに、ＲＮＡ結合タンパクが、ＡＲＥを含まないｍＲＮＡを認識するメカニズム（単数または複数）も未知である。
【０００６】
ＲＮＡ結合タンパクを用いたインビトロ結合アッセイから、ある特定のＲＮＡ結合タンパクと関連するｍＲＮＡは、多くの場合、構造的にあるいは機能的に関連することが判明した。しかしながら、このようなインビトロ方法は、細胞内および細胞間のシグナル事象に応答して変動する、ダイナミックな性質を持つインビボでのｍＲＮＡとｍＲＮＰ複合体との関連性を反映しない。従って、インビボにおいて、ＲＮＡ結合タンパク－ｍＲＮＡ相互作用を始めとして、ｍＲＮＡとｍＲＮＰ複合体タンパクとの関連性をモニタリングするための信頼度の高い方法が求められている。このような方法を用いることによって、ｍＲＮＡ－タンパク相互作用、およびその機能的意味の解明が可能となり、生物学的経路が明らかにされ、さらに治療標的および治療剤の特定が可能となろう。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００７】
（発明の概要）
本発明は、ｍＲＮＰ複合体を特定、利用、特性解明し、それによって、相互に調和的に発現し、ある特定のｍＲＮＰ複合体と関連する、機能的に関連する複数の遺伝子産物を特定する方法および組成物を提供する。ある特定のｍＲＮＰ複合体に関連する複数の遺伝子産物は、構造的および／または機能的関係に基づいて生物学的に関連するサブセットに分類される。ｍＲＮＡ、ＲＮＡ結合タンパク、他のｍＲＮＰ複合体関連タンパクを含むこれらの遺伝子産物は、酵素経路のような特定の生物経路に関与しているかも知れないし、あ

るいは、他の細胞事象または、病理現象、例えば、腫瘍成長、アポトーシス、分化、加齢、または細胞毒性に関与しているかも知れない。特定され、特性解明された、機能的・構造的に関連する複数遺伝子産物は、細胞または細胞集団に対し一つのリボノームプロフィールを生成する。このリボノームプロフィールは、細胞、または細胞集団の生涯における任意の一時点の、正常または病的状態、または、環境の影響や薬剤に対応する遺伝情報の流れのスナップショットを提供する。このリボノームプロフィールは、疾患または他の細胞事象に対する診断マーカーとして、また、１種以上のｍＲＮＰ複合体関連遺伝子産物の発現を変える治療標的および治療剤を速やかに特定するために使用される。特定された遺伝子産物自体も、診断および治療インディケーターとして使用される。

【０００８】

例えば、本発明は、被験体の細胞サンプルにおけるｍＲＮＰ複合体関連遺伝子産物の発現変化をモニタリングし、この発現変化を、正常な被験体のサンプルまたは他の非病的細胞サンプルのものと比較することによって、病状をモニタリングすることを始め、疾患または、疾患に罹る危険性を診断するための方法を提供する。例えば、本発明は、ある細胞サンプルのリボノームプロフィールを、ある細胞タイプの基準ＲＮＰプロフィール特性と比較することによって、ある細胞集団、例えば、腫瘍、バイオプシー、または体液における細胞タイプを評価するために有用である。細胞タイプの特定は、腫瘍、またはその他の細胞病理現象を診断し、治療処方を指示するのに有用である。

【０００９】

本発明は、細胞サンプルを試験化合物に接触させ、ｍＲＮＰ複合体を単離し、その発現が、化合物に反応して変化したｍＲＮＰ複合体成分を特定することによって、治療標的を特定する方法を提供する。治療標的は、そのＲＮＰ複合体の中から任意に選ばれる成分であってもよいし、あるいは、その成分をコードする遺伝子またはＲＮＡであってもよい。例えば、あるＲＮＰ複合体から単離されたＲＮＡを用いて、どの遺伝子が試験化合物によって影響されるのかを特定するために、核酸アレイをプローブ探索してもよい。

【００１０】

本発明はまた、試験化合物の、治療剤としての効力を評価するための方法を提供する。細胞サンプルは試験化合物と接触させられ、その細胞サンプルのｍＲＮＰ複合体は、そのｍＲＮＰ複合体に関連する遺伝子産物の発現変化を示すリボノームプロフィールを調製するのに使用される。処置細胞サンプルにおける遺伝子産物発現レベルの、未処置細胞サンプルのレベルと比較した場合の差は、試験化合物が治療剤候補であることを示す。

【００１１】

本発明はまた、試験化合物の毒性を定量し、細胞死に与る遺伝子を特定するのにも使用が可能である。毒性は、後述するように、細胞サンプルを様々な用量の試験化合物で処理することによって定量される。調整分子、例えば、転写因子をコードする核酸を含むアレイに対し、ある特定のＲＮＰ複合体から単離されたＲＮＡを用いてプローブ探索することによって、その発現が特定の毒素の存在下で変化させられる転写因子、ＲＮＡ結合タンパク、または、他の転写、転写後、翻訳、または翻訳後調整因子が特定される。

【００１２】

（詳細な説明）

本発明は、ｍＲＮＡ－タンパク（ｍＲＮＰ）複合体と機能的に相互関連するｍＲＮＡおよびタンパクを特定し、測定することによって細胞リボノームを掘り出し、特性解明をするための方法を提供する。本発明は、ゲノムとプロテオームの間のタンパク生合成経路に沿って存在する遺伝子調整情報を獲得し、利用する点に注目したものである（図１）。

【００１３】

本発明は、細胞の代謝および病的状態を診断、モニタリング、または評価するための有用なツールとして、治療標的候補を特定するための有用なツールとして、治療剤候補を特定し、その効力または毒性を評価するための有用なツールとして、ｍＲＮＡ－タンパク（ｍＲＮＰ）複合体を特定する。さらに、本発明は、構造的および／または機能的に関連する遺伝子産物を特定し、解明して、生物学的経路または過程を明らかにする方法を提供す

る。

【００１４】

一般に、ｍＲＮＰ複合体は、少なくとも一つのＲＮＡ結合タンパク、少なくとも一つの会合または結合ｍＲＮＡ、少なくとも一つの会合または結合タンパク（すなわち、ｍＲＮＰ複合体関連タンパク）を含むがそれらに限定されない各種成分から成るが、さらにその他の会合または結合分子（例えば、炭水化物、脂質、ビタミン等）から成っていてもよい。ある成分は、それが、ｍＲＮＰ複合体と、約１０$^{-6}$から１０$^{-9}$のＫｄにおいて結合するか、またはその他のやり方で付着する場合に、ｍＲＮＰ複合体に会合するとする。好ましい実施形態では、成分は、約１０$^{-7}$から１０$^{-9}$のＫｄにおいて複合体に会合する。より好ましい実施形態では、成分は、約１０$^{-8}$から１０$^{-9}$のＫｄにおいて複合体に会合する。

【００１５】

会合または結合ｍＲＮＡは、ある特定のＲＮＡ結合タンパク、またはｍＲＮＡ複合体関連タンパクとの関連に基づいて異なるサブセットに分類される。細胞中の各ｍＲＮＰ複合体を単離し、好ましくは、そのｍＲＮＰ複合体の成分を特定し、かつ、それらの成分の遺伝子前駆体および遺伝子産物を特定することによって、その細胞のリボノーム発現プロフィールの生成が可能となる。細胞リボノームのｍＲＮＡ成分を特定することによって、細胞トランスクリプトームの一連のサブプロフィールへの分解が可能となる。これらのサブプロフィールは、総合すると、細胞または組織の遺伝子発現状態を定義するのに用いることができる（図２参照）。リボノームプロフィールは、細胞の分化状態、細胞の種類または組織タイプ、細胞の発達状態、細胞の病原性（例えば、細胞が感染している場合、有害遺伝子を発現する場合、特定の遺伝子を欠失する場合、特定の遺伝子を発現しない場合、または特定の遺伝子を過剰発現する場合）、ｍＲＮＰ複合体を単離するのに使用された特定のリガンド、細胞に影響を及ぼす各種条件（例えば、環境、アポトーシス、またはストレス状態、および、疾患またはその他の障害）、および、当業者には既知のその他の要因を含めるが、ただしそれらに限定されない様々な要因に従って、細胞サンプル毎に異なる。

【００１６】

（ｍＲＮＰ複合体の単離）

ｍＲＮＰ複合体は、天然の生物サンプル、例えば、組織、細胞、体液、器官、または生物体から単離される。好ましい実施形態では、生物サンプルは、細胞集団から得られる。細胞集団は、単一細胞タイプを含むものであってもよい。あるいは、細胞集団は、一次培養体または二次培養体から得られる、または、腫瘍のような複雑な組織から得られる異なる細胞タイプの混合物を含んでもよい。

【００１７】

一つの実施形態では、ｍＲＮＰ複合体は、ｍＲＮＰ複合体のある成分の発現が誘発、または抑制されるなどして変化させられた細胞サンプルから単離される。別の実施形態では、ある特定のｍＲＮＰ複合体または成分、あるいはｍＲＮＰ複合体の１種以上の成分の前駆物質が、サンプルに導入されているか、または、遺伝的に変更されている。１種以上のｍＲＮＰ複合体成分の導入は、感染、形質変換、または他の、従来技術で既知の方法で行われてよい。一つの実施形態では、ｍＲＮＰ複合体の１種以上の成分を発現するベクターが細胞にトランスフェクトされる。適切なベクターとしては、プラスミドベクターまたはウィルスベクターのような組み換えベクターが挙げられるが、それらに限定されない。その成分は、細胞における発現のための、適当なプロモーターおよび／またはエンハンサー配列に動作的に連結されているのが好ましい。本発明のある実施形態では、ある特定の細胞タイプは、ＲＮＡ結合タンパクの発現を駆動する細胞タイプ特異的または誘発可能な遺伝子プロモーターを含むように加工される。このＲＮＡ結合タンパクに対して特異的なリガンド、例えば抗体は、そこに付着、または会合するｍＲＮＡと共にそのＲＮＡ結合タンパクを、対象とする細胞タイプを含む組織抽出物から免疫沈降させてもよい。次に、そのＲＮＡは特定されて、その細胞タイプの発現プロフィールを形成するか、あるいは、後述

するように、単離されてさらにその後の研究に使われる。

【００１８】

あるいは、細胞サンプルは、ｍＲＮＰ複合体のある成分を発現しないか、または、その成分を低レベルでしか発現しないノックアウト細胞系統、または、ノックアウト生物体を含んでもよい。好ましくは、ノックアウト細胞系統またはノックアウト生物体は、ある特定のＲＮＡ結合タンパク、ｍＲＮＡ複合体に会合するｍＲＮＡ、またはＲＮＡ結合タンパク、またはｍＲＮＰ複合体関連タンパクを発現しない。

【００１９】

ある好ましい実施形態では、成分の分離、観察、および／または検出を容易にするために、ｍＲＮＰ複合体成分をコードする核酸にタグが付される（例えば、タグ付きＲＮＡ結合タンパク）。接近可能なエピトープを用いてもよいし、成分上のエピトープが接近不能であったり不明の場合には、局外発現された組み換えタンパクに対するエピトープタグを用いてもよい。適切なタグとしては、ビオチン、ＭＳ２タンパク結合部位配列、Ｕ１ｓｎＲＮＡ７０ｋ結合部位配列、Ｕ１ｓｎＲＮＡ　Ａ結合部位配列、ｇ１０結合部位配列（Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，マジソン、ウィスコンシン州）、および、ＦＬＡＧ－ＴＡＧ（登録商標）（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ、セントルイス、ミズーリ州）が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。例えば、タグ標識ＲＮＡ結合タンパクの発現を指示するトランスフェクトベクターを含む形質変換細胞は、その他の細胞タイプと混合してもよいし、あるいは動物またはヒト被験体に組み込まれてもよい。ある実施形態では、リガンド、例えば、タグに対して特異的な抗体または抗体断片を用いて、形質変換細胞を含む組織抽出物から、関連ｍＲＮＡと共にタグ標識ＲＮＡ結合タンパクを免疫沈降させる。次に、ｍＲＮＰ複合体および関連ＲＮＡを特定することによって、その細胞タイプの発現プロフィールを形成し、その後の分析に役立てることが可能である。

【００２０】

１種以上のｍＲＮＰ複合体成分の発現を、細胞サンプルを既知のまたは試験化合物と接触させることによって変えてもよい。その化合物としては、タンパク、核酸、ペプチド、抗体、抗体断片、小型分子、または酵素が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。化合物が核酸である場合には、その核酸はアンチセンス核酸、リボザイム、ＲＮＡｉ、アプタマー、デコイ核酸、または競合核酸であってもよい。一つの実施形態では、化合物は、競合的結合を通じてｍＲＮＰ複合体成分の発現を変えてもよい。化合物は、例えば、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡの間の結合、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＰ複合体関連タンパクの間の結合、または、ｍＲＮＡとｍＲＮＰ複合体関連タンパクの間の結合を抑制してもよい。別の実施形態では、細胞サンプルは、１種以上のｍＲＮＡ複合体の発現を変えるために、病原体、例えば、ウィルス、細菌、プリオン、真菌、寄生生物、または酵母に感染される。

【００２１】

本発明においてはｍＲＮＰ複合体の単離には任意の方法を用いてよいが、同時係属出願中の米国出願第０９／７５０，４０１および１０／２３８，３０６号に開示される方法が好ましい。この開示を参照することにより本明細書に含める。インビボでｍＲＮＰ複合体を単離する方法は、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を含む生物サンプルを、そのｍＲＮＰ複合体の成分に特異的に結合するリガンドと接触させることを含む。例えば、リガンドは、抗体、核酸（例えば、アンチセンス、アプタマー、またはＲＮＡｉ分子）、または、その複合体の成分に特異的に結合する他の任意の化合物または分子であってもよい。ある実施形態では、リガンドは、ｍＲＮＰ複合体特異的抗体またはタンパクの生産と関連することがわかっている異常を持つ被験体の血清を用いて得られる。このような異常の例としては、自己免疫疾患、およびいくつかのガンが挙げられる。ある実施形態では、リガンドは、そのリガンドの分離、観察、または検出を容易にするために、他の化合物または分子によってタグ標識される。本発明の一つの実施形態では、リガンドは、従来技術で記載されるようにエピトープタグ標識される。

【００２２】

ある実施形態では、ｍＲＮＰ複合体は、リガンド（現在ｍＲＮＰ複合体に結合している）を、そのリガンドに特異的に結合する結合分子に結合させることによって分離する。結合分子は、リガンドに直接的（例えば、リガンドに対して特異的な結合相手）に結合してもよいし、間接的（例えば、リガンドのタグに対して特異的な結合相手）に結合してもよい。適当な結合分子としては、プロテインＡ、プロテインＧ、およびストレプトアビジンが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。結合分子はまた、自己免疫疾患またはガンのような異常を患う被験体の血清を用いて入手することも可能である。ある実施形態では、リガンドは、ｍＲＮＰ複合体の成分に、そのＦａｂ領域を通じて結合する抗体であり、結合分子は、抗体のＦｃ領域に結合する。

【００２３】

ある実施形態では、結合分子は支持体に付着される（例えば、ビーズ、ウェル、ピン、プレート、またはカラムのような固相支持体）。従って、ｍＲＮＰ複合体は、リガンドおよび結合分子を介して支持体に付着される。次に、ｍＲＮＰ複合体を、支持体から外す（例えば、適当な溶媒および、熟練した当業者には既知の条件を用いて）ことによって収集する。

【００２４】

本発明のある実施形態では、ｍＲＮＰ複合体は、リガンドをそれに結合させる前に、架橋結合によって安定化される。一般に、架橋結合は、共有結合（例えば、ｍＲＮＰ複合体の成分同士を共有的に結合させる）を含む。架橋結合は、物理的手段（例えば、加熱または紫外線照射）によって実行してもよいし、あるいは化学的手段（例えば、フォルムアルデヒド、パラフォルムアルデヒド、またはその他の既知の架橋仲介剤に、複合体を接触させること）によって実行してもよい。その方法は、従来技術に熟達した当業者には既知である。別の実施形態では、リガンドが、ｍＲＮＰ複合体に結合した後に、ｍＲＮＰ複合体に架橋結合される。さらに別の実施形態では、結合分子が、リガンドに結合した後にリガンドに架橋結合される。さらに別の実施形態では、結合分子は支持体に架橋結合される。

【００２５】

本発明の方法は、複数のｍＲＮＰ複合体の、同時的単離および特性解明を可能にする（例えば、「集合的」）。例えば、生物サンプルを、それぞれが別々のｍＲＮＰ複合体に対して特異的な複数のリガンドに接触させる。そのサンプルの複数のｍＲＮＰ複合体は、適当な特異的リガンドに結合する。次に、この複数のｍＲＮＰ複合体を、適当な結合分子を用いて分離し、その複数のｍＲＮＰ複合体を単離する。次に、このｍＲＮＰ複合体、およびそのｍＲＮＰ複合体の中に含まれるｍＲＮＡを、本明細書に記載される方法や、従来技術で既知の方法によって特性を解明し、および／または、特定する。あるいは、本発明の方法を一つのサンプルについて多数回行い、１回毎に別のリガンドを用いてｍＲＮＰ複合体を時系列的に特性解明し、特定する。

【００２６】

本発明の方法によって単離されたｍＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡから得られたｃＤＮＡの増幅は、本発明には必要ではないし、要求もされない。しかしながら、熟練した当業者であれば、従来技術で既知の数多くの核酸増幅法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ＱＴ－ＰＣＲ）、または鎖変位分析（ＳＤＡ））の中から任意に選ばれる方法に従って、特定された核酸を増幅することを選択するかも知れない。

【００２７】

（単離されたｍＲＮＰ複合体の分析）

本発明は、細胞の代謝状態または遺伝子発現状態を評価する方法を提供する。少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離して後、そのｍＲＮＰ複合体および／または少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体関連タンパクに関連する、少なくとも一つのｍＲＮＡの発現レベルを定量する。ある実施形態では、ある特定のｍＲＮＰ複合体におけるｍＲＮＡ（単複）またはｍＲＮＰ複合体関連タンパク（単複）の発現レベルは、例えば、機能的に関連する遺伝子産物サブセットの遺伝子発現を示すサブプロフィールを提供する。ある実施形態では、

ある特定のｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡサブセットは、機能的ＲＮＡネットワークまたは生物学的経路に特徴的なリボノームサブプロフィールを特定する。任意の特定の細胞または組織サンプルについてｍＲＮＡサブセットを収集した場合、その集合は、遺伝子発現プロフィールを構成する。さらに具体的には、その細胞または組織におけるリボノーム遺伝子発現を構成する。前述したように、リボノームプロフィールは細胞によってまちまちであることが理解されよう。従って、ある細胞のリボノームプロフィールは、その細胞の特定子として使用が可能であり、他の細胞のプロフィールまたはサブプロフィールと比較することが可能である。

【００２８】

従って、一つの局面において、本発明は、サンプルまたは細胞集団に存在する細胞タイプを評価する診断法を提供する。方法は、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体を単離し、そのｍＲＮＰ複合体の少なくとも一つの成分の発現を検出することを含み、前記少なくとも一つの成分は、ある細胞タイプに対して特異的であり、従って、その成分の発現の検出は、その細胞集団の中にその細胞タイプが存在することを示すものとする方法である。その成分は、全サンプル（例えば、組織または生物体）内において、または、細胞集団内においてある細胞タイプに特異的であってもよい。サンプル、または細胞集団は、例えば、腫瘍、組織、培養細胞、体液、器官、細胞抽出物、または細胞分解物であってもよい。本発明の方法はまた、細胞集団の中に存在する細胞タイプであって、内皮、上皮、および平滑筋を含むーただしそれらに限定されないー従来の細胞タイプを決定するために使用することも可能である。あるいは、本明細書で用いる細胞タイプはまた、特定の組織、特定の生物種、特定の分化状態、特定の病状、特定の細胞サイクル等から得られた細胞クラスを指すものであってもよい。

【００２９】

別の局面では、本発明は、機能的および／または構造的に関連する遺伝子および遺伝子産物を特定し、解明するための方法を提供する。少なくとも一つのｍＲＮＰが単離され、ｍＲＮＡおよび／またはｍＲＮＰ複合体関連タンパクが特定される。機能的に関連する遺伝子産物は、類似の経路、すなわち、酵素経路、疾患発生、腫瘍成長、アポトーシス、分化、加齢、または細胞毒性を含めたーただしこれらに限定されないー経路に関与する可能性がある。遺伝子産物をコードする遺伝子もまた標準法によって特定することが可能である。

【００３０】

単離されたｍＲＮＰ複合体は、一部はその成分の発現を全体として定量するために、または、その成分に分解するために調べることが可能である。ｍＲＮＰ複合体は、全体としてリガンドから分離することも可能であるし、または、ｍＲＮＡをリガンドーＲＮＡ結合タンパク複合体から分離し、その後ＲＮＡ結合タンパクをリガンドから分離することも可能である。あるいは、ｍＲＮＡがリガンドに結合している場合、ＲＮＡ結合タンパクをリガンドーｍＲＮＡ複合体から分離し、次に、ｍＲＮＡをリガンドから分離することも可能である。従来技術の実行者であれば、洗浄および化学反応を含めた、複数の成分を分離する標準法を弁えている。分離後、ｍＲＮＰ複合体の各成分を調べ、その名前、量、またはその他の特定因子を将来の参照用に記録しておく（例えば、コンピュータデータベースに）ことが好ましい。

【００３１】

本明細書に開示される方法に従って区画されたｍＲＮＰ複合体の上に、ｃＤＮＡを用いて相補的ｍＲＮＡを特定することが可能である。ｍＲＮＡサブセットを集合として特定するためにｃＤＮＡマイクロアレイグリッドを用いることが可能である。マイクロアレイは正確に配列されたグリッドで、その中に、各標的核酸（例えば、ｃＤＮＡ、オリゴヌクレオチド、または遺伝子）が、注意深く滴下されたｃＤＮＡのマトリックスの中に一つの位置を占める。マイクロアレイ上で試験される各標的核酸は配置される正確なアドレスを持ち、結合は定量することが可能である。マイクロアレイは、市販の基板（例えば、紙、ニトロセルロース、ナイロン、その他、任意のタイプの膜フィルター、チップ、例えば、シ

リコンチップ、ガラススライド、シリコンウェーファー、または、他の、適当な固相または弾力性支持体）として配置されてもよい。さらに、サンプル中のｍＲＮＡは、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」と呼ばれる過程である、結合および洗浄の厳格度に基づいて特定することが可能である。

【００３２】

ｍＲＮＡサブセット中のｍＲＮＡ等を特定し、配列決定し、および／またはその他のやり方で特性解明する別の方法として、差動ディプレイ、ファージディスプレイ、ＳＡＧＥ（遺伝子発現の連続分析）、および、ｍＲＮＡ調製標本からｃＤＮＡライブラリーの調製とライブライーメンバーの配列決定が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

【００３３】

従来技術でよく知られ、一般に利用可能なＤＮＡ配列決定用技術を用いて、本発明の実施形態の内から任意に選ばれるものを実行することが可能である。配列法は、ＤＮＡポリメラーゼのクレノウ断片、ＳＥＱＵＥＮＡＳＥ（登録商標）（Ｕ．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ，クリーブランド、オハイオ州）、Ｔａｑポリメラーゼ（パーキンエルマー、ボストン、マサチューセッツ州）、熱安定Ｔ７ポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ、シカゴ、イリノイ州）、または、ポリメラーゼと、Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（商標）、カールスバート、カリフォルニア州）によって市販されるＥｌｏｎｇａｓｅ（登録商標）増幅システムに認められるものと同じ校正エキソヌクレアーゼとの組み合わせを使用することが可能である。この過程は、装置、例えば、ハミルトンのマイクロラボ２０００（ハミルトン、レノ、ネバダ州）、ペルチエ熱サイクラー（ＰＴＣ２００）（ＭＪ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、ウォータータウン、マサチューセッツ州）、および、ＡＢＩキャタリストおよび、３７７３と３７７ＤＮＡシーケンサー（パーキンエルマー、シェルトン、コネチカット州）と共に自動化されることが好ましい。

【００３４】

ある実施形態では、本発明の方法は、細胞（例えば、発達中のもの、細胞周期変化を受けているもの、または、その他のやり方で、細胞変化または環境変化を受けているもの）から単離された核に対して、既知の技術による核放出アッセイを実行して、転写ｍＲＮＡを得、次に、この転写ｍＲＮＡを、同じ細胞のｍＲＮＰ複合体からｃＤＮＡマイクロアレイを用いて単離された全体的ｍＲＮＡレベルと比較することによって、実行される。従って、この方法は、定常な、集合的ｍＲＮＡレベルに及ぼす転写作用と転写後作用とを区別する方法を提供する。例えば、図２は、全体細胞ｍＲＮＡ（トランスクリプトーム）、核放出ｍＲＮＡ、および、ｍＲＮＰ複合体内で結合してリボノームの一部を形成するｍＲＮＡを比較する模式的イラストである。全体ＲＮＡ挿入図は、細胞（トランスクリプトーム）の中でマイクロアレイとして発現される全体ｍＲＮＡを示す。核放出実験を示すマイクロアレイは（左下段）は、単離核による転写とＡｔｌａｓ（商標）アレイ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ、パロアルト、カリフォルニア州）による分析によって得ることが可能である。定常レベルのｍＲＮＡを表すＲＮＡ蓄積を示す全体ＲＮＡ、すなわち転写プロフィールは、転写および転写後事象によって影響されるが、それと違って、核放出実験によって検出されるｍＲＮＡは、転写後事象の影響前の遺伝子の転写のみを表す。ｍＲＮＰ複合体を代表するマイクロアレイは、不連続で、トランスクリプトームまたは核放出よりも限局した数のｍＲＮＡサブセットを含む。ｍＲＮＰ複合体マイクロアレイは、ｍＲＮＰ－１からｍＲＮＰ－Ｘまで表示され、ｍＲＮＡ関連タンパクと反応する抗体を用いて単離されるｍＲＮＰ複合体に見出されるｍＲＮＡを示す。

【００３５】

ｍＲＮＰ複合体成分の特性を解明し、特定するその他の方法としては、標準検査室技術、例えば、逆転写または定量的ＰＣＲ、ＲＮアーゼ保護、ノーザンブロット分析、ウェスタンブロット分析、マクロまたはマイクロアレイ分析、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、および、免疫沈降が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。これらの方法から得られた結果は、ｍＲＮＡサブセットおよび、その他のｍＲＮＰ成分の機能的関係を解明するために、互いに比較され、対比される。

【００３６】
本発明の実施に有用である、ＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＰ複合体関連タンパクは従来技術で既知であり、あるいは、別のやり方で特定してもよいし、本明細書に記載される方法によって新たに発見されてもよい。ＲＮＡ結合タンパクは、各種調整・発達過程、例えば、ＲＮＡ処理と分画化、ｍＲＮＡスプライシングと輸送、ＲＮＡ安定化、ｍＲＮＡ翻訳、および、ウィルス遺伝子発現の制御に関与する。有用なＲＮＡ結合タンパクの例としては、ポリＡ結合タンパク（“ＰＡＢＰ”）、および、ショウジョウバエＥＬＡＶ　ＲＮＡ結合タンパクに対する４個のＥＬＡＶ／Ｈｕ哺乳類相同体が挙げられる。ＨｕＡ（ＨｕＲ）は普遍的に発現されるが、一方、ＨｕＢ，ＨｕＣおよびＨｕＤ（および、それぞれの、オールタナティブスプライシングによって生じる異性形も）は、主に神経組織に見出される。ＨｕＢ、ＨｕＣおよびＨｕＤはまた、いくつかの小細胞ガン、神経芽細胞腫、および骨髄芽細胞腫において腫瘍細胞特異的抗原としても発現される。Ｈｕタンパクは全て、ＡＵ富裕不安定要素（ＡＲＥ）に対して結合特異性を与える、３種のＲＮＡ－認識モチーフを含む。Ｈｕタンパクは、インビトロにおいて、ｃ－ｍｙｓ、ｃ－ｆｏｓ、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＧＡＰ－４３を含む、いくつかの、ＡＲＥ－含有早期反応性遺伝子ｍＲＮＡに対して結合する。ＡＲＥ－含有ｍＲＮＡに対するＨｕタンパクの結合は、ｍＲＮＡ転写物の安定と翻訳性の増大をもたらす。神経細胞特異的Ｈｕタンパクは、神経分化を誘発するためのレチノール酸治療後に、奇形ガン細胞において生産される、もっとも早期の神経細胞マーカーの一つである。

【００３７】
その他の例示のＲＮＡ結合タンパクは、前ｍＲＮＡ処理に関与する細胞タンパクのＲＮＡ認識モチーフファミリーから選択される。そのようなタンパクの一つの例は、Ｕ１ＡｓｎＲＮＰタンパクである。ＲＮＡ認識モチーフスーパーファミリーに関しては今日まで２００を越えるメンバーが報告されており、その大部分が普遍的に発現されており、系統的に保存されている。多くは、ポリアデニレートｍＲＮＡ、または核内小型リボ核酸（例えば、Ｕ１、Ｕ２等）、転移ＲＮＡ、５Ｓまたは７Ｓ　ＲＮＡに対して結合特異性を持つ。そのようなメンバーとして、ｈｎＲＮＰタンパク（Ａ、Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅ、Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ、Ｋ，Ｌ）、ＲＮＡ認識モチーフタンパクＣＡｒＧ、ＤＴ－７、ＰＴＢ、Ｋ１，Ｋ２、Ｋ３、ＨｕＤ、ＨＵＣ、ｒｂｐ９、ｅｌＦ４Ｂ、ｓｘｌ、ｔｒａ－２、ＡＵＢＦ、ＡＵＦ、３２ＫＤタンパク、ＡＳＦ／ＳＦ２、Ｕ２ＡＦ、ＳＣ３５、およびその他のｈｎＲＮＰタンパクが挙げられる。ＲＮＡ認識モチーフファミリーの組織特異的メンバーは上記のメンバーほど一般的ではないが、ＩＭＰ、Ｂｒｕｎｏ、ＡＺＰ－ＲＲＭＩ、前Ｂ細胞で発現されるＸ１６、ｐｕｆ特異的ショウジョウバエタンパクであるＢｊ６、および、神経細胞特異的であるＥＬＡＶ／Ｈｕを含む。本発明の方法の実施において有用なＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＰ複合体関連タンパクは、自己免疫およびガン患者の血清から単離されるものを含む。本発明の実施に有用なＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＰ複合体関連タンパクの、非網羅的リストを下記の表１に記載する。

【００３８】
（表１　ＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＰ複合体関連タンパク）

【００３９】

【表１】

SLBP	DAN	TTP
Hel-N1	Hel-N2	eIF-4A
eIF-4B	eIF-4G	eIF-4E
eIF-5	eIF-4EBP	MNK1
PABP	p62	KOC
p90	La	Sm
Ro	U1-70K	AUF-1
RNAse-L	GAPDH	GRSF
リボソームのP0,P1,P2/L32	PM-Scl	FMR
シュタウフェン(Stauffen)	Crab 95	TIA-1
Upf1	RNA BP1	RNA BP2
RNA BP3	CstF-50	NOVA-1
NOVA-2	CPEBP	GRBP
SXL	SC35	U2AF I
ASF/SF2	ETR-1	IMP-1
IMP-2	IMP-3	ZBP
LRBP-1	Barb	PTB
UPAmRNA BP	BARB1	BARB2
GIFASBP	CYP mRNA BP	IRE-BP
p50	RHA	FN mRNA BP
AUF-1	GA mRNA BP	ビリジン(Vigillin)
ERBP	CRD-BP	HuA
HuB	HuC	HuD
HnRNP A	hnRNP B	hnRNP C
HnRNP D	hnRNP E	hnRNP F
HnRNP G	hnRNP H	hnRNP K
HnRNP L	U2AF	

本明細書に記載の技術は、新規の（すなわち、新奇の、または従来未知の）ＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＰ複合体関連タンパクを特定するのに用いられる（図３）。従って、本発明の一つの実施形態では、対象とするｍＲＮＡ（図３では“ＲＮＡ　Ｙ”と表示される）は、新規のＲＮＡ結合タンパクを捕捉するための「餌」として使用される。好ましくは、ＲＮＡ　Ｙは、先ず、標準的分子生物学的手法を用いてｃＤＮＡに変換され、次に、３′または５′末端において、本発明のリガンドと結合する配列をコードするＤＮＡタグに連結される（リガンドは、図３ではタンパク“Ｘ”と描かれている）。言い換えると、このタグ付きＤＮＡは、リガンドの結合相手をコードする。得られた融合ＲＮＡは細胞内で発現され、そこで内因性のＲＢＰが結合し、ＲＮＡ　Ｙと相互作用を持つことが可能となる。次に細胞は分解され、セルフリーの抽出物が調製され、あらかじめ固相支持体マトリックス上に不動化されたタンパクＸと接触させられる。インキュベーション後、タンパクＸおよび付着ＲＮＡ融合分子とその会合ＲＮＡ結合タンパクは洗浄されて、残余の細胞物質が取り除かれる。洗浄後、新たに単離されたＲＮＡ結合タンパクが、ＲＮＡ－タンパク複合体から外され、タンパク微細配列決定法によって特定される。有用なリガンドとしては、ｍＲＮＰ複合体特異的抗体またはタンパク（例えば、自己免疫障害またはガンの被験体から得たもの）、またはタンパク（例えば、ＭＳＩＩコートタンパク）が挙げられる。有用な結合相手としては、リガンドに対して特異的な抗体が挙げられる。

【００４０】

一旦部分的タンパク配列が得られたならば、対応するＲＮＡ結合タンパク遺伝子は、ｃＤＮＡおよびゲノム配列に関する既知のデータベースから特定され、または、ｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーから単離され特定される。遺伝子は単離され、タンパクは発現され、抗体は、既知の技術を用いて組み換えＲＮＡ結合タンパクに対して生成されるのが好ましい。次に、この抗体を用いて、内因性ＲＮＡ結合タンパクを回収し、その内容を確認する。次に、この抗体をリボノーム分析に用いて、ＲＮＡ　Ｙと集合する（すなわち、関連する）細胞ＲＮＡセットを定める。ＲＮＡ結合タンパクについてさらに、ＲＮＡ　Ｙに

よってコードされるタンパク翻訳の調整能力を試験し、薬剤標的としての有効性を試験する。同様にして、本明細書において後述するように、ＲＮＡ　Ｙと集合する細胞ＲＮＡによってコードされるタンパクについても薬剤標的としての有効性を試験する。

【００４１】

（治療標的の特定）

本発明は、ある細胞サンプルのリボノームサブプロフィールを、コントロールサンプルのリボノームサブプロフィールと比較することによって、治療標的を特定する方法を提供する。ｍＲＮＰ複合体のある成分の発現において二つのサンプルの間に見られる差は、その成分が治療標的候補であることを示す。治療標的としては、ｍＲＮＰ複合体の任意の成分、または、その核酸または遺伝子産物が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。本発明のある実施形態では、細胞サンプルは試験化合物で処理され、コントロールサンプルは、試験化合物で処理されない細胞を含む。別の実施形態では、コントロールサンプルは、成長サイクルにおいて、試験サンプル中の細胞とは別の段階にある細胞を含む。さらに別の実施形態では、細胞サンプルは、腫瘍細胞、または他の病んだ細胞を含み、コントロールサンプルは正常細胞を含む。標的特定としては、従来技術の実行家には既知の方法、例えば、ライブラリーのスクリーニング、ペプチドファージディスプレイ、ｃＤＮＡマイクロチップアレイスクリンーニング、および、従来技術の実行家には既知の組み合わせ化学技術が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。標的発見に至る工程の要約を図９に示す。

【００４２】

（治療薬の特定）

別の局面で、本発明は、試験化合物の治療剤としての効力を評価する方法を提供する。細胞サンプルを試験化合物に接触させ、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体と関連する少なくとも一つの遺伝子産物の発現を含む、細胞サンプルのリボノームプロフィールまたはサブプロフィールを調製する。細胞サンプルにおける遺伝子産物の発現レベルを、コントロールサンプル（例えば、試験化合物に接触していない細胞サンプル）における遺伝子産物の発現レベルと比較する。処理した細胞サンプルと未処理の細胞サンプルの間に見られる、遺伝子産物の発現の差は、この試験化合物が治療剤の可能性を持つことを示す。試験化合物は、例えば、核酸、ホルモン、抗体、抗体断片、抗原、サイトカイン、成長因子、薬理学的因子（例えば、化学療法剤、発ガン性物質、またはその他の細胞）、化学的組成物、タンパク、ペプチド、および／または、小型分子であってもよい。

【００４３】

本発明の各種実施形態では、治療剤は、ｍＲＮＡまたはｍＲＮＰ複合体関連タンパクを安定化する、または脱安定化するものであってもよい。別の実施形態では、治療剤は、例えば、ｍＲＮＡの翻訳を抑制しても、ｍＲＮＡまたはｍＲＮＰ複合体関連タンパクの輸送を抑制しても、ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＡへの結合を抑制しても、ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＰ複合体関連タンパクへの結合を抑制しても、または、ｍＲＮＡのｍＲＮＰ複合体関連タンパクへの結合を抑制しても、そのいずれかであってもよい。

【００４４】

別の局面では、本発明は、試験化合物の毒性、予想される副作用、特異性、または選択性を、例えば、細胞サンプルを処理するのに用いられる試験化合物の濃度または量を変えることによって評価する方法を提供する。

【００４５】

さらに別の局面では、本発明は、被験体における治療剤の効力を評価、またはモニタリングする方法を提供する。本発明によれば、治療剤の有効量が被験体に投与される。その治療剤の投与によってｍＲＮＰ複合体と関連する遺伝子産物の発現変化が変化させられた、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体が、被験体の細胞サンプルから単離される。治療剤投与後に細胞サンプルに見られる遺伝子産物の発現を、コントロールサンプル（例えば、治療剤の投与前に、または、正常被験体から得られた第２細胞サンプル）における遺伝子産物の発現と比較する。処理細胞サンプルと未処理細胞サンプルの間に見られる発現差は治

療剤の効力を示す。前述の試験は、治療剤の連続効力をモニタリングするために一定期間繰り返すことも可能である。

【００４６】

治療剤は、疾患、障害、または状態の発生に関与する過剰発現または過小発現タンパクを標的にしてもよい。このような過剰発現または過小発現は、ＲＮＡの脱安定化または安定化をもたらす可能性があるからである。

【００４７】

（ｍＲＮＡを脱安定化する治療剤）

ある疾患、状態、または障害が、あるタンパクの過剰発現で特徴づけられる場合、そのような状態の治療のための治療剤は、そのタンパクの発現を抑えるまたは根絶するものである。例えば、ＲＮＡ結合タンパクは、ガン原遺伝子をコードする短命のｍＲＮＡ、成長因子、および細胞増殖に寄与するサイトカインの安定性を強化するものであるから、ＲＮＡ結合タンパク生産の抑制は、ガンまたは自己免疫疾患のような疾患を緩和する可能性がある（例えば、それぞれ、腫瘍成長または炎症を抑制することによって）。さらに、いくつかのヒト腫瘍におけるＲＮＡ結合タンパクの過剰発現は、化学療法およびＵＶ放射に対する耐性と相関する。ＵＶ放射または治療薬剤に応じて、ｃ－ｆｏｓ、ｃ－ｍｙｃ、サイクリンＢ１、およびその他の短命ｍＲＮＡの安定度が増すことはよく知られる。従って、これらの腫瘍におけるＲＮＡ結合タンパク発現の抑制は、腫瘍におけるｍＲＮＡの脱安定化をもたらし、結果、腫瘍の、ガン治療に対する反応性をより高める。

【００４８】

対象とするタンパクの過剰発現を抑える、または停止させるために、適当な試験化合物（例えば、ＲＮＡ結合タンパク阻害剤）の有効量を、インビトロまたはインビボで投与することによって、そのｍＲＮＡを脱安定化することが可能である。試験化合物は、例えば、ｍＲＮＡに対するＲＮＡ結合タンパクの結合を抑制するやり方でｍＲＮＡに結合する、ｍＲＮＡに対するＲＮＡ結合タンパクの結合を抑制するやり方でＲＮＡ結合タンパクに結合する、直接ｍＲＮＡを脱安定化させるようにｍＲＮＰ複合体に結合し脱安定化する、および／または、ｍＲＮＡに結合するようにしてもよい。ｍＲＮＡに結合はするが、ｍＲＮＡを安定化させない化合物は、ｍＲＮＡ結合タンパクがｍＲＮＡを安定化させる能力を抑制する可能性がある。この化合物が、ＲＮＡ結合タンパクと競合的に結合する場合、この化合物は、ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＡ結合能力を抑制することによって、ｍＲＮＡの安定度を下げることが可能である。

【００４９】

あるいは、試験化合物は、ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡ発現を抑制してもよい。

【００５０】

効果的試験化合物（例えば、ＲＮＡ結合タンパク阻害剤）は、複数の化合物について、それらのＲＮＡ結合タンパクの生産を干渉する能力、または、例えば、ｍＲＮＡに対する結合、および／または、安定化を抑制する能力を本明細書に記載する方法を用いてスクリーニングすることによって、簡単に確定することが可能である。ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡ生産を抑制することによって機能する化合物は、対象とするＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡを発現する細胞をその試験化合物に暴露し、それぞれ、ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡのレベルをモニタリングすることによって特定することが可能である。ｍＲＮＡに対するＲＮＡ結合タンパクの安定化作用を抑制することによって機能する化合物は、その他の場合では安定化される筈のＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡとを混合し、ＲＮＡ結合タンパク阻害剤として評価される複数の化合物を加え、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡの間の結合親和度をモニタリングすることによって特定することが可能である。ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡの結合親和度を増大させる、または低減させる化合物は、従来技術で既知の方法によって簡単に確定することが可能である。

【００５１】

（ｍＲＮＡを安定化させる治療剤）

ある疾患、状態、または障害が、ｍＲＮＡ安定化タンパクの過小発現で特徴づけられる

場合、そのような医学的状態の治療のための治療剤は、その過小表現タンパクと関連するｍＲＮＡを安定化することによって効果を現すことが可能である。したがって、ある化合物の有効量を、インビトロまたはインビボで投与することによって、ｍＲＮＡを安定化してもよい。その化合物は、ＲＮＡ結合タンパクと同様の結合能および安定化作用を持ってもよいし、あるいは、ＲＮＡ結合タンパクの、ｍＲＮＡ安定化能力を増進してもよいし、および／または、対象とする安定化ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡの生産を促進してもよい。このような化合物は、ＲＮＡ結合タンパク誘導因子と呼んでよく、ｍＲＮＡ、ＲＮＡ結合タンパク、またはその両方と相互作用を持つことによって動作してもよい。あるいは、ｍＲＮＡは、必要なｍＲＮＡ安定化作用を持つ適当なＲＮＡ結合タンパクの有効量を投与することによって安定化することも可能である。

【００５２】

ＲＮＡ結合タンパク生産を増す化合物は、前述の方法に従って、先ず、ＲＮＡ結合タンパクを発現する細胞を誘導因子候補に暴露し、ＲＮＡ結合タンパクのレベルをモニタリングすることによって特定することが可能である。ＲＮＡ結合タンパクの発現レベルが増大する場合、その化合物はＲＮＡ結合タンパク誘導因子である。ｍＲＮＡに対するＲＮＡ結合タンパクの結合は抑制するが、ｍＲＮＡには結合し、安定化させる化合物は、本明細書に開示される方法によって特定することが可能である。実技に長けた当業者は、その他の条件であれば安定化される筈のＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡを混合し、化合物を加え、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡとの結合親和度をモニタリングするであろう。ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡとの結合親和度を増大させる、または低減させる化合物は、本明細書に記述する通り、化合物への暴露後、ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＡに対する結合親和度を評価することによって簡単に確定することが可能である。次に、ｍＲＮＡの濃度の時間的変化をモニタリングすることによって、ｍＲＮＡに結合する化合物について、そのｍＲＮＡ安定化能力を評価することが可能である。

【００５３】

（抗体調製）

ｍＲＮＰ複合体に結合する抗体、およびその断片は、従来技術でよく知られる方法を用いて生成される。このような抗体としては、ポリクロナール、モノクロナール、キメラ、１本鎖、Ｆａｂ断片、および、Ｆａｂ発現ライブラリーによって生産される断片が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。抗体およびその断片は、従来技術で既知の抗体ファージディスプレイ技術によって生成されてもよい。

【００５４】

抗体の生産のためには、各種宿主、すなわち、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、およびヒトを含めた宿主が、ｍＲＮＰ複合体、または、免疫原性を持つ、その任意の断片または成分を注入することによって免疫化される。宿主の動物種に従って、免疫反応を増大させるためにアジュバントが使用される。そのようなアジュバントとしては、水酸化アルミのようなフロイントの鉱物ゲル、および、表面活性物質、例えば、リソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントの中では、ＢＣＧ（カルメットゲラン桿菌）、および、コリネバクテリウムパルブムが好ましい。

【００５５】

ｍＲＮＰ複合体の成分に対するモノクロナール抗体は、培養細胞系統による抗体分子の生産を可能とする技術から選ばれる任意の技術によって調製される。このような技術としては、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術、および、ＥＢＶ－ハイブリドーマ技術が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。一般に、動物は、ｍＲＮＰ複合体、またはその免疫原性断片（単複）、またはその接合体（単複）によって免疫化される。次に、リンパ様細胞（例えば、脾臓リンパ球）を免疫化された動物から入手し、恒久化細胞（例えば、骨髄腫細胞またはヘテロ骨髄腫細胞）と融合させて、ハイブリッド細胞を生産する。このハイブリッド細胞をスクリーニングし、所望の抗体を生産する抗体と特

定する。

【００５６】

抗体はまた、リンパ球集団においてインビボ生産を誘導することによって、あるいは、従来技術で既知の通りに、高度の特異的結合試薬から成る免疫グロブリンライブラリーまたはパネルをスクリーニングすることによって生産することが可能である。

【００５７】

ｍＲＮＰ複合体に対する特異的結合部位を含む抗体断片を生成することも可能である。例えば、そのような断片としては、抗体分子のペプシン消化によって生産されるＦ（ａｂ′）$_2$断片、および、Ｆ（ａｂ′）$_2$断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるＦａｂ断片が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。あるいは、所望の特異性を持つモノクロナールＦａｂ断片の速やかで、簡単な特定を可能とするために、Ｆａｂ発現ライブラリーが構築される。

【００５８】

ｍＲＮＰ複合体に対する所望の特異性を持つ抗体を特定するために、様々のイムノアッセイが用いられる。定められた特異性を持つポリクロナールまたはモノクロナール抗体による競合結合、または免疫放射能測定アッセイに関する数多くのプロトコールは従来技術でよく知られる。このようなイムノアッセイは、通常、ｍＲＮＰ複合体の成分と、その特異的抗体の間に起こる複合体形成の測定を含む。二つの、非干渉的エピトープに反応するモノクロナール抗体を利用するイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイも使用が可能である。

【００５９】

本発明は、各種ｍＲＮＰ複合体、またはその成分（例えば、ＲＮＡ結合タンパクに対する抗体）が不動化されるカラムを含むキットを提供する。抗体は、既知の技術に従って、診断用アッセイに好適な支持体（例えば、ラテックスまたはポリスチレンのような材料で形成されるビーズ、プレート、スライド、またはウェルのような固相支持体）に接合されてよい。同様に、抗体は、既知の技術に従って、検出可能な基、例えば、放射性ラベル（例えば^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、酵素ラベル（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ）、および、蛍光ラベル（例えば、フルオレセイン）に接合されてもよい。このような装置は、抗体とＲＮＡ結合タンパクの間の結合を検出するのに特異的な少なくとも一つの試薬を含むことが好ましい。試薬はまた、バッファー剤およびタンパク安定化剤（例えば、多糖類等）のような補助剤を含んでもよい。装置はさらに、要すれば、試験、コントロール試薬、試験を実施する装置等において背景干渉を低減させる試薬を含んでもよい。装置は、適切であれば、どのようなやり方で包装されてもよいが、通常は、試験を実施するための印刷された指令書と共に全ての要素が単一の容器に収められる。

【００６０】

ｍＲＮＰ複合体に対して惹起された抗体は薬剤に接合してもよい。患者に投与されると、この抗体はｍＲＮＰ複合体に結合するから、比較的高濃度の薬剤を、所望の組織または器官に搬送することが可能になる。一つの実施形態では、抗体は、抗ガン剤、すなわち、抗葉酸塩物質、抗腫瘍抗生物質、およびその他の腫瘍治療化合物を含む抗ガン剤に接合される。

【００６１】

ｍＲＮＰ複合体に結合する抗体はまた、各種マーカーに共有的にまたはイオン的に結合させ、腫瘍の存在を検出するのに使用することが可能である。適当量のマーカー結合抗体を患者に投与し、抗体を、腫瘍部位の、またはその周囲のｍＲＮＰに結合させ、マーカーを検出することによって、腫瘍の存在を検出することが可能である。適当なマーカーは従来技術でよく知られており、放射性同位元素マーカー、蛍光ラベル等が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。これらのマーカーのための適当な検出法は従来技術でよく知られており、ポジトロン発射断層撮影法、オートラジオグラフィー、フローサイトメトリー、放射受容体結合アッセイ、および、免疫組織化学が挙げられるが、ただしそれらに限

定されない。

【００６２】

（化合物ライブラリー用高処理スクリーニング法）

本発明の一つの実施形態では、化合物の併合ライブラリー（例えば、ファージディスプレーペプチドライブラリー、小型分子ライブラリー、およびオリゴヌクレオチドライブラリー）において、ｍＲＮＰ複合体、またはその成分に結合する化合物を特定するために、高処理能力スクリーニングアッセイおよび競合結合アッセイが使用される。

【００６３】

一つの実施形態では、ｍＲＮＰ成分、その触媒的、または免疫原性断片、またはそのオリゴペプチドを用いて、各種の薬剤スクリーニング技術の中から任意に選ばれる技術を用いて、化合物のライブラリーをスクリーニングすることが可能である。例示の技術は公刊されたＰＣＴ出願ＷＯ８４／０３５８４に記載される。なお、この出願を参照することにより本明細書に含める。このスクリーニングに使用される断片は、溶液中で遊離する、支持体（例えば、固相支持体に付着する、細胞表面に運ばれる、または、細胞内に局在する。

【００６４】

米国特許第５，２７０，１６３号（Ｇｏｌｄ等）－参照することにより本明細書に含める－に記載されるＳＥＬＥＸ法を用いて、オリゴヌクレオチドライブラリーをスクリーニングして、適当な結合特性を持つ化合物を求める。ＳＥＬＥＸ法によれば、ランダム化配列領域を含む１本鎖核酸の候補混合物をｍＲＮＰ複合体に接触させることが可能である。ｍＲＮＰ複合体に対して親和度を漸増させる核酸を分画し、増幅して、リガンド濃縮混合物を生成することが可能である。

【００６５】

ファージディスプレー技術を用いてペプチドファージディスプレーライブラリーをスクリーニングし、ｍＲＮＰ複合体、またはその成分に結合するペプチドを特定する。各種の分子、例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク、およびその断片から成る多様な集団を含むライブラリーを調製する方法は、従来技術で既知であり、また市販もされている。

【００６６】

ファージディスプレーされた、結合が予想されるペプチドから成るライブラリーをｍＲＮＰ複合体と共にインキュベートし、ｍＲＮＰ複合体またはその成分に特異的に結合する組み換えペプチドをコードするクローンを選択する。少なくとも１回のバイオパンニング（ｍＲＮＰ複合体への結合）の後、ファージＤＮＡを増幅し、配列決定し、それによって、ディスプレーされる結合ペプチド用の配列を供給する。簡単に言うと、標的、すなわちｍＲＮＰ複合体を組織培養プレートに一晩コートして、高湿度の容器内でインキュベートする。第１回のパンニングでは、約2×10^{11}のファージを、室温で６０分優しく揺すりながらタンパクをコートしたプレート上でインキュベートする。次に、プレートを、標準的洗液で洗浄する。次に、結合ファージを集め、標的タンパクによる溶出後増幅する。必要に応じて、２回目３回目のパンニングを実行することも可能である。最終パンニング後、ファージ感染細菌から成る個別のコロニーをランダムに採取し、ファージＤＮＡを単離し、ジデオキシ配列自動決定装置に委ねる。ディスプレーされるペプチドの配列は、そのＤＮＡ配列から導出することが可能である。

【００６７】

化合物の生物活性は、従来技術に熟練した当業者によって既知のインビトロアッセイ（例えば、タンパク合成アッセイ、または腫瘍細胞増殖アッセイ）によって評価することが可能である。あるいは、化合物の生物活性はインビボにおいて評価される。抗生物質を含めた各種化合物が、ｍＲＮＰ複合体およびその成分に対し、ｍＲＮＡ安定性に対してはまちまちの作用を及ぼしながら、結合することが可能である。一旦結合した化合物の活性は、本明細書に記載される方法を用いて簡単に定量することが可能である。

【００６８】

結合アッセイとしては、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＡとが、標識試験化合物と共にイ

ンキュベートされる、セルフリーアッセイが挙げられる。インキュベーション後、従来技術で既知の各種技術の内から任意に選ばれるものを用いて、ｍＲＮＡを、遊離のものも、試験化合物に結合したものも、未結合試験化合物から分離することが可能である。次に、ｍＲＮＰ複合体またはその成分に結合した試験化合物の量を、従来技術で基地の検出技術を用いて定量する。

【００６９】

あるいは、結合アッセイは、セルフリー競合結合アッセイである。このアッセイでは、ｍＲＮＡは標識ＲＮＡ結合タンパクとインキュベートされる。この反応系に試験化合物が添加され、ｍＲＮＡに対して、ＲＮＡ結合タンパクと結合を競い合う、その競合能力に関してアッセイされる。遊離の標識ＲＮＡ結合タンパクは、結合ＲＮＡタンパクから分離することが可能である。次に、結合したＲＮＡ結合タンパクの量を定量することによって、試験化合物の、ｍＲＮＡ結合を求めて競い合う競合能力が評価される。このアッセイは、ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡを支持体に連結し、洗浄によって簡単に未結合反応物質が除去されるようにして、多数の試験化合物のスクリーニングがやり易くなるように方式化することが可能である。プラスチック支持体（例えば、９６ウィル皿のようなプラスチックプレート）が好ましい。本明細書に記載されるセルフリーアッセイに使用が好適なＲＮＡ結合タンパクおよびｍＲＮＡは、天然の供給源（例えば、膜標本）から単離してもよいし、組み換え的にまたは化学的に調製してもよい。ＲＮＡ結合タンパクは、例えば、既知の組み換え技術を用いて、融合タンパクとして調製することが可能である。好ましい融合タンパクとしては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）成分、細胞局在実験に有用な緑色蛍光タンパク（ＧＦＰ）成分、または、アフィニティー精製に有用なＨｉｓタグが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

【００７０】

競合結合アッセイも細胞依存性であることが可能である。従って、ｍＲＮＰ複合体またはその成分に結合することが知られる化合物、好ましくは、標識化合物を、試験化合物の存在下に、また不在下に、そのｍＲＮＰ複合体またはその成分とインキュベートする。試験化合物の存在下にインキュベートされた細胞に会合する既知の試験化合物の量を、試験化合物の不在下にインキュベートされた細胞でのものと比較することによって、ＲＮＡ結合タンパク、ｍＲＮＡ、および／または、それらの複合体に対する、試験化合物の親和度を定量することが可能である。細胞増殖は、従来技術で知られるように、標識塩基（例えば、放射活性的に、例えば^{3}Ｈ，ＳｉＣ、または^{14}Ｃ；蛍光的に、例えば、ＣＹＱＲＡＮＴ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅ）；または、比色的に、例えば、ｒｄＵ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）またはＭＴＳ（Ｐｒｏｍｅｇａ））の、細胞核酸への取り込みを測定することによってモニタリングすることが可能である。サイトソル／原形質ｐＨ測定は、基質、例えば、ビス（カルボキシエチル）－カルボニルフルオレセイン（ＢＣＥＣＦ）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，ユージン、オレゴン州）を用いてディジタル画像顕微鏡によって実行することが可能である。

【００７１】

ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＡに対する結合に及ぼす、試験化合物の作用を定量するために実行が可能な、他のタイプのアッセイとしては、ルイスの肺ガンアッセイおよび、ボイデンチェンバーアッセイのような細胞外移動アッセイが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

【００７２】

従って、この方法は、複数の試験化合物において、それらが、ＲＮＡ結合タンパクがｍＲＮＡへの結合および安定性に及ぼす作用を修飾する能力に関してスクリーニングすることを可能とする。本明細書に記載するアッセイを用いることによって、ｍＲＮＡに結合し、かつ、ｍＲＮＡ安定性および関連タンパク合成によってもたらされる細胞活性に及ぼす作用を修飾することが可能な化合物が特定される。前記アッセイによって特定される化合物は、治療組成物と処方される。

【００７３】

（疾患の診断およびモニタリング）

別の局面では、本発明は、被験体の疾患、または疾患に罹る危険度を診断するための方法を提供する。ある被験体の細胞サンプルからリボノームプロフィールが調製され、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体が分析される。その発現変化は疾患または疾患の危険度を示すとされる、少なくとも一つの遺伝子産物の発現を定量する。この遺伝子産物は、ＲＮＡ結合タンパク、ｍＲＮＡ、ｍＲＮＰ複合体関連タンパク、または、そのｍＲＮＰ複合体に結合する、または、関連する他の遺伝子産物であってもよい。この細胞サンプル中の遺伝子産物の発現を、コントロールサンプル中の遺伝子産物の発現と比較する。コントロールサンプルは、正常細胞のサンプル、または、同じ被験体から得た第２の細胞サンプルであってもよい。あるいは、コントロールサンプルは、疾患の、および／または、正常な個体から得た陽性コントロールである。コントロールサンプルと比べた場合の細胞サンプルにおける遺伝子産物の相対的発現度を観察することによって、疾患の存在、または疾患の危険度を確定することが可能である。

【００７４】

別の局面では、本発明は、被験体における病状をモニタリングする方法を開示する。疾患の被験体の細胞サンプルから、その疾患と関連する少なくとも一つの遺伝子産物を有する、少なくとも一つのｍＲＮＰ複合体が単離される。被験体の細胞サンプルにおける遺伝子産物の発現は、コントロールサンプルにおける遺伝子産物の発現と比較される。コントロールサンプルにおける遺伝子産物の発現と比較した場合に疾患の被験体の細胞サンプルの遺伝子産物の発現に見られる差を特定することは、被験体の病状の変化を示すことになる。例えば、腫瘍関連抗原またはそのｍＲＮＡ生産の減少は、腫瘍負荷の減少または寛解を示す。逆に、腫瘍抗原の発現の増大は、激しい腫瘍成長を示す。投薬治療中におけるこのようなモニタリングは、被験体の薬剤投与スケジュールの効果に関する情報を提供し、その疾患または状態を治療するのに、ある特定の処方が効果的ではない、または、もはや効果的ではない時期を示す可能性がある。コントロールサンプルは、被験体から、好ましくは、その被験体が疾患の一つ以上の症状を持たない時期に得られた第２の細胞サンプルであってもよい。あるいは、コントロールサンプルは、正常な被験体、またはその他の正常な細胞サンプルから得たものである。

【００７５】

要約すると、本発明は、インビボにおいて、細胞のリボノームプロフィールを確定し、リボノームプロフィールにおける変化を検出するための方法を提供する。本発明は数多くの用途を持ち、その中には、細胞発達または成長のモニタリング、細胞状態のモニタリング、生物系の擾乱、例えば、疾患、状態、または障害のモニタリングが含まれるが、ただしそれらに限定されない。本発明はさらに、疾患、状態、または障害を診断し、適当な治療処方を確立するための方法を提供する。本発明はまた、生物、例えば、植物、真菌、細菌、ウィルス、原虫類、または動物種におけるリボノームプロフィールを識別するのに有用である。

【００７６】

本発明を用いて、遺伝子発現に貢献する転写要素および後転写要素を区別することが、また、ｍＲＮＰ複合体を経由するＲＮＡの動き、すなわち、ｍＲＮＰ複合体におけるタンパクとＲＮＡの混合相互作用を含めた動きを追跡することが可能である。従って、本発明を用いてＲＮＡ安定度の制御を調べることが可能である。本発明を用いて、活性ポリソームに対するｍＲＮＡの召集を追跡し、ｍＲＮＡ、例えば、転写因子またはＲＮＡ結合タンパクをコードするｍＲＮＡの継時的で、整然とした発現を測定し、かつ、複数のｍＲＮＡの同時的、調和的発現を測定することによって、単一の、または複数分子種としてのｍＲＮＡ翻訳の活性化を調べることが可能である。本発明を用いて、他の細胞成分と接触した際に見られるＲＮＡ自身の折衝機能を定量することも可能である。上記、および他の多くの用法については、熟練した当業者には本明細書と請求項を研究することによって明白となろう。

【００７７】

全ての引用文献（文献資料、特許公報、および特許出願を含む）の内容は、本出願を通じて引用された通りに、参照することによって本明細書に含まれることをここに明言する。下記の実施例は、本発明を具体的に明らかにするために記載されるもので、本発明を限定するものと考えてはならない。

【実施例】

【００７８】

（例示）

（実施例１：複数プローブシステムにおけるＲＮアーゼ保護）

様々なＲＮＡ結合タンパクを含む、いくつかの内因性ｍＲＮＰ複合体の免疫沈降を速やかに最適化するために複数プローブＲＮアーゼ保護アッセイを用いた。この複数プローブシステムでは、一つのｍＲＮＰ複合体に関連する多数のｍＲＮＡを、ポリアクリアミドゲルの単一レーンにおいてアッセイすることが可能である。

【００７９】

細胞培養および形質変換。げっ歯類Ｐ１９胚性ガン細胞を、アメリカ標準株収集施設（ＡＴＣＣ、マナサス、バージニア州）から入手し、イーグルのα－最小必須培地（ＭＥＭ）で、フェノールレッド（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ４１０６１－０２９１）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，カールスバード、カリフォルニア州）の添加無し、７．５％仔ウシ血清（ＢＣＳ）と２．５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）（Ｈｙｃｌｏｎｅ、ローガン、バーモント州）と１００Ｕのペニシリン／ストレプトマイシンの添加有り、による単層培養にて維持した。細胞は、あらかじめ０．１％ゼラチン（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、セントルイス、ミズーリ州）でコートし使用前に取り除いた、組織培養用フラスコまたはプレートで育成した。単層細胞培養物は、３７℃で５％CO_2中に維持した。

【００８０】

Ｐ１９細胞は、ＳＶ４０プロモーター駆動ｐアルファ２－遺伝子１０－ＨｕＢプラスミドによって安定にトランスフェクトされた。このプラスミドは、遺伝子１０にタグされた神経細胞特異的ＨｕＢタンパク（Ｈｅｌ－Ｎ２と呼ばれる）を局外に発現した。トランスフェクトプラスミドの発現は、培養液に０．２ｍｇ／ｍｌのＧ４１８（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、セントルイス、ミズーリ州）を添加することによって維持した。この構築体は、Ｈｅｌ－Ｎ１のＲＮＡ認識モチーフ２および３を接続するヒンジ領域における１３個のアミノ酸を欠くが、その他の点ではＲＮＡ認識モチーフは同一であり、インビトロ結合実験では、Ｈｅｌ－Ｎ１とＨｅｌ－Ｎ２のＡＵ－富裕ＲＮＡ結合特性に差は示されなかった。

【００８１】

抗体。従前記載した通りの標準法に従って、抗遺伝子１０（ｇ１０）モノクロナール抗体を生成した。ＨｕＡと反応するポリクロナール血清を、従前記載した通りの標準法に従って生成した。ポリＡ－結合タンパク（ＰＡＢＰ）と反応する抗体は、マッギル大学（カナダ）から入手した。

【００８２】

セルフリー抽出物の調製。細胞を、組織培養プレートからゴムスクレーパーで剥がし、冷却リン酸バッファー生食液（ＰＢＳ）で洗浄した。細胞は、１００ｍＭ　ＫＣｌ、５ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳｐＨ７．０、および、０．５％ＮＰ－４０を含む、ペレットの約２倍容量のポリソーム分解バッファー（ＰＬＢ）で、これに使用時に新たに１ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ），１００Ｕ／ｍＬ　ＲＮアーゼＯＵＴ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，　カールスバート、カリフォルニア州）、０．２％バナジルリボヌクレオシド複合体（ＶＲＣ）（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．，　カールスバート、カリフォルニア州）、０．２ｍＭフェニルメチルスルフォニルフロリド（ＰＭＳＦ）、１ｍｇ／ｍＬペプスタチンＡ、５ｍｇ／ｍＬペプスタチン、および２０ｍｇ／ｍＬロイペプチンを添加したものに再懸濁した。細胞溶解物を凍結し、－１００℃で保存した。使用時には、細胞溶解物を解凍し、卓上型マイクロ遠心器で４℃で１０分１２，０００ｒｐｍで遠心した。上清を取り出し、再び、卓

上型マイクロ遠心器で４℃で５分１６，０００ｒｐｍで遠心し、氷上に保存し、再度－１００℃で再凍結させた。このｍＲＮＰ含有細胞溶解物は、約３０－５０ｍｇ／ｍＬの総計タンパクを含んでいた。

【００８３】

免疫沈降。プロテインＡセファローズビーズ（Ｓｉｇｍａ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ、セントルイス、ミズーリ州）を、ＮＴ２バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　$MgCl_2$、および、０．０５％ＮＰ－４０）に５％ＢＳＡ添加したもので１：５ｖ／ｖに膨潤させた。この１：５ｖ／ｖの、あらかじめ膨潤させたプロテインＡビーズの３００μＬ分液を、過剰な免疫沈降抗体（抗体にもよるが、通常５－２０μＬ）と４℃で一晩インキュベートした。この抗体でコートされたプロテインＡビーズを、氷冷ＮＴ２バッファーで５回洗浄し、１００Ｕ／ｍＬのＲＮアーゼＯＵＴ、０．２％バナジ／リボヌクレオシド複合体、１ｍＭ　ＤＴＴ、および２０ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）を添加した９００μＬのＮＴ２バッファーに再懸濁させた。ビーズを素早く渦巻き攪拌し、１００μＬのｍＲＮＰ溶解物を加えた。直ちにビーズを遠心し、１００μＬ分液を取り出して、全ＲＮＡ（事実上、ｍＲＮＰ免疫沈降で使用される溶解物の１０分の１量）を表すものとした。免疫沈降反応と、全細胞ＲＮＡを代表するために取り出された分液とは、ゼロ分から２時間の期間室温で転回された。適当なインキュベーション後、プロテインＡビーズは４回氷冷ＮＴ－２で洗浄し、その後、１Ｍ尿素添加ＮＴ２バッファーで２回洗浄した。洗浄されたビーズは、０．１％ドデシル硫酸ナトリウムと３０μｇのプロテイナーゼＫを添加した１００μＬ　ＮＴ２バッファーに再懸濁し、５５℃の水浴にて３０分インキュベートした。プロテイナーゼＫの消化後、免疫沈降したＲＮＡを、２回のフェノール／クロロフォルム／イソアミルアルコール抽出によって分離し、エタノール沈殿させた。

【００８４】

ＲＮアーゼ保護アッセイ。ｍＲＮＰ複合体は、細胞溶解物から免疫沈降され、結合ＲＮＡは、メーカーの指示（４５０１４Ｋ）によるＰｈａｒＭｉｎｇｅｎリボカントアッセイ（Ｐｈａｒｍｉｇｅｎ、サンディエゴ、カリフォルニア州）においてＲＮアーゼ保護によって定量した。簡単に言うと、抽出ＲＮＡを、Ｌ３２、グリセルアルデヒド－３－フォスフェートデヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、数種のげっ歯類Ｍｙｃ関連タンパク（鋳型セット４５３５６Ｐ）およびサイクリン（鋳型セット４５６２０Ｐ）をコードするｍＲＮＡに対して特異的な鋳型から生成された、過剰な^{32}Ｐ－標識リボプローブに対してハイブリダイズさせた。２本鎖化されないＲＮＡは、ＲＮアーゼＡ＋Ｔ１による処理で消化した。各ｍＲＮＡ分子種についてリボプローブの長さは一意のサイズを持つから、サンプル中の検出可能なｍＲＮＡ分子種は全て、単一ゲルレーン上に展開することが可能である。保護されたリボプローブ断片は、リン酸画像化スクリーン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ、サニーベイル、カリフォルニア州）において２４時間の露光後視覚化された。リン酸画像を、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｓｔｏｒｍ８６０システムを用いて１００ミクロン解像度でスキャンし、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　ＩＭＡＧＥＱＵＡＮＴ（登録商標）ソフトウェア（Ｖ１．１）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ、サニーベイル、カリフォルニア州）を用いて分析した。

【００８５】

結果。図４は、ｇ１０－ＨｕＢ　ｃＤＮＡによってトランスフェクトされたげっ歯類Ｐ１９細胞抽出物から得られたＨｕＢおよびポリＡ結合タンパク（ＰＡＢＰ）ｍＲＮＰ複合体の免疫沈降を示す。プレブリードのウサギポリクロナール血清によって免疫沈降したペレットでは（図４Ａおよび４Ｂ，レーン３）、あるいは、このアッセイで試験した全ての血清、すなわち、ウサギ、マウス、および正常ヒト血清ではｍＲＮＡは検出されなかった（データ図示せず）。ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡプロフィールは、ｎ－ｍｙｃ、ｌ－ｍｆｃ、ｂ－ｍｙｃ、ｍａｘ、およびサイクリンＡ２、Ｂ１、Ｃ、Ｄ１とＤ２を含んでいたが、ｓｉｎ３、サイクリンＤ３、サイクリンＢ２、Ｌ３２、またはＧＡＰＤＨ　ｍＲＮＡを含んでいなかった（図４Ａおよび４Ｂ、レーン４）。逆に、ＰＡＢＰ

ｍＲＮＰ複合体から抽出したｍＲＮＡのプロフィールは、全ＲＮＡのプロフィールに似ており、Ｌ３２とＧＡＰＤＨにおいて濃縮レベルを示し、ｓｉｎ３　ｍＲＮＡにおいてレベル減少を示した（図４Ａおよび４Ｂ、レーン５）。これらの結果は、細胞成長および分化時における転写後遺伝子発現の制御におけるＨｕタンパクについて想定された役割と合致する。

【００８６】

（実施例２：ｃＤＮＡアレイによる、ＲＮＡ結合タンパク集合に関連するｍＲＮＡサブセットの特定）

増幅または反復的選択を要せずｍＲＮＡサブセットを検出するためにｃＤＮＡアレイ（図５）を用いた。

【００８７】

抗体。抗遺伝子１０（ｇ１０）モノクロナール抗体、およびそのタンパクに反応するポリクロナール血清を前述の通りにして生産した。５′キャップ結合タンパク（ｅｌＦ－４Ｅ）に対する抗体は、Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（サンディエゴ、カリフォルニア州）から入手した。ポリＡ結合タンパク（ＰＡＢＰ）と反応する抗体はマッギル大学（カナダ）から入手した。

【００８８】

細胞培養および分化。実施例１に記載する通りにしてトランスジェニック細胞を調製した。細胞をレチノイン酸で処理して、神経細胞分化を下記のようにして誘発した。５ｘ１０^{5}個のｐ１９細胞を６０ｍｍペトリ皿（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，ピッツバーグ、ペンシルバニア州、８－７５７－１３Ａ番）に０．５μＭ　ＲＡ（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，セントルイス、ミズーリ州、Ｒ２６２５番）と共に設置した。２日後、凝集体を形成した細胞の２５％を取り出し、新しいペトリ皿に設置し、新鮮な培養液とＲＡを補充した。２日後、細胞凝集体を、リン酸バッファー生食液（ＰＢＳ）で１回洗浄し、トリプシン処理した。次に、細胞を、２個の、１００ｍｍゼラチンコート組織培養プレートにプレートした。細胞はさらに４日後に収穫した。ＲＡ処理、ＨｕＢ（Ｈｅｌ－Ｎ２）で安定トランスフェクトされたＰ１９細胞は神経突起を伸ばし、神経細胞に特徴的なマーカーおよび形態を示したが、最終的には分化せず、分裂阻害剤による殺作用に対して感受性を持ち続けた。セルフリー抽出物および免疫沈降を、実施例１に記載する通りにして得た。

【００８９】

ｃＤＮＡアレイ分析。ｃＤＮＡアレイ分析を、ＡＴＬＡＳ（商標）マウスアレイ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，パロアルト、カリフォルニア州）を用いて実行した。このアレイは、ナイロン膜上に並べて、二重にスポットされた合計５９７個のｃＤＮＡ分節を含む。ｃＤＮＡアレイのプローブ探査は、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ（パロアルト、カリフォルニア州）ＡＴＬＡＳ（商標）ｃＤＮＡ発現アレイユーザーズマニュアル（ＰＴ３１４０－１）に記載してある通りに実施した。簡単に言うと、ＲＮＡを、ＨｕＢに安定にトランスフェクトされたＰ１９胚性ガン細胞から抽出し、これを用いて逆転写プローブを生成した。アレイに示される遺伝子に対して相補的なプライマーの保存セットを逆転写プローブ合成に用いた。プローブ合成は、^{32}Ｐα－ｄＡＴＰによって放射標識した。放射標識したプローブは、ＣＨＲＯＭＡ　ＳＰＩＮ（商標）－２００カラム（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，パロアルト、カリフォルニア州）に通過させて精製し、ＥＸＰＲＥＳＳＨＹＢ（商標）ハイブリダイゼーション液（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，パロアルト、カリフォルニア州）を用いてアレイ膜と一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、アレイ膜を洗浄し、リン酸画像化スクリーン（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ、サニーベイル、カリフォルニア州）にて視覚化した。

【００９０】

リン酸画像は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　ＳＴＯＲＵＭ８６０システムを用いて１００ミクロン解像度でスキャンし、ファイルとして保存した。画像は、ＡＴＬＡＳＩＭＡＧＥ（商標）１．０および１．０１ソフトウェア（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ

．，パロアルト、カリフォルニア州）を用いて分析した。任意の遺伝子の信号は、二重のｃＤＮＡスポットにおける信号の平均として計算した。ＡＴＬＡＳＩＭＡＧＥ（商標）１．０ソフトウェアマニュアル（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，パロアルト、カリフォルニア州）に記載してある通り、遺伝子信号の有意性を確認するために、デフォールトの外部背景設定を背景依存信号閾値と組み合わせて用いた。ある遺伝子の信号は、その調整強度（全体信号マイナス背景）が背景信号の２倍を越えている場合、背景を有意に上回るものとした。複数のｃＤＮＡアレイ画像の比較は、アレイ上の全ての遺伝子信号の平均を用い（全体正規化）、アレイ間の信号強度を正規化して行った。ＲＡ処理に応じてＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体のｍＲＮＡプロフィールに起こった変化は、４倍高くなった場合に有意とした（遺伝子発現変化の有意性を確立するのに通常使用される厳格度の２倍）。ｃＤＮＡアレイ画像および重複層は、ＡＤＯＢＥ　ＰＨＯＴＯＳＨＯＰ（登録商標）５．０．２（サンホセ、カリフォルニア州、米国）を用いて調製した。

【００９１】

結果。ＨｕＢトランフェクトＰ１９細胞の全体遺伝子発現プロフィール（トランスクリプトーム）の評価後、ＨｕＢおよびＰＡＢＰ　ｍＲＮＡ複合体を始め、ｅｌＦ－４Ｅ　ｍＲＮＰ複合体を別々に免疫沈降させ、捕捉されたｍＲＮＡをｃＤＮＡアレイ上で特定した。これらのアレイの最初の軸合わせは、６個のＤＮＡスポットとハイブリダイズする放射標識ラムダファージマーカーを、アレイ膜底部に刺突させることによって簡易化させた。一旦軸合わせ登録が確立されたならば、その後のブロットは、方向付けのために刺突ラムダマーカーの使用を必要としない。

【００９２】

ウサギのプレブリード血清による免疫沈降によって生成されるアレイは、アレイの底部に観察される刺突されたラムダマーカーを例外として実質的にブランクである。免疫沈降したＨｕＢ　ｍＲＮＡ複合体およびｅｌＦ－４Ｅ　ｍＲＮＡ複合体は、全体細胞ＲＮＡで検出されたｍＲＮＡの１０％よりはやや多くを含んでいたが、お互いにかなり違っていた（図６Ｂ、６Ｃおよび６Ｅ）。

【００９３】

ＨｕＢとｅｌｆ－４Ｅと同様、ＰＡＢＰもｍＲＮＡ安定化と翻訳を促進するとされている。当然のことながら、ＰＡＢＰ関連ｍＲＮＰ複合体は、ＨｕＢまたはｅｌＦ－４ＥｍＲＮＡ複合体に観察されるよりももっと沢山の検出可能なｍＲＮＡを含んでいた（図６Ｄ）。予想した通り、これらの細胞から得られるＰＡＢＰ　ｍＲＮＰ複合体のｍＲＮＡプロフィールは、トランスクリプトームのものに酷似していた。一方、ＨｕＢとｅｌＦ－４ＥｍＲＮＰ複合体において見られるように、いくつかのｍＲＮＡは、全体ＲＮＡと比べると、ＰＡＢＰ－ｍＲＮＰにおいて濃縮または欠乏していた（図６Ｄと６Ｅ）。これらのｍＲＮＰ複合体で検出されるｍＲＮＡのプロフィールおよび相対量は極めて再現性が高いが、リン酸画像において検出されるｍＲＮＡ分子種の絶対数は、プローブの比活性における違いのために変動した。

【００９４】

全体ＲＮＡを用いて得られるｃＤＮＡアレイは、ｍＲＮＰ複合体免疫沈降のために用いられる溶解物の量の１０分の１を用いて生成されるので、ｍＲＮＰ複合体中に検出される各ｍＲＮＡの絶対量と、全体ＲＮＡにおいて観察されるものとの比較は行わなかった。各マイクロアレイにおける各ｍＲＮＡ分子種相互の相対量を比較することによって、さらに正確な結果が得られた。例えば、β－アクチンとリボソームタンパクＳ２９をコードするｍＲＮＡの相対量（図６、それぞれ、矢印ａとｂ）は、全体細胞ＲＮＡではほぼ等しいが、各ｍＲＮＰ複合体の間では目覚しく変動した。これらの所見から、ＨｕＢ、ｅｌＦ－４Ｅ、およびＰＡＢＰ　ｍＲＮＰ複合体で検出されたｍＲＮＡプロフィールは、相互に、また、トランスクリプトームのものとはっきり異なっている。

【００９５】

（実施例３：レチノイン酸に対するｍＲＮＰ複合体の変化）

ＨｕＢは、主に、神経分化の制御で働くと考えられる神経細胞タンパクであるから、Ｈ

ｕＢ　ｍＲＮＰ複合体に見られるｍＲＮＡ集団が、神経細胞分化の化学的誘発因子であるＲＡに反応して変化するかどうかを調べるために実験を行った。ＨｕＢトランスフェクトＰ１９細胞をＲＡで処理して神経分化を起動し、ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体を免疫沈降させ、次に、関連ｍＲＮＡを、実施例１および２に記載するやり方でｃＤＮＡアレイ上に特定した。ＲＡ処理前後で、ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体から抽出したｍＲＮＡプロフィールの比較から、１８個のｍＲＮＡが、ＲＡ－処理ＨｕＢ　ｍＲＮＰにおいて一方的に存在するか、または、極めて濃縮されることが明らかになった（図７Ａおよび７Ｂ）。さらに、３個のｍＲＮＡ（Ｔ－リンパ球活性化タンパク、ＤＮＡ結合タンパクＳＡＴＢ１、およびＨＳＰ８４）は、ＲＡ処理に反応して、その量が４倍以上も減少した（図７Ａおよび７Ｂ）。ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体のｍＲＮＡプロフィールにおいて観察されたこの変化が一意のものかどうかを確定するために、普遍的に発現されるＥＬＡＶファミリーメンバーＨｕＡ（ＨｕＲ）に対するｍＲＮＡ複合体を、これらのＲＡ処理細胞から免疫沈降させた。ＲＡ処理後のＨｕＡ　ｍＲＮＡプロフィールに対して少数の変化が見られたが、それらは、ＨｕＢ　ｍＲＮＡプロフィールと比べると僅少であった（図７Ｃおよび７Ｄ）。

【００９６】

ＲＡ処理に対する反応として見られたＨｕＢ関連ｍＲＮＡプロフィールの変化は、単に全細胞ｍＲＮＡにおける変化を反映しているわけではない（図７Ｅおよび７Ｆ）。一方、ある場合では、ＨｕＢ　ｍＲＮＡにおける変化は、全ＲＮＡプロフィールの全体的変化を反映していた。図７Ａと７Ｂから図７Ｅと７Ｆまでを比較することによって、ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体に検出される様々に濃縮または枯渇したｍＲＮＡの数多くの実例が明らかである。比較目的のために、ＲＡ処理前後の、ＨｕＢ結合ｍＲＮＡと比較した場合の、全体ＲＮＡプロフィールの違いを示すｍＲＮＡの選択された例を図８に示す。これは、図７Ａ、７Ｂ、７Ｅおよび７Ｆに描かれるアレイの代表的スポットの、再度軸揃えさせた拡大図である。例えば、ＩＧＦ２　ｍＲＮＡは全体ＲＮＡと、ＲＡ処理細胞のＨｕＢ　ｍＲＮＰにおいてのみ検出可能である（図８）。一方、その他のＨｕＢ　ｍＲＮＰ結合ｍＲＮＡ、例えば、インテグリンベータ、サイクリンＤ２、およびＨｓｐ８４の量は、ＲＡ処理後、全体ＲＮＡプロフィールの変化とは無関係に増大または減少した（図８）。全体ｍＲＮＡとＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体とのｍＲＮＡプロフィール変化に見られるこの不一致は、ＲＡ処理に応じて起こるｍＲＮＰ複合体を動的に貫流するｍＲＮＡの分画化から生ずるものと考えられる。まとめとして、これらのｍＲＮＰ複合体から得られるｍＲＮＰプロフィールは動的であり、成長状態を始め、レチノイン酸のような生物学的誘導因子に応じて細胞環境に生じた変化をも反映する。

【００９７】

（実施例４：インビボにおけるＲＮＡ結合タンパクに対する標的配列の指向）

ＧｅｎＢａｎｋおよびＥＳＴデータベースを用い、ＲＡ処理ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体において濃縮されたｍＲＮＰ由来の３′ＵＴＲ配列と特定した（表２）。ＨｕＢに関して以前に定義したインビトロ配列、ＵＵＵＡＵＵＵを用いて、基本的局所軸合わせ探索ツール（ＢＬＡＳＴ（登録商標））（国立生物情報センター（ＮＣＢＩ）、ベッセダ、メリーランド州）分析、および／または、目視検査を実施して、神経性ＨｕＢ標的ｍＲＮＡの３′ＵＴＲ内部の共通結合配列近似の配列を特定した。認識可能なＨｕＢタンパク－ＲＮＡ結合配列を、インビボ捕捉ｍＲＮＡサブセットの内部に特定した。３′ＵＴＲ配列のために利用が可能なｍＲＮＡの多くは、インビトロでＨｕタンパクに結合するものと近似するウリジル酸塩富裕モチーフを含んでいた。さらに、これらのｍＲＮＡの大部分は、神経組織で発現されるタンパクをコードし、ＲＡ誘発神経分化後には上向調整される。表２に示す配列軸合わせは、ＨｕＢにおいて共通ＲＮＡ結合配列を駆動するのにインビトロ選択を用いた以前の結果と一致する。本明細書に記載される方法を用いて、他のＲＮＡ結合タンパクに対する、標的配列の指向性をインビボで識別することが可能である。

【００９８】

（表２）

【００９９】

【表２】

遺伝子	3'UTR コンセンサス配列
CD44	UUUUCUAUUCCUUU**UUUAUUU**UAUGUCAUUUUUUUA
IGF-2	UAAAAAACCAA**UUUGAUU**GGCUCUAAACA
	UAAAGAA**AUUAAUU**GGCUAAAAACAUA
	CUAAA**AUUAAUU**GGCUUAAAAA
HOX 2.5	UCACUCUU**UAUUAUU**AU
	AAAU**UUUAUUA**AGUUA
	AUCAGG**UUCAUUU**UGGUUGU
インヒビター J6	AU**UUUAUCU**AGUUA
	UUUUGUUUUUCUCCCUUUU**UUCAUUU**UGGUUGU
GADD45	UAUUUUUUUCUUUUUUUU**UUUUGGU**CUUUAU
	UUAAAUUCUCAGAAGU**UUUAUUA**UAAAUCUU
ネキシン 1	UUCUGUUAAAUAUU**UUUAUAU**ACUGCUUUCUUUUUU
	AUUUUAUAGUAGUU**UUUAUGU**UUUUAUGGAAAA
	AUUUGCCUU**UUUAAUU**CUUUUU
Egr-1	UAUUUUGUGGU**UUUAUUU**UACUUUGUACUU
Zif268	U**UUUGUUU**UCCUU
神経性カドヘリン	UUU**UUUAUUU**UCUGUAUUUUUU
	UUUUUUUUAAAUUUU**UUUAUUU**UCUUUUU
	UUUUUUAUUUUC**UGUAUUU**UUU
	UUUUUAAUUU**UUUAAUU**UUUUUU
インテグリンα5	AAUGG**UUUAUAU**UUAUGAU
	UUG**UUUAUAU**CUUCAAU
SEF2	UUCAAGCGC**UUGANUU**
Cf2r	UGCAUCGAUCCG**UUGAUUU**ACUACU
インテグリンβ	UAUAAUUU**UUAAUUU**UUUAUUAUUUU
	UAUUUUACCUUUUUUUUUUUUC**UUUAAUU**CGUGGU
CTCF	UUAUGAAUGU**UAUAUUU**GU
	UC**UUAAUUU**UUUCUCUUUUUUUUCU
TGF β2	UUUUUUUUUCCU**UUUAAUU**GUAAAUGGUUCUUU
	UUAAUGAUCAUUCAGAUUGUA**UAUAUUU**GUUUCCUUU
	UUCAAUUUUU**UUUAUAU**ACUAUCUU
	UUUUUC--**UUUAAUU**GGUUUUUUMTP----
	UGUCUUGUTCUGAGCA**UUUAUUU**UCAAA
	UUCUCGUCUUG**UUUAUUU**UACAA
	UAUAAUAAUAG**UUUAUGU**UUUGGAUGUUUGGU
サイクリンD2	AUGUCUUGUUCUU**UGUGUUU**UUAGGAU
	(AU/GA)**UUUAUUU**(UA/AG)

（実施例５：リボノームプロフィールによる標的発見）

後述される標的発見工程を図９にまとめた。

【０１００】

ＲＮＡ結合タンパク遺伝子の発現プロフィールを確立する。ＲＮＡ結合タンパク発現プロフィールが、正常および病的ヒト組織において生成された。ＲＮＡ結合タンパクに関する最初の組織および疾病スクリーニングが、オリゴｄＴプライマーと市販のＲＮＡサンプル（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｉｎｃ．，ラホヤ、カリフォルニア州；Ａｍｂｉｏｎ，Ｉｎｃ．，オースチン、テキサス州；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、パロアルト、カリフォルニア州）とを用い、定量的逆転写ＰＣＲによって行われた。１０－１００μｇのｃＤＮＡを用い、メーカーから支給されたプロトコールに従ってＢｉｏＲａｄ　ｉＣｙｃｌｅｒ定量的ＰＣＲ装置においてＳｙｂｒＧｒｅｅｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，ユジーン、オレゴン州）と遺伝子特異的ＰＣＲプライマーによる定量的ＰＣＲを実行した。実験結果は、付属のＢｉｏＲａｄ　ｉＣｙｃｌｅｒソフトウェアを用いて分析した。候補遺伝子のＲＮＡレベルはｒＲＮＡに対して正規化した。

【０１０１】

組織および細胞系統のさらに速やかで、包括的なスクリーニングを実行するために、特

注のＲＩＢＯＣＨＩＰ（商標）スポットマイクロアレイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．，ダーハム、ノースカロライナ州）を設計し、契約の下に製造させた（ＭＷＧ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＵＳＡ、ハイポイント、ノースカロライナ州）。既知の、および、予想されるヒトＲＮＡ結合タンパク遺伝子のリストを、ＧｅｎＢａｎｋ（ＮＣＢＩ、ベッセダ、メリーランド州）、ＰｕｂＭｅｄ（ＮＣＢＩ、ベッセダ、メリーランド州）、ＳＲＳ　Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ（ＬＩＯＮ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）、ＬｏｃｕｓＬｉｎｋ（ＮＣＢＩ、ベッセダ、メリーランド州）、Ｐｒｏｔｅｉｎ　ＦＡＭｉｌｙデータベース（ｐＦＡＭ）、Ｗｅｌｃｏｍｅ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｓａｎｇｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、ヒンクストン、英国）、ＧＯデータベース（Ｇｅｎｅ　Ｏｎｔｏｌｏｇｙ（商標）Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ）、および、Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ　Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ（ＳＣＯＰ（著作権））パッケージ（Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｕｎｃｉｌ、ケンブリッジ、英国）を含む広範な公共データベースと探索ツールを用いて収集・編集した。このアレイは、約１，４００以上のＲＮＡ結合タンパク遺伝子に対応する５０マーオリゴヌクレオチドを、ガラススライド上に、二重で、非接触位置に含んでいた（プラス、コントロール遺伝子）。

【０１０２】

ＲＮＡ結合タンパクの発現をスクリーニングするために、ＲＮＡを、ＱｉａｇｅｎＲＮｅａｓｙ（登録商標）プロトコール（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，バレンシア、カリフォルニア州）に従って、培養細胞、および、急速冷凍した臨床組織から調製した。全体またはポリＡ＋ＲＮＡを、増幅せずに、アミノアリルｄＵＴＰの存在下に逆転写してｃＤＮＡを生成し、その後Ｃｙ３またはＣｙ５蛍光染料（ＴＩＧＲ　ＳＯＰ＃Ｍ０００４）に対する直接結合によって標識した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、標準手順（ＴＩＧＲ　ＳＯＰ＃Ｍ０００５）によって実行した。データ分析および統計解析用のデータフローを図１０に示す。要するに、マイクロアレイスライドを先ずスキャンし、ＧＥＮＥＰＩＸ（登録）４．０ソフトウェア（Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，ユニオンシティー、カリフォルニア州）を用いてＧＥＮＥＰＩＸ（登録商標）Ａｘｏｎ４０００Ｂスキャナーによって読み取ってデータを獲得した。次に、スポット特徴を、ＢｉｏｄｉｓｃｏｖｅｒｙのＩＭＡＧＥＮＥ（商標）Ｖ４．２パッケージ（ＢｉｏＤｉｓｃｏｖｅｒｙ，　Ｉｎｃ．，マリナデルレイ、カリフォルニア州）で抽出した。アレイ内、アレイ間データ正規化、中央化、および縮尺を含めたデータ処理は、目視（例えば、ヒートマップ）と、統計環境Ｒ（Ｒｏｓｓ　Ｉｈａｋａ　ａｎｄ　Ｒｏｂｅｒｔ　Ｇｅｎｔｌｅｍａｎ，Ｒ、「データ分析とグラフィックスのための言語（“Ａ　ｌａｎｇｕａｇｅ　ｆｏｒ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ａｎｄ　Ｇｒａｐｈｉｃｓ”）」、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　ａｎｄ　Ｇｒａｐｈｉｃａｌ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，１９９６，５，２９９－３１４－参照することにより本明細書に含める）、および、マイクロアレイデータ正規化と分析ライブラリーから成るＢｉｏＣｏｎｄｕｃｔｏｒ　Ｓｕｉｔｅ（ＢｉｏＣｏｎｄｕｃｔｏｒ，Ｂｉｏｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　Ｕｎｉｔ　ｏｆ　Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、ボストン、マサチューセッツ州）によって導入される定量的方法（例えば、分布分析）によって実現された。正規化および縮尺による最終的データ分析は、ＧＥＮＥＳＰＲＩＮＧ（登録商標）４．２．１ソフトウェアプラットフォーム（Ｓｉｌｉｃｏｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、レドウッドシティー、カリフォルニア州）内部の、遺伝子クラスター化、統計的ろ過、および、クラス予言機能を用いて実行した。アレイデータに基づいて、組織または疾患特異的なやり方で、統計的に有意な程度に上向または下向調整される（例えば、差動的ＲＮＡ結合タンパクのｍＲＮＡレベル）ＲＮＡ結合タンパクが、定量的ＰＣＲ、ノーザンブロット、およびウェスタンブロット分析による確認研究のために選択される。

【０１０３】

細菌ベクターにおけるＲＮＡ結合タンパク遺伝子のクローニングと発現。候補の、差別的に発現されるＲＮＡ結合タンパクが特定されるや否や、完全長ｃＤＮＡクローンが、市販のＲＮＡ組織供給源を用いて逆転写ＰＣＲによって生成された。ＧＡＴＥＷＡＹ（商標

）ｐＥＮＴＲＤ－Ｔｏｐｏ侵入ベクターおよびｐＤＥＳＴ１７　６ＸＨｉｓデスティネーションベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｃｏｒｐ．，　カールスバート、カリフォルニア州）用の、ファージラムダによる（ａｔｔ）部位特異的組み換えプロトコールに基づいて（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃｏｒｐ．，カールスバート、カリフォルニア州）、完全長プラスミドクローンが構築された。ポリヒスチジンタグ付きＲＮＡ結合タンパク融合タンパクを発現する大腸菌（例えば、ＢＬ２１ＳＩまたはＢＬ２１Ａ１）を、３７℃で中央対数期まで成長させ、２０～３７℃で２～６時間、０，３Ｍ　ＮａＣｌでＢＬ２１ＳＩ細胞を、０．２％ｍＭアラビノースまたは０．１ｍＭ　ＩＰＴＧでＢＬ２１Ａ１細胞を誘発させた（各クローンに対してパイロット発現実験において得た最適条件に基づく）。細菌細胞を、超音波処理によって溶解し、融合タンパクをニッケルカラム（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，バレンシア、カリフォルニア州）の上で標準法を用いて精製した。不溶の融合タンパクは維持し、８Ｍ尿素の存在下に精製し、可溶性タンパクはＰＢＳに維持した。精製組み換えタンパクを用いてウサギおよび／またはニワトリを免疫化して、ポリクロナール抗体を生産した（通常接触生産による）。ポリクロナール抗体は、その免疫沈降能力、および、天然・組み換えタンパクをウェスタンブロットする能力について明らかにされた。

【０１０４】

ｍＲＮＰ複合体の探求。組織または疾患において特異的なやり方で発現されるＲＮＡ結合タンパクは、機能的に関連するｍＲＮＡグループの転写後処理のために、細胞変化の代理マーカーとなる。ある細胞におけるＲＮＡ結合タンパクの量および組み合わせの変化は疑いなく、これらのＲＮＡ結合タンパクによって結合されるすべてのｍＲＮＡの処理に影響を及ぼす。これらの特異的ＲＮＡ結合タンパクに関連するｍＲＮＡは、細胞の表現型に決定的に、または因果的に関わる可能性が非常に高い。従って、サブセットとして、そのｍＲＮＡが、組織または疾病特異的ｍＲＮＰ複合体と関連する遺伝子は、薬剤発見のための治療標的の豊かな供給源となる。

【０１０５】

優先的ＲＮＡ結合タンパク（例えば、発現に関してもっとも著明な変動を示すＲＮＡ結合タンパク）は、分析の第２段階、すなわち、リボノーム分析システム（ＲＡＳ（商標））アッセイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ，ダーハム、ノースカロライナ州）に進む（図１１）。ＲＡＳ（商標）アッセイは、インビボで形成されたｍＲＮＡとＲＮＡ結合タンパクの複合体、すなわち、ｍＲＮＰ複合体関連タンパクのアフィニティー単離と特性解明である。対象とする、ＲＮＡ結合タンパク、ｍＲＮＡ複合体関連タンパク、あるいは、ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡ複合体関連タンパクにおけるタグに対して特異的な抗体をメーカーの指示に従って用いて、ＲＮＡ結合タンパクと、ｍＲＮＡの関連するサブセットを同時に免疫沈降させた。選択されたＲＮＡ結合タンパク、または、ＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＡ複合体関連タンパクにおけるタグに対して惹起されたポリクロナールまたはモノクロナール抗体を用いて、ｍＲＮＰ複合体を、後述のように、細胞または組織分解物から単離し、各ＲＮＰ複合体について最適化された。この抽出ＲＮＡを、標準的なマイクロアレイ方式で分析した。方法における変化としては、パイロット研究に基づく、フォルムアルデヒドとの可逆的化学結合、各種のタグの使用、ビーズ化した試薬（合成ビーズ、例えば、セファローズに対して架橋結合される）、または、特定濃度の塩（例えば、ＮａＣｌまたはＫＣｌ）または界面活性剤（例えば、ＮＰ－４０、デオキシコレート）を含めたことが挙げられる。ｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡの分析のために、市販のガラススライドアレイ（例えば、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｈｕｍａｎ　Ｕｎｉｇｅｎｅ１４Ｋ（Ａｇｉｌｅｎｔ、パロアルト、カリフォルニア州）のようなもの）、または、膜アレイ、例えば、Ａｔｌａｓ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，パロアルト、カリフォルニア州）が、アレイメーカーによって支給されたハイブリダイゼーション、洗浄、および展開用のプロトコールに従って利用された。

【０１０６】

セルフリー抽出物の調製。ＲＡＳ（商標）アッセイ分解バッファー（ＲＬＢ）の組成は、標的ＲＮＡに対する特定のＲＮＡ結合タンパクの結合特性に従って変動する可能性があ

る。基本的なＲＬＢは、５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７－７．４、１％ＮＰ－４０、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＤＴＴ、１００Ｕ／ｍｌ　ＲＮアーゼＯＵＴ、０．２ｍＭ　ＰＭＳＦ、１μｇ／ｍｌのアプロチニン、および、１μｇ／ｍｌのロイペプチンを含む。この基本組成の変動としては、塩濃度の変化（０－５００ｍＭ　ＮａＣｌまたは０－５ｍＭ　ＫＣｌ）、イオン条件（０－１０ｍＭ　$MgCl_2$または０－２０ｍＭ　ＥＤＴＡ）、および、還元環境（０－５ｍＭ　ＤＴＴ）が挙げられる。例えば、ＰＴＢｍＲＮＰを調べるために細胞抽出物を調製するためには、培養細胞を氷冷ＰＢＳにて洗浄し、５ｍＭ　$MgCl_2$を含むＲＬＢに直接掻き入れ、氷上で１０分インキュベートし、その後、４℃で１０分３，７００ｘｇにて遠心した。

【０１０７】

ある場合には、溶解およびｍＲＮＰ単離前に、ＲＮＡ結合タンパクを標的ｍＲＮＡに架橋結合することが必要である。これは、培養細胞でも、新鮮な組織サンプルについても行った。架橋結合の程度は、各細胞系統または組織毎に測定し、複合体中のｍＲＮＡを免疫沈降させる能力に基づいてモニタリングした。培養細胞または組織は、０～１％のフォルムアルデヒドを含むＰＢＳ中で室温で１５～６０分インキュベートした。次に、架橋結合を、１Ｍトリスを最終濃度２５０ｍＭとなるように加えて停止させ、さらに２０分インキュベートした。次に、サンプルを５０ｍＭトリスを含むＰＢＳで３回洗浄した。培養細胞の場合、ペレットを、放射性免疫沈降（ＲＩＰＡ）バッファー（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ－４０、０．１％ＳＤＳ、０．５％ＤＯＣ、および、１００Ｕ／ｍｌ　ＲＮアーゼＯｕｔ）に、約２ｍｇ／ｍｌの最終タンパク濃度となるように再懸濁した。組織の場合は、サンプルをＲＩＰＡに再懸濁し、ポリトロンにて細胞をホモジェナイズして組織を破壊した。最初の溶解後、サンプル（組織および培養細胞）を、出力設定６（Ｂｒａｎｓｏｎ４５０、ＢｒａｎｓｏｎＵｌｔｒａｓｏｎｉｃｓ　Ｃｏｒｐ．，ダンブリー、コネチカット州）のプローブ超音波発信機にて、それぞれ２０秒で２回超音波処理した。超音波処理の間、サンプルは２分間氷上にて冷却させた。次に、溶解物を、３，７００ｘｇで１５分遠心して透明にした。その後、前述のようにｍＲＮＰ単離を行った。

【０１０８】

ｍＲＮＰの免疫沈降とＲＮＡ抽出。平均して、細胞溶解物における、典型的な、最終タンパク濃度は２ｍｇ／ｍｌであった。各免疫沈降条件のために約２ｍｇを用いた。透明とされた細胞抽出物を、一次抗体（例えば、抗ＰＴＢが最終濃度１０μｇ／ｍｌで使用された）、または、等濃度のコントロール抗体（例えば、最終濃度１０μｇ／ｍｌの免疫前またはＩｇＧ血清）と４℃で２時間インキュベートした。プロテインＡ　Ｔｒｉｓａｃｒｙｌ（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ロックフォード、イリノイ州）の２５μｌ分液を加え、サンプルを４℃で１時間回転させた。次に、免疫複合体を、ＲＬＢバッファーにて６回洗浄した。洗浄は、１洗浄当たり１ｍｌのＲＬＢバッファーを加え、その後マイクロ遠心器で５，０００ｒｐｍで３０秒の短時間遠心することによって行った。最後の洗浄後、ＰｉｃｏＰｕｒｅ（商標）ＲＮＡ単離キット（Ａｒｃｔｕｒｕｓ，Ｉｎｃ．，マウンテンビュー、カリフォルニア州）による５０μｌのＲＮＡ抽出バッファーをビーズに加え、短時間渦巻き回転し、遠心してビーズをペレットとした。ＰｉｃｏＰｕｒｅ（商標）のプロトコール（Ａｒｃｔｕｒｕｓ，Ｉｎｃ．，マウンテンビュー、カリフォルニア州）に従って、抽出ＲＮＡを精製した。次に、ｍＲＮＰ複合体中に存在するＲＮＡを、ＲｉｂｏＧｒｅｅｎ（商標）アッセイ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，ユージン、オレゴン州）を用いて定量した。

【０１０９】

マイクロアレイ分析のためにＲＮＡの増幅。ｍＲＮＰ複合体から単離したｍＲＮＡは、全体ＲＮＡの内のほんの僅かなサブセットを表すものに過ぎないので、我々は、標識前に単離ｍＲＮＡを増幅した。メーカーの指示に従ってＲＮＡ増幅を行うためにＭｅｓｓａｇｅ　Ａｍｐ（商標）（Ａｍｂｉｏｎ，Ｉｎｃ．，オースチン、テキサス州）を用いた。標識前に、Ｃｙ３またはＣｙ５－ｄＵＴＰによるランダムプライマー重合によって２ラウン

ドの増幅を行った。ハイブリダイゼーションと洗浄は、マイクロアレイメーカーのプロトコールおよび前述の通りに行った。マイクロアレイデータの獲得と分析は前述のように行った。

【０１１０】

ｍＲＮＰクラスターマイクロアレイ結果の分析。標準的ＲＡＳ（商標）分析では（例えば、正常対疾患、処置対未処置）、全体ＲＮＡ内容の量的および質的変化を、ｍＲＮＰ複合体の変化と比較した。得られたデータは四つのクラスに分けた。すなわち、（１）ｍＲＮＰ複合体において等しい量的変化を示したｍＲＮＰ転写物、（２）全体ＲＮＡには存在するが、ｍＲＮＰ複合体には存在しないＲＮＡ、（３）ｍＲＮＰ複合体には存在するが、全体では見かけ上存在しないか、検出レベル以下のＲＮＡ、および、（４）全体ＲＮＡとは量的に違ったやり方でクラスターとして変化するＲＮＡである。さらに、ＲＡＳ（商標）アッセイにより、クラス４で表される遺伝子で、全体量は変わらないが、オルタナティブ処理および調整のために細胞内で再分割される遺伝子が特定された。結果、様々なスプライス変種が翻訳され、ｍＲＮＡは細胞内の特定部位に輸送されて翻訳されるか、または、翻訳そのものが上向きまたは下向き修飾されることが考えられた。グループ３および４の内部に特定された遺伝子サブセットは、遺伝子発現の特性解明のために現在利用可能な他の方法では簡単には特定できないものであった。ｍＲＮＰ複合体の分析によって、複合体では濃縮されるが、その他の場所では、全体ＲＮＡの背景の中に埋没してしまう程の低レベルでしか存在しないｍＲＮＡが明らかにされた。例えば、ＦｒａｇｉｌｅＸ知恵遅れタンパク（ＦＭＲＰ）複合体と関連するｍＲＮＡを調べた最近の出版物では、３種の遺伝子（ＫＩＡＡ０５６１様、Ｒａｂ３ＧＤＰ／ＧＴＰ交換タンパク、および、ｈＣＴ２５３２４／（セレラ、ロックビル、メリーランド州））は、全体ＲＮＡクラスでは「欠如」と見なされたが、ＦＭＲＰ複合体クラスでは３０－６０倍に濃縮されていた。さらに、この技術によって、疾患の、または、その発現が細胞によって注意深く制御される細胞状態にある遺伝子、従って、薬剤発見において魅力的な標的となる可能性の高い遺伝子が特定される。本発明の一つの目的は、薬剤標的の特定であるから、下向きの努力は、低分子量薬剤に向けて追跡可能な標的となることが判明した標的クラスに向けられる。具体的に言うと、これらの標的クラスは、特に、核受容体、Ｇ－プロテイン結合受容体、フォスフォジエステラーゼ、キナーゼ、プロテアーゼ、および、イオンチャンネルを含む。治療的興味のある他の標的クラスとしては、分泌分子、細胞外リガンド、およびフォスファターゼが挙げられる。これらの遺伝子クラスの中で、特に魅力的な標的は、もっとも限定された全身発現プロフィールを持つものである。

【０１１１】

ｍＲＮＰ複合体の機能的確認。ＲＡＳ（商標）によって特定された候補標的遺伝子または遺伝子産物については、定量的ＰＣＲおよびウェスタンブロットによってＲＮＡおよびタンパクレベルにおける発現を確認した。さらに、関連ｍＲＮＡの運命、例えば、安定性、変性、または細胞内局在に関わる、ｍＲＮＰ複合体の機能を、様々の技術、すなわち、ｍＲＮＡとＲＮＡ結合タンパクまたはｍＲＮＰ複合体関連タンパクの間の三重相互作用を確認するために、共焦点顕微鏡検査、インサイチュハイブリダイゼーション、３－ハイブリッドリポーター分析、および、生化学的活性を評価するインビトロ法含めた多様な技術－ただしそれらに限定されない－を用いて探求した。この研究は、ＲＮＡ結合タンパクは、通常ｍＲＮＡの５′または３′末端に認められる特異的ヌクレオチド配列に結合することがインビトロで証明されたことによって支持された。

【０１１２】

ＲＮＡｉによる、疾患または細胞表現型における治療標的役割（単複）の有効性実証。疾患特異的ｍＲＮＰ複合体において特定された遺伝子が、対象とする疾患の原因またはその他の表現型に直接的役割を担うかどうかを確認するために、ＲＮＡｉ抑制実験のために候補標的遺伝子を選んだ。各候補の治療遺伝子について、その遺伝子のコード配列を表す１種以上の短いＤＮＡセグメントを、個別に、プラスミドで、センスまたはアンチセンス方向に、Ｕ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、または、ＲＮアーゼＰ　ＲＮＡ　Ｈ１の

下流にてクローンした。プラスミドベクターは、五つの候補治療遺伝子の２種以上の短いＤＮＡセグメントを、Ｕ６ポリメラーゼＩＩＩプロモーター、または、ＲＮアーゼＰ　ＲＮＡ　Ｈ１の下流に含むように構築した。あるいは、化学的に合成された相補的な２２ｂｐ　ＲＮＡをアニールすることによってＲＮＡｉを構築してもよい（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ，ラファイエット、コロラド州）。ベクターまたは２本鎖ＲＮＡを培養細胞にトランスフェクトした後、候補標的の発現に対する抑制作用を定量することによって表現型特性を評価した。さらに、ＲＮＡおよびタンパクレベルにおける遺伝子発現の抑制を確認するために、時間経過実験のノーザンブロットおよびウェスタンブロットを行い、個別の遺伝子の抑制の効力と持続時間を明らかにした。トランスフェクションは、１から５日間の一過性の発現を招く。あるいは、ＲＮＡｉを発現するベクターは、ネオマイシンのような優勢な選択可能マーカーによる同時トランスフェクションおよび選択によって、培養細胞において安定に発現させることが可能である。ＲＮＡｉ使用に対する別法として、従来のアンチセンスＲＮＡ、または、対象とする標的の優勢陰性形を発現するベクターを用いることも可能である。アンチセンス遺伝子および優勢陰性遺伝子は、直接のＤＮＡトランスフェクション、または、ウィルスベクターの使用によって転送することが可能である。そのようなウィルスベクターとしては、レトロウィルス、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス、バキュロウィルス、ポックスウィルス、およびポリオーマウィルスが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。疾患または細胞の表現型における遺伝子の役割を明らかにするために選ばれた、研究対象となった生物系は、関連する生物特性を模倣する（例えば、腫瘍細胞の無統率な成長）細胞培養または動物モデルシステムを含む生物系分野における知識に基づく。

【０１１３】

候補標的遺伝子の抑制の他に、ＲＮＡｉ構築体を用いて、候補遺伝子のｍＲＮＡに結合するＲＮＡ結合タンパクの発現を抑制した。複数ｍＲＮＡに結合し調整するＲＮＡ結合タンパクの抑制は、細胞の表現型により著明な作用を及ぼすようであるが、この過程は、ｍＲＮＰ複合体の決定的重要性を確証するための重要なコントロールであり続けている。

【０１１４】

（実施例６：神経分化のための新規標的の発見とその有効性証明）

ＨｕＢ（Ｈｅｌ－Ｎ２）は、神経分化の調節に役割を演じていると考えられるＲＮＡ結合タンパクである。胚性ガン細胞系統であるｐ１９細胞の分化過程において独特で、決定的に重要なやり方で関わる、ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体におけるｍＲＮＡの、神経およびグリア様表現型に対する機能的重要性が特定され、実証された。コントロールとして、ｐ１９細胞を、ＤＭＳＯ処理によって心筋および骨格筋運命に分化するように誘導することによって実験を二重化した。

【０１１５】

細胞培養。遺伝子１０にタグされた神経細胞特異的ＨｕＢタンパク（Ｈｅｌ－Ｎ２と呼ばれる）を局外に発現する、ＳＶ４０プロモーター駆動ｐアルファ２－遺伝子２－遺伝子１０－ＨｕＢプラスミドによって安定にトランスフェクトされたＰ１９細胞であるＧ１１細胞を、デユーク大学（ダーハム、ノースカロライナ州）から入手した。このトランスフェクトプラスミドは、培養液に０．２ｍｇ／ｍｌのＧ４１８（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，セントルイス、ミズーリ州）を補給することによって、Ｇ１１細胞中に維持した。親の、トランスフェクトされていないＰ１９細胞は、アメリカ標準株収集施設（ＡＴＣＣ、マナサス、バージニア州）から入手し、α－ＭＥＭで、フェノールレッドの添加無し、７．５％仔ウシ血清と２．５％ウシ胎児血清と１００Ｕのペニシリン／ストレプトマイシンの添加有り、による単層培養にて維持した。細胞は、あらかじめ０．１％ゼラチンでコートし使用前に取り除いた、組織培養用フラスコまたはプレートで育成した。単層細胞培養物は、３７℃で５％CO_2中に維持した。

【０１１６】

神経分化は、６０ｍｍペトリ皿に載せた5×10^5 Ｇ１１またはＰ１９細胞を０．５μＭのＲＡ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号＃Ｒ

２６２５）によって処理して誘発した。筋肉分化は、６０ｍｍペトリ皿に載せた５ｘ１０^{5}Ｐ１９細胞を５％ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号＃Ｄ２６５０）によって処理して誘発した。２日後、凝集体を形成した細胞の２５％を取り出し、新しいペトリ皿に設置し、新鮮な培養液とＲＡまたはＤＭＳＯを補充した。さらに２日後、細胞凝集体を、リン酸バッファー生食液（ＰＢＳ）で１回洗浄し、トリプシン処理した。次に、細胞を、２個の、１００ｍｍゼラチンコート組織培養プレートにプレートした。細胞はさらに４日後に収穫した。ＲＡ処理のＧ１１細胞は神経突起を伸ばし、神経細胞に特徴的なマーカーおよび形態を示したが、最終的には分化せず、分裂阻害剤による殺作用に対して感受性を持ち続けた。ＤＭＳＯ処理Ｇ１１細胞は、特徴的な筋細胞マーカーと形態を示したが、最終的には分化せず、分裂阻害剤による殺作用に対して感受性を持ち続けた。細胞抽出および免疫沈降を、実施例１に記載する通りに実行した。抗遺伝子１０（ｇ１０）モノクロナール抗体は、実施例１および２に記載する通りのやり方でデユーク大学（ダーハム、ノースカロライナ州）から入手した。

【０１１７】

免疫沈降後、関連ｍＲＮＡは、高密度マウス１２Ｋガラススライドマイクロアレイ（マススｃＤＮＡマイクロアレイキット、カタログ番号＃Ｇ４１０４Ａ、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，パロアルト、カリフォルニア州）上にて特定した。ＲＮＡ標識およびマイクロアレイ分析は、メーカーのプロトコールに従って実施した（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，パロアルト、カリフォルニア州）。ＲＡ処理前後におけるｍＲＮＡプロフィールの比較から、全体ＲＮＡサンプルで発現される約１０Ｋ遺伝子とは対照的に、ＲＡ処理後には、僅かに１，０７２個の遺伝子がＧ１１ ＨｕＢ ｍＲＮＰにおいて発現していることが明らかにされた。さらに、この１，０７２個の遺伝子を、ＧＯ（Ｇｅｎｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（商標）データベース）に基づいて、薬剤治療可能遺伝子クラス（例えば、通例の薬剤治療が向けられるタンパククラス）に分解すると、２７個のキナーゼ（全体ＲＮＡで検出された２７５個と比較）、４３個のフォスフォキナーゼ（全体ＲＮＡで検出された１４８個と比較）、１４個のプロテアーゼ（全体ＲＮＡで検出された１３７個と比較）、１４個の受容体（全体ＲＮＡで検出された８７個と比較）、３９個のサイトカイン（全体ＲＮＡで検出された１４３個と比較）、および、２０個の成長因子（全体ＲＮＡで検出された８７個と比較）であった（表３）。

【０１１８】

（表３）

【０１１９】

【表３】

遺伝子クラス	全細胞ＲＮＡ中に検出された遺伝子の数	ＨｕＢ ＲＮＰ複合体中に検出された遺伝子の数
キナーゼ	275	27
ホスファターゼ	148	43
プロテアーゼ	137	14
レセプター	87	14
サイトカイン	143	39
成長因子	87	20

（表４）

【０１２０】

【表４】

遺伝子	ΔHuB RNP*	Δ 総細胞 RNA*
CACN	+14.53X	+1.31X
CELSR	+9.41X	-1.33X
MBNL	+8.95X	+1.42X

＊ＨｕＢ　ＲＮＰまたは全体細胞ＲＮＡにおける各遺伝子のＲＮＡ量の変化。１日目および９日目におけるＧ１１細胞の分化／未分化を比較したもの。

【０１２１】

５回の繰り返し免疫沈降反応から、Ｇ１１細胞の全体ＲＮＡ含量に実質的変化があろうとあるまいと、ＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体において選択的に局在することが可逆的に見出されるＨｕＢ　ｍＲＮＰ複合体関連ｍＲＮＡを選んだ。ＨｕＢ複合体において、最大の量的増加によって分類される上位４０個の遺伝子の内、１９は、現在ほとんどまたは全く生物学的情報の無い発現配列タグ（ＥＳＴ）またはＲｉｋｅｎクローンであった。さらに、これら４０個の内、１４は、ＨｕＢ　ｍＲＮＰと全体ＲＮＡの両方において２倍を越えて増加した。その後の分析には３個の特定の遺伝子を選んだ。すなわち、カルシウムチャンネルベータ３サブユニット（ＣＡＣＮ）、カドヘリンＥＧＦ　ＬＡＧ７回通過Ｇタイプ受容体（ＣＥＬＳＲ）、および、筋ブラインドＲＮＡ結合タンパク遺伝子（ＭＢＮＬ）（表４）。この三つの遺伝子について、細胞のｍＲＮＡの全量において観察された変化と比べた場合の、ＨｕＢ　ｍＲＮＰにおけるｍＲＮＡレベルの変化を表４に示す。

【０１２２】

神経分化における役割を確認するために、定量的ＰＣＲによる広範な転写分析を行った。分析は、Ｇ１１細胞（ＨｕＢを構成的に発現する）と親のＰ１９細胞におけるＣＡＣＮ、ＣＥＬＳＲ、およびＭＢＮＬ遺伝子に対するＲＮＡ発現のパターンを見ることによって行った（図１２Ａ，１２Ｂおよび１２Ｃ）。試験細胞系統のＧ１１では、三つの遺伝子全てが、レチノイン酸処理後の分化の時間過程において一過性の誘導を示した。逆に、Ｇ１１細胞のＤＭＳＯ誘導では、同じ遺伝子の発現パターンに変化は誘発されなかった。これは、これらの遺伝子は神経分化には関与しているが、筋肉分化にはこれらの遺伝子の発現は必要とされないことを示唆する。

【０１２３】

神経分化におけるこれら三つの遺伝子の役割をさらに確認するために、発現を、局外発現ｇ１０タグ付きＨｕＢを欠如するＰ１９親細胞系統において定量的ＰＣＲによって調べた（図１３Ａ、１３Ｂ，および１３Ｃ）。速度はやや変動したけれども、三つの遺伝子の発現は全て、神経細胞への分化の時間過程では変化したが、筋肉への分化の間は比較的不変であった。

【０１２４】

従って、このＧ１１細胞から成るモデルシステムでは、１日目と９日目の比較に基づく全ＲＮＡサンプルを用いた単純なマイクロアレイ分析であったなら、神経発達におけるこれら三つの遺伝子の重要性を明瞭にすることはできなかったであろう。これらのデータは、１日目と９日目のサンプルを比較した場合Ｇ１１細胞で観察された定量的ＰＣＲレベルによって確認される。しかしながら、データは、ＨｕＢ含有ｍＲＮＰにおいて再配分されるが、ＨｕＢは神経分化に関与することが知られるのであるから、データは神経分化と関連して捉えられる。このような役割は、両試験細胞系統、Ｇ１１，およびさらに重要なことであるが、親細胞系統のＰ１９において、１日目と９日目の間において三つの遺伝子に観察された、一相または二相の差動発現パターンによって確認される。従って、重要なｍＲＮＰの分析によって、特定の生物過程において重要な遺伝子簡単に強調することが可能

である。

【０１２５】

（実施例７：肝臓毒性の見張り役となるＲＮＡ結合タンパクのスクリーニング）

ヒト細胞系統ＨｅｐＧ２を、肝臓毒性のモデルとして用いた。ＨｅｐＧ２細胞を試験化合物投与によって処置し、ＲＮＡ結合タンパク遺伝子発現に及ぼす作用を評価した。処理７２時間後に５０％の死亡率をもたらす用量を用いて、ＨｅｐＧ２細胞を２４時間処理し、その終了時に遺伝子発現に対する作用を定量した。２４時間時点を遺伝子発現の評価に用いることによって、重大な細胞死に至る化合物用量によって引き起こされる遺伝子発現変化を調べることが可能になった。

【０１２６】

最高耐性用量（ＨＴＤ）、すなわち、細胞において、最小の検出可能な形態変化（例えば、球形化、小胞形成、分離、溶解）をもたらす試験化合物の濃度を決めるために、予備的用量反応曲線を生成した。簡単に言うと、１０％ＦＣＳ添加ダルベッコの修正イーグル培養液（ＤＭＥＭ）に懸濁させた細胞を、９６ウェル組織培養プレートに2×10^4細胞／ウェルで撒いた。細胞接種の２４時間後、培養液を除去し、試験化合物の複数希釈液に加えて、ＦＣＳ無しの０．１％ＢＳＡ，および、０．２５％ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）または０．２５％ＤＭＳＯのいずれかを含む新鮮なＤＭＥＭを細胞に加えた。例えば、４μＭから１０ｍＭに渡る希釈液を、化合物、クロフィブレート、ＤＥＨＰ、ゲムフィブロジル、フェニトイン、および、アセタミノフェン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，セントルイス、ミズーリ州）について用いた。

【０１２７】

投与２４時間後、細胞を目視にて形態的変化の有無について評価した。ＨＴＤを用いて、生体染色細胞生存率アッセイ（例えば、アラマーブルー、ＭＴＴ（Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ、インディアナポリス、インディアナ州）、ＸＴＴ（Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ，インディアナポリス、インディアナ州）で使用する、より狭い用量範囲を定義した。生体染色アッセイでは、細胞は、２４時間ではなく７２時間に渡って前述のように接種・投与を受けた。この７２時間の生体染色毒性評価データを用いて、各化合物についてＴD_{50}値、すなわち、ＤＭＳＯ単独処理と比較した場合の、約５０％の細胞死を引き起こす相対的毒性用量を求めた。

【０１２８】

７２時間の細胞処理後に５０％の細胞死をもたらす試験化合物の濃度を用いて、ｍＲＮＡ分析用の細胞に投与した。細胞は、１０％ＦＣＳ添加ＤＭＥＭにおいてＴ１５０プレートに約２０％の集密度（ＴＤ５０定量で用いたものと等価的な密度）において撒き２４時間インキュベートした。培養液を除去し、ＤＭＥＭと０．１％ＢＳＡ（すなわち、ＦＣＳ無し）、および、ＤＭＳＯのみ、または、試験化合物とＤＭＳＯとを、先に求めたＴD_{50}濃度で含む培養液と交換した。薬剤投与の２４時間後、細胞を採取した。全体ＲＮＡを、ＱｉａｇｅｎＲＮｅａｓｙプロトコール（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．，バレンシア、カリフォルニア州）に従って、新鮮な、または、急速冷凍した細胞ペレットから調製した。全体ＲＮＡは分光光度計測によって定量した。完全性は、Ａｇｉｌｅｎｔバイオ分析装置２１００（Ａｇｉｌｅｎｔ，パロアルト、カリフォルニア州）上で展開して確認した。全体ＲＮＡは、増幅せずに、アミノアリルｄＵＴＰの存在下に逆転写してｃＤＮＡを生成し、その後Ｃｙ３またはＣｙ５蛍光染料（ＴＩＧＲ ＳＯＰ＃Ｍ０００４）に対する直接結合によって標識した。標識ＲＮＡは、約１４００種のＲＮＡ結合タンパクを含む、特注のオリゴヌクレオチドスポットマイクロアレイ（ＭＷＧ Ｂｉｏｔｅｃｈ、ハイポイント、ノースカロライナ州）を用いて分析した。最初のスクリーニングでは、Ｒｉｂｏｃｈｉｐ（商標）Ｖ．１．０マイクロアレイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．，ダーハム、ノースカロライナ州）を用いた。Ｒｉｂｏｃｈｉｐ（商標）（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．，ダーハム、ノースカロライナ州）は、１４００以上のＲＮＡ結合タンパクに対して相補的なオリゴヌクレオチド、プラス、コントロールから構成される。あるいは、Ｒｉｂｏｃｈｉｐ（商標）マイクロアレイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．，ダーハム、ノースカ

ロライナ州）は、毒性の質的・量的評価のために見張り遺伝子の完全セットを表す、転写因子の包括的収集体を含んでもよい。標識プローブのハイブリダイゼーションおよび洗浄は、標準手順（ＴＩＧＲ　ＳＯＰ＃Ｍ０００５）によって実行した。

【０１２９】

データ分析および統計解析用のデータフローを図１５に示す。要するに、マイクロアレイスライドを先ずスキャンし、ＧＥＮＥＰＩＸ（登録商標）４．０ソフトウェア（Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，ユニオンシティー、カリフォルニア州）を用いてＧＥＮＥＰＩＸ（登録）Ａｘｏｎ４０００Ｂスキャナーによって読み取ってデータを獲得した。次に、スポット特徴を、ＢｉｏｄｉｓｃｏｖｅｒｙのＩＭＡＧＥＮＥ　Ｖ４．２パッケージ（ＢｉｏＤｉｓｃｏｖｅｒｙ，　Ｉｎｃ．，マリナデルレイ、カリフォルニア州）で抽出した。アレイ内、アレイ間データ正規化、中央化、および縮尺を含めたデータ処理は、目視（例えば、ヒートマップ）と、統計環境Ｒ（Ｒｏｓｓ　Ｉｈａｋａ　ａｎｄ　Ｒｏｂｅｒｔ　Ｇｅｎｔｌｅｍａｎ，Ｒ、「データ分析とグラフィックスのための言語（“Ａ　ｌａｎｇｕａｇｅ　ｆｏｒ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ａｎｄ　Ｇｒａｐｈｉｃｓ”）」、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　ａｎｄ　Ｇｒａｐｈｉｃａｌ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，１９９６，５，２９９－３１４－参照することにより本明細書に含める）、および、マイクロアレイデータ正規化と分析ライブラリーから成るＢｉｏＣｏｎｄｕｃｔｏｒ　Ｓｕｉｔｅ（ＢｉｏＣｏｎｄｕｃｔｏｒ，Ｂｉｏｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ　Ｕｎｉｔ　ｏｆ　Ｄａｎａ　Ｆａｒｂｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、ボストン、マサチューセッツ州）によって導入される定量的方法（例えば、分布分析）によって実現された。正規化および縮尺による最終的データ分析は、ＧＥＮＥＳＰＲＩＮＧ（登録商標）４．２．１ソフトウェアプラットフォーム（Ｓｉｌｉｃｏｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、レドウッドシティー、カリフォルニア州）内部の、遺伝子クラスター化、統計的ろ過、および、クラス予言機能を用いて実行し、個々の化合物、化合物クラス、および一般的毒物反応に対して一意な、極めて予測性の高い遺伝子セットを特定した。

【０１３０】

これらの予測性の高い遺伝子セットは、未知の試験化合物によって引き起こされるＨｅｐＧ２細胞の遺伝子発現プロフィールの変化を評価する基礎として、また、上記化合物によって引き起こされる肝臓毒性を予測し、分類するための手段として役立つ（実施例９）。さらにこれらのデータは、他の組織における毒性を予測するのにも用いられる。試験化合物に暴露されたことによって起こる、ＨｅｐＧ２細胞の遺伝子発現の変化は、正常組織の膨大な収集体に関する遺伝子発現情報の内部的データベースにも例えられる。ＨｅｐＧ２細胞において、試験化合物処理によってその発現パターンがかき乱されるＲＮＡ結合タンパク遺伝子は、ＲＮＡ結合タンパクを発現する複合的組織の毒性を予測するのに使用される。例えば、ある化合物が、正常の心臓組織に一意に発現される遺伝子の発現に変化をもたらす場合、この化合物は、心臓毒性をもたらす可能性ありと表示される。

【０１３１】

（実施例８：ｍＲＮＰ複合体の特性解明によって、毒性機構または化合物の作用機構を確定する

変化させられた転写制御因子と下流の表現型作用の間の機械的接続を根拠付けるために、転写因子と、その発現が、特定の毒素の存在下に常に変化させられるＲＮＡ結合タンパクとを特定することは、この転写制御因子の変化によって影響される下流遺伝子の特定に結びつく。

【０１３２】

転写因子とＲＮＡ結合タンパクとを、毒性の見張り役として使用することと関連してもっとも貴重な成分の一つは、それらが、機械的な洞察と実験を供給してくれるその継続的な価値である（図１６）。毒素による転写因子またはＲＮＡ結合タンパクの定常的上向き調整は、これらの制御因子によって制御される遺伝子に対して下流方向の影響を及ぼすことが大いにあり得る。このような遺伝子は、この遺伝子のコード領域の上流のｃｉｓ調整要素における転写因子結合部位の出現によって暫定的に特定することが可能である。個別

の転写因子のＤＮＡ結合活性は、インビトロゲル遅延アッセイによって、毒物処理細胞溶解物で簡単に評価することが可能である。このアッセイは、タンパクが、標的ＤＮＡ配列に結合し、ゲル電気泳動中のその移動を遅れさせる能力を測定するものである。あるいは、マイクロアレイ分析と結合させたクロマチン免疫沈降を用いて、ＤＮＡの転写因子結合セグメントを特定してもよい。転写因子の調整作用の機能的評価は、リポーター遺伝子アッセイを用いて通例として実行される。このアッセイでは、転写因子結合部位の１個以上のコピーが、リポーター遺伝子、典型的には外来遺伝子（例えば、β－ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランフエラーゼ、または、蛍光分子、例えば、緑色蛍光タンパク（ＧＦＰ））の上流に挿入される。このアッセイでは、遺伝子発現の変化は、酵素活性または蛍光強度の変化を通じて定量的に報告される。従って、比較的標準的な技術を用いることによって、細胞遺伝子集合体に対する、下流に向けた、機械的作用における、毒素制御転写因子の作用特定が簡単に評価される。

【０１３３】

関連ｍＲＮＡの収集、組織化、および協調的処理におけるＲＮＡ結合タンパクの役割は、特定の遺伝子を通じて伝えられる、下流向き有毒作用に関する豊富な情報源となる可能性がある。ＲＮＡ結合タンパクは、ＲＮＡ結合タンパク自身の遺伝子の安定化、輸送、翻訳、および修飾を制御する遺伝子の５′および３′ＵＴＲにおける保存配列要素に結合するのであるから、このタンパクは、多数の下流遺伝子に作用を及ぼす。例えば、ＲＮＡ結合タンパク、トリステトラポリン（ＴＴＰ）は、ＴＮＦ－αおよびＧＭ－ＣＳＦの３′ＵＴＲのＡＵ富裕要素に結合し、このｍＲＮＡの変性を加速させる。さらに、ＴＴＰ欠乏マウスは、広範な自己免疫疾患と一致する重篤な病態を発現する。この疾患は、関節炎、皮膚炎、骨髄性肥大、および、悪液質を含み、これらの症状は、ＴＮＦ－αに対する抗体による中和によって寛解が可能である。ほぼ同様にして、もう一つのＲＮＡ結合タンパク、ＦＭＲＰの先天的喪失は、遺伝性精神遅滞のもっとも普遍的な形態である、ヒトにおける脆弱Ｘ症候群の主要原因である。ＦＭＲＰは、ｍＲＮＡサブセットに結合し、神経細胞シナプスに配置し、神経伝達物質に反応して局所のタンパク翻訳を可能とする。ＦＭＲＰの欠如は、シナプス伝達にとって必須のｍＲＮＡ集団の調整不備を招くものと考えられている。

【０１３４】

あるクラスの化合物によって明らかに上向き調整されるＲＮＡ結合タンパク遺伝子を定義することによって、これらのＲＮＡ結合タンパクと関連するｍＲＮＡプールも特定することが可能になる。あるクラスの化合物によって制御されるＲＮＡ結合タンパクはクローンし、標準的なクローン手順と市販の発現ベクターを用いて、ＧＳＴまたは６ＸＨｉｓ標識融合タンパクとして発現させることが可能である。細菌性の発現ベクターを用いて、ＲＮＡ結合タンパクを、大腸菌において、または、インビトロ結合転写翻訳システムにおいて発現させることが可能である。この組み換えタンパクを、ＧＳＴまたは６ＸＨｉｓ標識タンパクに対して特異的に結合するニッケルまたはＧＳＴビーズとインキュベーションし、付着させた後で、化合物処理細胞由来の全ＲＮＡ標本を、このＲＮＡ結合タンパクに加える。ビーズは、ＨｅｐＧ２細胞由来のｍＲＮＡの結合を許す。このようにして、肝臓細胞において調整ＲＮＡ結合タンパクと関連し、薬剤処理によって異常な作用を受けた可能性の高い細胞ｍＲＮＡが、前述のような標準的マイクロアレイ分析によって特定される。

【０１３５】

あるいは、薬剤処理によって修飾されるＲＮＡ結合タンパクに対して特異的な抗体が利用可能であるかに応じて、ＨｅｐＧ２細胞由来の内因性ｍＲＮＰ複合体を免疫沈降させ、前述のようにｍＲＮＡサブセットを探求することが可能である。化合物によって変化させられたＲＮＡ結合タンパクの使用によって、スプライシング、核輸送、安定性、細胞内局在、または、ある化合物クラスの作用機構にとって重要な共通機能を持つ遺伝子グループの翻訳の局面で差別的に、または調和的に調整されるｍＲＮＡプールを特定することが可能になる。

【０１３６】

（実施例９：ある対象ｍＲＮＡと関連する、完全セットのＲＮＡ結合タンパク、およびＲＮＡ関連タンパクを特定するために細胞および組織からばらばらのｍＲＮＰ複合体を単離すること）

ＲｉｂｏＴｒａｐ（商標）アッセイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ、ダーハム、ノースカロライナ州）と呼ばれる、別の、指向性の高い方法を用いて、インビボにおいて疾患関連ｍＲＮＡと内因的に関連する、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＰ複合体関連タンパクを検出した。このアッセイは、対象遺伝子、例えば、薬剤標的と同時制御されるｍＲＮＡの組み合わせを定義する。得られる情報は、有効標的に関する新規経路情報、別様の、または複数の薬剤治療における新たな治療標的、および、臨床治験でモニタリング用として用いられる代理疾病マーカーを提供する可能性がある。

【０１３７】

標準的な組み換えＤＮＡおよびＰＣＲ技術を用いて、対象遺伝子および／またはその５′および３′ＵＴＲを表すｃＤＮＡを構築した。このｃＤＮＡの３′ＵＴＲは、ファージＭＳ２コートタンパクのＲＮＡ結合部位を表すステムループの一連の反復列を持つ。あるいは、特定のタンパク（例えば、ＨＩＶ　ＰＲＥおよびＲｅｖタンパク）に結合することが知られる任意のＲＮＡステムループまたはその他のＲＮＡ構造体の使用が可能である。

【０１３８】

原型実験では、ｃ－ｍｙｃ　ｃＤＮＡを用いた。なぜなら対応ｍＲＮＡが、インビトロでもインビボでもＥＬＡＶ／Ｈｕタンパクの結合標的だからである。ｃ－ｍｙｃ　ｃＤＮＡは、ＣＭＶのような適当な哺乳類細胞プロモーター、ＳＶ４０，またはアクチンプロモーターを持つ発現ベクターにクローンする。あるいは、アデノウィルスまたはレトロウィルスプロモーターを持つベクターにクローンし、適合的な哺乳類細胞系統にトランスフェクトさせる。例えば、神経細胞タンパクをコードするｃＤＮＡを、ＰＣ１２（ラット）、Ｐ１９（マウス）、またはｈＮＴ２（ヒト）のような神経性細胞系統において発現させる。あるいは、代謝研究のために、ｃＤＮＡを、前脂肪細胞（マウス３Ｔ３Ｌ１）またはヒト脂肪細胞系統に発現させる。

【０１３９】

加工されたｃ－ｍｙｃ　ｃＤＮＡの発現後、細胞抽出物を調製して、ＭＳ２コートタンパク結合部位を含むｃ－ｍｙｃ　ｍＲＮＡを釣り上げる。ＭＳ２コートタンパクは、アガロース、またはセファローズビーズ、または他の適当な固相マトリックスに連結される。ＭＳ２コートタンパクに対する抗体、または、ビオチニル化ＭＳ２コートタンパクもストレプトアビジンビーズに結合することが可能である。これらの試薬により、細胞抽出物から、ＭＳ２ステムループ反復列を含むｍＲＮＡ、および、インビボにおいてそのｍＲＮＡと関連するＲＮＡ結合タンパクおよび／またはｍＲＮＡ複合体関連タンパクを分離することが可能になる。

【０１４０】

方法に対する修正としては、フォルムアルデヒドとの化学的架橋、または、各種タグおよびビーズ試薬の使用が挙げられる。ＲｉｂｏＴｒａｐ（商標）アッセイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ、ダーハム、ノースカロライナ州）によって対象ｍＲＮＡと一緒に単離されたタンパクは、標準的なプロテオーム法を用いて特定することが可能である。例えば、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化飛行時間型質量分析（ＭＡＬＤＩＴＯＦ）、および、タンデム質量分析（または質量分析／質量分析）を用いて、ペプチド配列を特定し、データベース探索に備える。特定されたタンパクと反応する抗体は、標準法に従って惹起し、前述のようにＲＡＳ（商標）アッセイを実行するのに使用が可能である。

【０１４１】

ＲＡＳ（商標）アッセイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ、ダーハム、ノースカロライナ州）運用後、ｍＲＮＰ複合体に存在するｍＲＮＰサブ集団は、特定され、共通のＵＴＲ配列要素の有無に関して調べることが可能である。なお、相同性に関するコンピュータ分析は、制御コードにおける未翻訳配列要素（ＵＳＥＲコード）を特定するに当たって信頼度の高い方法ではないことに注意すべきである。なぜなら、それらの要素は、１本鎖ではなく構造

的であることが多いからである。さらに重要なことは、ｍＲＮＡサブ集団同士について、機能的相関の有無を調べることが可能である。例えば、各ｍＲＮＡは、遺伝子表示名および、機能的ゲノミクスデータベースにおける既知の機能によって分類することが可能である（例えば、ＬｏｃｕｓＬｉｎｋ（ＮＣＢＩ、ベッセダ、メリーランド州）、ＧＯデータベース（Ｇｅｎｅ　Ｏｎｔｏｌｏｇｙ（商標）Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ）、Ｐｒｏｔｅｏｍｅ　Ｂｉｏｋｎｏｗｌｅｄｇｅ（登録商標）Ｌｉｂｒａｒｙ（Ｉｎｃｙｔｅ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｉｎｃ．，パロアルト、カリフォルニア州）。例えば、ＲｉｂｏＴｒａｐ（商標）アッセイ（Ｒｉｂｏｎｏｍｉｃｓ、ダーハム、ノースカロライナ州）によって用いられるタンパクが免疫制御に関与している場合、同じｍＲＮＰ複合体中に見られる他のｍＲＮＡも、免疫制御における役割の有無に関して分析することが可能である。一方、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＰ複合体において別のＲＮＡ結合タンパクを通じて間接的に結合することが可能である（例えば、ＵＴＲにおける、ＲＮＡ結合タンパクを認識する、または、ＲＮＡ結合タンパクの、その他の既知の結合部位を認識するＵＳＥＲコード要素の存在に対して評価される）。

【０１４２】

ＲＡＳ（商標）アッセイの目的は、ｍＲＮＡ集団であって、そのｍＲＮＡ同士が、ＵＴＲにおいて関連する構造的特性を持ち、または、それらのｍＲＮＡによってコードされるタンパク同士が機能的相関を持つ、そのようなｍＲＮＡ集団を特定することである。予想される関連機能としては、ａ）コードされるタンパクが、共通の代謝経路に関与すること、ｂ）一過性に同時調整される複数のコードタンパク、ｃ）細胞の中に、または上に同様に局在する複数のコードタンパク、ｄ）生物機構（例えば、リボソーム）の形成または制御に参画する複数のコードタンパクが挙げられる。一組の機能的に関連するタンパクの発現によってもたらされる複雑な性質と表現型を特定することは、認識、細胞特異的活性化、炎症、または分化のような過程を含むことが考えられる。これらの複雑な過程に関与することが知られるタンパクは他の研究から知られる一方、その機能の大部分はほとんど未知である。本発明の価値の一つは、上記の過程の中に、別様の薬剤標的または代理マーカーとして役立つ可能性のある、さらに大きな一組のタンパクを発見することである。

【０１４３】

本発明は、その精神または本質的特性から逸脱することなく、その他の特定的形態において具現化することが可能である。従って、前述の実施形態は、本明細書に記載される発明の例示であって、限定するものではない。本明細書には特許請求の範囲の等価物が含まれるとはいうものの、本発明は下記の特許請求の範囲によって記述される。

【図面の簡単な説明】

【０１４４】

【図１】図１は、ゲノムからプロテオームへの遺伝情報の流れで、中間レベルはリボノームとトランスクリプトームで表される遺伝情報の流れの概観的模式図である。トランスクリプトームは、ゲノムに対する全ｍＲＮＡ相補体を表すが、必ずしもタンパク生産と直接には相関しない。ｍＲＮＡの加工、輸送および翻訳は、プロテオーム結果を決定する動的調節工程を表すリボノームで起こる。

【図２】図２Ａは、ｍＲＮＰ複合体（例えば、ｍＲＮＰ１、ｍＲＮＰ２、ｍＲＮＰｘ）と関連するｍＲＮＡの転写を示すイラストである。図２Ｂは、全細胞ｍＲＮＡ、核放出ｍＲＮＡ、および、ｍＲＮＰ複合体内に結合されるｍＲＮＡそれぞれのアレイを比較するイラストである。

【図３】図３は、新規ＲＮＡ結合タンパクを特定するための戦略を概観する模式図である。

【図４】図４Ａおよび４Ｂは、ｍＲＮＰ複合体と関連するｍＲＮＡの、多数プローブＲＮアーゼ保護分析を図説する。細胞分解物のｍＲＮＰ複合体を免疫沈降させ、ペレット化したＲＮＡを抽出し、ＲＮアーゼ保護によって定量した。図４Ａおよび４Ｂは、それぞれ、ｍＭｙｃおよびＣｙｃ－１多数プローブ鋳型セットの例を示す。レーン（１）未消化のリボプローブ（リボプローブプラスミド鋳型のせいでＲＮアーゼ消化産物よりもやや長い）

、（２）全体細胞ＲＮＡ、（３）ウサギプレブリード血清コントロール、（４）ハブｍＲＮＰ複合体から抽出したｍＲＮＡ，（５）ポリＡ結合タンパク（ＰＡＢＰ）ｍＲＮＰ複合体から抽出したｍＲＮＡ。星印（＊）は、全体ＲＮＡでは検出されないｍＲＮＡ分子種を示す。

【図５】図５は、ＤＮＡアレイによる、ＲＮＡサブセットのリボノームプロフィール形成を概観する模式図である。このｍＲＮＰ複合体は、２種の細胞サンプルから単離されたものであり（例えば、二つの個体、生物種、細胞タイプ、処置、または発達段階）、関連ＲＮＡプールは、ＲＮＡプローブを製造するために逆転写される。遺伝子のＤＮＡアレイ、すなわちｃＤＮＡは、ｍＲＮＰ由来プローブの各プールによってプローブ探索されて、遺伝子発現サブプロフィール（１０）を生成する。次にサブプロフィールを、減法または加法によって比較して、全体発現プロフィール（２０）を生成する。全体細胞プロフィールのサブプロフィール（ｍＲＮＰ１、ｍＲＮＰ２、．．．ｍＲＮＰｎ）は添加因子として示される。重畳される、各サブプロフィールは、単一細胞タイプにおける個別のｍＲＮＰ複合体を表すが、あるいは、複雑な組織または腫瘍における個別の細胞トランスクリプトームを表す。

【図６】図６は、後述の実施例２Ｂの結果を示し、ｃＤＮＡアレイによってｍＲＮＰ複合体に関連するｍＲＮＡを示す。パネル：（Ａ）プレブリード、（Ｂ）ＨｕＢ、ｍＲＮＰ複合体、（Ｃ）ｅｌＦ－４Ｅ　ｍＲＮＰ複合体、（Ｄ）ポリＡ－結合タンパク（ＰＡＢＰ）ｍＲＮＰ複合体、（Ｅ）全細胞ＲＮＡ。工程の特異性の例は、ｍＲＮＰプロフィールにおいて、β－アクチンとリボソームタンパクＳ２９をコードするｍＲＮＡの量の差によって示される（それぞれ、矢印ａとｂ）。

【図７】図７は、実施例２の結果を示し、レチノイン酸処理の前後におけるＨｕＢおよびＨｕＡ　ｍＲＮＰ複合体のｍＲＮＡプロフィールの比較を示す。パネル：（Ａ）未処置細胞から免疫沈降させたＨｕＢ　ｍＲＮＰから抽出したｍＲＮＡ、（Ｂ）レチノイン酸処理細胞から免疫沈降させたＨｕＢ　ｍＲＮＰから抽出したｍＲＮＡ、（Ｃ）未処置細胞から免疫沈降させたＨｕＡ（ＨｕＲ）　ｍＲＮＰから抽出したｍＲＮＡ、（Ｄ）レチノイン酸処理細胞から免疫沈降させたＨｕＡ　ｍＲＮＰから抽出したｍＲＮＡ、（Ｅ）未処置細胞溶解物から抽出した全ｍＲＮＡ、（Ｆ）レチノイン酸処理細胞溶解物から抽出した全ｍＲＮＡ。

【図８】図８は、総合遺伝子発現プロファイリングとリボノームプロファイリングの比較である。図は、図７の代表的マイクロアレイスポットを示す。スポットは軸合わせをし、拡大され、レチノイン酸処理前後の、全体ｍＲＮＡにおけるＩＧＦ－２、インテグリンβ、サイクリンＤ２、およびＨＳＰ８４と、ＨｕＢ結合ｍＲＮＡと関連するものとの比較をする。全体およびＨｕＢ関連ＩＧＦ－２ｍＲＮＡレベルは、レチノイン酸処理に応じて増加した。逆に、ＨｕＢ関連インテグリンβ、サイクリンＤ２、およびＨｓｐ８４　ｍＲＮＡレベルは、ＲＡ処理後、全体ＲＮＡレベルの変化とは無関係に増減した。＊ｍＲＮＡは、ＲＡ処理細胞のみに検出された。

【図９】図９は、ＲＮＡ結合タンパクとｍＲＮＰ複合体による標的発見過程の模式的概観図である。

【図１０】図１０は、ＲＮＡ結合タンパク発現および／またはｍＲＮＰ複合体の比較から得られたマイクロアレイ結果を分析・解釈するためのデータフローの模式的概観図である。

【図１１】図１１は、全細胞ＲＮＡのマイクロアレイ分析と比較した、リボノーム分析システム（ＲＡＳ（商標））アッセイの模式的概観図である。

【図１２－１】図１２Ａおよび１２Ｂは、実施例２８の結果を示し、３種の遺伝子の発現プロフィールの比較を示す。（Ａ）カルシウムチャンネルベータ３サブユニット（ＣＡＣＮ）、（Ｂ）カドヘリンＥＧＦ　ＬＡＧ７回通過Ｇタイプ受容体（ＣＥＬＳＲ）で、安定にトランフェクトされたｇ１０標識ＨｕＢ遺伝子を含む。レチノイン酸（ＲＡ）による神経細胞分化誘発後、および、ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）による筋分化のコントロール条件。これら３種の遺伝子の発現は、ジメチルスルフォキシドまたはレチノイン酸

のどちらかによる処置１から９日の経過中に定量的ＲＴ－ＰＣＲで分析した。
【図１２－２】図１２Ｃは、実施例２８の結果を示し、３種の遺伝子の発現プロフィールの比較を示す。（Ｃ）Ｇ１１細胞における筋ブラインドＲＮＡ結合タンパク（ＭＢＮＬ）で、安定にトランフェクトされたｇ１０標識ＨｕＢ遺伝子を含む。レチノイン酸（ＲＡ）による神経細胞分化誘発後、および、ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）による筋分化のコントロール条件。これら３種の遺伝子の発現は、ジメチルスルフォキシドまたはレチノイン酸のどちらかによる処置１から９日の経過中に定量的ＲＴ－ＰＣＲで分析した。
【図１３－１】図１３Ａは、実施例２の結果を示し、３種の遺伝子の発現プロフィールの比較を示す。（Ａ）カルシウムチャンネルベータ３サブユニット（ＣＡＣＮ）で、親のｐ１９細胞において、レチノイン酸（ＲＡ）による神経細胞分化の誘発後、および、ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）による筋分化のコントロール条件で得られたもの。これら３種の遺伝子の発現は、ＤＭＳＯまたはＲＡのどちらかによる処置１から９日の経過中に定量的ＲＴ－ＰＣＲで分析した。
【図１３－２】図１３Ｂ、および１３Ｃは、実施例２の結果を示し、３種の遺伝子の発現プロフィールの比較を示す。（Ｂ）カドヘリンＥＧＦ　ＬＡＧ７回通過Ｇタイプ受容体（ＣＥＬＳＲ）、（Ｃ）Ｇ１１細胞における筋ブラインドＲＮＡ結合タンパク（ＭＢＮＬ）で、親のｐ１９細胞において、レチノイン酸（ＲＡ）による神経細胞分化の誘発後、および、ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）による筋分化のコントロール条件で得られたもの。これら３種の遺伝子の発現は、ＤＭＳＯまたはＲＡのどちらかによる処置１から９日の経過中に定量的ＲＴ－ＰＣＲで分析した。
【図１４】図１４は、ＲＮＡ結合タンパク発現プロフィールに関する毒素ゲノム実験で得られたマイクロアレイ結果を分析・解釈するためのデータフローを示す模式的概観図である。
【図１５】図１５は、作用機構研究における転写制御因子（転写因子とＲＮＡ結合タンパク）の使用法を描く。ＲｉｂｏＣｈｉｐ（商標）による転写因子とＲＮＡ結合タンパク（ＲＢＰ）のマイクロアレイ分析に基づく発現プロファイリングは、毒物の可能性のある物質を評価したり、あるいは、薬剤または治療剤の作用機構研究を定めるのに有用である。転写因子とＲＮＡ結合タンパクは、全ての遺伝子発現変化の「モニタリング制御」を表す。転写因子の場合、作用機構研究は、調節される遺伝子のプロモーター領域の転写因子結合要素を調べることを含む。ＲＮＡ結合タンパクの場合、作用機構研究は、特定のＲＮＡ結合タンパクによって内因的に結合されるｍＲＮＡプールを調べることを含む。
【図１６】図１６は、ＲｉｂｏＴｒａｐ（商標）アッセイの模式的概観図である。リガンド、例えば、ＭＳＩＩコートタンパク（ＣＰ）で標識された、対象とするＲＮＡ結合タンパク（ＲＢＰ１またはＲＢＰ２）をコードするｍＲＮＡを、トランスフェクションによって細胞に導入し、発現させる。タグにより、ＲＮＡ結合タンパクを付着させたｍＲＮＡの回収を可能とする。リガンドに対する結合相手、例えば、ＣＰ抗体を用いて、標識ｍＲＮＡ、およびその関連ＲＮＡ結合タンパクを免疫沈降させる。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ribonomics, Inc.

<120> Method for Identifying Functionally Related Genes and Drug Targets

<130> RBN-001CPPC

<150> US 10/309,788
<151> 2002-12-04

<150> US 60/173,338
<151> 1999-12-28

<150> US 09/750,401
<151> 2000-12-28

<160> 38

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of CD44

<400> 1
auuuucuauu ccuuuuuuau uuuaugucau uuuuuua 37

<210> 2
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of IGF-2

<400> 2
uaaaaaacca aauuugauug gcucuaaaca 30

<210> 3
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of IGF-2

<400> 3
uaaagaaauu aauuggcuaa aaacaua 27

<210> 4
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of IGF-2

<400> 4
cuaaaaauua auuggcuuaa aaa 23

<210> 5
<211> 17
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of HOX 2.5

<400> 5
ucacucuuau uauuuau 17

<210> 6
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of HOX 2.5

<400> 6
aaauuuuauu aaguua 16

<210> 7
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of HOX 2.5

<400> 7
aucagguuca uuuugguugu 20

<210> 8
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Inhibitor J6

<400> 8
auuuuaucug uua 13

<210> 9
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Inhibitor J6

<400> 9
uuuuguuuuu cucccuuuuu uaguuuuuuc aaa 33

<210> 10
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of GADD45

<400> 10
uauuuuuuuu cuuuuuuuuu uuuggucuuu au 32

<210> 11
<211> 31
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of GADD45

<400> 11
uuaaauucuc agaaguuuua uuauaaaucu u 31

<210> 12
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Nexin 1

<400> 12
uucuguuaaa uauuuuuaua uacugcuuuc uuuuuu 36

<210> 13
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Nexin 1

<400> 13
auuuuauagu aguuuuuaug uuuuuaugga aaa 33

<210> 14
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Nexin 1

<400> 14
auuugccuuu uuaauucuuu uu 22

<210> 15
<211> 30
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Egr-1

<400> 15
uauuuugugg uuuuauuuua cuuuguacuu 30

<210> 16
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Zif 268

<400> 16
uuuuguuuuc cuu 13

<210> 17
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Neuronal-Cadherin

<400> 17
uuuuuuauuu ucuguauuuu uu 22

<210> 18
<211> 29
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Neuronal-Cadherin

<400> 18
uuuuuuuuaa auuuuuuuau uuucuuuuu 29

<210> 19
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Neuronal-Cadherin

<400> 19
uuuuuuauuu ucuguauuuu uu 22

<210> 20
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Neuronal-Cadherin

<400> 20
uuuuuaauuu uuuaauuuuu uuu 23

<210> 21
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of integrin alpha 5

<400> 21
aaugguuuau auuuaugau 19

<210> 22
<211> 17
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of integrin alpha 5

<400> 22
uuguuuauau cuucaau 17

<210> 23
<211> 16
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of SEF2

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> wherein n at position 14 is a U, G, C or A

<400> 23
uucaagcgcu uganuu 16

<210> 24
<211> 25
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of Cf2r

<400> 24
ugcaucgauc cguugauuua cuacu 25

<210> 25
<211> 26
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of integrin beta

<400> 25

uauaauuuuu aauuuuuuau uauuuu 26

<210> 26
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of integrin beta

<400> 26
uuauuuuacc uuuuuuuuuu uucuuuaauu ccuggu 36

<210> 27
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of CTCF

<400> 27
uuaugaaugu uauauuugu 19

<210> 28
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of CTCF

<400> 28
ucuuaauuuu uucucuuuuu uuucuuu 27

<210> 29
<211> 33
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of TGF beta 2

<400> 29
uuuuuuuuuc cuuuuaauug uaaaugguuc uuu 33

<210> 30
<211> 37
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of TGF beta 2

<400> 30
uuaaugauca uucagauugu auauauuugu uuccuuu 37

<210> 31
<211> 25

<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of TGF beta 2

<400> 31
uucaauuuuu uuuauauacu aucuu 25

<210> 32
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of TGF beta 2

<400> 32
uuuuucuuua auugguuuuu uu 22

<210> 33
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of MTP

<400> 33
ugucuugucu gagcauuuau uuucaaa 27

<210> 34
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of MTP

<400> 34
uucucgucuu guuuauuuua caa 23

<210> 35
<211> 32
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of MTP

<400> 35
uauaauaaua guuuauguuu uggauguuug gu 32

<210> 36
<211> 27
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'-UTR consensus sequence of cyclin D2

<400> 36
augucuuguu cuuuguguuu uuaggau 27

<210> 37
<211> 11
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> in vitro consensus sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> nn is AU or GA

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> nn is UA or AG

<400> 37
nnuuuauuun n 11

<210> 38
<211> 7
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> in vitro binding sequence for HuB

<400> 38
uuuauuu 7

【図１】

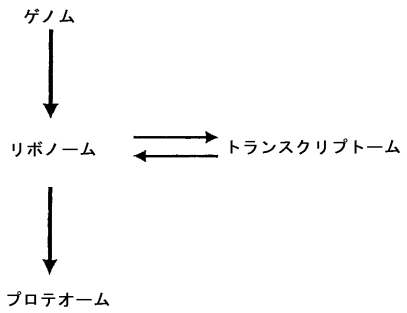

FIG. 1

【図２】

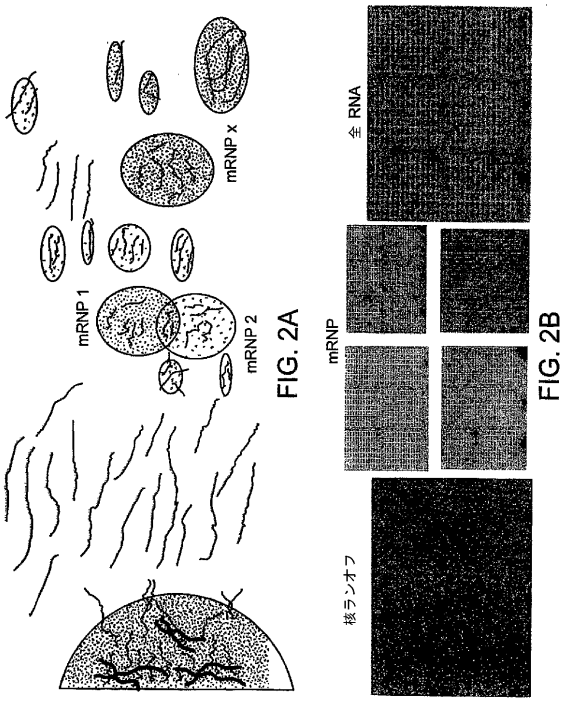

FIG. 2A

FIG. 2B

【図３】

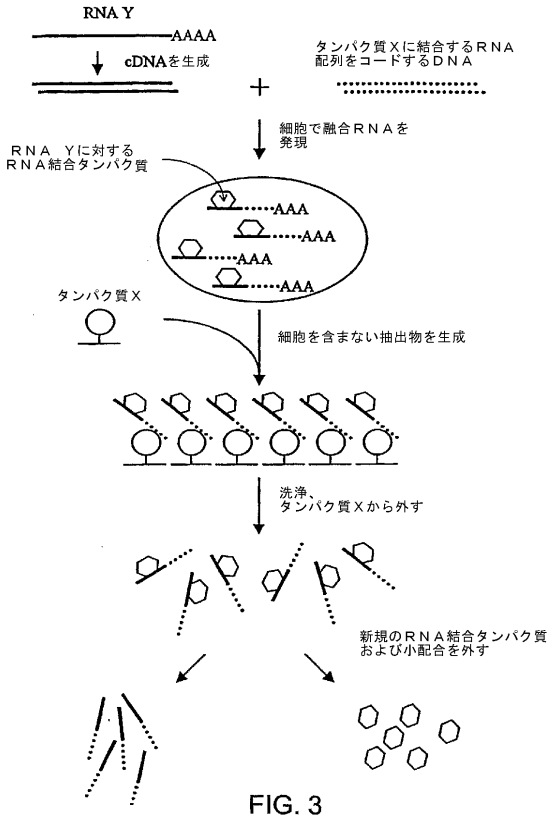

FIG. 3

【図４】

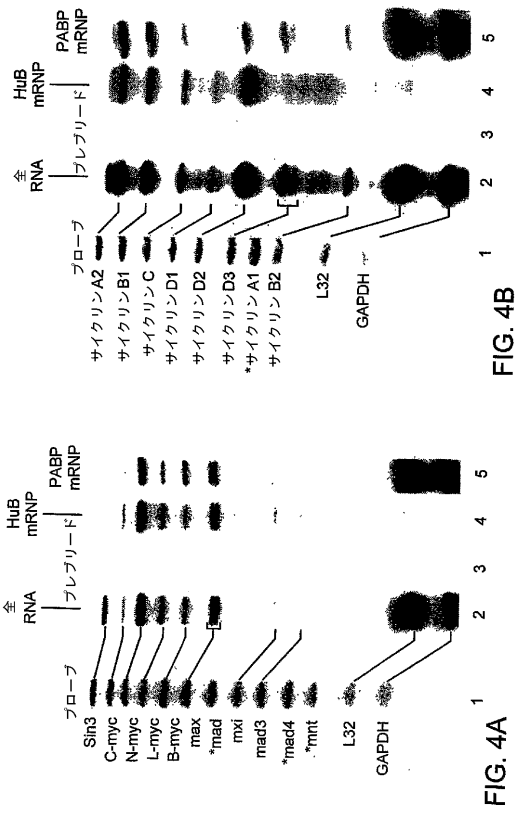

FIG. 4B

FIG. 4A

【図５】

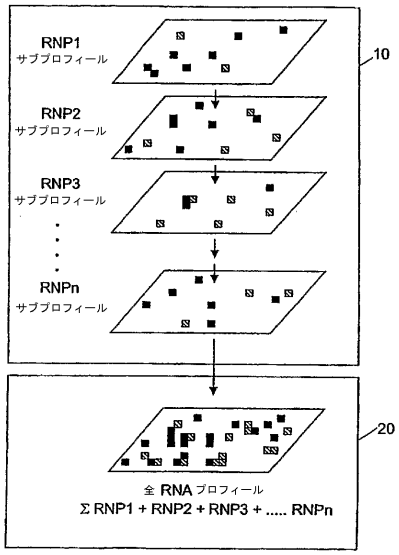

FIG. 5

【図６】

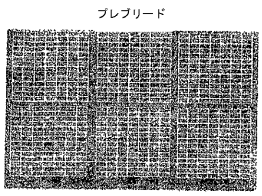

FIG. 6A

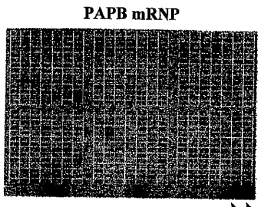

FIG. 6D

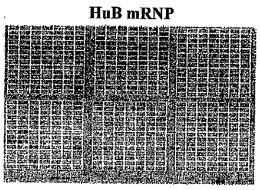

FIG. 6B

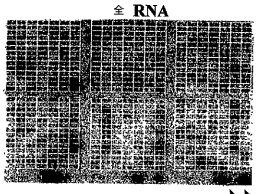

FIG. 6E

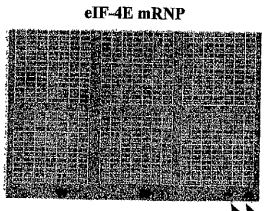

FIG. 6C

【図７】

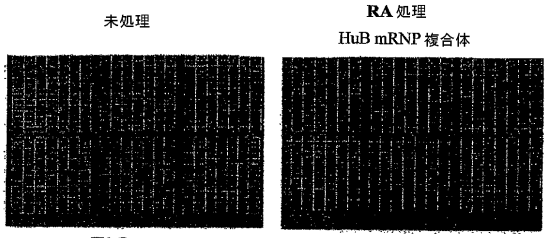

FIG. 7A

FIG. 7B

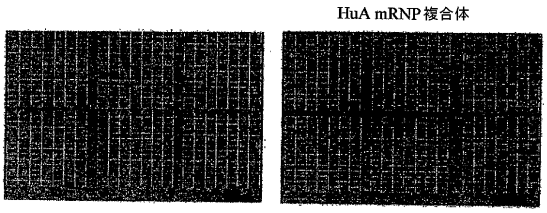

FIG. 7C

FIG. 7D

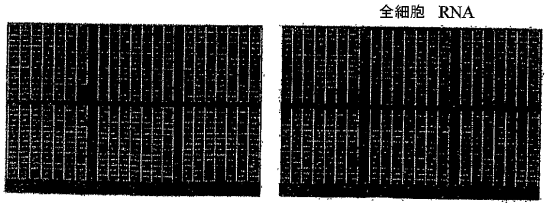

FIG. 7E

FIG. 7F

【図８】

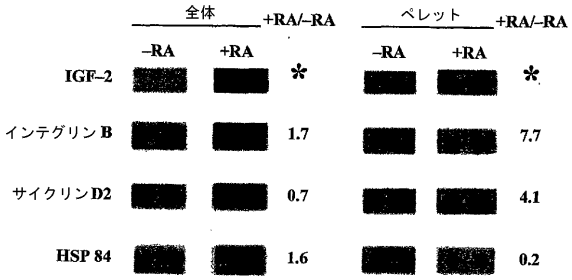

FIG. 8

【図９】

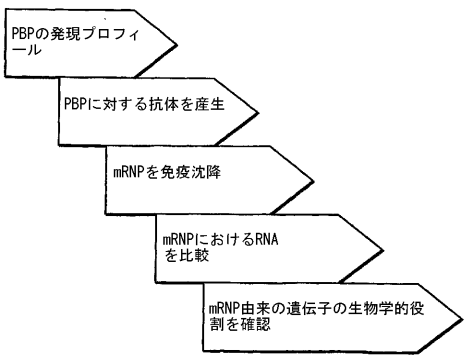

FIG. 9

【図１０】

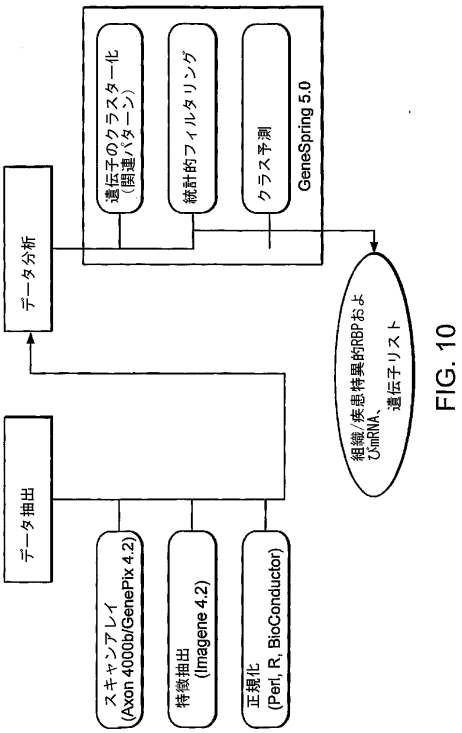

FIG. 10

【図１１】

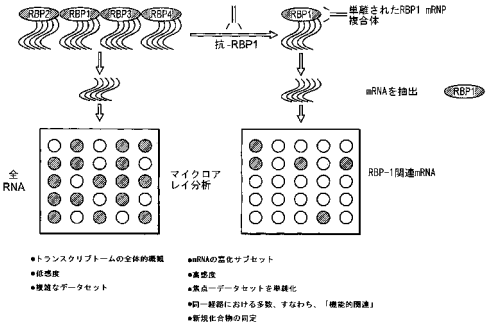

FIG. 11

【図１２－１】

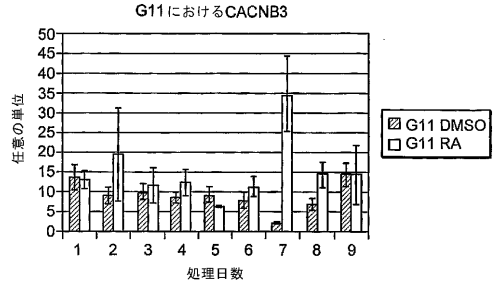

FIG. 12A

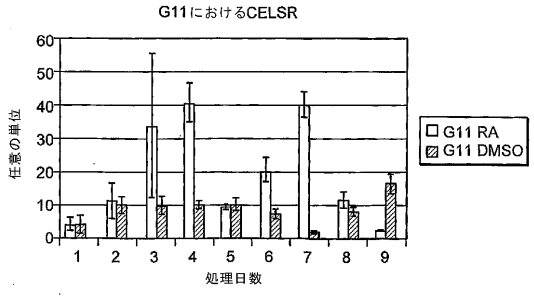

FIG. 12B

【図１２－２】

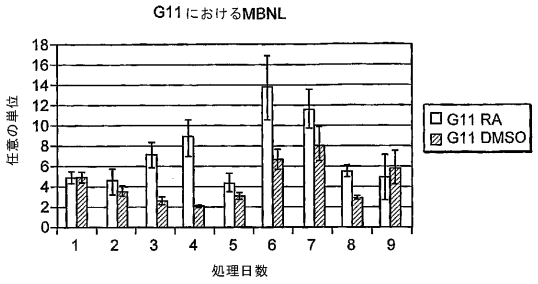

FIG. 12C

【図１３－１】

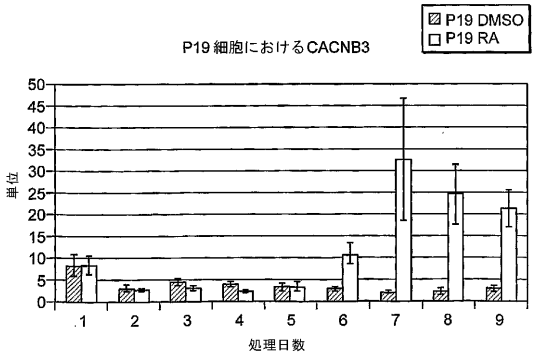

FIG. 13A

【図１３－２】

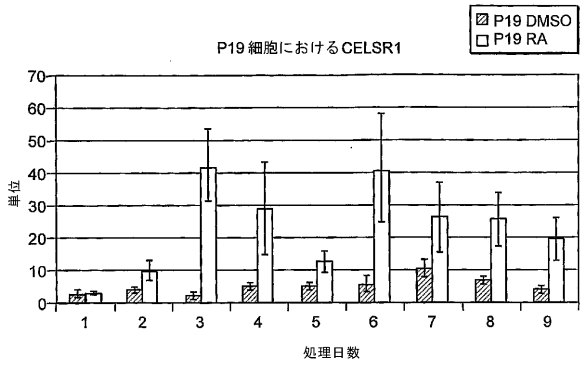

FIG. 13B

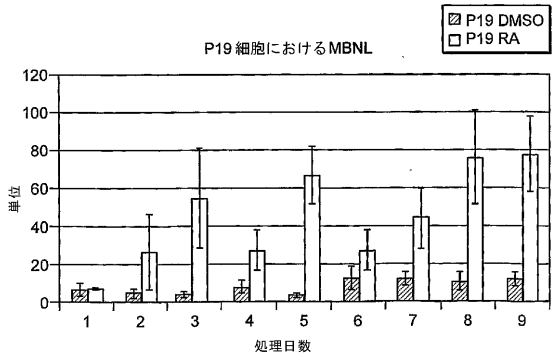

FIG. 13C

【図１４】

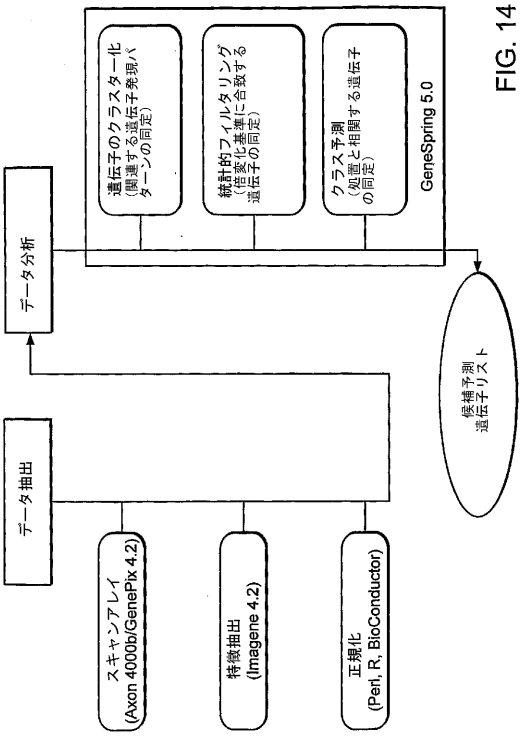

FIG. 14

【図１５】

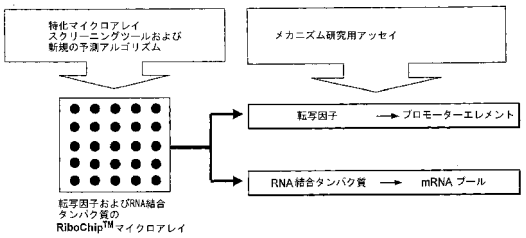

FIG. 15

【図１６】

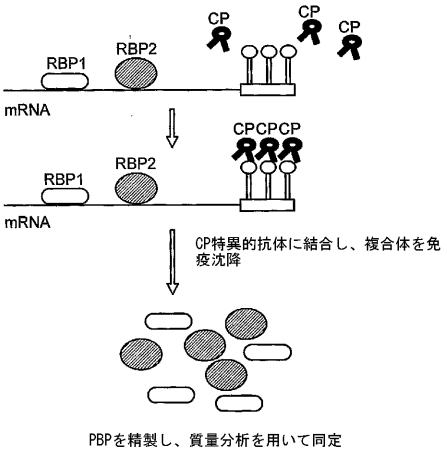

FIG. 16

【手続補正書】
【提出日】平成17年8月18日(2005.8.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】全図
【補正方法】変更
【補正の内容】

【図１】

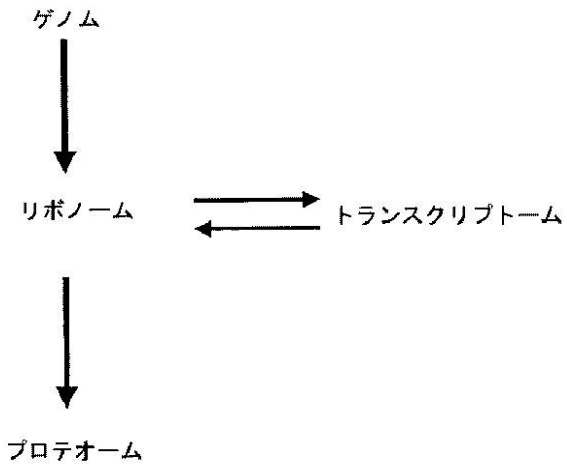

FIG. 1

【図２】

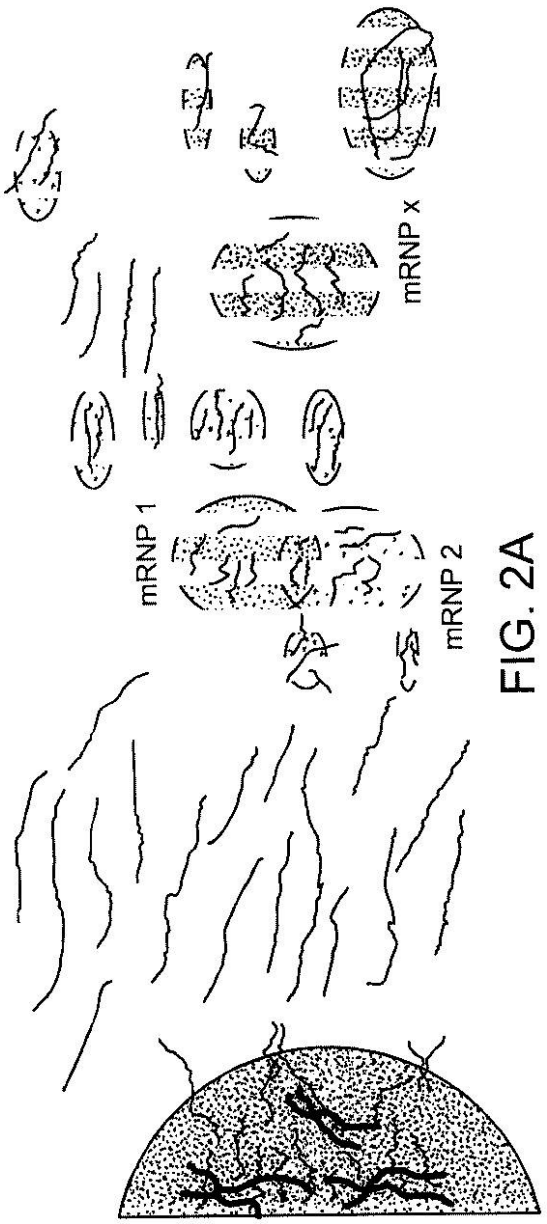

FIG. 2A

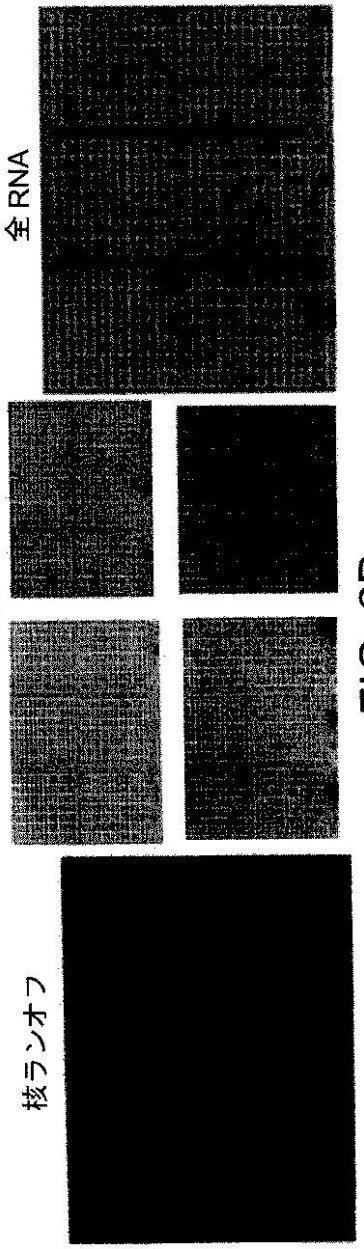

FIG. 2B

【図３】

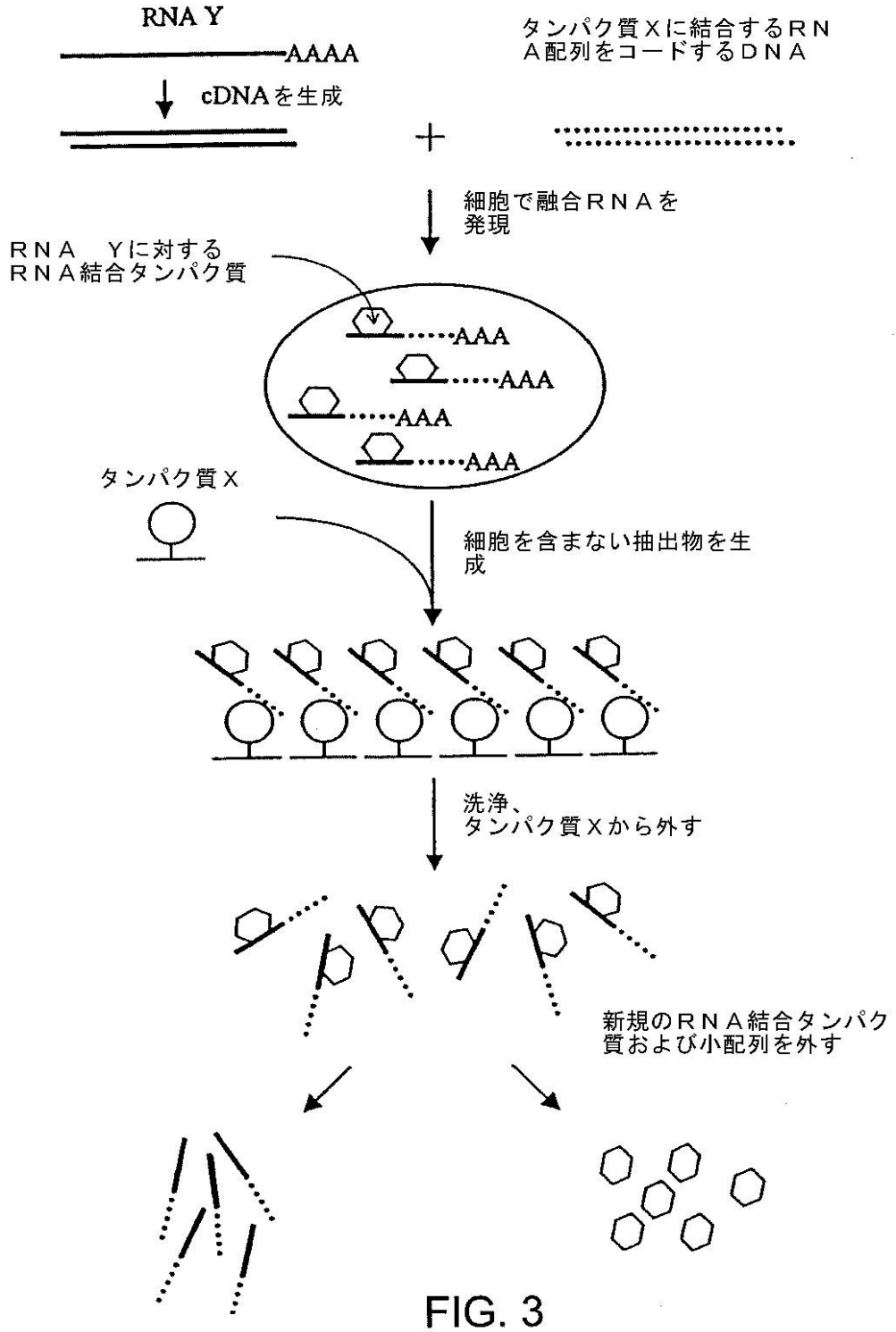
RNA Y
AAAA
cDNAを生成
タンパク質Ｘに結合するＲＮＡ配列をコードするＤＮＡ
細胞で融合ＲＮＡを発現
ＲＮＡ　Ｙに対するＲＮＡ結合タンパク質
AAA
AAA
AAA
AAA
タンパク質Ｘ
細胞を含まない抽出物を生成
洗浄、タンパク質Ｘから外す
新規のＲＮＡ結合タンパク質および小配列を外す

FIG. 3

【図４】

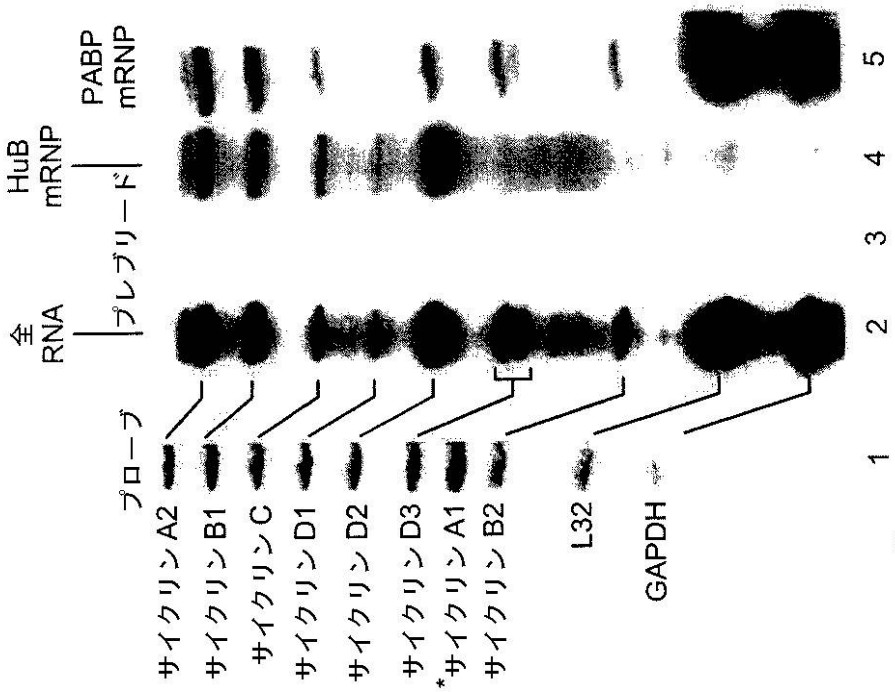

FIG. 4B

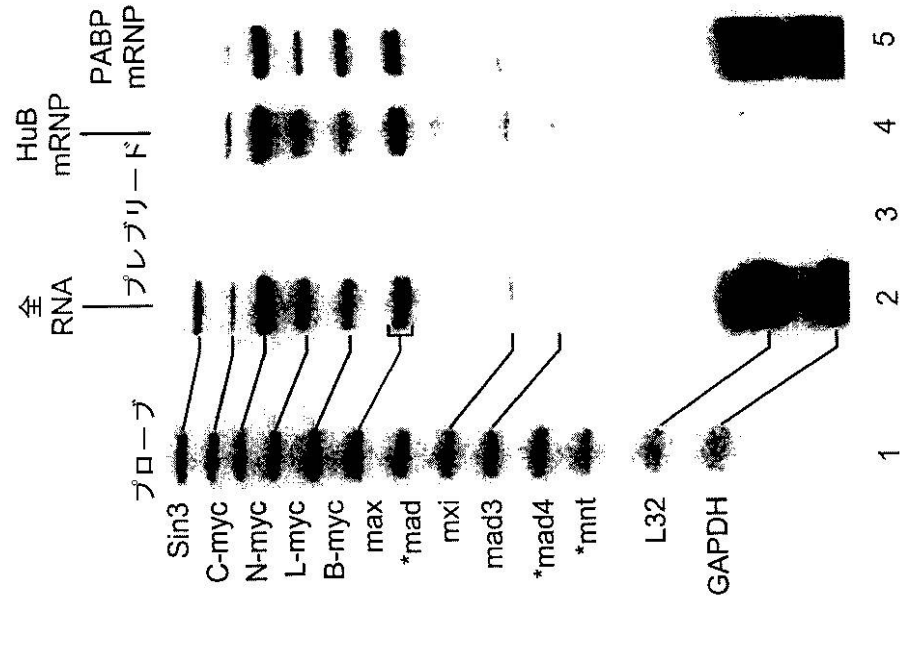

FIG. 4A

【図５】

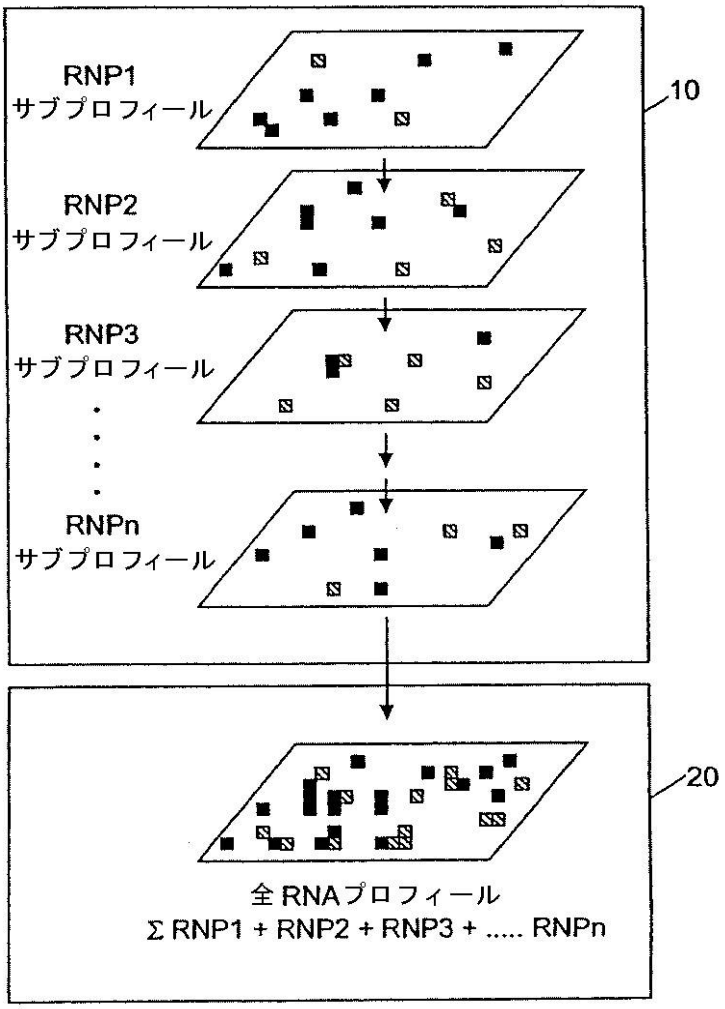
RNP1
サブプロフィール
RNP2
サブプロフィール
RNP3
サブプロフィール
RNPn
サブプロフィール
10
20
全RNAプロフィール
Σ RNP1 + RNP2 + RNP3 + ... RNPn

FIG. 5

【図６】

プレブリード

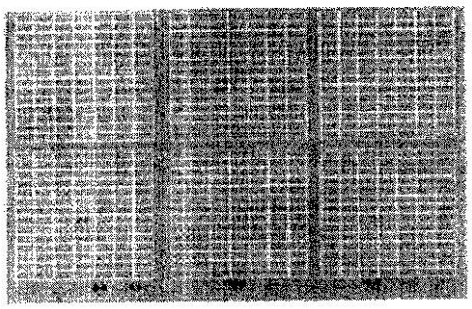

FIG. 6A

PAPB mRNP

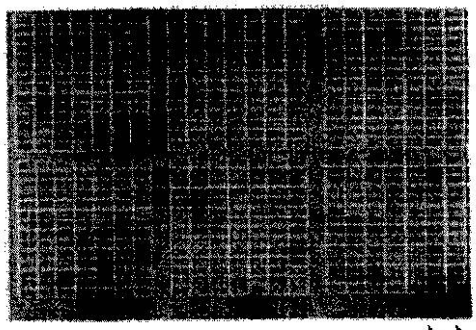

FIG. 6D

a b

HuB mRNP

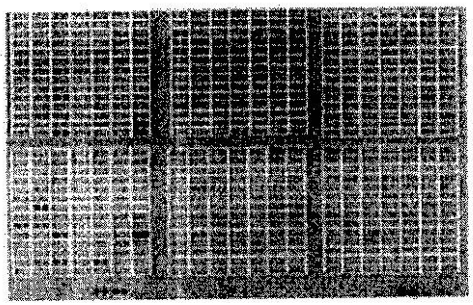

FIG. 6B

a b

全 RNA

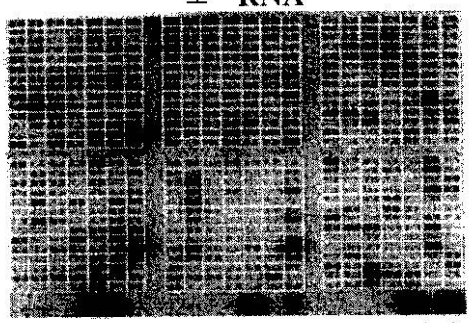

FIG. 6E

a b

eIF-4E mRNP

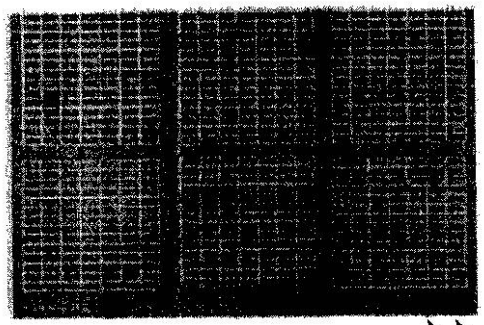

FIG. 6C

a b

【図７】

未処理

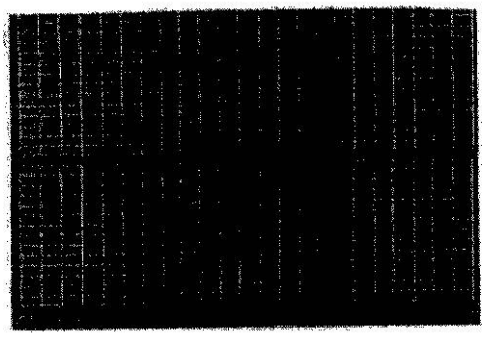

FIG. 7A

RA 処理

HuB mRNP 複合体

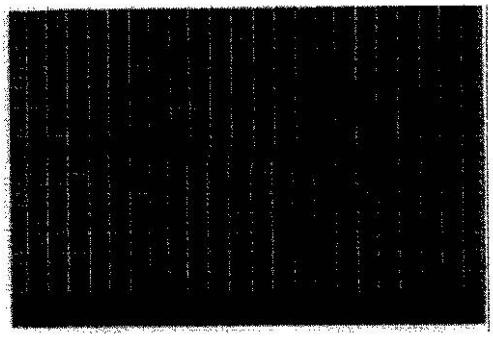

FIG. 7B

HuA mRNP 複合体

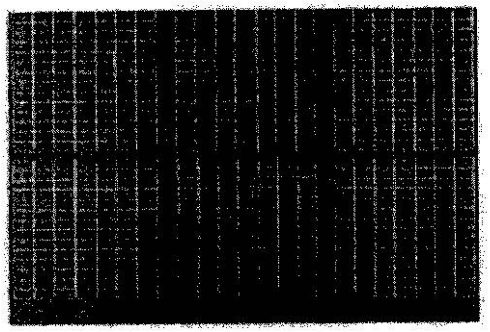

FIG. 7C

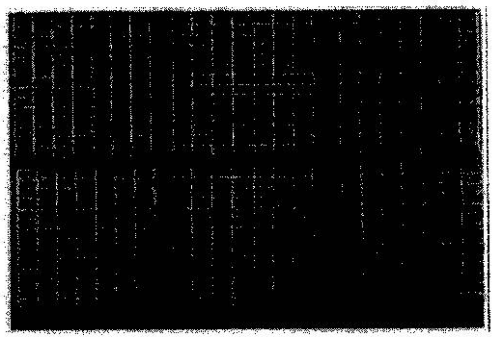

FIG. 7D

全細胞 RNA

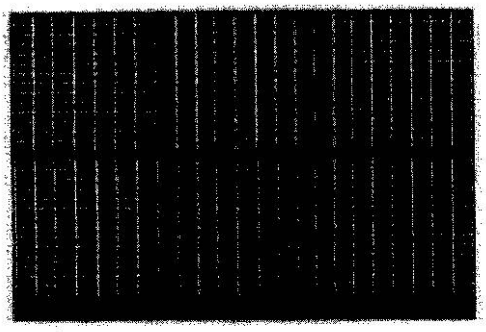

FIG. 7E

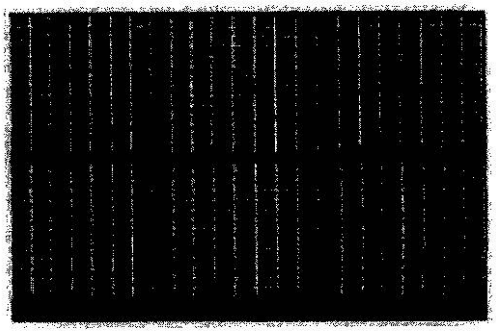

FIG. 7F

【図８】

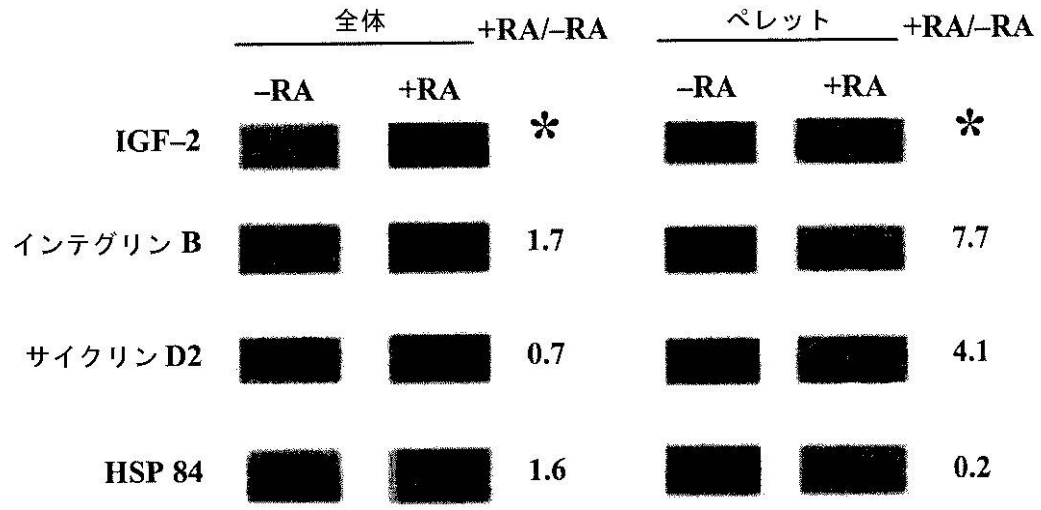

FIG. 8

【図９】

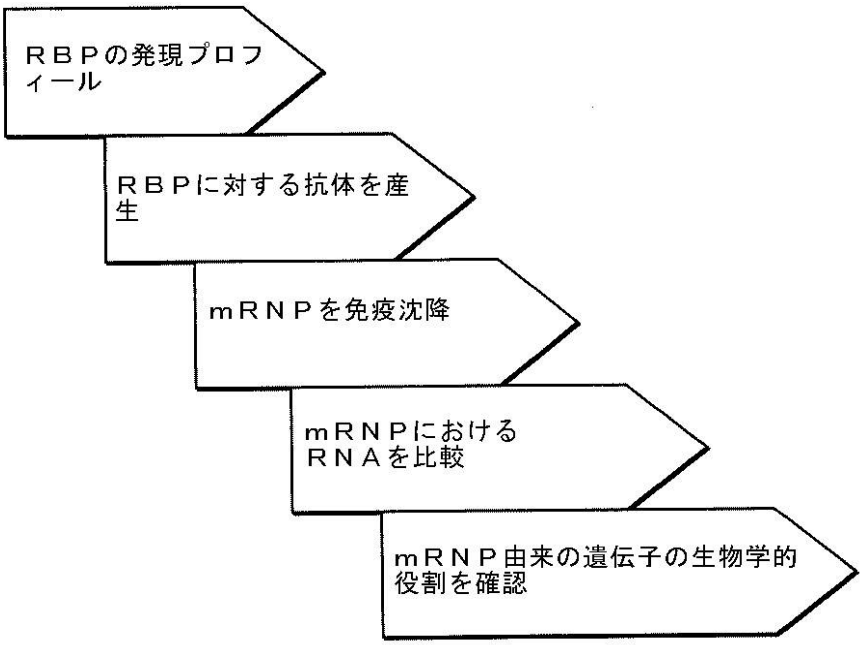

FIG. 9

【図１０】

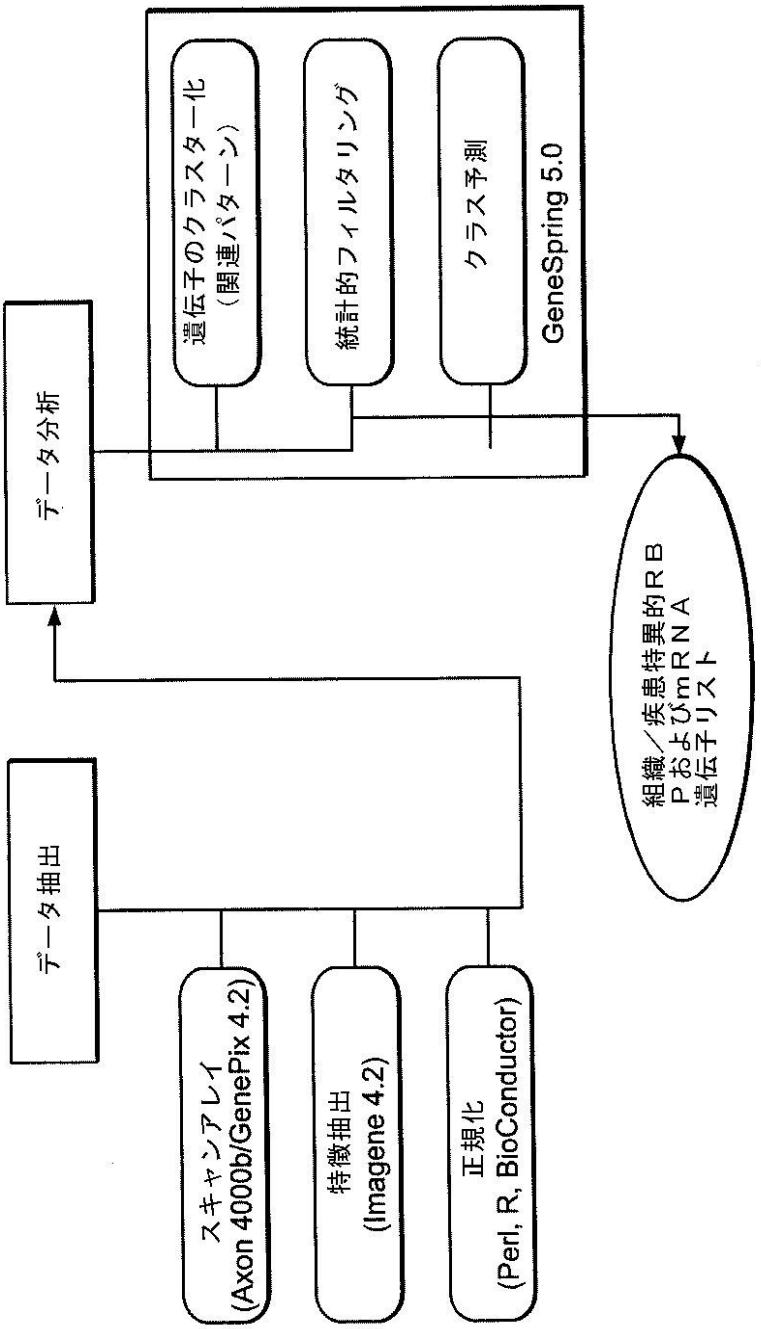
データ抽出
スキャンアレイ
(Axon 4000b/GenePix 4.2)
特徴抽出
(Imagene 4.2)
正規化
(Perl, R, BioConductor)
データ分析
GeneSpring 5.0
遺伝子のクラスター化
（関連パターン）
統計的フィルタリング
クラス予測
組織／疾患特異的ＲＢＰおよびｍＲＮＡ
遺伝子リスト

FIG. 10

【図１１】

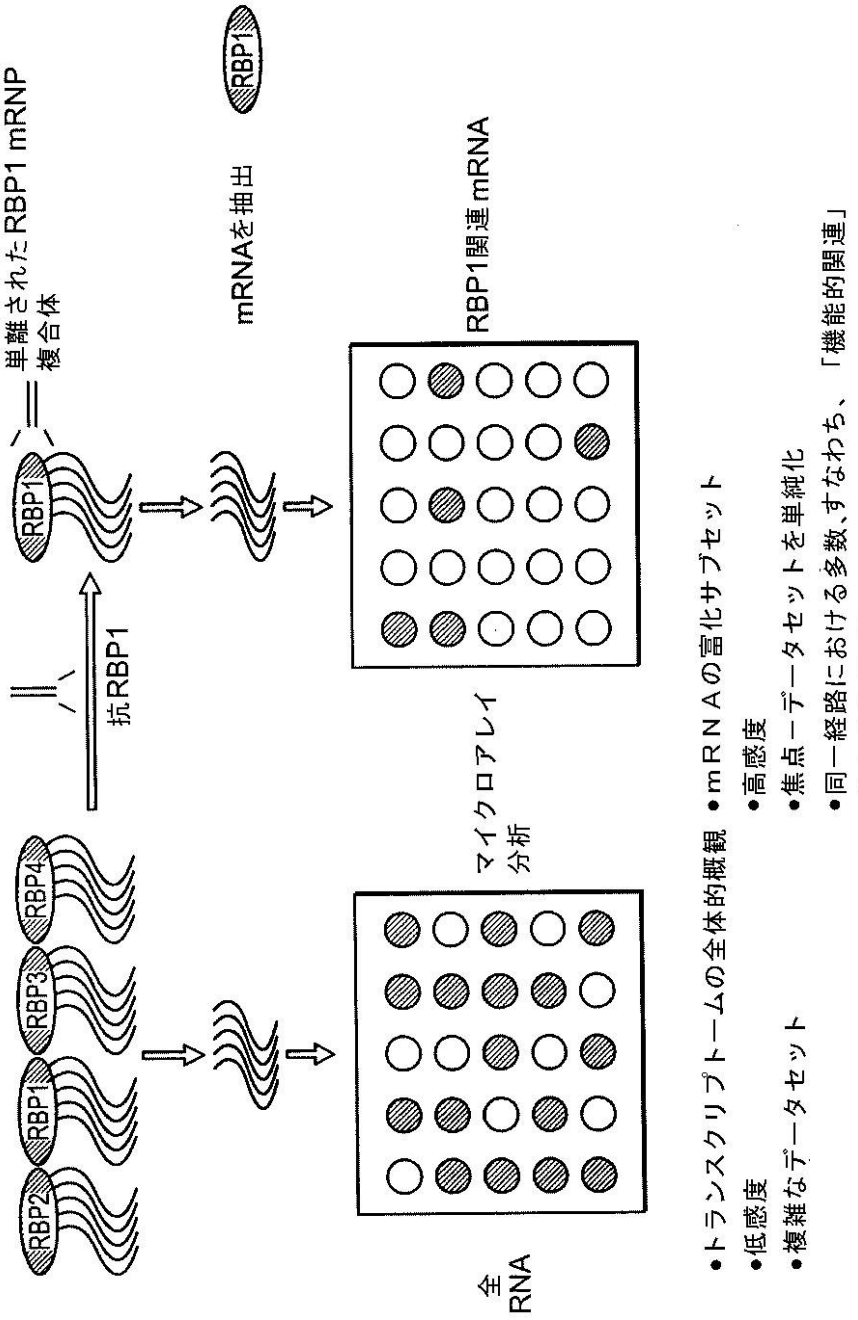
単離されたRBP1 mRNP
複合体
RBP1
抗RBP1
mRNAを抽出
RBP1
RBP1関連mRNA
RBP2
RBP1
RBP3
RBP4
マイクロアレイ
分析
全
RNA
●トランスクリプトームの全体的概観
●低感度
●複雑なデータセット
●ｍＲＮＡの富化サブセット
●高感度
●焦点－データセットを単純化
●同一経路における多数、すなわち、「機能的関連」
●新規成分の同定

FIG. 11

【図１２－１】

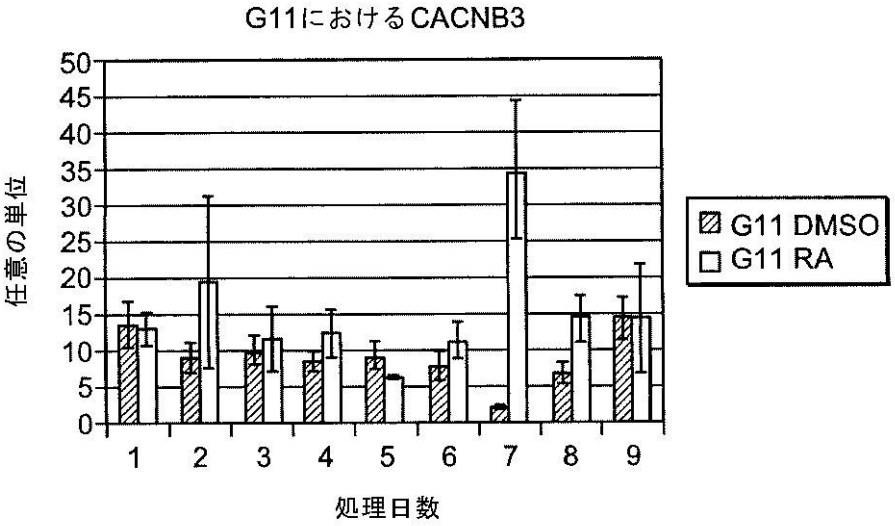

FIG. 12A

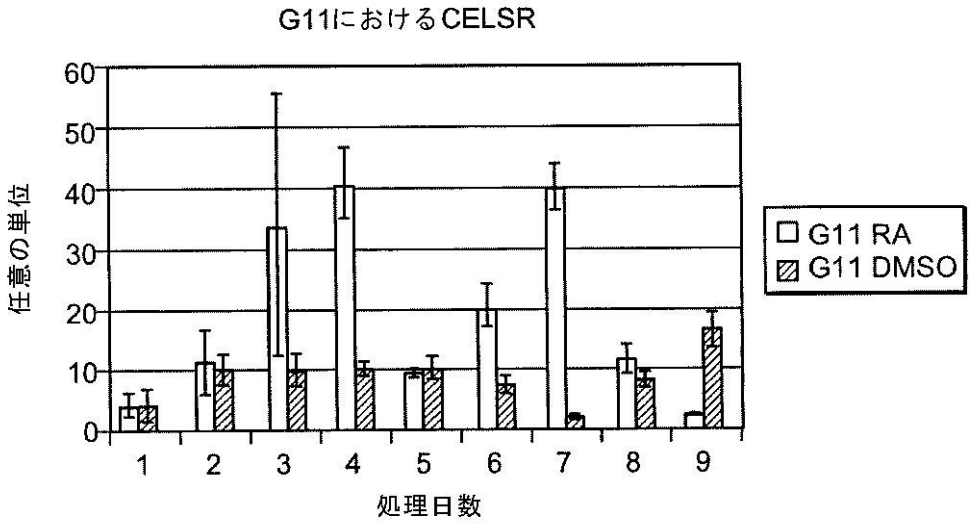

FIG. 12B

【図１２－２】

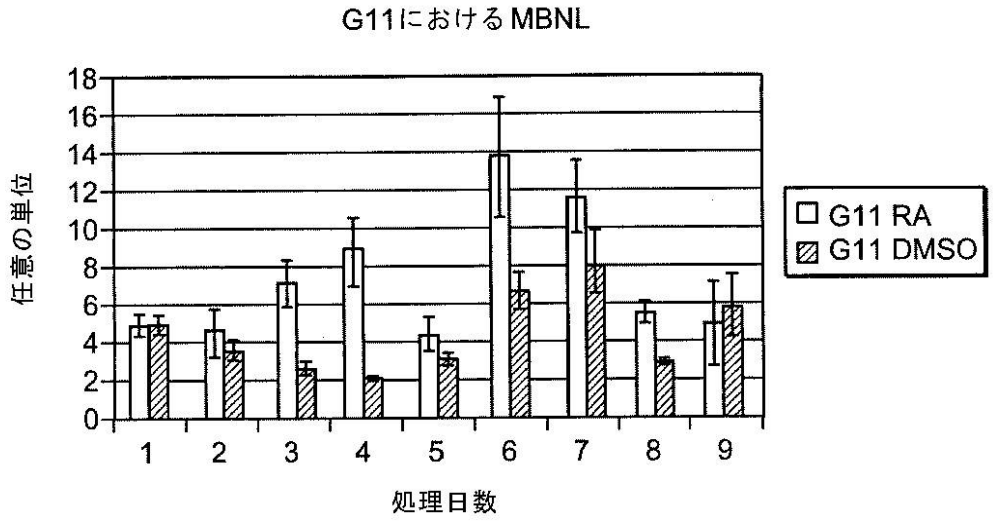

FIG. 12C

【図１３－１】

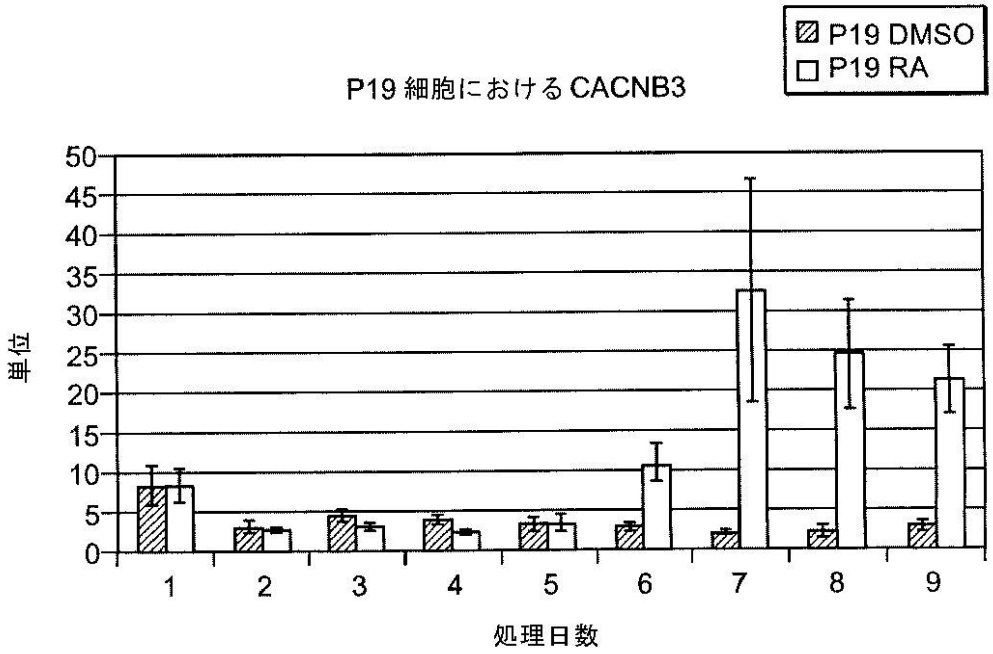

FIG. 13A

【図１３－２】

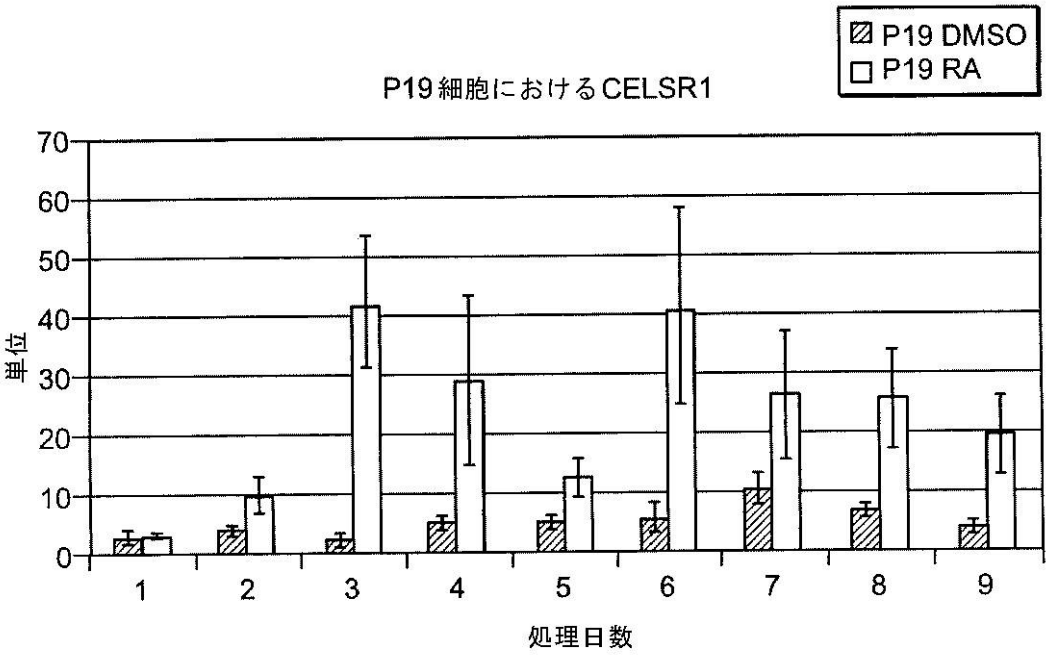

FIG. 13B

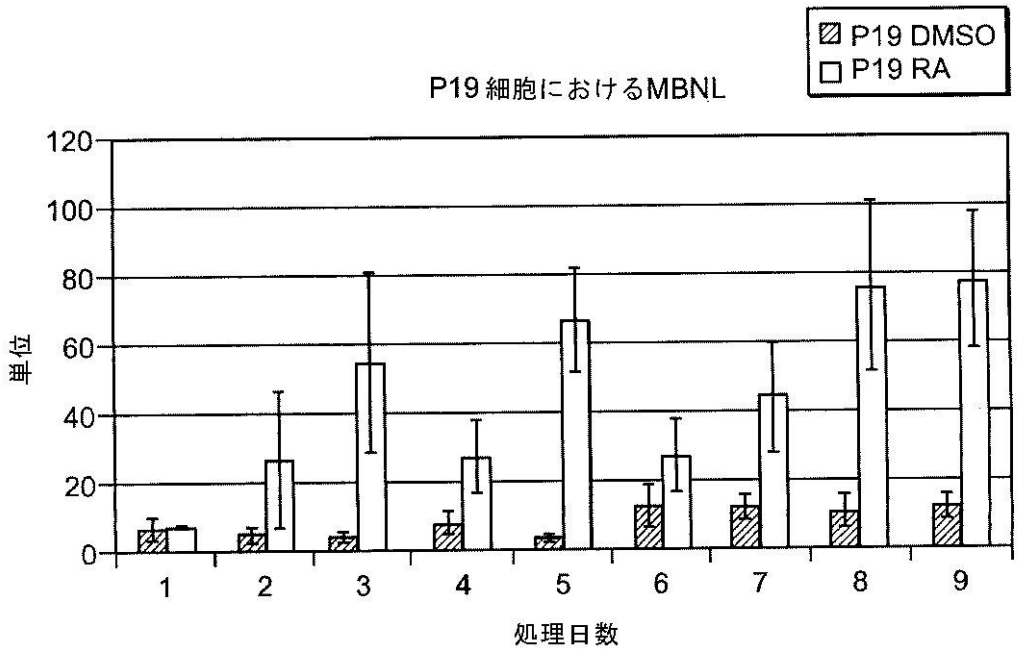

FIG. 13C

【図１４】

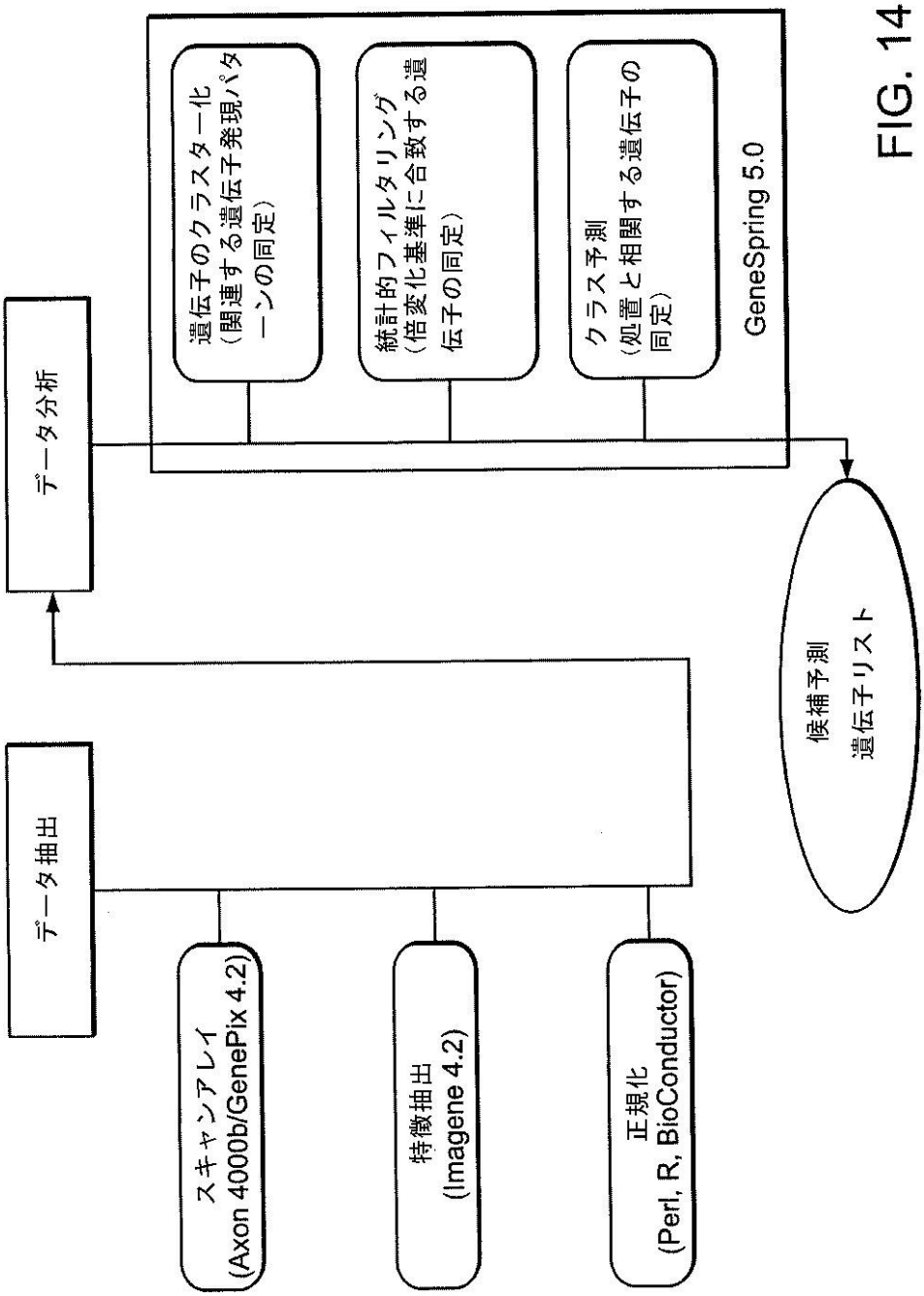
データ抽出
スキャンアレイ
(Axon 4000b/GenePix 4.2)
特徴抽出
(Imagene 4.2)
正規化
(Perl, R, BioConductor)
データ分析
遺伝子のクラスター化
（関連する遺伝子発現パターンの同定）
統計的フィルタリング
（倍変化基準に合致する遺伝子の同定）
クラス予測
（処置と相関する遺伝子の同定）
GeneSpring 5.0
候補予測
遺伝子リスト

FIG. 14

【図１５】

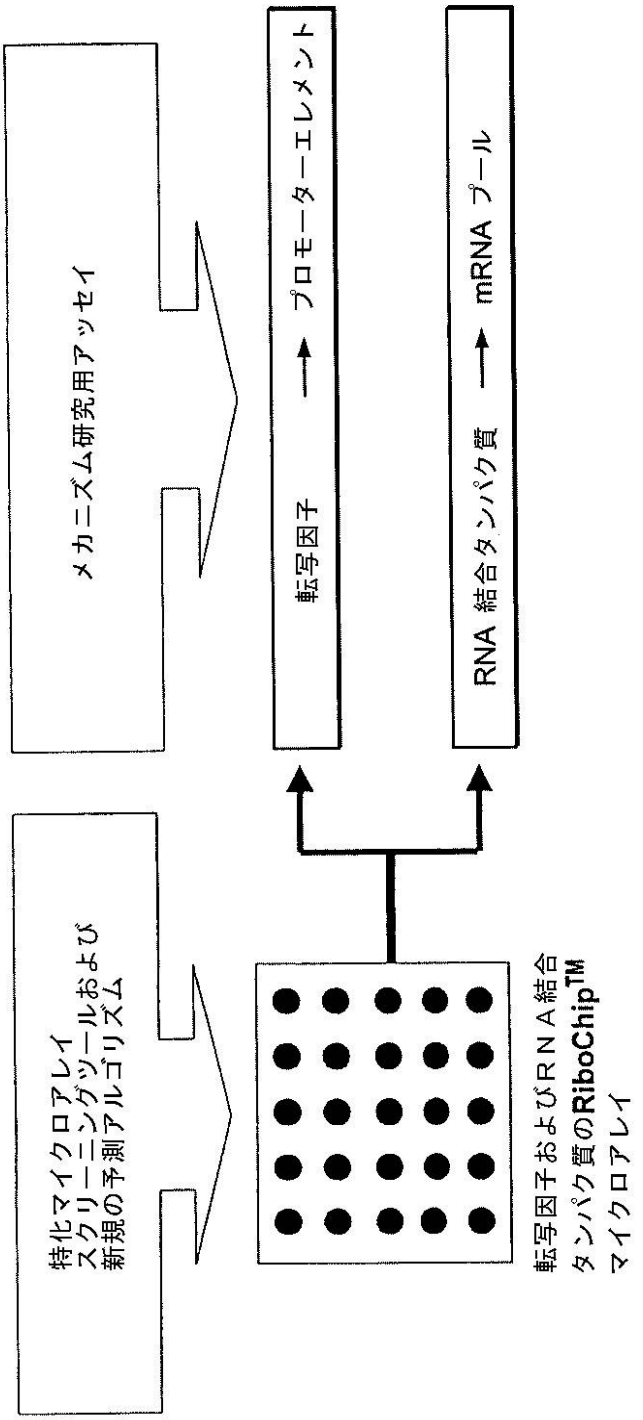
メカニズム研究用アッセイ
転写因子 → プロモーターエレメント
RNA 結合タンパク質 → mRNA プール
特化マイクロアレイ
スクリーニングツールおよび
新規の予測アルゴリズム
転写因子およびＲＮＡ結合
タンパク質のRiboChip™
マイクロアレイ

FIG. 15

【図１６】

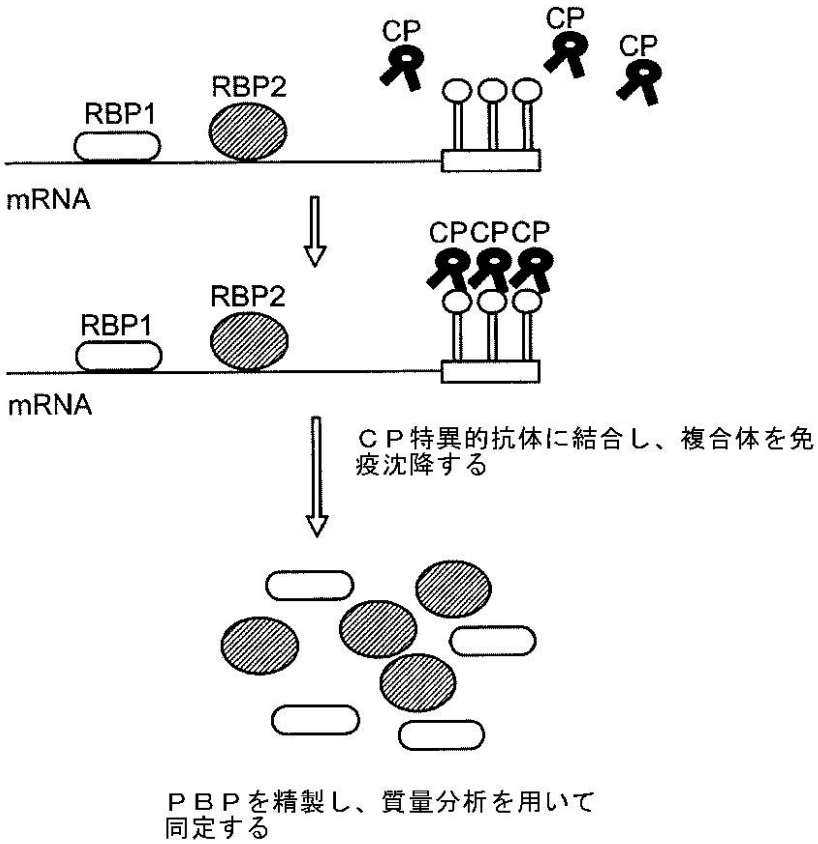

FIG. 16

【手続補正書】
【提出日】平成17年11月9日(2005.11.9)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2006508685000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/38475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; C12P 21/06; C12N 15/00; C07H 21/02
US CL : 435/6, 69.1, 7.1, 7.21. 320.1, 536/23.1, 24.3, 24.32, 530/350, 324
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)
U.S. : 435/6, 69.1, 7.1, 7.21. 320.1, 536/23.1, 24.3, 24.32, 530/350, 324

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WURTZ et al, Identification of Two RNA-Binding Proteins in Balbiani Ring Premessenger Ribonucleoprotein Granules as Presence of These Proteins in Specific Subsets of Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein Particles, Molecular and Cellular Biology, April 1996, Vol 16(4) pages 1425-1435 especially page 1426, column 1, last paragraph, page page 1427, column 1, paragraph 4-5, page 1430, page 1434, column 1, paragraph 2-5.	1, 9-11, 13-16, and 21-22
X	TAMININ et al, Oligomerization properties of fragile-X mental retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. Biochem J. 1999, Vol 343, pages 517-523, especially 517, last paragraph, page 518, column 2, paragraph 1, figure 5, page 521, column 1, paragraph 1-2.	1, 2-5, 7-11, 13-18, 20-24, 27, 50-53
X	CHEN et al, RNA-Protein Interactions: Involvement of NS3, NS5, and 3' Noncoding Regions of Japanese Encephalitis Virus Genomic RNA, Journal of Virology, May 1997 Vol 71)5) pages 3466-3473, especially page3469, column 1, paragraph 1-2	1-2, 20-21
X	US 5,773,246 (KEENE et al) 30 June 1998 (30.06.1998), column 9, line 22 through column 12, line 51, column 13, line 61 through column 14,line 44, column 24, line 33-53, column 26, line 33 through column 28,line 36.	1-58

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent 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
22 March 2004 (22.03.2004)

Date of mailing of the international search report
13 MAY 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
Maria B Marvich, PhD
Telephone No. 571/272-1600

GERRY LEFFERS
PRIMARY EXAMINER

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/38475

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
East databases- USPAT, PGPUB, EPO, JPO, Derwent, IBM-IDB
STN databases-CAPlus, Medline, Biosis
Hel-NI, Hel-N2, CarG, DT-7, PTB, HuD, HuC, elav, rbp9, eIF4B, sxl, tra-2, AUBf, AUF, ASF/SF2, SC35, hnRNP, PLE21, U1snRNP, US-b, AsHur, mRNA and immunoprecipitation, mRNP

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 テネンバウム, スコット エー.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７１２, ダーハム, パーク オーバールック ドライブ ３３１２
(72)発明者 カーソン, クレイグ シー.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７６１３, ラリー, バーハム コート ５６０８
(72)発明者 フェルプス, ウィリアム シー.
アメリカ合衆国 ノースカロライナ ２７７１２, ダーハム, キルトシャー ロード ５８０５

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 CA12 DA02 DA03 EA04
FA02 FA10 GA11 GA18 HA08 HA09 HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QA20 QQ08 QQ20 QQ26 QQ35 QQ53 QQ79
QR08 QR32 QR33 QR35 QR36 QR42 QR47 QR48 QR55 QR58
QR59 QR66 QR69 QR77 QR80 QR82 QS05 QS10 QS12 QS16
QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX02