明　細　書

発明の名称 ：

ＲＮＡ分子とペプチドとの複合体の製造方法、及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、ＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとの複合体を製造する方法、及びその利用等に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬品に代表される分子標的医薬の開発が盛んに行われてきており、その市場規模も広がってきている。しかし、さらなる発展のためには、特異性や、抗原への親和性のより高い「質の良い抗体」を効率良く選別する手法が求められている。また、現在でも多くの原因不明の難病や慢性疾患があるにもかかわらず、その原因究明が進んでいない故、「創薬標的の枯渇」の問題も指摘されている。

[0003] 遺伝子解析と比較してタンパク質の解析は、一般的により困難である。遺伝子に関してはＰＣＲ法等の様々な遺伝子増幅法が開発されており、大量に試料を調製することが容易である一方、タンパク質に関しては直接的に増幅する手段がないこともその一因である。

[0004] そこで、タンパク質の解析をより容易にする方法の一例として、タンパク質と、当該タンパク質をコードする遺伝子とが直接結合している複合体を利用する方法が開発されている。

[0005] 例えば、特許文献１及び非特許文献１～２には、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとを、ピューロマイシンを介して共有結合で連結した複合体を用いて、機能性ペプチドをセレクションする手法が開示されている。より具体的には、遺伝子（ｍＲＮＡ）の３’末端側に所定のリンカーを介してピューロマイシンを連結し、この遺伝子を翻訳に供することによって、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとが、ピューロマイシンを介して連結される。これらの手法は、mRNA display法、又は、In vitr

o virus法等とも称されており、１０^{13}～１０^{14}個程度の上記複合体が含まれる非常に大きなライブラリーを用いることができる手法である。また、この方法から派生した方法として、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに変換してから使用するcDNA display法や、非天然アミノ酸を利用可能なRAPID displayなどの方法も開発されている。

[0006] 上述のmRNA display法において、遺伝子（ｍＲＮＡ）とピューロマイシン又はピューロマイシンの代替物（ペプチド受容分子又はペプチドアクセプターと総称する）との連結方法にはいくつかの方法が開発されている。mRNA display法が開発された当初は、スプリントＤＮＡと称されるＤＮＡを足場として用いる方法が主流であった。この方法は、より具体的には、ペプチド受容分子を含む上記リンカーと、上記遺伝子（ｍＲＮＡ）の３’末端側とを、同じスプリントＤＮＡに対してハイブリダイズさせて、このリンカーと遺伝子（ｍＲＮＡ）の３’末端側とを酵素的にライゲーションするものである（非特許文献３等）。

[0007] しかし、現在では、遺伝子（ｍＲＮＡ）とペプチド受容分子との連結方法として、一端に、ｍＲＮＡの３’末端側の塩基配列と対合する側鎖塩基を有し、他端にペプチド受容分子を有するリンカーを用いる方法（特許文献２等も参照）が主流となっている。このようなリンカーを用いる場合、当該リンカーの上記一端は、ｍＲＮＡの３’末端側の塩基配列とハイブリダイズをし、次いで、リンカーの一端とｍＲＮＡの３’末端とが酵素的に連結されてヘアピン構造が形成される。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：ＷＯ９８/３１７００（１９９８年７月２３日国際公開）
特許文献2：ＷＯ２０１１/０４９１５７（２０１１年４月２８日国際公開）

非特許文献

[0009] 非特許文献1：RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-12302, 1997.

非特許文献2：In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. FEBS Letters 414: 405-408, 1997.

非特許文献3：Optimized Synthesis of RNA-Protein Fusions for in Vitro Protein Selection. METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 318, P268-293, 2000.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 非特許文献３等に記載のスプリントＤＮＡを用いる方法は、上記遺伝子（ｍＲＮＡ）の３’末端側の塩基配列、及び、ピューロマイシンを含む上記リンカーの塩基配列の双方が厳密に制御されていなければ、両者のライゲーションの効率が大きく落ちるという問題がある。

[0011] 一方、特許文献２等にも記載される遺伝子（ｍＲＮＡ）とペプチド受容分子との連結方法（ヘアピン構造の形成）は、１）スプリントＤＮＡが不要である上、２）リンカーの上記一端の塩基配列と、ｍＲＮＡの３’末端側の塩基配列とのハイブリダイズの厳密さに関しても一定の許容度がある（１～数塩基のずれを有していても酵素的に連結可能）という点では、スプリントＤＮＡを用いる方法より優れている。

[0012] しかし、mRNA display法は、遺伝子（ｍＲＮＡ）とペプチド受容分子との連結工程以外にも様々な工程を含んでなる方法である故、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとを連結した複合体を効率良く得るという観点では、未だ多くの改善の余地が残されていると考えられる。

[0013] 本発明の一態様は、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとをペプチド受容分子を介して連結した複合体を効率良く得る方法及びその利用を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本願発明者らは上記課題について鋭意検討を行った。その結果、遺伝子（ｍＲＮＡ）とペプチド受容分子とをスプリントＤＮＡを用いて連結する方法が、意外にも、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとの複合

体を効率良く得るという観点で優れている可能性を見出した。そして、この知見に基づき、スプリントＤＮＡを用いる方法に再び着目した結果として、本願発明に想到するに至った。

[0015] 上記の課題を解決するために、本発明の一態様は、以下のとおりである。

（１） ペプチドをコードするＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとの複合体を製造する方法であって、

工程（ｉ）： プロモーター領域及びその下流に位置するペプチドをコードする領域を含むＤＮＡ分子から転写反応によってＲＮＡ分子を作製する工程であって、当該ＤＮＡ分子の最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる工程と、

工程（ｉｉ）： 工程（ｉ）で得られた上記ＲＮＡ分子の３’末端に、スプリントポリヌクレオチドを足場として用いて、ペプチド受容分子を結合する工程と、

工程（ｉｉｉ）： 工程（ｉｉ）で得られたペプチド受容分子が結合されている上記ＲＮＡ分子を翻訳することによって、上記ＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとが、上記ペプチド受容分子を介して連結している、ＲＮＡ分子とペプチドとの複合体を作製する工程と、

を含んでなる、方法。

（２） ｍＲＮＡディスプレイ法に用いるＤＮＡライブラリーであって、

プロモーター領域及びその下流に位置する候補ペプチドをコードする領域を含み、かつ最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる、複数の異なる候補ＤＮＡ分子を含む、ＤＮＡライブラリー。

発明の効果

[0016] 本発明の一態様によれば、遺伝子（ｍＲＮＡ）とその翻訳産物であるペプチドとをペプチド受容分子を介して連結した複合体を効率良く得る方法とその利用とを提供することが出来るという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]従来の方法の一例と本発明の方法の一例との相違を説明する図である。

[図2]実施例１における結果を示す図である。

[図3]実施例２における結果を示す図である。

[図4]実施例３における結果を示す図である。

[図5]実施例４におけるプロテアーゼを用いたｃＤＮＡの溶出方法を説明する図である。

[図6]実施例４における結果を示す図である。

[図7]本発明の方法の別の一例を説明する図である。

[図8]実施例５における結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明に係る、ペプチドをコードするＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとの複合体を製造する方法は、

工程（ｉ）： プロモーター領域及びその下流に位置するペプチドをコードする領域を含むＤＮＡ分子から転写反応によってＲＮＡ分子を作製する工程であって、当該ＤＮＡ分子の最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる工程と、

工程（ｉｉ）： 工程（ｉ）で得られた上記ＲＮＡ分子の３’末端に、スプリントポリヌクレオチドを足場として用いて、ペプチド受容分子を結合する工程と、

工程（ｉｉｉ）： 工程（ｉｉ）で得られたペプチド受容分子が結合されている上記ＲＮＡ分子を翻訳することによって、上記ＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとが、上記ペプチド受容分子を介して連結している、ＲＮＡ分子とペプチドとの複合体を作製する工程と、を含んでなる。

[0019] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。

[0020] （定義）

本明細書において「ライブラリー」とは、複数（２つ以上）の異なる分子（例えば、複数の異なるＤＮＡ分子、複数の異なるＲＮＡ分子、又は複数の

異なるＲＮＡ－ペプチド複合体）の集合を指し、例えば、同じカテゴリ（例えば、ＤＮＡ分子のカテゴリ、ＲＮＡ分子のカテゴリ、又はＲＮＡ－ペプチド複合体のカテゴリ）に分類される、複数の異なる分子の集合を指す。分子のカテゴリの名称を関して、ＤＮＡライブラリー（ＤＮＡ分子のライブラリー）、ＲＮＡライブラリー（ＲＮＡ分子のライブラリー）、ＲＮＡ－ペプチド複合体ライブラリー（ＲＮＡ－ペプチド複合体分子のライブラリー）などと称する場合もある。本実施形態に係る方法では、必要に応じて、多数の候補分子から出発する選抜が容易となるため、本実施形態における「ライブラリー」は、好ましくは10^9個以上、より好ましくは10^{10}個以上、10^{11}個以上、又は10^{12}個以上、さらに好ましくは10^{13}個以上の異なる分子を含み得る。

[0021] 「選抜／セレクション」とは、集団の中のその他の分子から、ある分子を実質的に区分けすることを意味し、例えば、同じカテゴリに分類される、複数の異なる分子の集合から、ある分子を実質的に区分けすることを意味する。本明細書で用いられる場合、「選抜／セレクション」により、所望の分子が、選抜後にライブラリー中の所望の分子でないものに較べて、少なくとも２倍、好ましくは３０倍以上、より好ましくは１００倍以上、さらに好ましくは１０００倍以上に濃縮され得る。本明細書において示されているように、選抜段階は、所定の方法において、何回でも反復することができ、また、異なったタイプの選抜段階を組み合わせることもできる。

[0022] （従来の方法）

本実施形態に係る方法の説明に先立ち、スプリントポリヌクレオチド（ＤＮＡ）を用いる、従来のｍＲＮＡディスプレイ法の一例を、図１の（Ａ）を参照して簡単に説明する。

[0023] 従来のｍＲＮＡディスプレイ法の一例では、以下の工程を行う。

[0024] （１）まず、候補ペプチドをコードする候補ＤＮＡ分子のライブラリーを用意する。候補ＤＮＡ分子は、通常、二本鎖であり、工程（２）における転写反応に使用されるＲＮＡポリメラーゼが認識するプロモーター領域の下流

にペプチドをコードする領域が配置された構造を有する。ペプチドをコードする領域の上流側には、使用される無細胞翻訳系に適切な翻訳開始配列（例えば、開始コドン）が存在する。

[0025] （２）次いで、候補ＤＮＡ分子にＲＮＡポリメラーゼを作用させて転写反応を行い、対応する候補ＲＮＡ分子のライブラリーを作製する。その後、作製された候補ＲＮＡ分子を他の転写反応成分から分離する。

[0026] （３）次いで、３’末端にペプチド受容分子（例えば、ピューロマイシン）が結合されているリンカーを、候補ＲＮＡ分子の３’末端にライゲーションする。リンカーはヌクレオチドを含んでおり、ヌクレオチドの３’末端にペプチド受容分子が結合されている。ヌクレオチドとペプチド受容分子との間にはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挿入されていてもよい。候補ＲＮＡ分子とリンカーとの結合のために「スプリントポリヌクレオチド」と称するオリゴヌクレオチド（例えば「スプリントＤＮＡ」）を使用してもよい。この場合、候補ＲＮＡ分子の３’末端側にハイブリダイズ可能な配列と、リンカーのヌクレオチドの５’末端側にハイブリダイズ可能な配列とを含むスプリントポリヌクレオチドを足場とする。すなわち、スプリントポリヌクレオチドには、リンカーの５’末端側の配列と相補的な配列とそれに隣接した候補ＲＮＡ分子の３’末端側の配列と相補的な配列とが含まれる。スプリントポリヌクレオチドを介して連結された候補ＲＮＡ分子とリンカーとを例えばＴ４ ＤＮＡリガーゼを用いる反応によってライゲーション（結合）する。なお、工程（２）において使用されるＲＮＡポリメラーゼの特性に起因して任意の頻度（例えば５０％程度）で候補ＲＮＡ分子の３’末端に、１～数塩基が付加される。それゆえ、作製されたライブラリー中には３’末端に１～数塩基が付加された候補ＲＮＡ分子が存在する。この３’末端配列の不均一性に起因してライゲーション効率が低下し得る。次いで、精製を行って、ライゲーションされなかった候補ＲＮＡ分子を除去する。ここで、ライゲーションされなかった候補ＲＮＡ分子を除去しなければ、工程（４）においてＲＮＡとの複合体を形成しないペプチドが生成され、工程（６）における結

合パートナーとの接触の際に、目的の候補ＲＮＡ－ペプチド複合体が得られる効率が低下する。

[0027] （４）次いで、無細胞翻訳系において候補ＲＮＡ分子を翻訳し、当該候補ＲＮＡ分子と対応する候補ペプチドとが上記リンカーを介して連結している候補ＲＮＡ－ペプチド複合体を作製する。次いで、工程（５）の逆転写反応が行えるよう無細胞翻訳系中の夾雑物（高濃度のＭｇやＫ等）を取り除くために、精製を行う。

[0028] （５）次いで、ＲＮａｓｅによる分解を防ぐこと等を目的として、逆転写反応を行って、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体における候補ＲＮＡ分子部分をＤＮＡ（ｃＤＮＡ）分子との二本鎖にする。これにより候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーが作製される。

[0029] （６）次いで、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーを結合パートナー（例えば、固形支持体上に固定された抗体など）と接触させ、結合反応を行う。結合パートナーと結合しなかった候補ＲＮＡ－ペプチド複合体は、例えば、バッファー等で洗浄して除去する。

[0030] （７）次いで、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体と結合パートナーとを解離させて、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体を回収する。このようにして、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーから所望するＲＮＡ－ペプチド複合体が選抜される。

[0031] （８）次いで、ＰＣＲ法によりｃＤＮＡの増幅を行う。この増幅産物を用いて工程（２）に戻り、同様の操作を繰り返し、目的の候補ＲＮＡ－ペプチド複合体を濃縮する。

[0032] （本実施形態の方法）

本実施形態に係る方法を用いたｍＲＮＡディスプレイ法の詳細を、図１の（Ｂ）を参照しての詳細を説明する。

[0033] ［工程１］

工程１では、プロモーター領域及びその下流に位置する候補ペプチドをコードする領域を含み、かつ最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なく

とも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる、複数の異なる候補ＤＮＡ分子を含む、候補ＤＮＡ分子のライブラリーを用意する。

[0034] 本明細書において「ペプチド」とは、２個以上のアミノ酸がペプチド結合によって結合した化合物を指す。アミノ酸の数は限定されず、例えば、２～１０００個、好ましくは４～２００個、より好ましくは６～１００個、さらに好ましくは７～１０個であり得る。ペプチドは、例えば、タンパク質のフラグメント又は全長であってもよい。一例において、ペプチドは、抗体（scFv等）又はそのフラグメントであり得る。

[0035] 候補ＤＮＡ分子は、配列既知のものであってもよいし、配列未知のものであってもよい。当該配列は、ゲノム情報として自然界に存在する配列に基づくもの（例えば、自然界に存在するｍＲＮＡを逆転写したｃＤＮＡ）あってもよいし、人為的に設計した配列であってもよい。例えば、有機合成によってランダムに合成された配列を有してもよいし、ＰＣＲ法を利用したランダム変異の挿入により配列未知のタンパク質をコードするようになったものでもよい。

[0036] 候補ＤＮＡ分子は、候補ペプチドをコードする領域を含む。また、候補ＤＮＡ分子は、必要に応じて、アンチセンス鎖を鋳型として転写を行うための領域（転写制御領域）を含む。転写制御領域としては、例えば、プロモーター領域が挙げられる。これらの転写制御領域は、工程２の転写反応で用いるＲＮＡポリメラーゼの種類によって適宜選択すればよい。一例において、プロモーター領域は、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ、ＳＰ６ ＲＮＡポリメラーゼ又はＴ３ ＲＮＡポリメラーゼが認識するもの（Ｔ７プロモーター、ＳＰ６プロモーター又はＴ３プロモーター）であり得る。

[0037] プロモーター領域及びその下流に位置する候補ペプチドをコードする領域を含む候補ＤＮＡ分子は、転写反応によってペプチドをコードする候補ＲＮＡ分子が生成される限り、一本鎖でも二本鎖でも、それらが混在（部分的に二本鎖でそれ以外が一本鎖）していてもよい。

[0038] 詳細には、候補ＤＮＡ分子中のプロモーター領域は、下流に位置する候補

ペプチドをコードする領域から候補ペプチドをコードする候補ＲＮＡ分子が転写される限り、一本鎖でも二本鎖でも、それらが混在していてもよく、例えば、プロモーター領域の一部が一本鎖（センス鎖又はアンチセンス鎖）から構成され、それ以外の部分が二本鎖であってもよい。このように一部が一本鎖（センス鎖又はアンチセンス鎖）から構成されるものも本明細書における「プロモーター領域」に含まれる。プロモーター領域がプロモーター活性を示せば候補ペプチドをコードする候補ＲＮＡ分子が転写される。プロモーター活性は当該分野で公知の方法で測定することができる。また、候補ペプチドをコードする候補ＲＮＡ分子が転写されることは、当該分野で公知の方法によるＲＮＡ分子の検出又は翻訳によって生成されるペプチドの検出などによって確認することができる。

[0039] さらに、候補ＤＮＡ分子中の候補ペプチドをコードする領域は、上流に位置するプロモーター領域の作用によって候補ペプチドをコードする候補ＲＮＡ分子が転写される限り、一本鎖でも二本鎖でも、それらが混在していてもよく、例えば、コード領域の全体が一本鎖（センス鎖又はアンチセンス鎖）であってもよい。アンチセンス鎖の配列を鋳型として候補ＲＮＡ分子が転写されることから、候補ペプチドをコードする領域は、好ましくは少なくともアンチセンス鎖を含む。このような一部又は全部が一本鎖（センス鎖又はアンチセンス鎖）から構成されるものも本明細書における「ペプチドをコードする領域」に含まれる。候補ペプチドをコードする領域が少なくともアンチセンス鎖を含むことは、候補ＤＮＡ分子の最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含めるためにも好適である。

[0040] 候補ＤＮＡ分子は、必要に応じて、候補ＲＮＡ分子を翻訳するための配列を含む。候補ＲＮＡ分子を翻訳するための配列は、工程４で用いるリボソームの種類によって適宜選択すればよい。無細胞翻訳系として大腸菌由来のリボソームを利用する場合には、開始コドンの上流にリボソーム結合配列であるShine-Dalgarno（SD）配列を含むことにより、翻訳反応の効率が上昇する

。真核生物由来の無細胞翻訳系を用いる場合は、翻訳の開始を促進するKozak配列を有してもよい。また、工程２の転写反応の際に５’末端に７－メチル化グアノシンキャップ構造を付加することもできる。その他、転写するための配列及び翻訳するための配列は、当業者が適宜選択することができる。

[0041] 後述の工程２では、候補ＤＮＡ分子の転写を行う。転写の方法は特に限定されないが、１つの反応系内で候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡ分子の転写を行う場合には、転写制御領域の配列は、候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡ分子間で同じであることが好ましい。また、後述の工程４では、候補ＲＮＡ分子の翻訳を行う。翻訳の方法は特に限定されないが、１つの反応系内で候補ＲＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＲＮＡ分子の翻訳を行う場合には、候補ＲＮＡ分子を翻訳するための配列は、候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡ分子間で同じであることが好ましい。また、後述の工程３では、スプリントポリヌクレオチドを足場として候補ＲＮＡ分子の３’末端とリンカーのオリゴヌクレオチドの５’末端とをライゲーションする。１つの反応系内で候補ＲＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＲＮＡ分子のライゲーションを行う場合には、スプリントポリヌクレオチドとハイブリダイズするための候補ＲＮＡ分子の３’末端側の配列に対応する配列は、候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡ分子間で同じであることが好ましい。したがって、候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡは、好ましい一例において、（ａ）転写制御領域の配列、（ｂ）候補ＲＮＡ分子を翻訳するための配列、及び（ｃ）スプリントポリヌクレオチドとハイブリダイズするための候補ＲＮＡ分子の３’末端側の配列に対応する配列のうちの、１つ、２つ、又は３つ全てが同じである。

[0042] また、候補ＤＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＤＮＡは、より好ましい一例において、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）領域以外の配列が同じである。自然界に存在するｍＲＮＡを逆転写したｃＤＮＡのライブラリーの調製においても、人工的に設計したＤＮＡのライブラリーの調製に

おいても、共通のプライマーセットを用いたＤＮＡの増幅、共通の転写系を用いたＤＮＡからＲＮＡへの転写、及び／又は、共通の翻訳系を用いたＲＮＡからペプチドへの翻訳を可能とするために、ライブラリー中に含まれる全ての候補ＤＮＡ間で、ＯＲＦ領域よりも５’末端側に共通配列を、３’末端側に他の共通配列を設ける技術は公知である。

[0043] 本実施形態における方法における特徴の１つが、候補ＤＮＡ分子のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいることである。好ましくは、連続する２個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる。２’－修飾ヌクレオシド誘導体の一つは、候補ＤＮＡ分子のアンチセンス鎖の５’末端から２つ目の位置に位置することが好ましく、２個以上の２’－修飾ヌクレオシド誘導体がある場合はうち一つが５’末端に位置することが好ましい。あるいは、２’－修飾ヌクレオシド誘導体の一つが、候補ＤＮＡ分子のアンチセンス鎖の５’末端に位置していてもよい。

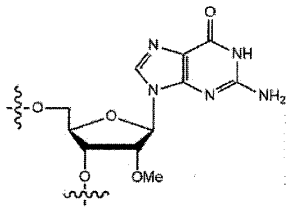
[0044] アンチセンス鎖の５’末端は、ペプチドをコードする領域を挟んでプロモーター領域の反対側である。そのため、アンチセンス鎖では、３’末端側から、（プロモーター領域）－（候補ペプチドをコードする領域）－（２’－修飾ヌクレオシド誘導体）の順序で配置されている（但し、間に他の配列を含んでいてもよい）。そのため、２’－修飾ヌクレオシド誘導体は、転写方向における下流に位置する。

[0045] ２’における修飾は、特に限定されないが、例えば、炭素数１～１０のアルコキシ基、ハロゲン基、及び炭素数１～１０のエステル基等が挙げられる。

[0046] ２’－修飾ヌクレオシド誘導体は、２’－Ｏ－メチルヌクレオシド（例えば、２’－Ｏ－メチルアデノシン、２’－Ｏ－メチルグアノシン、２’－Ｏ－メチルチミジン、２’－Ｏ－メチルシチジン、２’－Ｏ－メチルウリジン、及び２’－Ｏ－メチルイノシン等）が好ましく、２’－Ｏ－メチルグアノシンがより好ましい。２’－Ｏ－メチルグアノシン（Ｇｍ）は下記の構造式

で表される。

[化1]



[0047] このような候補ＤＮＡの製造方法は特に限定されないが、一例として、５’末端側の少なくとも１個のヌクレオシドが２’－修飾ヌクレオシド誘導体に置換されているReverseプライマーと通常のForwardプライマーとを用いて、２’－修飾ヌクレオシド誘導体に置換されていない候補ＤＮＡ分子のライブラリーに対して、ＰＣＲ反応を行うことが挙げられる。上記Reverseプライマーは、５’末端のヌクレオシドと５’末端から２番目のヌクレオシドとが何れも２’－修飾ヌクレオシド誘導体に置換されていることが好ましい。

[0048] ［工程２］

工程２では、上記候補ＤＮＡ分子を鋳型として転写し、対応する候補ＲＮＡ分子のライブラリーを作製する（「工程（ｉ）」の一態様）。

[0049] 転写は、公知の方法で行えばよい。典型的には、転写はインサイチュ又はインビトロにおいて行い、インビトロにおいて行うことが好ましい。インビトロにおいて行う場合、ＲＮＡポリメラーゼの種類は特に限定されず、例えば、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ、ＳＰ６ ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３ ＲＮＡポリメラーゼ等のバクテリオファージ由来のＲＮＡポリメラーゼが好ましいものとして挙げられ、Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼがより好ましい。

[0050] ここで、本実施形態では、ＲＮＡの鋳型となるアンチセンス鎖の５’末端側に、少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体が存在する。これにより、ＤＮＡ鋳型に対応しない１～数塩基がＲＮＡの３’末端に付加される現象が低減される。したがって、本実施形態によれば、上記に挙げたような塩基付加を起こし易いＲＮＡポリメラーゼを用いても、効果的に塩基付加を低減することができる。好ましい一例において、候補ＲＮＡ分子のライブラ

リー中の６０％以上、７０％以上、８０％以上、又は９０％以上の候補ＲＮＡ分子が塩基付加されていない。

[0051] 好ましい一例において、候補ＲＮＡ分子のライブラリー中の全ての候補ＲＮＡは、（ａ）転写制御領域の配列、及び（ｂ）スプリントポリヌクレオチドとハイブリダイズするための３’末端側の配列のうちの一方又は両方が同じである。

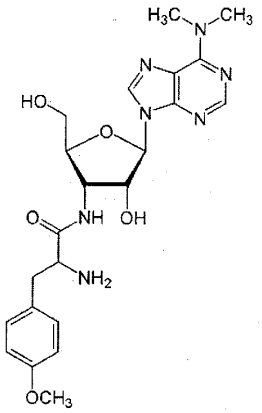
[0052] 従来の方法では、使用するＲＮＡポリメラーゼの特性に起因して候補ＲＮＡ分子の３’末端に１～数塩基が付加されるため、工程３におけるリンカーの結合効率が低下するという問題があった。この問題を解決するために、候補ＲＮＡの３’末端周辺部分に相補的で３’末端にピューロマイシンを結合したリンカーをハイブリダイズさせ、次に両者をＴ４
ＲＮＡリガーゼを用いるライゲーションにより連結してヘアピン構造を形成させる方法
が開発された。また、分解能の高い電気泳動によってライブラリーの精製を行い、１～数塩基が付加された候補ＲＮＡ分子を除去することも考えられた。一方、本実施形態の方法では、精製を行わなくとも後述の工程３においてより簡便にかつ高い効率でペプチド受容分子を結合することができる。

[0053] ［工程３］

工程３では、候補ＲＮＡ分子の３’末端に、スプリントポリヌクレオチドを足場として用いて、ペプチド受容分子を結合する（「工程（ｉｉ）」の一態様）。

[0054] 「ペプチド受容分子」は、翻訳されたペプチドと連結できるものであれば特に限定されないが、例えば、ピューロマイシン、ピューロマイシン誘導体、オリゴＲＮＡ・アミノ酸複合体（例えば、ＷＯ２０１１／０４９１５７に記載のペプチドアクセプター領域）等の公知のものが挙げられる。ピューロマイシン（Ｐｕ）は下記の構造式で表される。

[化2]



[0055] 候補ＲＮＡ分子の３’末端とピューロマイシンとは、典型的には、オリゴヌクレオチドを含むリンカーを介して結合される。オリゴヌクレオチドの長さに特に限定はなく、例えば、１０～３０個程度、好ましくは１５～２０個のヌクレオチドからなる。オリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチドとしては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ等が挙げられる。リンカーは、オリゴヌクレオチド以外に、さらに他の物質（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ））が挿入されていてもよい。ＰＥＧの長さは、特に限定されないが、一例において、主鎖の原子数が６～１８個のものを３～１０個連結したものであることが好ましい。リンカーは、一例において、５’－（オリゴヌクレオチド）－（ＰＥＧ）－（ペプチド受容分子）－３’の構造であり得る。このようなリンカーは、公知の方法を作製すればよい。

[0056] スプリントポリヌクレオチドは、候補ＲＮＡ分子の３’末端側にハイブリダイズ可能な配列と、リンカーのオリゴヌクレオチドの５’末端側にハイブリダイズ可能な配列とを含む。したがって、候補ＲＮＡ分子、ペプチド受容分子とオリゴヌクレオチドとを含むリンカー、及びスプリントポリヌクレオチドを共存させると、スプリントポリヌクレオチドの５’末端側に候補ＲＮＡ分子の３’末端側がハイブリダイズし、スプリントポリヌクレオチドの３’末端側にオリゴヌクレオチドの５’末端側がハイブリダイズする。そして、例えば、ＤＮＡリガーゼ（Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ等）又はＲＮＡリガーゼ（

Ｔ４ ＲＮＡリガーゼ等）等を用いて、候補ＲＮＡ分子の３’末端とオリゴヌクレオチドの５’末端とをライゲーションする。

[0057] スプリントポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドとしては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡ、ＬＮＡ等が挙げられる。逆転写時のプライマーとしても使用できる観点から、一例において、ＤＮＡであることが好ましい。

[0058] スプリントポリヌクレオチドは、例えば、１４～４０個程度の連続するヌクレオチドを含んで構成されている。一例では、スプリントポリヌクレオチドの５’末端側の例えば、７～２０個程度、好ましくは９～１５個の連続するヌクレオチドが、候補ＲＮＡ分子の３’末端側の配列とハイブリダイズし、スプリントポリヌクレオチドの３’末端側の例えば、７～２０個程度、好ましくは９～１５個の連続するヌクレオチドが、リンカーのオリゴヌクレオチドの５’末端側の配列とハイブリダイズする。特に好ましい一例では、スプリントポリヌクレオチドにハイブリダイズした状態で、候補ＲＮＡ分子の３’末端と、リンカーのオリゴヌクレオチドの５’末端との間にヌクレオチドのギャップが存在しないように設計される。

[0059] 本実施形態では、上述のとおり、候補ＲＮＡにおける塩基の付加が低減されているため、ライゲーション効率が向上する。そのため、ペプチド受容分子と結合しなかった候補ＲＮＡ分子を除去するための精製を行う必要がない。一方、従来の方法ではライゲーション効率が低く、ライゲーションされなかった候補ＲＮＡ分子を除去する必要があった。除去をしなければ、翻訳の際にＲＮＡとの複合体を形成しないペプチドが生成され、その後の結合パートナーとの接触の際に、目的の候補ＲＮＡ－ペプチド複合体が得られる効率が低下する。このような精製工程を省略することにより比較的不安定なＲＮＡ分子が分解される可能性を低減することができる。

[0060] ［工程４］

工程４では、工程３で得られたペプチド受容分子が結合されている候補ＲＮＡ分子を翻訳することによって、候補ＲＮＡ分子と、当該候補ＲＮＡ分子にコードされている候補ペプチドとが、ペプチド受容分子を介して連結して

いる、候補ＲＮＡ分子と候補ペプチドとの複合体（候補ＲＮＡ－ペプチド複合体）のライブラリーを作製する（「工程（ｉｉｉ）」の一態様）。

[0061] 翻訳は、無細胞翻訳系で行うことが好ましい。無細胞翻訳系としては、小麦胚芽又はウサギ網状赤血球等の抽出液を使用する無細胞翻訳系、及び、大腸菌のリボソームを用いる系で、翻訳に必要な因子をそれぞれ精製して混ぜ合わせた再構成型の無細胞翻訳系等が挙げられる（H. F. Kung, B. Redfield, B. V. Treadwell, B. Eskin, C. Spears and H. Weissbach (1977) “DNA-directed in vitrosynthesis of beta-galactosidase. Studies with purified factors” The Journal of Biological Chemistry Vol. 252, No. 19, 6889-6894 ; M. C. Gonza, C. Cunningham and R. M. Green (1985) “Isolation and point of action of a factor from Escherichia coli required to reconstruct translation” Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 82, 1648-1652 ; M. Y. Pavlov and M. Ehrenberg (1996) “Rate of translation of natural mRNAs in an optimized in Vitrosystem” Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 328, No. 1, 9-16 ; Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa and T. Ueda (2001) “Cell-free translation reconstituted with purified components” Nature Biotechnology Vol. 19, No. 8, 751-755 ; H. Ohashi, Y. Shimizu, B. W. Ying, and T. Ueda (2007) “Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components” Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 352, No. 1, 270-276）。再構成型の無細胞翻訳系とは、主に大腸菌抽出液を使用する無細胞翻訳系を細分化し、各因子を再構成することにより、翻訳と関係のない成分が除かれたシステムであり、従来の細胞抽出液を使用する無細胞翻訳系よりもヌクレアーゼやプロテアーゼなどの阻害物質の混入を容易に防ぐことができる。好ましい無細胞翻訳系として、PURE systemが挙げられる。

[0062] 無細胞翻訳系は、ヌクレアーゼ（特には、ＲＮａｓｅ）を実質的に含まな

いことが好ましい。本明細書において「ヌクレアーゼを実質的に含まない」とは、ヌクレアーゼ活性を測定した場合に、ヌクレアーゼ活性を示す数値が一定程度以下であることをいう。ヌクレアーゼ活性の測定方法は公知であり、例えば、蛍光標識したＲＮＡ基質のＲＮａｓｅによる分解を蛍光強度の変化を指標として検出することができる。一例において、無細胞翻訳系は、ＲＮａｓｅを実質的に含まないことが好ましい。ヌクレアーゼ（特には、ＲＮａｓｅ）を実質的に含まないことにより、ＲＮＡ分子が分解される虞が低減されるため、従来工程４の後に行っていた逆転写反応を行う必要がない。

[0063] また、無細胞翻訳系は、候補ＤＮＡ分子に対して活性のあるＲＮＡポリメラーゼを実質的に含まないことが好ましい。本明細書において「候補ＤＮＡ分子に対して活性のあるＲＮＡポリメラーゼ」とは、候補ＤＮＡ分子に対して転写反応を行うことができるＲＮＡポリメラーゼを指す。例えば、候補ＤＮＡに含まれるプロモーターに対応するＲＮＡポリメラーゼであって、失活していないものが挙げられる。候補ＤＮＡ分子に対して活性のあるＲＮＡポリメラーゼを実質的に含まないことにより、工程４の前に候補ＤＮＡ分子及びライゲーションされなかった候補ＲＮＡ分子を除去する必要がない。

[0064] また、無細胞翻訳系は、プロテアーゼを実質的に含まないことが好ましい。本明細書において「プロテアーゼを実質的に含まない」とは、プロテアーゼ活性を測定した場合に、プロテアーゼ活性を示す数値が一定程度以下であることをいう。プロテアーゼ活性の測定方法は公知であり、例えば、蛍光標識したカゼインのプロテアーゼによる分解を蛍光強度の変化を指標として検出することができる。プロテアーゼを実質的に含まないことにより、翻訳されたペプチドが分解されることが低減される。

[0065] 候補ペプチドを構成するアミノ酸は、天然型のアミノ酸であってもよいし、非天然型のアミノ酸であってもよい。

[0066] 本実施形態では、一例において、候補ＲＮＡ分子から翻訳された候補ペプチドのＣ末端にペプチド受容分子が連結し、候補ＲＮＡ分子と対応する候補ペプチドとがペプチド受容分子を介して連結している候補ＲＮＡ－ペプチド

複合体が作製される。ペプチド受容分子がピューロマイシンである場合、ピューロマイシンがリボソームにおけるペプチド転移反応の基質として伸長中のペプチド鎖のＣ末端に連結する。一例において、ＲＮＡ分子－（任意でリンカー）－ペプチド受容分子－候補ペプチドの構造であり得る。

[0067] ＲＮａｓｅ及び／又はプロテアーゼを含まない無細胞翻訳系を用いる好ましい一例において、工程４の後に精製を行う必要がない。

[0068] 一例において、工程４で作製された候補ＲＮＡ－ペプチド複合体は逆転写反応に供されないため、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーは、候補ＲＮＡが一本鎖である。

[0069] ［工程５］

工程５では、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーを結合パートナーと接触させ、結合反応を行う。

[0070] 結合反応は、例えば、抗原と抗体との結合、タンパク質レセプターとリガンドとの結合、接着分子と相手方分子との結合、酵素と基質との結合、核酸とそれに結合するタンパク質との結合、情報伝達系におけるタンパク質同士の間の結合、糖タンパク質とタンパク質との結合、又は糖鎖とタンパク質との結合などに基づき得る。結合パートナーは、セレクションの目的に応じて適宜選択すればよい。結合パートナーは、例えば、固相に固定されていてもよいし、固相に捕捉される物質で標識されていてもよい。固相は結合パートナーと結合できる物であればよく、固相の形状は板状、棒状、粒子状、又はビーズ状等が挙げられる。固相は、スクリーニングに用いる媒体である水や有機溶媒に不溶な素材を用いることができる。例えば、プラスチック、ガラス、ポリスチレン等の樹脂、金薄膜などの金属を固相に利用する素材として挙げることができる。磁気ビーズ等を用いることもできる。なお、１つの反応系中に含まれる結合パートナーは、１種類であってもよいし、複数種類であってもよい。

[0071] 結合パートナーと結合しなかった候補ＲＮＡ－ペプチド複合体は、例えば、バッファー等で洗浄して除去すればよい。

[0072] ［工程６］

工程６では、逆転写反応を行って、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体における候補ＲＮＡ分子部分をＤＮＡ（ｃＤＮＡ）分子との二本鎖にする。本実施形態において、逆転写反応は、溶出等によって結合パートナーから解離させた後に行うこともできるし、結合パートナーに結合した状態で行うこともできる。結合パートナーに結合した状態で行うことにより、ＲＮＡ（アプタマー）によって結合しているｃＤＮＡを抑制できるというメリットがある。逆転写反応は例えば通常の方法で行えばよい。本実施形態では、工程５よりも後に逆転写反応を行うため、工程５よりも前に逆転写反応のための精製を行う必要がないというメリットを有する。そのため、精製により候補ＲＮＡ分子の多様性が減少するという従来の方法における問題が生じない。

[0073] ［工程７］

工程７では、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体と結合パートナーとを解離させて、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体を回収する。解離させる方法は、結合パートナーとの結合の種類に応じて適宜選択すればよい。例えば、Ficin、パパイン、トリプシンなどのプロテアーゼ、または、ＩｄｅＳ、ＩｄｅＺなどの抗体配列特異的なプロテアーゼが利用可能である。このように工程５～７を行って、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーから所望するＲＮＡ－ペプチド複合体が選抜される（「工程（ｉｖ）」の一態様）。

[0074] ［工程８］

選抜されたＲＮＡ－ペプチド複合体は、その後、ＲＮＡ及び／又はペプチドの配列等が分析されてもよい。分析は、通常のアミノ酸配列シークエンサーで行うこともでき、このようなペプチドに結合しているＲＮＡからＤＮＡを逆転写し、得られたｃＤＮＡの塩基配列を解析することによって行うこともできる。また、適宜、精製や定量を行ってもよい。

[0075] また、ここで得られたｃＤＮＡを用いて上記工程１を行うこともできる。例えば、５’末端の少なくとも１個のヌクレオシドが２’－修飾ヌクレオシド誘導体に置換されているReverseプライマーと通常のForwardプライマーと

を用いて、ここで得られたｃＤＮＡ又はその増幅産物に対して、ＰＣＲ反応を行う。そしてこれに得られたＤＮＡ分子を用いて再び工程２～７を行う。このように工程１～７のサイクルを複数回繰り返すことによって、所望の性質を有する候補ＲＮＡ－ペプチド複合体が濃縮される。そして、これを用いて解析を行う。

[0076] （別の実施形態の方法）

別の実施形態に係る方法では、上述の実施形態の工程５と工程６との順序を入れ替えることも可能である。すなわち、従来のｍＲＮＡディスプレイ法の工程４において、工程３で得られたペプチド受容分子が結合されている候補ＲＮＡ分子を翻訳した後、続いて工程６に相当する逆転写反応を行い、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体における候補ＲＮＡ分子部分をＤＮＡ（ｃＤＮＡ）分子との二本鎖にする。その後、工程５に相当する、候補ＲＮＡ－ペプチド複合体のライブラリーを結合パートナーと接触させる結合反応を行う。

[0077] ここで、逆転写反応において、試料にEDTAを加えた後に加熱処理することにより、逆転写反応効率を向上させることができる。

[0078] （応用例）

創薬の標的分子に相互作用するタンパク質の同定、薬剤標的タンパク質の解析、抗体分子の取得やその改変、抗体が認識する抗原タンパク質及びその抗原部位の特定、種々の機能性タンパク質やペプチドの改変、ワクチンの活性確認等が挙げられる。

[0079] 特に本実施形態は、ペプチドセレクション法の一つであるmRNA display法を改良したものであり、ＤＮＡライブラリーのアンチセンス鎖の５’末端に２’－Ｏ－メチルグアノシンで修飾することで、塩基の付加を抑えｍＲＮＡライブラリーの３’末端を揃え、ペプチド受容分子（例えば、ピューロマイシン）との連結効率を飛躍的に向上させた（約５０％から約９０％まで）。さらに、無細胞翻訳系（PURE system）からＲＮＡポリメラーゼを除いたことにより、翻訳前に鋳型ＤＮＡやピューロマイシンを含まないｍＲＮＡを精製・ヌクレアーゼ処理などによって除去する必要がなくなった。さらに、ＲＮ

ａｓｅを含まないPURE systemを用いることで、ＲＮＡが比較的安定であり、翻訳直後の精製や逆転写反応を行う必要がなくなった。これらのことから、精製や逆転写をポジティブセレクション時に行うことが可能となり、ペプチドセレクションが簡便化された。これにより、マルチチャンネルの自動分注器を用いたハイスループットなペプチドスクリーニングが可能となった。また、全体の工程数が少なく、作業中にＲＮＡの分解及び吸着を低減することができるため、より効率的にペプチドスクリーニングを行うことができる。さらに並列化することにより、コストが削減される。

[0080] これにより、抗体医薬のスクリーニングや原因不明の疾患の原因特定による新たな創薬標的の発掘、ワクチンによる効果的な抗体産生の定量化による効果の高いワクチン開発の支援、免疫解析による健康状態の確認、疾患の分類などが可能となる。また、少数疾患の研究を促進にも繋がる。このように、本実施形態の方法は、広い用途において応用され得る。

[0081] （本発明に係る具体的な態様の例示）

（１） ペプチドをコードするＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとの複合体を製造する方法であって、

工程（ｉ）： プロモーター領域及びその下流に位置するペプチドをコードする領域を含むＤＮＡ分子から転写反応によってＲＮＡ分子を作製する工程であって、当該ＤＮＡ分子の最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる工程と、

工程（ｉｉ）： 工程（ｉ）で得られた上記ＲＮＡ分子の３’末端に、スプリントポリヌクレオチドを足場として用いて、ペプチド受容分子を結合する工程と、

工程（ｉｉｉ）： 工程（ｉｉ）で得られたペプチド受容分子が結合されている上記ＲＮＡ分子を翻訳することによって、上記ＲＮＡ分子と、当該ＲＮＡ分子にコードされているペプチドとが、上記ペプチド受容分子を介して連結している、ＲＮＡ分子とペプチドとの複合体を作製する工程と、

を含んでなる、方法。

（２）　上記翻訳は、ＲＮａｓｅを実質的に含まないインビトロ翻訳系で行う、（１）に記載の方法。

（３）　上記翻訳は、上記ＤＮＡ分子に対して活性のあるＲＮＡポリメラーゼを実質的に含まないインビトロ翻訳系で行う、（１）又は（２）に記載の方法。

（４）　上記ＤＮＡ分子は、連続する２個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる、（１）～（３）の何れかに記載の方法。

（５）　上記２’－修飾ヌクレオシド誘導体は、２’－Ｏ－メチルグアノシンである、（１）～（４）の何れかに記載の方法。

（６）　上記ペプチド受容分子は、ピューロマイシンである、（１）～（５）の何れかに記載の方法。

（７）　複数の異なる上記ＤＮＡ分子を用いて、複数の異なるＲＮＡ分子とペプチドとの上記複合体を作製する、（１）～（６）の何れかに記載の方法。

（８）　（１）～（７）の何れかに記載の方法を含む、ｍＲＮＡディスプレイ法であって、

工程（ｉｉｉ）で得られたＲＮＡ分子とペプチドとの複合体から、所望する複合体を選抜する工程（ｉｖ）を含む、方法。なお、工程（ｉｖ）が行われる事前に、上記ＲＮＡ分子とペプチドとの複合体におけるＲＮＡ分子部分は、その少なくとも一部が、相補的なＤＮＡ（ｃＤＮＡ）分子との二本鎖構造を形成していてもよい。

（９）　工程（ｉ）～工程（ｉｖ）を１サイクルとして、複数サイクルを繰り返し行う、（８）に記載の方法。

（１０）　ｍＲＮＡディスプレイ法に用いるＤＮＡライブラリーであって、

プロモーター領域及びその下流に位置する候補ペプチドをコードする領域を含み、かつ最も下流のアンチセンス鎖の５’末端側に少なくとも１個の２’－修飾ヌクレオシド誘導体を含んでいる、複数の異なる候補ＤＮＡ分子を

含む、ＤＮＡライブラリー。

（１１）　10^{13}個以上の異なる候補ＤＮＡ分子を含む、（１０）に記載のＤＮＡライブラリー。

[0082] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。本出願は、２０１７年３月１７日に出願された日本国特許出願：特願２０１７－０５３６２１に対して優先権の利益を主張するものであり、それを参照することにより、その内容の全てが本書に含まれる。

実施例

[0083] 〔実施例１：実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）モデルマウスの血清から抗原ペプチドの探索〕

［方法］

（１）実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ）マウス抗体磁気ビーズの作製

Ｃ５７Ｂ６マウス（１０週齢）に、ＭＯＧ３５－５５ペプチド（MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK）を完全フロイントアジュバントを用いて免疫した。免疫後２０～２２日に全血を回収し、等量のＰＢＳと混和し、フィコールを用いて血清成分を分離した。血清１００μＬを１００μＬのＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ磁気ビーズ（dynabeads）に４℃で１時間結合させた。これを５００μＬの洗浄バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．５，３００ｍＭ ＮａＣｌ，０．１％ ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）で５回洗浄し、ＥＡＥマウス抗体が固定化された磁気ビーズを作製した。

[0084] （２）ライブラリーＤＮＡの作製

ランダムＯＲＦ領域を含む１０ｎＭのランダムライブラリーＤＮＡ：GCTGC

CGCTGCCGCTGCC (MNN)n CATATGTATATCTCCTTCTTAAAG(n=8)又は下記（７）で回収したｃＤＮＡ（２サイクル目以降）を、１μMのF-primer (CCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG) 及びR-primer (GmGmTCGGCGGATCAAAGTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCA (Gm：2’－Ｏ－メチルグアノシン)) を用いてＰＣＲ（９４℃：１０秒，５８℃：１０秒，７２℃：３０秒，８サイクル）を行った。これによって、Ｔ７プロモーター配列、シャイン・ダルガノ配列（ＳＤ配列）及びランダムＯＲＦ領域を含むテンプレートＤＮＡライブラリー：CCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG (NNK)n TGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCTACTTTGATCCGCCGACC (n=8)を作製した。これをFastGene Gel/PCR Extraction Kitを用いて精製した。

[0085] （３）転写反応

１０ｎMのテンプレートＤＮＡライブラリーから、５０μＬスケール（０．０８６ｎｇＴ７ ＲＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓ，４．５ｍＭ ＮＴＰ，４０ｍＭ ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ

（ｐＨ ７．６），２０ｍＭ $MgCl_2$，２ｍＭ ｓｐｅｒｍｉｄｉｎｅ，５ｍＭ ＤＴＴ）で、３７℃で１時間転写を行い、ＲＮＡライブラリーを作製した。

[0086] （４）ピューロマイシン（Ｐｕ）付加

得られたＲＮＡライブラリー３μＬに10ｍＭ ＡＴＰ １μＬ，１００μＭ Ｐｕ－ＤＮＡ (CTCCCGCCCCCCGTCC[spacer18]$_5$CC[Puromycin]) ２μＬ，１００μＭ ｓｐｌｉｎｔ－ＤＮＡ (GGGCGGGAGGGTCGGCGGATCAA) ２μＬ、及びx1 T4 DNA ligase buffer １３μＬを加え、９５℃で３分間加熱した。室温で冷却した後０．５μＬのT4 DNA Ligase（７０Ｕ／μＬ）を加え、３７℃で１．５時間反応させた。

[0087] （５）翻訳反応／ｍＲＮＡ－ペプチドライブラリーの作製

２．４μＬのピューロマイシン付加ＲＮＡライブラリーを２０μＬスケールのPURE system（１４μＬのSolution A，２μＬのSolution B（ＲＮＡポリメラーゼ、RF1マイナス），２μＬの50 mM Hepes-KOH(pH 7.6), 100 mM KCl

, 10 mM $MgCl_2$, 30% glycerol）を用いて３７℃で１時間反応させた。次いで、ここに３０μＬのbinding buffer（50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 61 mM EDTA）を加えた。

[0088] （６）ペプチドセレクション

（５）で得られたｍＲＮＡ－ペプチドライブラリーを、健康なマウス由来の抗体を固定化したＰｒｏｔｅｉｎ Ｇ磁気ビーズ（dynabeads）１０μＬに加え、４℃で３０分反応させた。上清をＥＡＥマウス由来の抗体を結合させた磁気ビーズ１０μＬに加え、４℃で３０分反応させた。磁気ビーズを５０μＬの洗浄バッファー（50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100）で８回洗浄した。

[0089] （７）逆転写反応

磁気ビーズに200μM dNTP, 1 mM DTT, 200nM Primer P2(GGTCGGCGGATCAAAGTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCA) 0.5μL、ProtoScriptII RTase 200 U を含む 1x ProtoScript bufferを加え、３７℃で３０分間反応させた。上清を捨て、５０μＬの洗浄bufferで１回洗浄した。

[0090] （８）溶出

５０μＬの溶出buffer（10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 75 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 10 mM DTT）を加えた。これを９７℃で３分間加熱し上清を回収した。

[0091] 上記（３）～（８）をbiomek FXを用いて５サイクル行い、Primer-F2:CCGAAGGAGATATACATATG、Primer-R2:ANNCTGCCGCTGCCGCTGC(N = A,G,C,T)を用いてＰＣＲを行い、ＨｉＳｅｑ２５００を用いてシングルリード８０ｂａｓｅでシーケンシングを行った。

[0092] ［結果］

結果を図２に示す。（Ａ）はペプチドセレクションにおいて得られたペプチド配列とＭＯＧタンパク質に対するスコアを示す。Rank2の７番目は終始コドンであり、１～６番目の配列のみが翻訳されていると推定される。（Ｂ）はＥＡＥマウス抗体のＭＯＧタンパク質の認識部位を示す。（Ｃ）はＥＡＥ

マウス抗体の抗原のモチーフ配列を示す。図２からわかるとおり、得られたアミノ酸配列からＭＯＧ３５－５５ペプチドの一部と相同性の高いモチーフ配列が得られた。また、ＭＯＧタンパク質の他の部位に対しての配列は検出されず、疾患原因となったペプチドを特異的に得ることに成功した。

[0093] 〔実施例２：2’－Ｏ－メチルグアノシンによるペプチドセレクションの効率化〕

（１）ＤＮＡの作製

１０ｎＭのＦＬＡＧペプチドテンプレート２重鎖ＤＮＡ：GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGAAGTACTCCCCAACCGACTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCTACTTTGATCCGCCGACCのアンチセンス鎖の５’末端の２塩基にグアノシン（ＷＴ）又は2’－Ｏ－メチルグアノシン（Ｇｍ）が導入されたテンプレートＤＮＡを作製した。

[0094] （２）転写反応

それぞれのテンプレートＤＮＡ（１０ｎＭ）を２０μＬスケール（0.086 ng T7 RNA polymerase,4.5 mM NTP, 40 mM HEPES-KOH(pH 7.6), 20 mM $MgCl_2$, 2 mM spermidine, 5 mMDTT）で３７℃、１時間反応させ、転写されたｍＲＮＡをＱｕｂｉｔを用いて定量した。

[0095] （３）ペプチドセレクション

それぞれ１μＭのｍＲＮＡ、固相担体に抗ＦＬＡＧ（登録商標）Ｍ２抗体磁気ビーズ（シグマＭ８８２３）を用いて実施例１と同様にBiomek FXを用いたセレクションを行い、得られたｃＤＮＡをｑＰＣＲを用いて定量した。

[0096] ［結果］

結果を図３に示す。（Ａ）はテンプレートＤＮＡによるペプチド回収効率を示す。（Ｂ）はｑＰＣＲによるｃＤＮＡの検量線を示す。図３から算出されるとおり、2’－Ｏ－メチルグアノシン（Ｇｍ）が導入されたテンプレートＤＮＡを用いることによって、ペプチドセレクションの効率が１０倍程度向上することが確認された。

[0097] 〔実施例３：従来の方法との比較〕

終始コドンの下流における、Ｐｕ－ＤＮＡとの連結に用いる配列（下線部）のみが異なる３種類のＦＬＡＧペプチドをコードする二本鎖ＤＮＡを作製し、それぞれを用いたペプチドセレクションの効率を検証した。

[表1]

	配列
Template DNA 1	CCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTACTCCCCAACCGACTGCAAGAAGGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCTAGGACGGGGGGCGGAAA
Template DNA 2	CCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTACTCCCCAACCGACTGCAAGAAGGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCTACTTTGATCCGCCGACC
Template DNA 3	CCTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTACTCCCCAACCGACTGCAAGAAGGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCTACTTTGATCCGCCGAC*C* (C*:アンチセンス鎖に2’-O-メチルグアノシンを導入)

実験１：ｍＲＮＡ／Ｐｕ－ＤＮＡのLigation効率の検証

上記テンプレートＤＮＡからＴ７ ＲＮＡポリメラーゼを用いてｍＲＮＡを作製した。Qubit（登録商標） RNA HS Assay Kitを用いてＲＮＡを定量し、それぞれ７μＭに調製した。Template DNA 1由来ＲＮＡは１０μＭ Pu-DNA(CTCCCGCCCCCCGTCC[spacer18]$_5$CC[Puromycin]), 1 mM ATPを含むx0.6 T4 RNA Ligase buffer(添付)15 μLと混和し９５℃で２分間加熱を行い、室温で冷却した。その後、１μＬ（１０Ｕ）のT4 RNA Ligase1（ＮＥＢ社製）を加え、３７℃で１．５時間反応させた。Template DNA 2,3由来ＲＮＡ（３μＬ）は5μM Pu-DNA、5μM splint-DNA (GGGCGGGAGGGTCGGCGGATCAA) を含むx0.6 T4 DNA Ligase buffer(添付・１mM ATP含有)１５μＬと混和し、９５℃で２分間加熱し、室温で冷却した。その後、１μＬ（４００Ｕ）のT4 DNA Ligase（ＮＥＢ社製）を加え、３７℃で１．５
時間又は１６℃で一晩（１６時間）反応させた。それぞれ、０．５μＬを７Ｍウレア１０％ＰＡＧＥで電気泳動（１８０Ｖ ４５ｍｉｎ）した。ｍＲＮＡ／Ｐｕ－ＤＮＡ連結部位の構造は、図４の（Ａ）に示すとおりである。

[0098] 結果を図４の（Ｂ）及び（Ｃ）に示す。（Ｂ）は３７℃で１．５時間反応させた場合のｍＲＮＡ／Ｐｕ－ＤＮＡのLigation効率を示す。（Ｃ）は１６℃で一晩反応させた場合のｍＲＮＡ／Ｐｕ－ＤＮＡのLigation効率を示す。

図４の（Ｂ）及び（Ｃ）に示すとおり、何れの条件であっても、ｍＲＮＡ／Ｐｕ－ＤＮＡのLigation効率は、Template DNA 3＞Template DNA 1＞Template DNA 2であり、テンプレートＤＮＡにＧｍを用いたものが最も効率よいことがわかった。Template DNA 3の方がTemplate DNA 1より効率が高かったことから、Template 1におけるヘアピン構造形成の際にピューロマイシンの配置が分子の末端側ではなく内側であることが効率の低下を引き起こす可能性が示唆された。

[0099] 実験２：ペプチド回収効率の検証

実験１で用いたそれぞれのｍＲＮＡ（７μＭ）、固相担体に１０μLの抗ＦＬＡＧ（登録商標）Ｍ２抗体磁気ビーズ（シグマＭ８８２３）を用いて実施例２と同様にBiomek FXを用いたセレクションを行い、得られたｃＤＮＡをｑＰＣＲを用いて定量した。なお、Template DNA 1を用いたペプチドセレクションには、T4 RNA ligase 1（ＮＥＢ社製）を用いた。

[0100] 結果を図４の（Ｄ）に示す。（Ｄ）は各テンプレートＤＮＡを用いたペプチドセレクション効率を示す。テンプレートＤＮＡにＧｍを用いたもの（Template DNA 3）が最もペプチド回収率が高く、ＲＮＡポリメラーゼのrun-off（末端への塩基付加）産物に対し、ヘアピン構造形成（Template DNA 1）を用いてmRNA/Pu-DNAのLigationを行うよりも、Ｇｍを用いてLigationを行った方が非常に効率的であることがわかった。ｍＲＮＡの回収率は、Template DNA １～３の順にそれぞれ、１．３％、１．４％、１１．８％であった。

[0101] 〔実施例４：プロテアーゼを用いたペプチド回収方法〕

［方法］

実施例２と同じ条件で、ＦＬＡＧペプチド－ｃＤＮＡを作製し、抗ＦＬＡＧ（登録商標）Ｍ２抗体磁気ビーズ（シグマＭ８８２３）からのｃＤＮＡの回収方法を検討した。

[0102] 磁気ビーズを１０μＬのFicin buffer (50 mM Tris-HCl(pH 6.8), 10mM EDTA, 5mM Cystein)、０．１ｍｇ～２ｍｇのFicin (SIGMA: F4125) を加え、３７℃で１時間静置した。上清を９８℃で５分間加熱し、Ficinを失活させ、qP

CRで溶出したcDNAを定量した。また、ビーズ上に残ったcDNA量は、Ficin buffer中で９８℃で５分間加熱することで回収し、qPCRにより定量を行った。図５は、実施例４におけるプロテアーゼを用いたｃＤＮＡの溶出方法を説明する図である。

[0103] 結果を図６に示す。図６からわかるとおり、０．１ｍｇ以上のFicinを用いることで、９５％以上、０．７５ｍｇを使用することで９９％以上のｃＤＮＡを溶出できることを確認した。同様に、パパイン、トリプシンなどのプロテアーゼまたは、ＩｄｅＳ、ＩｄｅＺなどの抗体配列特異的なプロテアーゼも利用可能である。

[0104] 〔実施例５：ＤＥＣＯＤＥ法の別の一例〕

［方法］

実施例２と同じテンプレートＤＮＡを用い、２０μＬスケールでＦＬＡＧペプチド－ｍＲＮＡ複合体を作製した。これを１／４量ずつ分割し、３サンプルに0.23μL EDTA(0.5 M)を加え、２５℃で１０分または５０℃で１０分、または９５℃で１分静置した。これに、０．３３μＬ $MgCl_2$ (0.5 M)を加え、２０μＬのReverse transcription mix (1 mM dNTP, 10 mM DTT 0.2μM Primer P2 (GGTCGGCGGATCAAAGTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCA) 0.125μL、ProtoScript II RTase 100μ を含む 1x ProtoScript buffer) を加え、３７℃で４０分反応させた。これを、1μLの抗ＦＬＡＧ　Ｍ２抗体磁気ビーズ (SIGMA:M8823) に室温で３０分結合反応を行い、50μLの洗浄バッファーで１０回洗浄を行った。これに30μLの溶出buffer　(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 10 mM DTT)を加え、９７℃で３分加熱し速やかに上清を回収し、qPCRで定量を行った。残り1サンプルは、20μL のbinding buffer (50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 61 mM EDTA) を加え、1μLの抗ＦＬＡＧ　Ｍ２抗体磁気ビーズ (SIGMA:M8823)と室温で30分結合反応を行い、50μLの洗浄バッファーで１０回洗浄を行った。これに30μLの溶出buffer　(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 75 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 10 mM DTT)を加え、９７℃で３分加熱し速やかに上清を回収し、qPCRで定量を行った (control) 。

[0105] 本実施例で行ったDECODE法を図７として図示する。

[0106] ［結果］

結果を図８に示す。図８からわかるとおり、翻訳直後にcDNA合成を行い、その後抗体への結合反応を行う手順でのDECODE法も可能であり、EDTAを加えた後に高温で処理することで若干の効率化が期待できる。

産業上の利用可能性

[0107] 本発明は、例えば、抗体医薬品に代表される分子標的医薬等の創薬分野において利用することができる。