

明 細 書

発明の名称：

標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させるための融合タンパク質
技術分野

[0001] 本発明は、標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させるための、融合タンパク質に関する。

背景技術

[0002] 近年、様々な解析より明らかになった核酸結合性のタンパク質因子を用いて、意図する配列に結合する技術が確立、利用されている。この配列特異的な結合を利用することで、標的とするDNA配列の除去、またはその下流に存在するタンパク質コード遺伝子の発現の制御（活性化、又は不活化）が可能になりつつある。

[0003] DNAに作用するタンパク質因子を利用した技術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TAL Effector Nuclease（TALEN）、Crispr-cas9等が知られているが、RNAに特異的に作用するタンパク質因子を利用した技術の開発はいまだ限定されている。

[0004] 本発明者らは、主に植物が有するタンパク質であるPPRタンパク質（pentatricopeptide repeat（PPR）モチーフを有するタンパク質）の特性を利用して、標的RNAの配列に対して特異的に結合することができるタンパク質の設計方法を提案してきた（特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2013/058404

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 特許文献1の開示においては、PPRモチーフがRNA結合特性を発揮す

る際に機能するアミノ酸を同定し、PPRモチーフの構造と標的塩基との関係が明らかにしたことで、任意の配列、長さを有するRNAに結合可能な、PPRモチーフを有するタンパク質の構築を可能とした。しかし、特許文献1に記載の技術を利用して、実際に標的RNAを制御する方法は、これまで見出されていなかった。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、PPRタンパク質を利用し、標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させるための方法を鋭意検討した結果、所定の機能ドメインとPPRタンパク質との融合タンパク質が、標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させ得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち本発明は、一実施形態において、標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させるための融合タンパク質であって、

前記融合タンパク質は、

(A) mRNAからのタンパク質発現量を向上させる、1または複数の機能ドメイン、および

(B) 標的mRNAに対してRNA塩基選択的に、または、RNA塩基配列特異的に結合可能なポリペプチド部分、

を含み、

前記(B)のポリペプチド部分が、式1で表される30～38アミノ酸長のポリペプチドからなるPPRモチーフを1個以上含む、ポリペプチド部分であり

[化1]



(式中：

Helix Aは、12アミノ酸長の、 α ヘリックス構造を形成可能な部

分であって、式2で表され、

[化2]



式2中、 $A_1 \sim A_{12}$ はそれぞれ独立にアミノ酸を表し；

Xは、存在しないか、または、1～9アミノ酸長からなる部分であり；

Helix Bは、11～13アミノ酸長からなる、 α ヘリックス構造を形成可能な部分であり；

Lは、2～7アミノ酸長の、式3で表される部分であり；

[化3]



式3中、各アミノ酸は、“i”（-1）、“ii”（-2）、とC末端側からナンバリングされ、

ただし、 $L_{III} \sim L_{VII}$ は存在しない場合がある。）

A_1 、 A_4 、及び L_{II} の3つのアミノ酸の組み合わせ、又は A_4 、 L_{II} の2つのアミノ酸の組み合わせが、標的mRNAの塩基または塩基配列に対応したものとなっている、

融合タンパク質、に関する。

[0009] また、本発明は、一実施形態において、前記（B）のポリペプチド部分は、前記PPRモチーフを2～30個含み、前記複数のPPRモチーフが、標的mRNAの塩基配列に特異的に結合するように配置されていることを特徴とする。

[0010] また、本発明は、一実施形態において、前記（B）のポリペプチド部分が、前記PPRモチーフを5～25個含むことを特徴とする。

[0011] また、本発明は、一実施形態において、前記（A）の機能ドメインが、前

記（Ｂ）のポリペプチド部分のＮ末端側および／またはＣ末端側に結合されていることを特徴とする。

[0012] また、本発明は、一実施形態において、前記（Ａ）の機能ドメインが、ｍＲＮＡヘリボソームを誘導するドメイン、ｍＲＮＡの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメイン、ｍＲＮＡの核外への輸送に関連するドメイン、小胞体膜への結合に関連するドメイン、小胞体保留シグナル（ＥＲ retention signal）配列を含むドメイン、および、小胞体シグナル配列を含むドメイン、からなる群から選択されることを特徴とする。

[0013] また、本発明は、一実施形態において、前記ｍＲＮＡヘリボソームを誘導するドメインが、DENR（Density-regulated protein）、MCT-1（Malignant T-cell amplified sequence 1）、TPT1（Translationally-controlled tumor protein）、および、Lerep04（Zinc finger CCCH-domain）からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記ｍＲＮＡの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメインが、eIF4EおよびeIF4Gからなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記ｍＲＮＡの核外への輸送に関連するドメインが、SLBP（Stem-loop binding protein）の全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記小胞体膜への結合に関連するドメインが、SEC61B、TRAP-alpha（Translocon associated protein alpha）、SR-alpha、Dia1（Cytochrome b5 reductase 3）、および、p180からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記小胞体保留シグナル（ER retention signal）配

列は、K D E L (K E E L) 配列を含むシグナル配列であり、または、

前記小胞体シグナル配列は、M G W S C I I L F L V A T A T G A H S (配列番号 22) を含むシグナル配列である、ことを特徴とする。

[0014] また、本発明は、一実施形態において、前記の各 P P R モチーフにおける A_1 、 A_4 、および L_{ii} の 3 つのアミノ酸の組み合わせが；

P P R モチーフの標的とする塩基が A (アデニン) である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の 3 つのアミノ酸の組み合わせが、(A_1 、 A_4 、 L_{ii}) の順に、(バリン、トレオニン、アスパラギン)、(フェニルアラニン、セリン、アスパラギン)、(フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギン)、(イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸)、または(トレオニン、トレオニン、アスパラギン)であり；

P P R モチーフの標的とする塩基が G (グアニン) である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の 3 つのアミノ酸の組み合わせが、(A_1 、 A_4 、 L_{ii}) の順に、(グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸)、(バリン、トレオニン、アスパラギン酸)、(リジン、トレオニン、アスパラギン酸)、または(ロイシン、トレオニン、アスパラギン酸)であり；

P P R モチーフの標的とする塩基が U (ウラシル) である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の 3 つのアミノ酸の組み合わせが、(A_1 、 A_4 、 L_{ii}) の順に、(バリン、アスパラギン、アスパラギン酸)、(イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン)、(イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸)、(イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸)、(フェニルアラニン、プロリン、アスパラギン酸)、または(チロシン、プロリン、アスパラギン酸)であり；または、

P P R モチーフの標的とする塩基が C (シトシン) である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の 3 つのアミノ酸の組み合わせが、(A_1 、 A_4 、 L_{ii}) の順に、(バリン、アスパラギン、アスパラギン)、(イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン)、(バリン、アスパラギン、セリン)、または(イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸)である、ことを特徴とする。

[0015] また、本発明は、一実施形態において、前記の各 P P R モチーフにおける A₄ および L_i の 2 つのアミノ酸の組み合わせが；

P P R モチーフの標的とする塩基が A（アデニン）である場合には、A₄ および L_i の 2 つのアミノ酸の組み合わせが、（A₄、L_i）の順に、（トレオニン、アスパラギン）、

（セリン、アスパラギン）、または（グリシン、アスパラギン）であり；

P P R モチーフの標的とする塩基が G（グアニン）である場合には、A₄ および L_i の 2 つのアミノ酸の組み合わせが、（A₄、L_i）の順に、（トレオニン、アスパラギン酸）

または（グリシン、アスパラギン酸）であり；

P P R モチーフの標的とする塩基が U（ウラシル）である場合には、A₄ および L_i の 2 つのアミノ酸の組み合わせが、（A₄、L_i）の順に、（アスパラギン、アスパラギン酸）、（プロリン、アスパラギン酸）、（メチオニン、アスパラギン酸）、または（バリン、トレオニン）であり；

P P R モチーフの標的とする塩基が C（シトシン）である場合には、A₄ および L_i の 2 つのアミノ酸の組み合わせが、（A₄、L_i）の順に、（アスパラギン、アスパラギン）、

（アスパラギン、セリン）、または（ロイシン、アスパラギン酸）である、ことを特徴とする。

[0016] また、本発明は、他の実施形態において、上記の本発明の融合タンパク質をコードする、核酸に関する。

[0017] また、本発明は、他の実施形態において、上記の本発明の核酸を含む、ベクター（好ましくは発現ベクター）に関する。

[0018] また、本発明は、他の実施形態において、細胞内で標的 mRNA からのタンパク質発現量を向上させる方法であって、

上記の本発明の融合タンパク質、または、上記の本発明のベクターを準備するステップ、および、

前記融合タンパク質、または、ベクターを細胞内へ導入するステップ、を

含む、

方法、に関する。

[0019] また、本発明は、一実施態様において、前記細胞が、真核生物の細胞であることを特徴とする。

[0020] また、本発明は、一実施態様において、前記細胞が、動物細胞であることを特徴とする。

[0021] また、本発明は、一実施態様において、前記動物細胞が、ヒト細胞であることを特徴とする。

[0022] 上記に述べた本発明の一又は複数の特徴を任意に組み合わせた発明も、本発明の範囲に含まれる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1は、実施例において用いたエフェクタープラスミドおよびレポータープラスミドの模式図、および、実験概要の模式図を示す。図1Aは、本実施例において用いたエフェクタープラスミドとレポータープラスミドの模式図を示す。エフェクタープラスミドからは、PPRモチーフとeIF4Gを融合したタンパク質が発現する。本実施例では、標的配列に関してよく研究が進んでいるCRR4タンパク質を使用した。レポータープラスミドからは、ウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）とホタルルシフェラーゼ（FLuc）がジシストロニックmRNAの形で転写される。PPR結合配列（ここではCRR4結合配列）は、FLucの5'側に挿入した。図1Bは、本実施例の実験概要の模式図を示す。PPR結合配列の有無に関係なくRLucは同様のレベルで翻訳される。そのためRLucの活性値は、このレポーターシステムでのトランスフェクションのコントロールとして扱うことができる。FLucの翻訳は、PPR-eIF4GがPPR結合配列へ結合し、eIF4Gの効果によって翻訳因子を引き寄せることが出来た時のみ開始される。一方、PPR結合配列が存在せず、PPR-eIF4Gが結合できない場合はFLucの翻訳は低レベルのままである。

[図2]図2は、HEK293T細胞を用いたレポーターアッセイの実験手順を

示す。

[図3]図3は、実施例1の実験結果を示す。配列特異的な翻訳活性化は、C R R 4 - e l F 4 GとP P R結合配列に依存する。この実験では、C R R 4 - F l a g（翻訳活性化因子なし、白色）もしくはC R R 4 - e l F 4 G（翻訳活性化因子あり、灰色）を挿入したエフェクタープラスミドと、P P R結合配列を挿入、もしくは非挿入のレポーターベクターを使って行われた。結果は、P P R - e l F 4 GとP P R結合配列の両方の存在下で特異的に2.75倍の翻訳活性が認められた。値は平均と標準偏差を示す（N=3）。

[図4]図4は、実施例2の実験の概要を示す。

[図5]図5は、実施例2の実験の結果、および、それぞれのドメインの機能の説明を示す。

[図6]図6は、実施例2の実験の結果、および、それぞれのドメインの機能の説明を示す。

発明を実施するための形態

[0024] [P P Rモチーフ及びP P Rタンパク質]

本発明で「P P Rモチーフ」というときは、特に記載した場合を除き、W e b上のタンパク質ドメイン検索プログラムでアミノ酸配列を解析した際に、P f a mにおいてP F 0 1 5 3 5、P r o s i t eにおいてP S 5 1 3 7 5で得られるE値が所定値以下（望ましくはE-03）のアミノ酸配列をもつ30～38アミノ酸で構成されるポリペプチドをいう。本発明で定義するP P Rモチーフを構成するアミノ酸の位置番号は、P F 0 1 5 3 5とほぼ同義である一方で、P S 5 1 3 7 5のアミノ酸の場所から2引いた数（例；本発明の1番→P S 5 1 3 7 5の3番）に相当する。ただし、“i i”（-2）番のアミノ酸というときは、P P Rモチーフを構成するアミノ酸の後ろ（C末端側）から2番目のアミノ酸、又は次のP P Rモチーフの1番アミノ酸に対して2コN末端側、すなわち-2番目のアミノ酸とする。次のP P Rモチーフが明確に同定されない場合、次のヘリックス構造の1番目のアミノ酸に対して、2コ前のアミノ酸を“i i”とする。P f a mについてはh t t

p: // p f a m . s a n g e r . a c . u k /、P r o s i t e について
は、h t t p : // w w w . e x p a s y . o r g / p r o s i t e / を参
照することができる。

[0025] P P R モチーフの保存アミノ酸配列は、アミノ酸レベルでの保存性は低い
が、2 次構造上で2 つの α ヘリックスはよく保存されている。典型的な P P
R モチーフは3 5 アミノ酸で構成されるが、その長さは3 0 ～3 8 アミノ酸
と可變的である。

[0026] 本発明でいう P P R モチーフは、より具体的には、式 1 で表される、3 0
～3 8 アミノ酸長のポリペプチドからなる。

[0027] [化4]



(式中：

H e l i x A は、1 2 アミノ酸長の、 α ヘリックス構造を形成可能な部
分であって、式 2 で表され、

[0028] [化5]



式 2 中、 $A_1 \sim A_{12}$ はそれぞれ独立にアミノ酸を表し；

X は、存在しないか、または、1 ～9 アミノ酸長からなる部分であり；

H e l i x B は、1 1 ～1 3 アミノ酸長からなる、 α ヘリックス構造を
形成可能な部分であり；

L は、2 ～7 アミノ酸長の、式 3 で表される部分であり；

[0029]

[化6]



式3中、各アミノ酸は、“i”（-1）、“ii”（-2）、とC末端側からナンバリングされ、

ただし、 $L_{iii} \sim L_{vii}$ は存在しない場合がある。

[0030] 本発明で「PPRタンパク質」というときは、特に記載した場合を除き、上述のPPRモチーフを、1個以上、好ましくは2個以上有するPPRタンパク質をいう。本明細書で「タンパク質」というときは、特に記載した場合を除き、ポリペプチド（複数のアミノ酸がペプチド結合した鎖）からなる物質全般をいい、比較的低分子のポリペプチドからなるものも含まれる。本発明で「アミノ酸」という場合、通常のアミノ酸分子を指すことがあるほか、ペプチド鎖を構成しているアミノ酸残基を指すことがある。いずれを指しているかは、文脈から、当業者には明らかである。

[0031] 本発明で、PPRモチーフのRNA塩基との結合性に関し、「選択的」というときは、特に記載した場合を除き、RNA塩基のいずれか一つの塩基に対する結合活性が、他の塩基に対する結合活性より高いことをいう。この選択性は、当業者であれば実験を企画し、確認することができるほか、当業者が計算により求めることもできる。

[0032] 本発明でRNA塩基というときは、特に記載した場合を除き、RNAを構成するリボヌクレオチドの塩基を指し、具体的には、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、又はウラシル（U）のいずれかをいう。なおPPRタンパク質は、RNA中の塩基に対して選択性を有しうるが、核酸モノマーに結合するわけではない。

[0033] PPRタンパク質は植物に多く存在し、シロイヌナズナでは500タンパク質、約5000モチーフが見いだせる。イネ、ポプラ、イワヒバ等、多く

の陸上植物にも多様なアミノ酸配列のPPRモチーフおよびPPRタンパク質が存在する。本発明においては、自然界に存在するPPRモチーフおよびPPRタンパク質を用いてもよいし、例えばWO2013/058404に開示された方法に基づいて設計されたPPRモチーフおよびPPRタンパク質を利用してもよい。具体的には、WO2013/058404に開示された以下の情報に基づいて、所望のPPRモチーフおよびPPRタンパク質を設計することができる。

[0034] (I) 選択的結合のために重要なアミノ酸の位置に関する情報

PPRモチーフの、1、4、“i i” (−1) 番の3つのアミノ酸の組み合わせ (A1、A4、L i i)、又は4、“i i” (−1) 番の2つのアミノ酸の組み合わせ (A4、L i i) が、RNA塩基との選択的な結合のために重要であり、これらの組み合わせにより、結合するRNA塩基がいずれであるかを決定できる。

[0035] 本発明は、WO2013/058404に開示された、A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせ、および／またはA4、及びL i iの2つのアミノ酸の組み合わせに関する知見を利用することができる。

[0036] (II) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせとRNA塩基との対応に関する情報

(3−1) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、バリン、アスパラギン及びアスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Uに強く結合し、次にCに、その次にA又はGに対して結合するという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3−2) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、バリン、トレオニン、アスパラギンの場合、そのPPRモチーフは、Aに強く結合し、次にGに、その次にCに対して結合するが、Uには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3−3) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、バリン、アスパラギン、アスパラギンの場合、そのPPRモチーフは、C

に強く結合し、次にA又はUに対して結合するが、Gには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-4) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Gに強く結合するが、A、U及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-5) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、イソロイシン、アスパラギン、アスパラギンの場合、そのPPRモチーフは、Cに強く結合し、次にUに、その次にAに対して結合するが、Gには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-6) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、バリン、トレオニン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Gに強く結合し、次にUに対して結合するが、AとCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-7) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、リジン、トレオニン、アスパラギン酸、の場合、そのPPRモチーフは、Gに強く結合し、次にAに対して結合するが、U及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-8) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、フェニルアラニン、セリン、アスパラギンの場合、そのPPRモチーフは、Aに強く結合し、次にCに、その次にG及びUに対して結合するという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-9) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、バリン、アスパラギン、セリンの場合、そのPPRモチーフは、Cに強く結合し、次にUに対して結合するが、A及びGには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-10) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギンの場合、そのPPRモチ

ーフは、Aに強く結合するが、G、U及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-11) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Uに強く結合し、次にAに対して結合するが、G及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-12) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、トレオニン、トレオニン、アスパラギンの場合、そのPPRモチーフは、Aに強く結合するが、G、U及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-13) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Uに強く結合し、次にCに対して結合するが、A及びGには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-14) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、フェニルアラニン、プロリン、アスパラギン酸の場合PPR、そのモチーフは、Uに強く結合し、次にCに対して結合するが、A及びGには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-15) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、チロシン、プロリン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Uに強く結合するが、A、G及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(3-16) A1、A4、及びL i iの3つのアミノ酸の組み合わせが、順に、ロイシン、トレオニン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Gに強く結合するが、A、U及びCには結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

[0037] (11) A4、及びL i iの2つのアミノ酸の組み合わせとRNA塩基との対応に関する情報

(2-1) A4、L i i が、順に、アスパラギン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、U に強く結合し、次に C、その次に A 及び G に対して結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-2) A4、L i i が、順に、アスパラギン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、C に強く結合し、次に U、その次に A 及び G に対して結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-3) A4、L i i が、順に、トレオニン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、A に強く結合し、次に G、U 及び C に対して弱く結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-4) A4、L i i が、順に、トレオニン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、G に強く結合し、次に A、U 及び C に対して弱く結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-5) A4、L i i が、順に、セリン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、A に強く結合し、次に G、U 及び C に対して結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-6) A4、L i i が、順に、グリシン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、G に強く結合し、次に U、その次に A と結合するが、C に結合しないという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-7) A4、L i i が、順に、アスパラギン、セリンの場合、その P P R モチーフは、C に強く結合し、次に U、その次に A 及び G に対して結合するという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-8) A4、L i i が、順に、プロリン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、U に強く結合し、次に G、C 及び C に対して結合するが、A に結合しないという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-9) A4、L i i が、順に、グリシン、アスパラギン酸の場合、その P P R モチーフは、A に強く結合し、次に G に対して結合するが、C 及び U に結合しないという、選択的な R N A 塩基結合能を有する。

(2-10) A4、L i i が、順に、メチオニン、アスパラギン酸の場合、

そのPPRモチーフは、Uに強く結合し、次にA、G及びCに対して弱く結合するという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(2-11) A4、L i i が、順に、ロイシン、アスパラギン酸の場合、そのPPRモチーフは、Cに強く結合し、次にUに対して結合するが、A及びGに結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

(2-12) A4、L i i が、順に、バリン、トレオニンの場合、そのPPRモチーフは、Uに強く結合し、次にAに対して結合するが、G及びCに結合しないという、選択的なRNA塩基結合能を有する。

[0038] [PPRモチーフおよびPPRタンパク質の利用]

同定および設計:

一のPPRモチーフは、RNAの特定の塩基を認識しうる。そして、本発明に基づけば、特定の位置のアミノ酸を適切にすることで、A、U、G、Cそれぞれに選択的なPPRモチーフを選択または設計することができ、さらにはそのようなPPRモチーフの適切な連続を含むタンパク質は、対応する特異的な配列を認識しうる。さらに、上述の知見により、所望のRNA塩基に選択的に結合可能なPPRモチーフ、および所望のRNAに配列特異的に結合可能な、複数個のPPRモチーフを有するタンパク質を設計することができる。設計に際し、PPRモチーフ中の重要な位置のアミノ酸以外の部分は、天然型のPPRモチーフの配列情報を参考にしてもよい。また、全体として天然型を用い、前記の重要な位置のアミノ酸だけを置換することにより、設計してもよい。PPRモチーフの繰り返し数は、標的配列に応じ、適宜とすることができるが、例えば2個以上とすることができ、2～30個とすることができる。

[0039] 上記のように設計されたPPRモチーフまたはPPRタンパク質は、当業者にはよく知られた方法により調製することができる。例えば、設計されたPPRモチーフまたはPPRタンパク質のアミノ酸配列から、それをコードする核酸配列を決定し、クローニングし、所望のPPRモチーフまたはPPRタンパク質を生産する形質転換体（発現ベクター、等）を作製することが

できる。

[0040] 融合タンパク質の調製およびその利用：

本発明は、上記に説明したPPRモチーフまたはPPRタンパク質（すなわち、標的mRNAに対してRNA塩基選択的に、または、RNA塩基配列特異的に結合可能なポリペプチド）と、mRNAからのタンパク質発現量を向上させる、1または複数の機能ドメインとの融合タンパク質に関する。

[0041] 本発明において利用可能である、「mRNAからのタンパク質発現量を向上させる機能ドメイン」は、例えば、mRNAの翻訳を直接的または間接的に促進することが知られているタンパク質の機能ドメインの全部または機能的な一部であってよい。より具体的には、本発明において利用可能である機能ドメインは、例えば、mRNAヘリボソームを誘導するドメイン、mRNAの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメイン、mRNAの核外への輸送に関連するドメイン、小胞体膜への結合に関連するドメイン、小胞体保留シグナル（ER retention signal）配列を含むドメイン、または、小胞体シグナル配列を含むドメイン、であってよい。

[0042] さらに具体的には、上記のmRNAヘリボソームを誘導するドメインは、DENR（Density-regulated protein）、MCT-1（Malignant T-cell amplified sequence 1）、TPT1（Translationally-controlled tumor protein）、および、Lerep04（Zinc finger CCCH-domain）からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであってよい。また、上記のmRNAの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメインは、eIF4EおよびeIF4Gからなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであってよい。また、上記のmRNAの核外への輸送に関連するドメインは、SLBP（Stem-loop binding protein）の全部または機能的な一部を含むドメインであってよい。また、上記の小胞体膜への結合に関連するドメインは、SEC6

1B、TRAP- α (Translocon associated protein α)、SR- α 、Dia1 (Cytochrome b5 reductase 3)、および、p180からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであってよい。また、上記の小胞体保留シグナル (ER retention signal) 配列は、KDEL (KEEL) 配列を含むシグナル配列であってよい。また、前記小胞体シグナル配列は、MGWSCIIILFLVATATGAHS (配列番号22) を含むシグナル配列であってよい。

[0043] 本発明の融合タンパク質において、機能ドメインは、PPRタンパク質のN末端側に融合されてよく、C末端側に融合されてもよく、N末端側とC末端側の両方に融合されてもよい。また、本発明の融合タンパク質は、複数の機能ドメイン (例えば、2～5個の機能ドメイン) を含んでよい。さらに、本発明の融合タンパク質は、機能ドメインとPPRタンパク質とがリンカー等を介して間接的に融合されていてもよい。

[0044] 本発明は、上記に説明した融合タンパク質をコードする核酸、および、当該核酸を含むベクター (例えば発現ベクター) にも関する。本明細書において、発現ベクターとは、例えば上流から、プロモーター配列を有するDNA、所望のタンパク質をコードするDNA、およびターミネーター配列を有するDNAを含むベクターを意味するが、所望の機能を発揮する限り、必ずしもこの順に配列されている必要はない。本発明においては、当業者が通常使用し得る様々な発現ベクターを使用することができる。

[0045] 本発明の融合タンパク質は、真核生物のRNA翻訳機構を利用していることから、真核生物 (例えば、動物、植物、微生物 (酵母、等)、原生生物) の細胞で機能し得る。本発明の融合タンパク質は、特に、動物細胞内 (in vitroまたはin vivo) で機能し得る。本発明の融合タンパク質、または、本発明の融合タンパク質を発現するベクターを導入し得る動物細胞としては、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、マウス、ラット由来の細胞を挙げることができる。また、本発明の融合タンパク

質、または、本発明の融合タンパク質を発現するベクターを導入し得る培養細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、VERO（ATCC CCL-81）細胞、BHK細胞、イヌ腎由来MDCK細胞、ハムスターAV-12-664細胞、HeLa細胞、WI38細胞、293細胞、293T細胞、PER.C6細胞を挙げることができるが、これらに限定されない。

[0046] 本明細書において用いられる用語は、特に定義されたものを除き、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0047] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0048] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0049] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0050] 実施例1：PPRモチーフとeIF4Gとの融合タンパク質による標的mRNAからのタンパク質発現量の向上

[0051] 材料

（装置）

・分子生物学実験のための基本的な施設（プラスミド構築のためなど）

- ・倒立顕微鏡 (DM IL S40, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)
- ・CO₂インキュベーター (KM-CC17RH2, Panasonic Healthcare, Tokyo, Japan)
- ・クリーンベンチ (MHE-S1300A2, Panasonic Healthcare, Tokyo, Japan)
- ・アスピレーター (SP-30, Air Liquide Medical Systems, Bovezzo BS, Italy)
- ・遠心機 (スイングローター) (LC-200, Tomy Seiko, Tokyo, Japan)
- ・超低温フリーザー (-80°C) (MDF-C8V, Panasonic Healthcare, Tokyo, Japan)
- ・plateリーダー (EnSight Kaleido, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

[0052] (細胞培養)

- ・HEK293T細胞株 (注釈1参照)
- ・Dulbecco's modified Eagle's 培地 (DMEM, 高グルコース) (注釈2参照)
- ・100×penicillin-streptomycin溶液
- ・Fetal bovine serum (FBS) (注釈3参照)
- ・EDTA-NaCl溶液: 10mM EDTA and 0.85% (w/v) NaCl、pHを7.2-7.4に調整、オートクレーブ滅菌、室温保存
- ・100×20mm細胞培養シャーレ (Greiner bio one, Frickenhausen, Germany)
- ・10mL使い捨て滅菌ピペット
- ・15mL and 50mL プラスチック遠沈管
- ・1.8mLクライオチューブ (Nunc; Thermo Fisher)

Scientific, Waltham, MA, USA)

・フリーズコンテナ (Nalgene; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

・Bambanker (Lymphotec, Tokyo, Japan)

[0053] (トランスフェクション)

・エフェクタープラスミド: pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を基本ベクターとして使用した。PPRとeIF4Gの融合遺伝子が発現カセットに挿入されている ($100\text{ ng}/\mu\text{L}$) (注釈4参照)

・レポータープラスミド: pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を基本ベクターとして使用した。ルシフェラーゼ遺伝子を発現カセットに挿入され、その5'-UTRにPPR結合配列が挿入されている ($100\text{ ng}/\mu\text{L}$)

・Poly-L-lysineコーティングされた96-well plate (AGC Techno glass, Shizuoka, Japan)

・1×phosphate-buffered saline, PBS (-): $1.47\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $8.1\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 137 mM NaCl , and 2.7 mM KCl . pHを7.4に調整、オートクレーブ滅菌、室温保存

・血球計算盤 (細胞数カウントのため) (Improved Neubauer Type Cell counter plate, Watson, Hyogo, Japan)

・トランスフェクション試薬 (HilyMax, Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)

[0054] (ルシフェラーゼアッセイ)

・Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA.)

・ 96-well luminometer plate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) .

[0055] 実験方法

(ベクター構築)

レポーターアッセイには、エフェクタープラスミドとレポータープラスミドが必要であり、両プラスミドとも p c D N A 3. 1 をもとに構築されている。エフェクタープラスミド側は P P R タンパク質と、ヒト e l F 4 G の部分的なドメイン (配列番号 1) をコードする融合遺伝子を含む (図 1 A) 。 P P R タンパク質部分は、C R R 4 (配列番号 2) を用いた。レポータープラスミド側には、ウミシイタケルシフェラーゼ (R L u c) とホタルルシフェラーゼ (F L u c) という 2 つのオープンリーディングフレーム (O R F) を含んでおり、これらはジシストロニックに転写される (図 1 A) 。 R L u c 遺伝子は F L u c 遺伝子の 5' 側に位置しており、遺伝子発現のコントロールとして用いた。 P P R 結合領域は F L u c の O R F の 5' U T R に挿入され、4 塩基配列 (A T C G と G A T C) によって中断される C R R 4 認識配列 (5' - U A U C U U G U C U U U A - 3') (配列番号 3) の 3 回の繰り返しからなる。エフェクター融合遺伝子、レポーター遺伝子ともに、それら遺伝子発現には、サイトメガロウイルスプロモーター (C M V) とウシ成長ホルモン遺伝子由来ポリアデニレーションシグナルが使用した。コントロール実験のために、e l F 4 G を有しないエフェクタープラスミドを、P P R に F L A G エピトープタグを融合することで構築した。また、P P R 結合領域を持たないコントロール用のレポータープラスミドを構築した。

[0056] 本実施例における、細胞培養からレポーターアッセイまでの手順の概略を図 2 に描写した。

[0057] (凍結ストックからの細胞培養)

本工程は無菌的に実施する。あらかじめ、全ての器具は 7 0 % エタノールで消毒する。

1. 1 5 m L 遠沈管 (滅菌済) に 9 m L の D M E M 培地を入れる。

2. クライオチューブ内の1 mLのHEK 293 T凍結細胞を37℃ウォーターバスでインキュベートすることによって、素早く融解する。
3. その細胞を9 mLのDMEMを含んだ15 mL遠沈管に加える。
4. 室温で、1100×g、2分間の遠心を行い、上清を取り除く。
5. その細胞を、10 mLのDMEM（最終濃度が10%になるようにFBSを添加）に再懸濁する。
6. 懸濁された細胞を100 mmシャーレに移した。そのシャーレを37℃、5%CO₂条件下のインキュベーターに静置した。凍結ストックから培養を始めた時は、その培養細胞は24時間後に継代した。

[0058] 健全な細胞状態を維持するために（注釈5参照）、シャーレ表面での細胞密度を10%から80%の間に維持する。継代は、基本的に3日毎に行い（週に2回）、もしくは細胞の成長率に応じて行う。さらに、継代回数を低く保つために、細胞は1ヶ月に1回、凍結ストックから、培養しなおす。継代回数を低く保ち、細胞の健全な状態を保つことが効率的なDNAトランスフェクションにとって重要である。

[0059] （細胞維持のための継代）

1. 必要枚数の新しい100 mmシャーレを準備する。8 mLのDMEMと1 mLのFBSを各シャーレにあらかじめ添加する。
2. 培養細胞を含むシャーレ上の培地をアスピレーターで取り除く（注釈6参照）。
3. 2 mLのEDTA-NaCl溶液を、シャーレ内の表面の接着細胞上に、細胞を剥がさないように、優しく加える。シャーレを回転させて溶液を満遍なく全体に行き渡らせる。EDTA-NaCl溶液をアスピレーターで取り除く。シャーレをタッピングして細胞を剥がす。
4. DMEM 10 mLをシャーレ内の細胞に加え、緩やかにピペティングして懸濁する。
5. 事前に準備された9 mLの培地を含むシャーレに、各1 mLの懸濁細胞（10%の培養細胞）を加える。シャーレを回転させ、全体に細胞を行き渡

らせる。

[0060] (細胞の凍結保存)

凍結ストックはBambanker試薬と、対数増殖中の～50%細胞密度の培養細胞を用いて作る。Bambankerの使用により、高回収率かつ長期保存が容易に可能となる。

1. 継代後2日目の細胞を継代時の手順に従い、細胞を剥がす。5-10 mLのDMEMを加え、50 mLの遠沈管に細胞を回収する。
2. 室温で、1100×g、2分間の遠心を行い、上清を取り除く。
3. 1枚のシャーレあたり1 mLのBambankerを加えて懸濁する。
4. 懸濁細胞を素早くクライオチューブに分注し、蓋を閉める。
5. 専用フリーズコンテナに入れ、-80℃で12時間静置する(注釈7参照)。
6. 普通のサンプルボックスに移し、-80℃もしくは液体窒素内で保存する。

[0061] (一過的な遺伝子導入(トランスフェクション))

1. 始める前に、継代後2日目の細胞を含むシャーレを、必要とされる枚数を準備し、その細胞が健全(正常)であるかを確認する(注釈8参照)。おおよその見積りで、1枚のシャーレで96アッセイを行うことができる。
2. 継代後2日目の細胞を継代時の手順に従い、細胞を剥がし、懸濁細胞を50 mLの遠沈管に移す。
3. 室温で、1100×g、2分間の遠心を行い、上清を取り除く。
4. 10 mLのDMEM(最終濃度が10%になるようにFBSを添加)内で、細胞塊を完全に分散させる。
5. 血球計算盤と倒立顕微鏡を用いて、細胞数をカウントする。1-2×10⁵個/mLになるように適量のDMEM(最終濃度が10%になるようにFBSを添加)内に懸濁する。
6. 96-well plateを用意し、各wellあたり200 μL(2-4×10⁴個/mL)の懸濁培養細胞を加え、37℃、5%CO₂条件下

のインキュベーター内で一晚静置する。1 well が1アッセイに使用される。

7. 翌日、各 well から慎重に培地を取り除き、100 μ L の新しい DMEM (最終濃度が10%になるように FBS を添加) と交換する。

8. 400 ng のエフェクタープラスミド (100 ng/ μ L を4 μ L) と 100 ng のレポータープラスミド (100 ng/ μ L を1 μ L) を、新しい 96-well PCR plate (もしくは0.2 mL チューブ) 上の単一 well 内に加える。

9. 1アッセイあたり、1 μ L の HiLyMAX を10 μ L の無血清 DME M で希釈する。

10. 11 μ L の希釈溶液を、プラスミドを含む全ての well に加える。ピペティングでよく混合する。

11. 室温で15分間静置する。培養細胞を含む well に、全量の混合物を加える。37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で24時間静置する。

[0062] (ルシフェラーゼアッセイ)

デュアルルシフェラーゼアッセイは、Dual-Glo Luciferase Assay System を使用して行われ、少しの変更点を除きメーカーの使用説明書に従って行う。

1. トランスフェクション24時間後、各 well の培地を、40 μ L の1×PBS (-) に交換する。

2. Dual-Glo Luciferase 試薬を、各 well に40 μ L ずつ加え、ピペティングでよく混合する。

3. 室温で10分間静置し、全量を96-well luminometer plate に移す。

4. FLuc 遺伝子発現に関するホタルルシフェラーゼによる発光をプレートリーダーで測定する。

5. Dual-Glo Stop & Glo バッファーで Stop & Glo 基

質を100倍希釈する。その希釈された溶液40 μ Lを各wellに加える。

6. 少なくとも室温で10分間静置し、それからRLuc遺伝子発現に関するウミシイタケルシフェラーゼによる発光を測定する。

[0063] (データ分析)

1. アッセイ間のトランスフェクション効率の違いや実験誤差を補正するためにFLuc/RLuc値を計算する。
2. レポーター遺伝子発現の活性上昇を、PPR結合領域存在下、非存在下のそれぞれにおいて、本発明に係るプラスミド(CRR4と翻訳活性化ドメインeIF4Gとの融合タンパク質をコードするプラスミド)を用いて得られた実験値を、コントロールプラスミド(CRR4とFLAG-tagとの融合タンパク質をコードするプラスミド)を用いて得られた実験値で割り算することによって求める。

[0064] 実験結果

ルシフェラーゼアッセイの結果を図3に示した。図3に示すとおり、PPR-eIF4GとPPR結合配列の両方の存在下で特異的に2.75倍の翻訳活性が認められた。すなわち、PPRタンパク質と、mRNAからのタンパク質発現量を向上させる機能ドメインとの融合タンパク質は、標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させることが示された。

[0065] 注釈

(注釈1) HEK293Tは、SV40 large T antigenを発現しているヒト胎児由来腎臓細胞株である。この細胞株は培養が容易であり、様々な方法で高効率のトランスフェクションが可能である。HEK293T細胞はRIKEN BRC(ja.brc.riken.jp)もしくはATCC(www.atcc.org)で入手可能である。

(注釈2) DMEMは、微生物コンタミネーションを避けるために、1 $\times$ penicillin-streptomycin溶液を添加する。

(注釈3) 使用前に、FBSは56℃、30分間の非動化が行われ、4℃で

保存する。

(注釈4) プラスミドの純度は、トランスフェクション効率に極めて重要である。プラスミドはトランスフェクショングレードのキットを用いることで単離すること。

(注釈5) 日々の成長率が健全な細胞であることの指標となる。細胞の成長が抑制されることを回避するために、細胞は、常に十分なスペースと栄養条件下で培養すること。

(注釈6) HEK293T細胞は容易に培養シャーレから剥がれるので、培地を交換する際には、優しく扱うこと。

(注釈7) 専用フリーズコンテナは凍結スピードを調節できる箱であり(−80℃で、およそ1分あたり−1℃)、そしてこれにより、非プログラム式の−80℃フリーザーでの凍結保存が可能である。

(注釈8) トランスフェクションに関して50–80%の培養密度での細胞を使用する。しかしながら、適切な細胞密度はトランスフェクション試薬に依存する。加えて、トランスフェクション試薬(μL)とプラスミドDNA(μg)の比率もメーカーの使用説明書に応じて、最適化すべきである。ここで記述された手順は、96-well plateで、HEK293T細胞、トランスフェクション試薬としてHiLyMAxを用いた条件で最適化されている。

[0066] 実施例2：PPRとその他の機能ドメインとの融合タンパク質による標的mRNAからのタンパク質発現量の向上

[0067] 細胞を用いて有用物質生産を行う場合、内在・外来遺伝子のタンパク質合成量を精密に制御する必要がある。最終タンパク質合成量は、遺伝子の挿入位置、mRNA転写量、転写後制御(RNAレベルでの制御)、翻訳後修飾などによって決定される。そこで、PPRタンパク質が標的RNA分子と配列特異的に結合することを利用した、mRNAの翻訳増強方法を考案した(図4)。真核生物では、mRNAの翻訳は、翻訳開始因子(eukaryotic initiation factor; eIF)がmRNAに介在

し、その結果、リボソームが翻訳開始点付近にリクルートされることで開始する。つまり、mRNA上にリボソームを寄せることさえ出来れば翻訳の人為的な増強が可能であると考えた。また、タンパク質翻訳は、一般的にERで行われている。そこで、ERへ目的mRNAを積極的に局在させることで、翻訳増強できると考えた。

[0068] 検証実験

上記のアイデアを検証するために、動物培養細胞（HEK293T）を使ったレポーターアッセイシステムを作成した（用いた機能ドメインが異なること以外は、実施例1に記載の方法と同様の方法で実験を行った）。特定のRNA配列（UAUCUUGUCUUUA）（配列番号3）に結合することが分かっているCRR4タンパク質（シロイヌナズナPPRタンパク質の一つ）を使って系を構築した。まず、CRR4と候補タンパク質機能ドメインとの融合タンパク質発現ベクター（エフェクタープラスミド）を作成した。候補ドメインは、（a）eIFタンパク質（eIF4E, eIF4G）、（b）リボソーム結合タンパク質（DENR, MCT-1, TPT1, Lerepo4）、（c）転写されたmRNAの核から細胞質への輸送促進するHistonの翻訳制御因子（SLBP）、（d）ERアンカータンパク質（SEC61B, TRAP-alpha, SR-alpha, Dia1, p180）、（e）ER retention signal（KDEL）、（f）ER signal peptide、を選んだ。融合タンパク質は、HA-CRR4-XXもしくは、XX-CRR4-HAの形で発現するようにクローニングした（HA：エピトープタグ（配列番号4）；XX：候補ドメイン）。

[0069] レポータープラスミドは、CMVプロモーター制御下で、ウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）とホタルルシフェラーゼ（FLuc）がジストロニックmRNAの形で転写される発現カセットを搭載した。FLucの5'側に、PPR結合配列（UAUCUUGUCUUUA）（配列番号3）が3つ挿入されている。

[0070] エフェクタープラスミドとレポータープラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションし、RLUC、FLUCの発光量を測定した。RLUC発光量は、トランスフェクションコントロールとして扱い、FLUC発光量／RLUC発光量の値を翻訳活性量として扱った。

[0071] 結果

以下の（A）、（B）の指標を用いて、図5および図6に示す結果を検討した。

（A）標的非存在下と存在下との比較

配列特異的にどれくらい翻訳量変化があったのかが分かる。

（B）標的存在下、エフェクターなし（empty）と比較（黒色破線）

ドメイン付加による翻訳量変化が分かる。

[0072] 1. CRR4のC末側にeIF4Eを融合

（A）2.7倍

（B）1.6倍

2. CRR4のC末側にeIF4Gを融合

（A）4.5倍

（B）3.3倍

3. CRR4のN末側にDENRを融合

（A）1.7倍

（B）1.3倍

4. CRR4のC末側にDENRを融合

（A）2.4倍

（B）1.7倍

5. CRR4のN末側にMCT-1を融合

（A）1.3倍

（B）1.0倍

6. CRR4のC末側にMCT-1を融合

（A）2.0倍

(B) 1. 2 倍

7. CRR4のN末側にTPT-1を融合

(A) 1. 4 倍

(B) 1. 0 倍

8. CRR4のC末側にTPT-1を融合

(A) 2. 4 倍

(B) 1. 9 倍

9. CRR4のN末側にLereo 4を融合

(A) 3. 0 倍

(B) 1. 8 倍

10. CRR4のC末側にLereo 4を融合

(A) 3. 3 倍

(B) 2. 6 倍

11. CRR4のC末側にSLBPを融合

(A) 4. 1 倍

(B) 3. 3 倍

12. CRR4のC末側にSec61Bを融合

(A) 1. 6 倍

(B) 1. 6 倍

13. CRR4のC末側にSec61BTMを融合

(A) 2. 4 倍

(B) 1. 9 倍

14. CRR4のC末側にTRAP-alphaを融合

(A) 3. 5 倍

(B) 4. 5 倍

15. CRR4のC末側にTRAPTMを融合

(A) 2. 3 倍

(B) 1. 6 倍

16. CRR4のN末側にSR - a l p h aを融合

(A) 1. 7倍

(B) 1. 5倍

17. CRR4のN末側にD i a 1 T Mを融合

(A) 1. 8倍

(B) 1. 2倍

18. CRR4のN末側にP 1 8 0 T M 2 Rを融合

(A) 2. 1倍

(B) 1. 5倍

19. CRR4のN末側にP 1 8 0 T M Hを融合

(A) 2. 3倍

(B) 2. 5倍

20. CRR4のN末側にP 1 8 0 T M 2を融合

(A) 3. 0倍

(B) 2. 1倍

21. CRR4のC末側にK D E Lを融合

(A) 1. 8倍

(B) 1. 4倍

22. CRR4のC末側にK E E Lを融合

(A) 2. 3倍

(B) 2. 1倍

23. CRR4のN末側にS i g n a l p e p t i d e (S P)を融合

(A) 1. 4倍

(B) 2. 0倍

[0073] 上記のとおり、指標(A)および標的(B)のいずれにおいても、すべての機能ドメインで翻訳上昇が認められた。すなわち、本発明の融合タンパク質によって、標的mRNAの翻訳を増強させることが可能であることが明確に示された。

[0074] 本実施例において使用した機能ドメインのアミノ酸配列を以下に示す。

[表1]

Domain	Sequence
④IF4E	MATVEPETTFPTFNPPTTEEEKTESNQEVANPEHYIKHPLQNRWALW FFKNDKSKTWQANLRLISKFDTVEDFWALYNHIQLSSNLMPGCDYS LFDGIEFMLEDEKNKRGGRWLITLNKQQRSDLDRFWLETLLCLI GESFDDYSDDVCGAVVNVRAKGDKIAIWTTECENREAVTHIGRVYK ERLGLFPFKIVIGYQSHADTATKSGSTTENRFVVGRY (配列番号5)
④IF4G	EEKKRYDREYLLGFQFIFASMQKPEGLPHISDVVLDKANKTFLRPL DPTRELQGINCGFDFTPSFANLGRITLSTRGFPFGGPGGELPRGPQA GLGPRRSQQGPRKEPRKIIATVLMTEDIKLNKAEKAWKPSSKRTAA DKDRGEEDADGSKTQDLFRRVRSILNKILTPQMFOQLMKQVTQLAID TEERLKGVIDLIFEKAISEPNFSVAYANMCRCLMALKVPTTEKPTV TVNFRKLLLNRCQKEFEKDKDDDEVFEKKQKEMDEAATAEERGLK EELSEARDIARERSIGNIKFIGELFKLKMUTEAIMHDCVVKLLKNH DEBSLECLCRLLTTIGKDLDFEKAKPRMDQYFNQMEKIIKEKKTSS RIRFMLQDVLDLGRSNWVPRRGDQGPKTIDQIHKEAEMEEHREHIK VQQLMAKGSOKRGGPGPPISRGLPLVDOGGWNTVPISKGSRPID TSRLTKITKPGSIDSNNQLFAPGGRLSWGKGSSGGSGAKPSDAASE AARPATSTLNKFSALQQOAVPTTESTDNRRVVRSSLSRERGEKAGDR GDRLESERGGDRGRDLNARTPATKESFSKEVEERSRERPSQPEG LRKAASLTEDRDRGRDAVKREAALPPVSPLKAALSEEELEKKSIAI IEEYLHLNDMKEAVQCQVELASPSLLFIFVRHGVSTLERSAIARE HMGQLLHQLLCAGHLSTAQYYQGLYEILELAEDMEIDIPHVWLYLA ELVTPILQEGGVPMGELFREITKPLRPLGKAASLLEILGLLCKSM GPKKVGTLWREAGLSWKEFLPEGQDIGAFVAEQKVEYTLGESEAP GQRALPSEELNRQLEKLLKEGSSNQRFVDWIEANLSEQQIVSNTLV RALMTAVCYSIIIPETPLRVDVAVLKARAKLLQKYLCEQKELQAL YALQALVVTLEQPPNLLRMFFDALYDEDVVKEDAFYSWESSKDPAE QQKGVALKSVTAFFKWLREAEESDH (配列番号1)
⑤ENR	MAADISESSGADCKGDPNRSKLDADYPLVLYCGVCSLPTEYCEY MPDVAKCRQWLEKNFPNEFAKLTVENSPKQEAGISEGQGTAGEEEE KKKQKRGGRGQIKQKKKTVPQKVTIAKIPRAKKKYVTRVCGLATFE IDLKEAQRFFAQKPSCGASVTGEDEIIIQGDFTDDIIDVIOEKWPE VDDDSIEDLGEVKK (配列番号6)
NCT-1	MPKKFDEKENVENCIOKTSVINGIKNQLIEQFFGIEPWLNQIMPK KDPVKIVRCHEHIEILTVNGELLFFRQREGPFYPTLRLLLHKYPFIL PHQQVDKGAIKFVLSGANIMCPGLTSPGAKLYPAAVDITIVAIMAEG

	KQHLCVGVMMKMSAEDIEKVNKGIGIENIHYLNDGLWHMKTYK (配列番号7)
TPT-1	MIYRDLISHDEMFSDIYKIREIADGLCLEVEGKMSRTEGNIDDS LIGGNASAEQPEGEQTESTVITGVDIVMNHHLQETSFTKEAYKKYI KDYMKSIGKLEEQRPERVKPFMTGAEEQIKHILANFKNYQFFIGE NMNPDGMVALLDYREDGVTPYMIFFKDGLEMEKC (配列番号8)
Lerep04	PPKQAAQAGGSKKAEQKKKEKIIEDKTFGLKNKKGAKQOKFIKAVT HQVKFGQQNPRQVAQSEAEKKLKKDDKKKELQELNELFKPVVAAQK ISKGADPKSVVCAPFKQGQCTKGDKCKFSHDLTLERKCEKRSVYID ARDEBLEKDTMDNWDEKKLEEVVNKKHGEAEKKKPKTQIVCKHFLE AIENNKYGFVWVCPGGGDI CMYRHALPFGFVLKKDKKKEEKEDEIS LEDLIERERSALGPNVTKITLESFLAWKERKRQEKIDKLEQDMERR KADFKAGKALVISGREVFEPFELVNDDDEEADDTRYTQGTGGDEV DDSVSVNDIDLSLYIPRDVDETGITVASLERFSTYTSKDKENKLSE ASGGRAENGERSDLEEDNEREGTENGAI DAVPVDEKSFHWRGFG (配列番号9)
SLBP	ACRPRSPPRHQSRCDGDASPPSPARWSLGRKRRADGRWRPDAEE AEHRGAERRPESFTTPEGPKPRSRCSDWASAVEEDEMTRVKNEMA RYKRKLLINDFGRERKSSSGSSDSKESMSTVPADFETDESVLMRQ KQINYGKNTIAYDRIYKEVPRHLRQPGIHPKTPNKFKKYSRSWDQ QIKLWKVALHFWDPFAEGCDLQEIHPVDLESAESSSEPQTSSQDD FDVYSGTPTKVRHMDSQVEDEFDLEACLTEPLRDFSAMS (配列番号10)
Sec61B	PGPTPSGTNVGSSGRSPSKAVAAARAAGSTVRQRKNASCGRSAGRT TSAGTGGMWRPFYTEDSEGLKVGVPVVLVMSLLFIASVFMHLHIWKY TRS (配列番号11)
Sec61B-TM	VGPVFPVLVMSLLFIASVFMHLHIW (配列番号12)
TRAP-alpha	RLLPRLLLLLLLLVFPATVLFRGGPRGLLAVAQDLTEDEETVEDSII EDEDDEAEVEEDEPTDLVEDKEEEDVSGEPEASPSADTTILFVKGE DPPANNIVKFLVGFTNKGTEDFIVESLDASFRYPQDYQFYIQNFTA LPLNTVVPQRQATFEYSFIPAEPMGGRPFGLVINLNYKDLNGNVF QDAVFNQTVTVIEREDGLDGETIFMYMFLAGLGLLVIVGLHQLLES RKRKRPIQKVEMGTSSQNDVDMSWIPQETLNQINKASPERLPRKRA OKRSVGSDE (配列番号13)
TRAP-TM	TIFMYMFLAGLGLLVIVGLHQLL (配列番号14)
SR-alpha	LDFFFTIPSKGGLVLWCFFQGVSDSCTGPVNALIRSVLLQVGFQKILT

	LTYVDKLIIDVHRLFRDKYRTEIQQQSALSLLNGTFDFQNDFLRL REAESESSKIRAPTTMKKFEDSEKAKKFVRSMIETRGEKPKAKNS KKKGAKKEGSDGPLATSKPVPAEKSGLPVGPENGVELSKEELIRK REEPIQKHGRGMEKSNKSTKSDAPKEKGKKAPEVWELGGCANKEVL DYSTPTTNGTPEAAALSEDINLIRGTGSGGQLQDLDCSSSDDEGAAQ NSTKPSATKGTLCGMFGMLKGLVGSKSLSRDEMESVLDKMRDHLIA KNVAADIAVQLCESVANKLEGKVMGTFSTVTSTVKQALQESLVQIL QPORRVDMLRDIMDAQRQRFPYVVTFCGVNGVGKSTNLAKISFWLL ENGFSVLIAACDTFRAGAVEQLRTHTRRLSALHPPEKHGGRTMVQL FEKGYGKDAAGIAMEAIAFARNQGFDVVLVDTAGRMQDNAPLMTAL AKLITYNTPDVLVLFVGEALVGNEAVDQLVKFNALADHSMAQTPRL IDGIVLTKPDTIDDKYGAAISMTYITSKFIVFVGTGQTYCDLRSLN AKAVVAALMKA (配列番号15)
DiaTM	STLGHMVLFPVWFLYSLL (配列番号16)
P180TMR2	DIYDTQTLGVVVFPGGFVMSAIGIFLVSTFSMKETSYEEALANQRK EMAKTHHQVEKKKKEKTVEKKGKTKKKKEKPNGKIPDHDPAFNVT VLLREPVRAPAVAVAPTVPQPPIIIVAPVATVPAMPQEKCLASSPKDK KKKEKKVAKVEPAVSSVNSIQVLTSKAAILETAPKEGRNTDVAQS PEAPKQEAPAKKSGSKKKGPPDADGPLYLPYKTLVSTVGSVMVFNE GEAQRLEIELSEKAGIIQDTWHKATQKGDVP (配列番号17)
P180TMH	LGVVVFPGGFVMSAIGIFLVSTF (配列番号18)
P180TM2	DIYDTQTLGVVVFPGGFVMSAIGIFLVSTF (配列番号19)
KDEL	KDEL (配列番号20)
KEEL	KEEL (配列番号21)
ER signal peptide	MGWSCIIILFLVATATGAHS (配列番号22)

請求の範囲

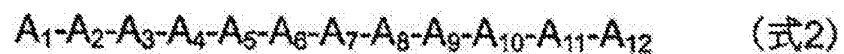
- [請求項1] 標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させるための融合タンパク質であって、
- 前記融合タンパク質は、
- (A) mRNAからのタンパク質発現量を向上させる、1または複数の機能ドメイン、および
- (B) 標的mRNAに対してRNA塩基選択的に、または、RNA塩基配列特異的に結合可能なポリペプチド部分、
- を含み、
- 前記(B)のポリペプチド部分が、式1で表される30～38アミノ酸長のポリペプチドからなるPPRモチーフを1個以上含む、ポリペプチド部分であり
- [化1]



(式中：

Helix Aは、12アミノ酸長の、 α ヘリックス構造を形成可能な部分であって、式2で表され、

[化2]



式2中、 $A_1 \sim A_{12}$ はそれぞれ独立にアミノ酸を表し；

Xは、存在しないか、または、1～9アミノ酸長からなる部分であり；

Helix Bは、11～13アミノ酸長からなる、 α ヘリックス構造を形成可能な部分であり；

L は、2～7 アミノ酸長の、式3で表される部分であり；

[化3]



式3中、各アミノ酸は、“i”（-1）、“ii”（-2）、とC末端側からナンバリングされ、

ただし、 $L_{III} \sim L_{VII}$ は存在しない場合がある。）

A_1 、 A_4 、及び L_{II} の3つのアミノ酸の組み合わせ、又は A_4 、 L_{II} の2つのアミノ酸の組み合わせが、標的mRNAの塩基または塩基配列に対応したものとなっている、融合タンパク質。

[請求項2] 請求項1に記載の融合タンパク質であって、前記（B）のポリペプチド部分は、前記PPRモチーフを2～30個含み、前記複数のPPRモチーフが、標的mRNAの塩基配列に特異的に結合するように配置されている、融合タンパク質。

[請求項3] 請求項2に記載の融合タンパク質であって、前記（B）のポリペプチド部分は、前記PPRモチーフを5～25個含む、融合タンパク質。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の融合タンパク質であって、前記（A）の機能ドメインは、前記（B）のポリペプチド部分のN末端側および／またはC末端側に結合されている、融合タンパク質。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の融合タンパク質であって、前記（A）の機能ドメインが、mRNAヘリボソームを誘導するドメイン、mRNAの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメイン、mRNAの核外への輸送に関連するドメイン、小胞体膜への結合に関連する

ドメイン、小胞体保留シグナル (ER retention signal) 配列を含むドメイン、および、小胞体シグナル配列を含むドメイン、からなる群から選択される、融合タンパク質。

[請求項6]

請求項5に記載の融合タンパク質であって、

前記mRNAヘリボソームを誘導するドメインは、DENR (Density-regulated protein)、MCT-1 (Malignant T-cell amplified sequence 1)、TPT1 (Translationally-controlled tumor protein)、および、Lerapo4 (Zinc finger CCH-domain) からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記mRNAの翻訳開始または翻訳促進に関連するドメインは、eIF4EおよびeIF4Gからなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記mRNAの核外への輸送に関連するドメインは、SLBP (Stem-loop binding protein) の全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記小胞体膜への結合に関連するドメインは、SEC61B、TRAP-alpha (Translocon associated protein alpha)、SR-alpha、Dia1 (Cytochrome b5 reductase 3)、および、p180からなる群から選択されるポリペプチドの全部または機能的な一部を含むドメインであり、

前記小胞体保留シグナル (ER retention signal) 配列は、KDEL (KEEL) 配列を含むシグナル配列であり、または、

前記小胞体シグナル配列は、MGWSC I I L F L V A T A T G A
H Sを含むシグナル配列である、

融合タンパク質。

[請求項7]

請求項1～6のいずれか1項に記載の融合タンパク質であって、前記の各PPRモチーフにおける A_1 、 A_4 、および L_{ii} の3つのアミノ酸の組み合わせが；

PPRモチーフの標的とする塩基がA（アデニン）である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の3つのアミノ酸の組み合わせが、（ A_1 、 A_4 、 L_{ii} ）の順に、（バリン、トレオニン、アスパラギン）、（フェニルアラニン、セリン、アスパラギン）、（フェニルアラニン、トレオニン、アスパラギン）、（イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸）、または（トレオニン、トレオニン、アスパラギン）であり；

PPRモチーフの標的とする塩基がG（グアニン）である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の3つのアミノ酸の組み合わせが、（ A_1 、 A_4 、 L_{ii} ）の順に、（グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸）、（バリン、トレオニン、アスパラギン酸）、（リジン、トレオニン、アスパラギン酸）、または（ロイシン、トレオニン、アスパラギン酸）であり；

PPRモチーフの標的とする塩基がU（ウラシル）である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の3つのアミノ酸の組み合わせが、（ A_1 、 A_4 、 L_{ii} ）の順に、（バリン、アスパラギン、アスパラギン酸）、（イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン）、（イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン酸）、（イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸）、（フェニルアラニン、プロリン、アスパラギン酸）、または（チロシン、プロリン、アスパラギン酸）であり；または、

PPRモチーフの標的とする塩基がC（シトシン）である場合には、 A_1 、 A_4 、および L_{ii} の3つのアミノ酸の組み合わせが、（ A_1 、

A_4 、 L_{ii}) の順に、(バリン、アスパラギン、アスパラギン)、(イソロイシン、アスパラギン、アスパラギン)、(バリン、アスパラギン、セリン)、または(イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸)である、

融合タンパク質。

[請求項8]

請求項1～6のいずれか1項に記載の融合タンパク質であって、前記の各PPRモチーフにおける A_4 および L_{ii} の2つのアミノ酸の組み合わせが；

PPRモチーフの標的とする塩基がA（アデニン）である場合には、 A_4 および L_{ii} の2つのアミノ酸の組み合わせが、(A_4 、 L_{ii})の順に、(トレオニン、アスパラギン)、(セリン、アスパラギン)、または(グリシン、アスパラギン)であり；

PPRモチーフの標的とする塩基がG（グアニン）である場合には、 A_4 および L_{ii} の2つのアミノ酸の組み合わせが、(A_4 、 L_{ii})の順に、(トレオニン、アスパラギン酸)または(グリシン、アスパラギン酸)であり；

PPRモチーフの標的とする塩基がU（ウラシル）である場合には、 A_4 および L_{ii} の2つのアミノ酸の組み合わせが、(A_4 、 L_{ii})の順に、(アスパラギン、アスパラギン酸)、(プロリン、アスパラギン酸)、(メチオニン、アスパラギン酸)、または(バリン、トレオニン)であり；

PPRモチーフの標的とする塩基がC（シトシン）である場合には、 A_4 および L_{ii} の2つのアミノ酸の組み合わせが、(A_4 、 L_{ii})の順に、(アスパラギン、アスパラギン)、(アスパラギン、セリン)、または(ロイシン、アスパラギン酸)である、融合タンパク質。

- [請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の融合タンパク質をコードする、核酸。
- [請求項10] 請求項9に記載の核酸を含む、ベクター。
- [請求項11] ベクターが発現ベクターである、請求項10に記載のベクター。
- [請求項12] 細胞内で標的mRNAからのタンパク質発現量を向上させる方法であって、
請求項1～8のいずれか1項に記載の融合タンパク質、または、請求項10または11に記載のベクターを準備するステップ、および、
前記融合タンパク質、または、ベクターを細胞内へ導入するステップ、を含む、
方法。
- [請求項13] 請求項12に記載の方法であって、
前記細胞が、真核生物の細胞である、
方法。
- [請求項14] 請求項13に記載の方法であって、
前記細胞が、動物細胞である、
方法。
- [請求項15] 請求項14に記載の発明であって、
前記動物細胞が、ヒト細胞である、
方法。