

明 細 書

発明の名称：

キャップ化RNA及びその製造方法並びにタンパク質の製造装置及びタンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、キャップ構造を有するキャップ化RNA及びその製造方法並びにタンパク質の製造装置及びタンパク質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 真核生物のmRNAなどでは、RNAの5'末端に7-メチルグアニル酸が三リン酸結合を介して5'-5'結合した5'キャップ構造が知られている。キャップ構造は、mRNAの翻訳を促進することが知られており、タンパク質発現系などでmRNAにキャップ構造を人工的に導入して目的タンパク質を効率的に合成することができる。

[0003] 本発明者らは、これまで、5'末端がキャップ修飾されたRNAであるキャップ化RNAの製造方法であって、活性化キャップ化合物と、5'末端がモノリン酸化されたモノリン酸RNAとを反応させるキャップ化RNAの製造方法を開発している（例えば、特許文献1参照）。この方法によって、化学的な方法でRNAの5'末端にキャップ構造を導入することができる。RNAの主鎖の5'末端にキャップ構造を有する一般的なRNAを図1（a）に示す。

[0004] 一方、本発明者らは、タンパク質をコードし、全長の塩基数が102以上の3の倍数であり、少なくとも1の開始コドン（開始コドン）を有しており、この開始コドンと同じ読み枠の終止コドン（停止コドン）を有しておらず、さらにIRESを含んでいない環状RNAを開発している（例えば、特許文献2、非特許文献1参照）。この環状RNAは、キャップ構造を有していないが、高い効率で回転式タンパク質翻訳を行うことが可能である。

[0005] 上記のとおり、RNAには直鎖状と環状があり、直鎖状RNAでは主鎖の

5' 末端に1つのキャップ構造を有するものが一般的であり、一方で環状RNAではキャップ構造を有するものは知られていない。一般的に、直鎖状RNAでは、5' 末端にキャップ構造を導入することで、その直後にある開始コドンから翻訳反応が開始されることが知られている。一方、5' 末端のない環状mRNAにおいては、キャップ構造を導入できないため、翻訳反応を開始するためにはIRES配列を導入することが一般的である。また、直鎖mRNAにおいても2つのタンパク質がコードされている場合、2番目の翻訳領域において翻訳反応を開始するためには、IRES配列を導入する方法が知られている（例えば、非特許文献2参照）。本文献では、eT_{oe}holdにIRESが組み込まれており、eT_{oe}holdは特定のtRNAとのセンス・アンチセンス相互作用によって活性化されるまで不活性されるように設計されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2021/172204号（要約、請求項1など）

特許文献2：国際公開第2013/118878号（要約、請求項1、段落004など）

[0007] 非特許文献1：「ヒト培養細胞内でたんぱく質の大量合成に成功 ～環状mRNAを用いた終わりのない回転式たんぱく質合成反応を実現～」、国立研究開発法人科学技術振興機構、プレスリリース、平成27年11月10日、科学技術振興機構（JST）、名古屋大学、理化学研究所（共同発表）、＜URL：<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20151110/index.html#ZU1>>

非特許文献2：“RNA-responsive elements for eukaryotic translational control”, Evan M. Zhao et al., nature biotechnology, 2021年10月28日, <URL:<https://doi.org/10.1038/s41587-021-01068-2>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 特許文献1のような直鎖状RNAでは、5'末端にキャップ構造を1つ化学的に導入することが可能であるが、翻訳活性を向上させるためのさらなる改良が求められている。
- [0009] また、特許文献2のようなキャップ構造を有していない環状RNAは、リボソームを構成する翻訳開始因子がRNAに結合する速度が遅く、翻訳活性においてさらなる改善の余地があった。
- [0010] 本発明の目的は、従来にない様々なタイプの構造を有し翻訳活性が高いキャップ化RNA及びその製造方法を提供することにある。また、本発明の他の目的は、このようなキャップ化RNAを用いてタンパク質を合成可能なタンパク質の製造装置及びタンパク質の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0011] [1] 開始コドンから始まりタンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の領域と、を有し、前記上流領域にキャップ構造を有する分岐部を備えることを特徴するキャップ化RNA。
- [0012] [2] 前記分岐部が下記(a)～(c)のいずれか少なくとも1つの構造を有することを特徴とするキャップ化RNA
- (a) 前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記上流領域にハイブリダイズされている、
 - (b) 前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられている、
 - (c) 前記RNAが直鎖状RNAであり、前記上流領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有し、かつ各枝分かれに前記キャップ構造が設けられている。
- [0013] [3] 前記(a)において、前記RNAが環状RNAであり、該環状RNAの前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記環状RNAの前記上流領域にハイブ

リダイズされていることを特徴とする上記〔２〕に記載のキャップ化RNA

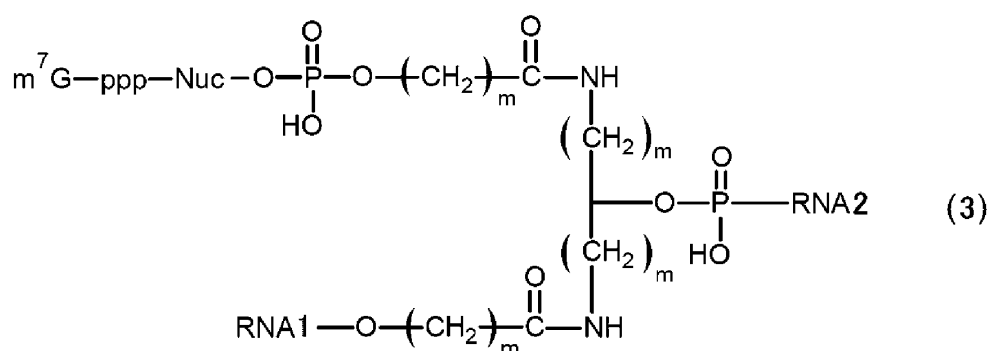
[0014] [4] 前記 (a) において、前記 RNA が直鎖状 RNA であり、該直鎖状 RNA の前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記直鎖状 RNA の前記上流領域にハイブリダイズされていることを特徴とする上記 [2] に記載のキャップ化 RNA。

[0015] [5] 前記(b)において、前記RNAが環状RNAであり、該環状RNAの前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられていることを特徴とする上記[2]に記載のキャップ化RNA。

[0016] [6] 前記(b)において、前記RNAが直鎖状RNAであり、該直鎖状RNAの前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられていることを特徴とする上記[2]に記載のキャップ化RNA。

[0017] [7] 前記 (b) において、下記式 (3) で示される構造を有することを特徴とする上記 [2] に記載のキャップ化 RNA。

[化1]

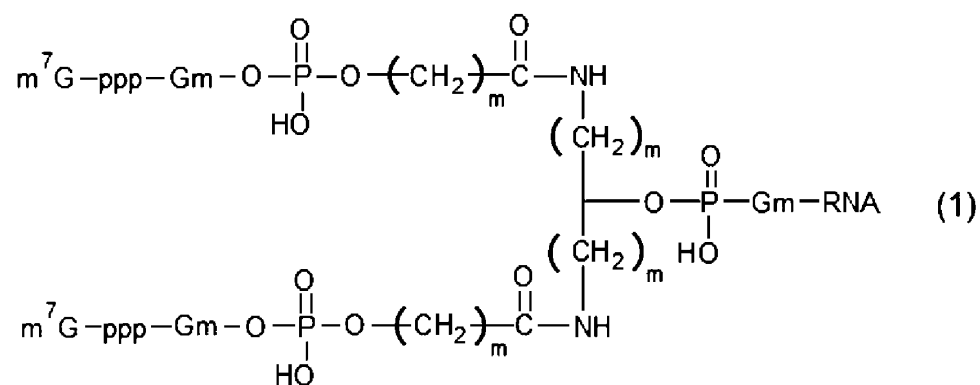


(ここで、 m^7G はキャップを示し、 p はリン酸基を示す。 Nuc は天然型又は非天然型のヌクレオチドが1つ以上連結したポリヌクレオチドを示す。 m は1～5の整数を示し、複数の m は互いに同一であっても異なってもよい。

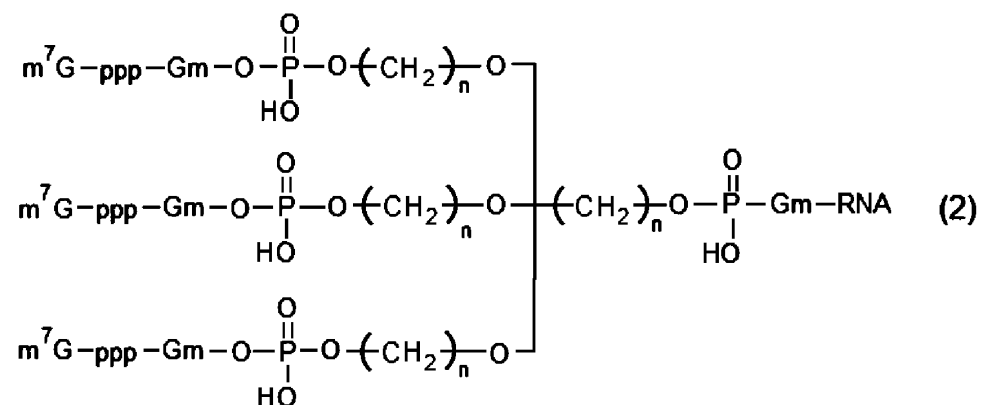
い。RNA 1 と RNA 2 は主鎖を構成する RNA を示し、RNA 1 は 3' 末端側で、RNA 2 は 5' 末端側で、それぞれ分岐構造の部分と連結されている。式 (3) の RNA は、RNA 1 の 5' 末端と RNA 2 の 3' 末端が連結して環状構造を形成した環状 RNA でもよく、連結せずに直鎖状 RNA でもよい。)

[0018] [8] 前記(c)において、下記式(1)又は式(2)で示される構造を有することを特徴とする上記[2]に記載のキャップ化RNA。

[化2]



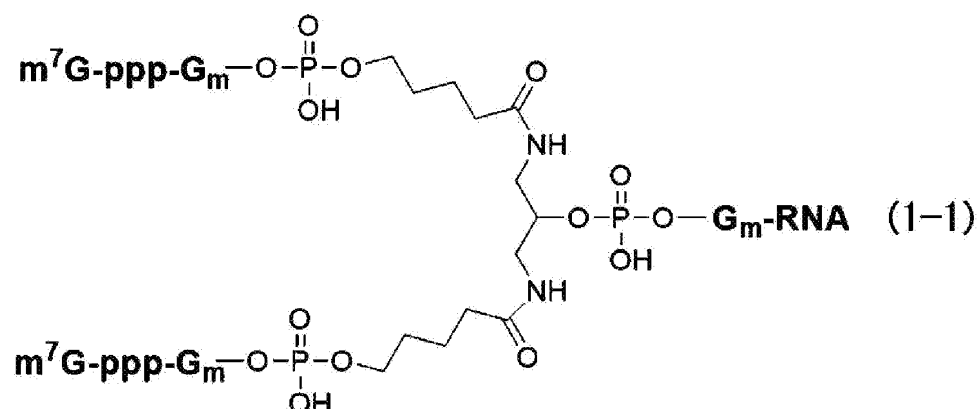
[化3]



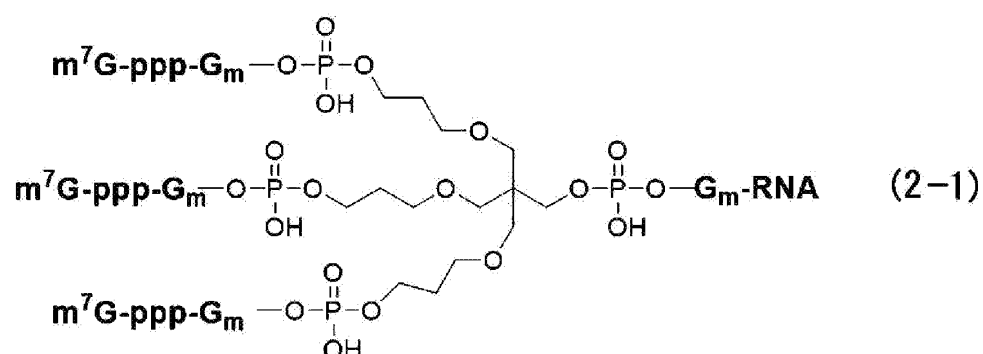
(ここで、 m^7G はキャップを示し、 p はリン酸基を示し、 Gm はグアニンヌクレオチドの2' -水酸基がメチル化された構造を示し、 m は1～5の整数を示し、複数の m は互いに同一であっても異なってもよく、 n は1～5の整数を示し、複数の n は互いに同一であっても異なってもよい。)

[0019] [9] 前記式(1)が下記式(1-1)で示される構造を有し、前記式(2)が下記式(2-1)で示される構造を有することを特徴とする上記[8]に記載のキャップ化RNA。

[化4]



[化5]



【0020】 【10】前記RNAが、複数の翻訳領域を有することを特徴とする上記【1】に記載のキャップ化RNA。

[0021] [1 1] 上記 [1] に記載のキャップ化RNAの製造方法であって、下記（
a）～（c）のいずれか少なくとも1つの工程を有することを特徴とするキ
ャップ化RNAの製造方法

(a) 前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブを前記上流領域にハイブリダイズさせる、又は、

(b) 前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖を有する前記RNAを合成したのち、前記分岐鎖に前記キャップ構造を結合させる、

(c) 前記RNAが直鎖状RNAであり、前記上流領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有するRNAを合成したのち、各枝分かれに前記キャップ構造を結合させる。

[0022] [12] 上記[1]に記載のキャップ化RNAと、該キャップ化RNAを鋳型として前記翻訳領域がコードする前記タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、を備えることを特徴とするタンパク質の製造装置。

[0023] [13] 上記[1]に記載のキャップ化RNAを、該キャップ化RNAを鋳型として前記翻訳領域がコードする前記タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系に添加して、前記タンパク質を発現させることを特徴とするタンパク質の製造方法。

[0024] [14] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出装置であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する上流領域と、を有する環状RNAからなる検出用プローブと、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状RNAの前記上流領域に前記目的RNAをハイブリダイズさせてキャップ化RNAを生成させる手段と、

前記キャップ化RNAを添加することで前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する手段と、を備えることを特徴とする目的RNAの検出装置。

[0025] [15] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出方法であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の非翻訳領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する上流領域と、を有する環状RNAからなる検出用プローブを用意する工程と、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状RNAの前記上流領域に前記目的RNAをハイブリダイズさせてキャップ化RNAを生成させる工程と、

前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系に該キャップ化RNAを添加して前記標識タンパク質を発現させる工程と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する工程と、を備えることを特徴とする目的RNAの検出方法。

[0026] [1 (Pre)] 開始コドンから始まりタンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の非翻訳領域と、を有するRNAの前記非翻訳領域にキャップ構造を有するキャップ化RNAであって、下記(a)～(c)のいずれか少なくとも1つの構造を有することを特徴とするキャップ化RNA

(a) 前記非翻訳領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記非翻訳領域にハイブリダイズされている、

(b) 前記非翻訳領域の一部に前記RNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられている、

(c) 前記非翻訳領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有し、かつ各枝分かれに前記キャップ構造が設けられている。

[0027] [9 (Pre)] 上記[1 (Pre)]に記載のキャップ化RNAの製造方法であって、下記(a)～(c)のいずれか少なくとも1つの工程を有することを特徴とするキャップ化RNAの製造方法

(a) 前記非翻訳領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキ

キャップ構造を有するキャップ化プローブを前記非翻訳領域にハイブリダイズさせる、又は、

(b) 前記非翻訳領域の一部に前記RNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖を有する前記RNAを合成したのち、前記分岐鎖に前記キャップ構造を結合させる、

(c) 前記非翻訳領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有するRNAを合成したのち、各枝分かれに前記キャップ構造を結合させる。

[0028] [12 (Pre)] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出装置であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の非翻訳領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する非翻訳領域と、を有する環状RNAからなるプローブと、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状RNAの前記非翻訳領域に前記目的RNAをハイブリダイズさせてキャップ化RNAを生成させる手段と、

前記キャップ化RNAを添加することで前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する手段と、を備えることを特徴とする目的RNAの検出装置。

[0029] [13 (Pre)] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出方法であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の非翻訳領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する非翻訳領域と、を有する環状RNAからなるプローブを用意する工程と、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状RNAの

前記非翻訳領域に前記目的RNAをハイブリダイズさせてキャップ化RNAを生成させる工程と、

前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系に該キャップ化RNAを添加して前記標識タンパク質を発現させる工程と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する工程と、を備えることを特徴とする目的RNAの検出方法。

発明の効果

[0030] 本発明によれば、従来にない様々なタイプの構造を有し翻訳活性が高いキャップ化RNA及びその製造方法を提供することができる。また、本発明の他の目的は、このようなキャップ化RNAを用いてタンパク質を合成可能なタンパク質の製造装置及びタンパク質の製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]本発明のキャップ化RNA（ハイブリダイゼーションタイプ）の概要を示す図である。

[図2]本発明のキャップ化RNA（分岐鎖タイプ）の概要を示す図である。

[図3]実施例における本実験で使用した環状RNAとキャップ化プローブの塩基配列などを示す図である。

[図4]実施例における鋳型DNAと転写されたRNAの配列を示す図である。

[図5]実施例におけるキャップ化プローブの合成実験の結果を示す図である。

[図6]実施例における直鎖状RNAの合成実験の結果を示す図である。

[図7]実施例における直鎖状RNAの環化実験の結果を示す図である。

[図8]実施例における翻訳活性を相対評価した結果を示す図である。

[図9]実施例における各種のプローブを使用した場合における翻訳活性の評価結果を示す図である。

[図10]実施例におけるポリA配列の有無による翻訳活性の評価結果を示す図である。

[図11]実施例におけるプローブRNAの比率を変えて翻訳活性を評価した結果を示す図である。

[図12]実施例におけるキャップ化分岐鎖含有RNAオリゴヌクレオチドの合成スキームを示す概略図である。

[図13]実施例における分岐鎖の化学キャップ化反応を示す図である。

[図14]実施例における環状RNAの合成反応を示す図である。

[図15]実施例におけるキャップ化分岐鎖含有環状mRNAのヒト由来培養細胞（H e L a）における翻訳活性評価を示す図である。

[図16]実施例における合成したブランチ構造を含む107塩基長のRNAの構造を示す図である。

[図17]実施例における合成したブランチ構造／複数のキャップ構造を含む107塩基長のH e L a細胞における翻訳活性の評価結果を示す図である。

[図18]実施例における合成したRNAのHPLCで分析した結果を示す図である。

[図19]実施例における脱保護したRNAの吸光度測定の結果とキャップ化RNAの電気泳動結果を示す図である。

[図20]実施例におけるキャップ化RNAの吸光度測定の結果を示す図である。

[図21]実施例におけるアニーリング後のRNAの配列を示す図である。

[図22]実施例におけるバイシストロニックのmRNAの構造と翻訳活性を評価した結果を示す図である。

[図23]実施例におけるマルチuORF-mRNAの全体構造とプローブRNAの配列を示す図である。

[図24]実施例におけるマルチuORF-mRNAの全体構造と配列を示す図である。

[図25]実施例におけるマルチuORF-mRNAのHPLC分析の結果を示す図である。

[図26]実施例におけるマルチuORF-mRNAのHPLC分析の結果を示す図である。

[図27]実施例におけるマルチuORF-mRNAの変性PAGEの写真とキ

ャップ化効率を示す図である。

[図28]実施例におけるマルチuORF-mRNAの翻訳活性の評価結果を示す図である。

[図29]実施例におけるIRESを含むプラスミド断片の配列を示す図である。

[図30]実施例におけるCap化環状RNAとIRESの翻訳活性の評価結果を示す図である。

[図31]分岐鎖にキャップ構造を導入した環状mRNAの翻訳活性が、これを含まないものを比較して大きく向上したことを示す実験結果を示す図である。

[図32]分岐鎖にキャップ構造を導入した環状mRNAの分岐鎖長と翻訳活性の関係（分岐鎖長が可変であること）を示す実験結果を示す図である。

[図33]分岐鎖にキャップ構造を持つ環状mRNAの翻訳活性が、EMCV由来IRES配列を含むmRNA等に比較して高いことを示す実験結果を示す図である。

[図34]ATF4-Renilla mRNAのin vitro転写による合成した結果を示す図である。

[図35]RNAの化学合成の結果を示す図である。

[図36]RNAの化学的キャップ化の結果を示す図である。

[図37]環状NanoLuc mRNAのin vitro転写による合成の結果を示す図である。

[図38]環状NanoLuc mRNAの環化反応の結果を示す図である。

[図39]環状Luc mRNAに対するcsRNAの結果を示す図である。

[図40]RNAの化学合成の結果を示す図である。

[図41]RNAの化学的キャップ化の結果を示す図である。

[図42]RNAの化学的キャップ化の結果を示す図である。

[図43]ATF4-Renilla mRNA及びATF4-csRNAの配列及び二次構造を示す図である。

[図44] ATF4-Renilla mRNA及びATF4-csRNA 5～8のHeLa細胞における翻訳反応を示す図である。

[図45]化学修飾を導入したcsRNAのHeLa細胞抽出液における翻訳反応の実験結果を示す図である。

[図46]LNA修飾を導入したcsRNAと環状mRNAのHeLa細胞における翻訳反応の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0032] 本発明のキャップ化RNAは、開始コドン（例えば、AUG）から始まりタンパク質をコードする翻訳領域と、この開始コドンの上流側（5'末端側）の上流領域とを有する。この上流領域は、非翻訳領域（5'UTR）であってもよく、他のオープンリーディングフレーム（ORF）の読み枠内であってもよい。そして、このキャップ化RNAは、上流領域にキャップ構造を有する分岐部を有する。ここで、「キャップ構造を有する分岐部」とは、キャップ構造が主鎖のRNAから分岐するあらゆる形態が含まれる。これは、例えば、キャップ構造を有する核酸（DNA、RNAなど）などの分子が、主鎖のRNAにハイブリダイズしたもの、主鎖を構成するヌクレオチドが枝分かれしたもの、主鎖を構成するヌクレオチドに共有結合したものなどが含まれる。なお、環状RNAの場合、3'UTRやpolyAも上流領域に含まれるが、分岐部は開始コドンに近い5'UTRやuORFに位置するのが好ましい。

[0033] 具体的には、キャップ化RNAは、下記（a）～（c）のいずれか少なくとも1つの構造を有する。

（a）上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが上流領域にハイブリダイズされている（以下、「ハイブリダイズタイプ」）。

（b）上流領域の一部にRNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖にキャップ構造が設けられている構造（以下、「分岐鎖タイプ」）。

(c) 前記上流領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有し、かつ各枝分かれに前記キャップ構造が設けられている構造（以下、「マルチキャップタイプ」）。

なお、本発明のキャップ化RNAには、天然型のRNA（すなわち、ATP、GTP、CTP、UTPからなるヌクレオチドが連結したポリヌクレオチド）だけでなく、RNAのヌクレオチドにmC4リンカー、2'OMe、LNAなどが導入された非天然核酸鎖（修飾核酸鎖）なども含まれる。以下、各タイプのキャップ化RNAについて説明する。

[0034] 1. ハイブリダイズタイプ

以下、ハイブリダイズタイプのキャップ化RNAについて説明する。図1の(B)に、直鎖状RNAにおけるハイブリダイズタイプのキャップ化RNAを、(C)に環状RNAにおけるハイブリダイズタイプのキャップ化RNAを、それぞれ実施例に記載された構造で示している。直鎖状RNA、環状RNAのいずれにおいても、翻訳対象であるタンパク質がコードされたRNA（以下、「コードRNA」）の上流領域（例えば非翻訳領域（5'UTR））に対して、キャップ構造を有するRNAであるキャップ化プローブがハイブリダイズされている。

[0035] コードRNAは、開始コドンから始まりタンパク質をコードする翻訳領域（図では「NanoLuc」の領域）と、開始コドンの上流（5'末端側）の上流領域（例えば、非翻訳領域（「5'UTR」の領域））を有している。本実施形態では、翻訳領域の3'末端には停止コドンがあり、この停止コドンの下流（3'末端側）には非翻訳領域（3'UTR）を有する場合がある。さらに、3'UTRにはポリA配列が含まれている。コードRNAは直鎖状RNAでは直鎖状であり、環状RNAでは直鎖状RNAの5'末端と3'末端が連結した環状構造となっている。なお、本実施形態では、コードRNAには停止コドンを含む実施態様を示しているが、これに限定されず、例えば、特許文献2や非特許文献1のように、停止コドンを持たないものとしてもよい。この停止コドンを含まないケースでは、これら先行技術に開示

されているように、全長の塩基数を102以上の3の倍数とした環状コードRNAを環状RNAとすれば、回転式タンパク質翻訳により高い翻訳効率で目的タンパク質を生成することができる。

[0036] コードRNAは、翻訳領域が1つだけのものや、2つ以上のもののいずれであってもよい。翻訳領域が2つ以上ある場合、各翻訳領域の上流にそれぞれ上流領域を有しており、キャップ化プローブはいずれかの上流領域にハイブリダイズするものを使用することができる。この場合、その上流領域の直下の開始コドンから始まる翻訳領域のタンパク質の翻訳活性が向上する。また、コードRNAの主鎖の5'末端に通常のキャップ構造を有するものであってもよい。5'末端に通常のキャップ構造を有する場合、キャップ化プローブのキャップ構造との併用により、キャップ化RNAの翻訳効率がより向上する。

[0037] キャップ化プローブは、コードRNAよりも短鎖のRNAで構成され、コードRNAの5' UTRの一部又は全部の配列と相補的な塩基配列を有する。コードRNAの5' UTRにおけるキャップ化プローブがハイブリダイズする位置は、特に制限はないが、Kozak配列を有する場合はその上流側が好ましい。キャップ化プローブの長さは特に制限はないが、10～50塩基数(nt)程度の長さが好ましい。また、キャップ化プローブは、5'末端にキャップが結合していてもよく、3'末端にキャップが結合していてもよい。さらに、キャップ化プローブは、3'末端側にポリA配列を有していてもよい。ポリA配列の長さ(塩基数)は、特に制限はないが、10～50塩基数程度が好ましい。キャップ化プローブは、リボースの2'炭素と4'炭素が架橋されたLocked Nucleic Acid (LNA) や、C4リンカーなどを有していてもよい。

[0038] キャップ化RNAでは、キャップ化プローブは、コードRNAの5' UTRにハイブリダイズしている。ここで、「ハイブリダイズ」とは、ストリンジентな条件でハイブリダイズすることを意味する。この「ストリンジентな条件」とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリ

ッドがほとんど形成されない条件をいう。また、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズ」するRNAとしては、コードRNAの5' UTRの所定の範囲の配列と完全に相補的な配列に対して、一定以上の相同性を有するRNAが挙げられる。この場合の相同性としては、例えばBLASTアルゴリズムにおいて、通常60%以上であり、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは100%である。

[0039] 次に、ハイブリダイズタイプのキャップ化RNAの製造方法について説明する。キャップ化RNAを構成するコードRNAは、目的とする配列を有するRNAに対して相補的な配列を有するDNAを用い、これをRNAポリメラーゼで転写することで作製することができる。あるいは、コードRNAは、DNA合成装置などを用いて化学的に合成してもよい。環状のコードRNAは、直鎖状のコードRNAを作製したのち、T4 RNAリガーゼ2などを用いて末端どうしを連結して環化することで作製することができる。

[0040] プローブRNAは、以下の方法で作製することができる。まず、ベースとなるキャップ化されていないRNAを、ホスホロアミダイト、リン酸化試薬、2'-OMe RNAアミダイト、LNAアミダイト、C4リンカーアミダイト、CPGカラムなどを使用し、RNA固相合成法などで作製する。次に、このRNAに、m⁷GDP、2-ニトロイミダゾールなどを反応させてリン酸化RNAのキャップ化を行う。この反応の詳細は、特許文献1を参照することができる。

[0041] キャップ化RNAは、コードRNAとプローブRNAをアニーリングさせることで作製することができる。アニーリングの際のコードRNAとプローブRNAの比率（モル比）は、翻訳活性の観点から、1:1~1:20の範囲内が好ましく、1:5~1:15の範囲内がより好ましい。アニーリングの温度は、80℃以上、好ましくは90℃以上とし、反応時間は1~30分、好ましくは3~10分程度とすることができる。

[0042] ハイブリダイズタイプのキャップ化RNAは、コードRNAが直鎖状、環

状であるかに問わず、5' UTRの任意の位置にキャップ構造を付加できる。キャップ構造を有するRNAでは、キャップ構造を有していないRNAと比較して、リボソームを構成する翻訳開始因子がコードRNAに結合する速度が向上し、その結果、翻訳活性が向上する。又はハイブリダイズタイプのキャップ化RNAでは、環状RNAあるいは直鎖RNAにおいて、プローブによるハイブリダイゼーションによりキャップを提示することで、翻訳を増強あるいは任意の位置から翻訳現象を誘導することを可能にする。

[0043] さらに、直鎖状RNAにおいては、キャップ化プローブを用いることで、本来タンパク質合成の読み枠として用いられない、例えば2番目以降の開始コドンから翻訳反応を誘導できる。これにより、キャップ化プローブにより任意のRNAの位置から翻訳を誘導できる。

[0044] また、環状RNAについては、これまでキャップ構造を有するものは知られていなかったが、本発明のハイブリダイズタイプのキャップ化RNAでは、環状RNAにおいてもキャップ構造を導入することができる。これにより、キャップ構造を有していない環状RNAと比較して、翻訳活性を大幅に向上させることができる。

[0045] 2. 分岐鎖タイプ

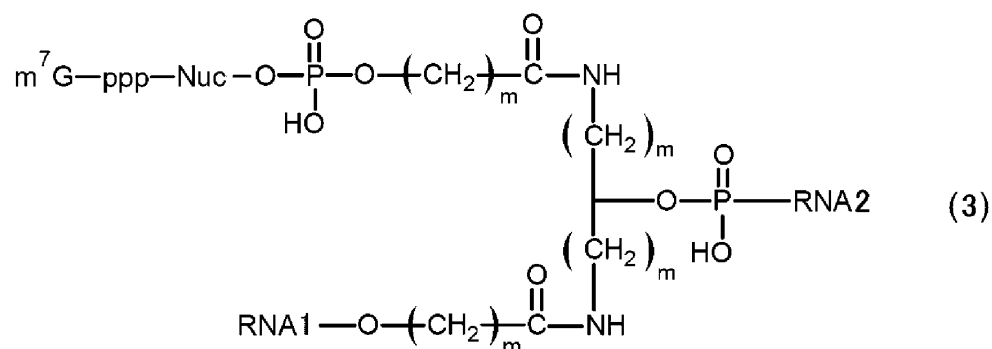
以下、分岐鎖タイプのキャップ化RNAについて説明する。図2の(a)に、直鎖状RNAにおける分岐鎖タイプのキャップ化RNAを、(b)に環状RNAにおける分岐鎖タイプのキャップ化RNAを、それぞれ実施例に記載された構造で示す。直鎖状RNA、環状RNAのいずれにおいても、コードRNAの上流領域は、コードRNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖を有しており、この分岐鎖にキャップ構造が設けられている。

[0046] コードRNAの全体的な構成は、上記の「1. ハイブリダイズタイプ」で説明したとおりである。分岐鎖タイプでは、コードRNAの5' UTRの一部が主鎖から分岐する分岐鎖を有しており、その分岐鎖の5'末端にキャップ構造を有している。コードRNAの主鎖の5'末端は、直鎖状RNAではリン酸化されている。また、コードRNAは、翻訳領域が1つだけのものや

、2つ以上のもののいずれであってもよい。コードRNAが直鎖状の場合、5'末端に通常のキャップ構造を有していてもよい。

[0047] 分岐鎖タイプのRNAとしては以下の式(3)を例示することができる。

[化6]

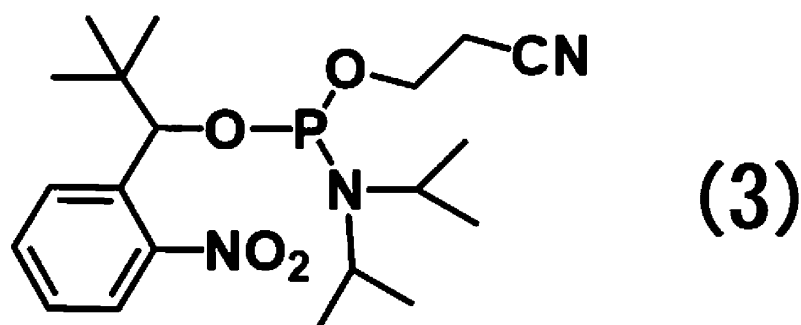


(ここで、 m^7G はキャップを示し、 p はリン酸基を示す。 Nuc は天然型又は非天然型のヌクレオチドが1つ以上連結したポリヌクレオチドを示す。 m は1～5の整数を示し、複数の m は互いに同一であっても異なってもよい。 $RNA1$ と $RNA2$ は主鎖を構成する RNA を示し、 $RNA1$ は3'末端側で、 $RNA2$ は5'末端側で、それぞれ分岐構造の部分と連結されている。式(3)の RNA は、 $RNA1$ の5'末端と $RNA2$ の3'末端が連結して環状構造を形成した環状 RNA でもよく、連結せずに直鎖状 RNA でもよい。)

[0048] 次に、分岐鎖タイプのキャップ化RNAの製造方法について説明する。5' UTRに分岐鎖を有するコードRNAは、RNA合成に使用される通常のホスホロアミダイト試薬と、分岐鎖を有するホスホロアミダイト試薬と、化学リン酸化試薬と、を使用し、核酸自動合成機を用いて合成することができる。分岐鎖を有するホスホロアミダイトとしては、後述する実施例で使用している1-[5-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ペンチルアミド]-3-[5-レブリニルオキシペンチルアミド]-プロピル-2-[(2-シアノエチル)-(N, N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイトなどを挙げることができる。また、化学リン酸化試薬としては、後述する実施

例の化合物 1（下記式（3））を挙げることができる。

[化7]



[0049] 通常のホスホロアミダイト試薬や装置を用いて、コードRNAの5' UTRの配列を上流側から合成し、分岐鎖を導入したい位置において分岐鎖を有するホスホロアミダイト試薬を使用することで、所望の位置に分岐鎖を導入することができる。コードRNAの分岐鎖の5'末端は、化学リン酸化試薬により疎水性保護基が導入されているため、この疎水性保護基を光照射などで分解して分岐鎖の5'末端をリン酸基とする。そして、7-メチルグアノシン 5'-ニリン酸イミダゾリド塩（ $1\text{m-m}^7\text{GDP}$ ）、2-ニトロイミダゾールなどのヘテロ芳香族化合物を用いて分岐鎖の5'末端へキャップを付加する。最後に、T4ポリヌクレオチドキナーゼなどを用いてコードRNAの主鎖の5'末端をリン酸化する。これにより、直鎖状のキャップ化RNAが得られる。環状のコードRNAは、直鎖状のキャップ化RNAを作製したのち、T4 RNAリガーゼ2などを用いて末端どうしを連結して環化することで作製することができる。

[0050] 分岐鎖タイプのキャップ化RNAは、ハイブリダイズタイプのキャップ化RNAと同様に、コードRNAが直鎖状、環状であるかに問わず、5' UTRの任意の位置にキャップ構造を付加できる。コードRNAが2以上の翻訳領域を有する場合、目的とする翻訳領域の上流にある5' UTRに分岐鎖キャップを導入することで、その翻訳領域の翻訳活性を向上させることができる。これにより、例えばタンパク質合成の読み枠として用いられていない開

始コドンから翻訳反応を誘導することができる。また、分岐鎖タイプのキャップ化RNAでは、従来はキャップ構造を有していない環状RNAにおいてもキャップ構造を導入することができる。これにより、キャップ構造を有していない環状RNAと比較して、翻訳活性を大幅に向上させることができる。

[0051] 分岐鎖タイプのキャップ化RNAは、後述する実施例に示すように、直鎖状よりも環状の方が、翻訳活性が高く、免疫原性が低い傾向がある。

上流領域におけるキャップの位置は、開始コドンに近いほど翻訳活性が高くなる傾向がある。上流領域における分岐の位置（すなわち、式（3）におけるRNA1とRNA2の間の構造の位置）は、特に制限はないが、分岐の先にキャップ構造が設けられていることから、分岐の位置は開始コドンに近いほど翻訳活性が高くなる傾向がある。分岐の位置は、開始コドンを基準に5'側の1～50ntの範囲内が好ましく、1～30ntの範囲内がより好ましく、1～15ntの範囲内が特に好ましい。

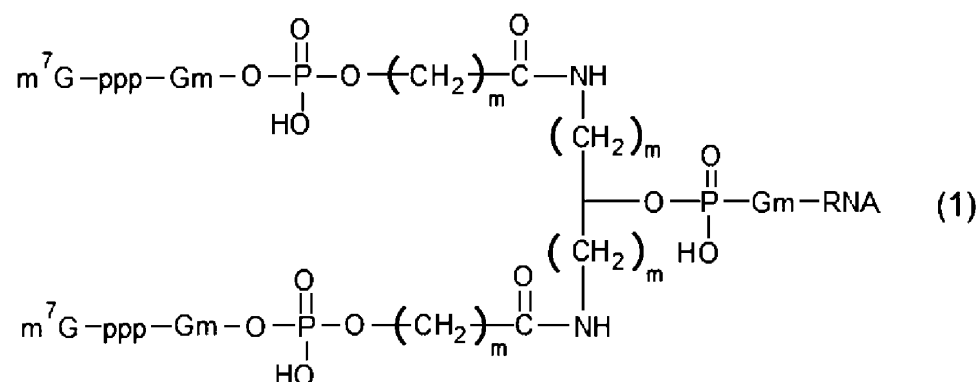
さらに、分岐鎖の分岐した部分の鎖長（すなわち、式（3）におけるNucのポリヌクレオチドの長さ）は、特に制限はないが、長すぎても短すぎても翻訳活性が低くなる傾向がある。ここで、分岐鎖の鎖長は、分岐箇所から5'キャップの間と定義する。分岐鎖の鎖長は、1～20ntの範囲内が好ましく、3～10ntの範囲内がより好ましく、5～8ntの範囲内が特に好ましい。鎖長が短すぎると、キャップ構造の位置と分岐の部分の距離が短くなり、分岐部分の構造によって翻訳開始因子複合体の形成やリボソームの結合などが阻害されやすくなり、通常のRNAと比較して分岐型のRNAでは翻訳活性が低くなると考えられる。

[0052] 3. マルチキャップタイプ

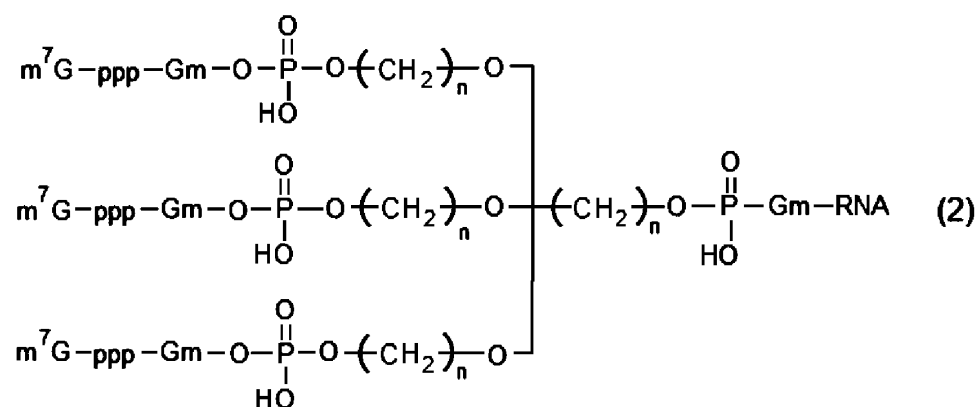
以下、マルチキャップタイプのキャップ化RNAについて説明する。マルチタイプキャップのキャップ化RNAは、直鎖状コードRNAの5'UTRの5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有しており、各枝分かれにキャップ構造が設けられている。

【0053】 マルチキャップタイプのキャップ化RNAの例として、下記式（１）で示される２分岐タイプか、式（２）で示される３分岐タイプの構造を挙げることができる。

[化8]



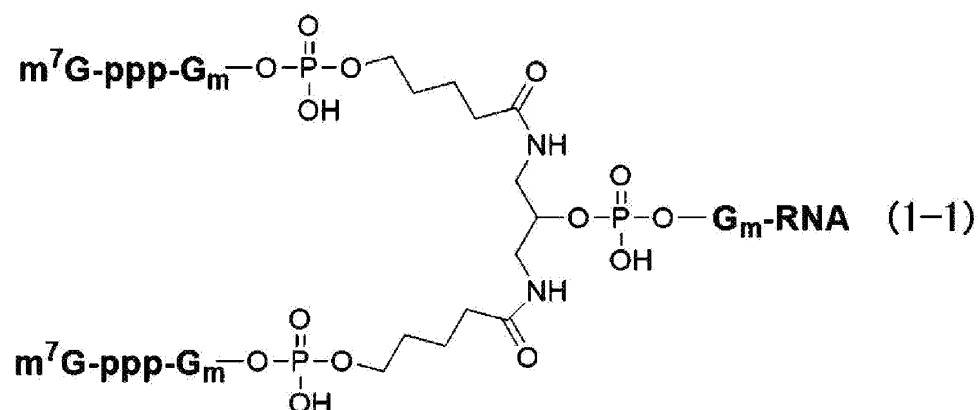
[化9]



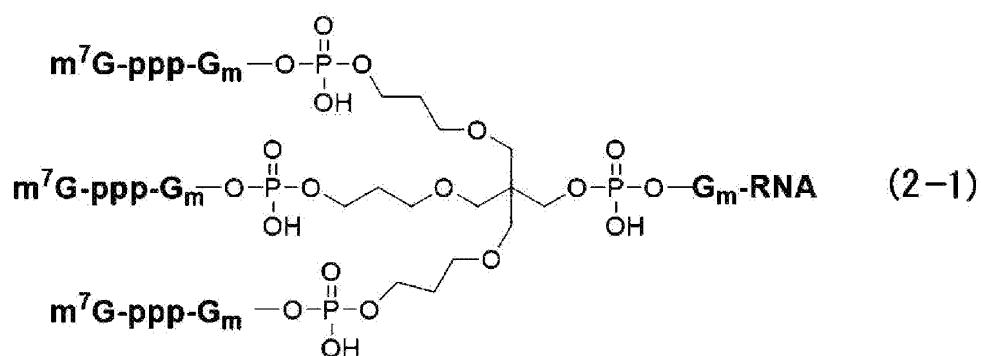
(ここで、 m^7G はキャップを示し、 p はリン酸基を示し、 Gm はグアニンヌクレオチドの2'-水酸基がメチル化された構造を示し、 m は1～5の整数を示し、複数の m は互いに同一であっても異なってもよく、 n は1～5の整数を示し、複数の n は互いに同一であっても異なってもよい。)

[0054] この場合において、上記式（１）が下記式（１－１）で示される構造を有し、上記式（２）が下記式（２－１）で示される構造を有することが好ましい。

[化10]



[化11]



[0055] 次に、マルチキャップタイプのキャップ化RNAの製造方法について説明する。キャップ化前のRNAは、RNA合成に使用される通常のホスホロアミダイト試薬と、分岐鎖を有するホスホロアミダイト試薬と、化学リン酸化試薬と、を使用し、核酸自動合成機を用いて合成することができる。分岐鎖を有するホスホロアミダイトとしては、後述する実施例で使用している1，3-ビス-〔5-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）ペンチルアミド〕プロピル-2-〔（2-シアノエチル）-（N，N-ジイソプロピル）〕-ホスホロアミダイト（2分岐タイプ）、トリス-2，2，2-〔3-（4，4'-ジメトキシトリチルオキシ）プロピルオキシメチル〕エチル-〔（2-シアノエチル）-（N，N-ジイソプロピル）〕-ホスホロアミダイト（3分岐タイプ）などを挙げることができる。また、化学リン酸化試薬と

しては、後述する実施例の化合物 1（式（3））を挙げることができる。

[0056] 分岐鎖を有するホスホロアミダイト試薬を使用して、5'末端にブランチ構造を形成し、通常のホスホロアミダイト試薬や装置を用いて、コードRNAの5'UTRの配列を上流側から合成することで、5'末端に複数の枝分かれを有するコードRNAを合成する。コードRNAの各枝分かれの5'末端は、化学リン酸化試薬により疎水性保護基を導入しておき、この疎水性保護基を光照射などで分解して分岐鎖の5'末端をリン酸基とする。そして、7-メチルグアノシン 5'-ニリン酸イミダゾリド塩（Im-m⁷GDP）、2-ニトロイミダゾールなどのヘテロ芳香族化合物を用いてブランチ構造の各枝分かれの5'末端へキャップを付加する。これにより、それぞれの枝分かれにキャップが結合した直鎖状のキャップ化RNAが得られる。

[0057] マルチキャップタイプのキャップ化RNAは主鎖の5'末端に複数のキャップを有しているため、キャップが1つの通常のキャップ化RNAと比較して、リボソームを構成する翻訳開始因子がキャップと結合しやすくなり、マルチリガンド効果により翻訳活性を大幅に向上させることができる。

[0058] 4. タンパク質の製造装置及び製造方法

本発明のタンパク質の製造装置は、上記のキャップ化RNAと、このキャップ化RNAを鋳型として翻訳領域がコードするタンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、を備える。本発明のタンパク質の製造方法では、キャップ化RNAを真核細胞の発現系に添加してタンパク質を発現させる。真核細胞としては、酵母や糸状菌等の真菌類、植物細胞、昆虫細胞、人などの動物細胞を挙げることができ、具体的には、例えば、マウスL-細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、HeLa細胞、CHO細胞、出芽酵母などを例示することができる。真核細胞の発現系は、細胞発現系、無細胞発現系のいずれであってもよい。細胞発現系へのキャップ化RNAの導入は、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などの方法で行うことができる。細胞発現系では、細胞へのキャップ化RNAの導入後、適切な温度などの条件で細胞を培養し、培養後に細胞を溶解

させたのち、目的とするタンパク質を分離精製する。無細胞発現系では、真核細胞の溶解物を使用することができる。

[0059] 5. 目的RNAの検出装置及び検出方法

上述したように、環状RNAはキャップ構造を有していないため、単独では翻訳されないが、キャップ構造を有するRNAをハイブリダイズさせることで、環状RNAにコードされたタンパク質を翻訳させることができる。この性質を利用して、環状RNAを検出用プローブとして、目的RNAを検出することができる。目的RNAとしては、真核生物やウイルスなどを由来とするRNAを挙げることができる。以下、本発明の目的RNAの検出装置及び検出方法について説明する。

[0060] 本発明の目的RNAの検出装置は、RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAを検出する装置である。本検出装置は、環状RNAからなる検出用プローブ、キャップ化RNAを生成させる手段、真核細胞の発現系、標識タンパク質を検出する手段を備える。

[0061] 検出用プローブは、開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、この開始コドンの上流側の領域と、を有している。この上流領域は、検出対象となる目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有している。標識タンパク質としては、後述する実施例で使用しているルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質（GFP）などの蛍光標識タンパク質、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリフォスファターゼ（AP）などの酵素標識タンパク質などを挙げることができる。

[0062] キャップ化RNAを生成させる手段は、上記の検出用プローブ（環状RNA）と目的RNAとをハイブリダイズさせる手段である。これには、RNAをアニーリングさせる通常の試薬や装置を使用することができる。このような試薬としては、Trie-HClなどの緩衝液を挙げることができる。また、装置としては、試薬を80℃以上に加熱したのちに室温まで冷却するヒートブロック又はサーマルサイクラーなどの装置を挙げることができる。

真核細胞の発現系は、上記で生成したキャップ化RNAを鋳型として翻訳

領域がコードする前記標識タンパク質を発現可能な系であり、上述したH e L a細胞などを挙げることができる。

[0063] 標識タンパク質を検出する手段としては、標識タンパク質の種類によって種々の装置を使用することができる。このような手段としては、標識タンパク質が蛍光標識タンパク質の場合は蛍光測定装置を挙げることができ、酵素標識タンパク質の場合は発光基質や蛍光測定装置などを挙げることもできる。

[0064] 本発明の目的RNAの検出方法は、上記の検出装置を使用して実施することができる。まず、上記の環状RNAを含む検出用プローブを用意し、目的RNAを含む試料に添加してキャップ化RNAを生成させる。次に、標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系にキャップ化RNAを添加して標識タンパク質を発現させ、その後、発現した標識タンパク質を検出する。このような方法により、目的RNAを効率的に検出することができる。

実施例

[0065] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、これらは本発明の目的を限定するものではない。また、以下の実施例において「%」表示は特に規定しない限り質量基準（質量パーセント）である。

[0066] 1. キャップ化RNA（ハイブリダイズタイプ）

以下では、ハイブリダイゼーションタイプのキャップ化RNAに関する実験を示す。図3は、本実験で使用した環状RNAとキャップ化プローブの塩基配列などを示す図である。図の上部左側の図がキャップ化RNAの構造を示している。環状RNA（コードRNA）として、5'側の5'上流領域（図では非翻訳領域（「5' UTR」と表記））、その下流側にK o z a k配列（「K o z a k」と表記）を有しており、N a n o L u cルシフェラーゼをコードする領域（「N a n o L u c」と表記）と、停止コドン（「s t o p」と表記）、3'側の非翻訳領域（「3' UTR」と表記）、p o l y A配列（「p o l y A₃₀」）を有している。また、図のキャップ化プローブは、5'末端にキャップ構造（m⁷G）を有し、環状RNAの5' UTRの一部の領域と相補的な配列

を有し、3'末端のpolyA30を有している。そして、キャップ化RNAは、キャップ化プローブが環状RNAの5'UTRにハイブリダイズしている。

[0067] 図の上部右側は本実施例で使用したキャップ化プローブの配列を示している。キャップ化プローブは、5'末端にキャップ構造を有する「5' cap probe」、3'末端にキャップ構造を有する「3' cap probe」、5'末端にキャップ構造を有し3'末端にポリAを有する「5' cap probe with polyA」の3種類を使用した。図の下部は環状RNAの配列を示している。「ggcg・・・cgc」で表される太字の領域が、キャップ化プローブがハイブリダイゼーションする部分である。

[0068] (1) プローブRNA合成

RNA合成は0.2 μ molスケールで行い、日本テクノサービス株式会社 NTS M-2-MX DNA/RNA合成機又はNRs-4A1OR7 DNA/RNA合成機を使用した。RNA固相合成に用いたホスホロアミダイトには、rA (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Adenosine (n-acetyl) OP), rC (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Cytidine (n-acetyl) OP), rG (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Guanosine (n-acetyl) OP), U (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Uridine OP) (ChemGenes) を使用した。リン酸化試薬には、5' phosphate-ON Reagent (ChemGenes) を使用した。2'-OMe RNAアミダイトには、2'-OMe-C-CE-phosphoramidite、2'-OMe-G(iBu)-CE-phosphoramidite (ChemGenes) を使用した。LNAアミダイトには、MBN-Ganosine (N, N-DMF)-phosphoramidite (ChemGenes)、MBN-5'-Methyl-Cytidine (N-bz)-phosphoramidite (Ch

emGenes)を使用した。C4リンカーアミダイトは、既報 (Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 8922-8926) に従って合成したものを用了。CPGは3'-TOM-ribo Cytidine (n-acetyl) 2'-lcaa CPG 1000 Å, 3'-TOM-ribo Adenosine (n-acetyl) 2'-lcaa CPG 1000 Å (ChemGenes)、3'-phosphate ON lcaa CPG 1000 Åを使用した。

[0069] RNAの合成後、CPGを1.5 mLループ付きスクリーチューブ (ザルスタット) へ移し、40% aq. methylamine / 28% aq. ammonia (1:1) 1.0 mLを加えて65℃で20分インキュベートした。Millex LH 0.45 μmフィルターを用いてろ過し、滅菌水 (500 μL) で洗い込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1M TBAF in THF 1.0 mLを加えて溶解させ、室温に一晩静置した。1M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 1.0 mLを加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。NAP-25カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩を行った。逆相HPLCによりRNAを精製した。

[0070] HPLC (HITACHI) 条件; カラム: hydrosphere C18 column (4.6 x 250 mm; YMC)、移動相: A) 50 mM TEAA緩衝液 (pH 7.0), 5% アセトニトリル、B) アセトニトリル、グラジエント: 0-20 min B conc. 0% to 20%、流速: 1.0 mL/min

[0071] 15%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) (アクリルアミド: ビスアクリルアミド = 19:1 (wt/wt), 7.5 M尿素) にて合成したRNAを分析した。PAGEには、TBE 緩衝液 (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3) を用了。LC/MSに分析した。LC/MS (agilent) 条件; ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 0.3 mL/min, A; 8.6

mM TEA/100mM HFIP solution, B; MeOH, 0-30%/20min

[0072] 合成したRNAの配列や分子量などの情報を下記表に示す（RNA1～12はそれぞれ配列番号1～12に対応）。

[表1]

配列名	配列	分子量	測定値
RNA1	pGCGUCACCUAAUAUGCGCC	6382.8	6383.7
RNA2	pG-C4-GCGUCACCUAAUAUGCGCC	6880.1	6881.0
RNA3	pC4-GCGUCACCUAAUAUGCGCC	6534.9	6535.8
RNA4	GCGUCACCUAAUAUGCGCC-C4-p	6534.9	6535.2
RNA5	pCGCGUGGAACUACUCCUA	6382.8	6383.7
RNA6	pGCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16259.1	16261.4
RNA7	pG-C4-GCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16756.4	16759.7
RNA8	pC4-GCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16411.2	16414.3
RNA9	p-m ₂ -CGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16287.1	16289.5
RNA10	pC4-mGmCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16439.2	16441.5
RNA11	pGCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16373.2	16375.2
RNA12	pC4-GCGUCACCUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16525.3	16528.3

C4; C4リンカー、m₂; 2'OMe、下線; LNA

[0073] (2) リン酸化RNAのキャップ化反応

1. 5mLチューブに、それぞれ終濃度20μM RNA, 10mM CaCl₂となるように混合し、凍結乾燥により乾固させた後、DMSOに溶解した。そこへDMSOに溶解した1m (m⁷GDP) · Na (Hongene Biotech) を終濃度10mM、2-ニトロイミダゾールを終濃度10mM となるように加えた。その反応液を55℃で3時間インキュベートした。反応液を滅菌水により2倍希釈した後に、イソプロパノール沈殿を行った。HPLC精製し、LC/MSに分析した。

[0074] HPLC条件; カラム: hydrosphere C18 column (4.6×250mm; YMC)、移動相: A) 50mM TEAA 緩衝液 (pH7.0), 5%アセトニトリル、B) アセトニトリル、グラジエント: 0-20min B conc. 0% to 20%、流速: 1.0 mL/min

LC/MS (agilent) 条件; ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 0.3mL/min, A; 8.6mM

TEA／100mM HFIP solution, B; MeOH, 0
－30％／20min

HPLC精製したキャップ化RNAは、イソプロパノールと酢酸ナトリウム
(pH5.2)を用いて沈殿させた。

[0075] 合成したキャップ化RNAの配列や分子量などの情報を下記表に示す（キ
ャップ化RNA1～12はそれぞれ配列番号13～24に対応）。

[表2]

配列名	配列	分子量	測定値
キャップ化RNA1	m7GpppGCGUACCUUAAUAUGCGCC	6823.0	6822.9
キャップ化RNA2	m7GpppG-C4-GCGUACCUUAAUAUGCGCC	7320.3	7320.2
キャップ化RNA3	m7Gppp-C4-GCGUACCUUAAUAUGCGCC	6975.1	6974.9
キャップ化RNA4	GCGUACCUUAAUAUGCGCC-C4-pppm7G	6975.1	6975.0
キャップ化RNA5	m7GpppCGCCGUGGAACUAUCUCCUA	6823.0	6822.9
キャップ化RNA6	m7GpppGCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16699.3	16701.0
キャップ化RNA7	m7GpppG-C4-GCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	17196.6	17198.7
キャップ化RNA8	m7Gppp-C4-GCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16851.4	16853.1
キャップ化RNA9	m7Gppp-m ₇ GCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16727.4	16728.7
キャップ化RNA10	m7Gppp-C4-mGmGUGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16879.4	16881.3
キャップ化RNA11	m7GpppGCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16813.5	16814.9
キャップ化RNA12	m7Gppp-C4-GCGUACCUUAAUAUGCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	16965.5	16966.8

C4; C4リンカー、m₇; 2'OMe、下線; LNA

[0076] 図5はキャップ化プローブの合成実験の結果を示す図である。図の（A）
は、キャップ化プローブの合成スキームを示している。化学合成したモノリ
ン酸化RNAを塩化カルシウムと共に凍結乾燥した。1m（m⁷GDP）・N
a（化学的キャップ化試薬）と2-ニトロイミダゾールを添加して、DMS
O溶液中で反応させた。図の（B）は、キャップ化プローブの結果を示して
おり、キャップ化反応したRNAをPAGEにより解析して、SYBR G
reen IIにより染色した。キャップ化反応が進行すると、メチルグア
ニンが付加するため、一塩基分バンドが上にシフトした。PAGE解析の結
果、8～9割程度の効率でキャップ化反応が進行したことがわかる。

[0077] （3）転写反応による直鎖状RNAの合成

直鎖状RNAは、二本鎖DNAを鋳型としてT7 RNA polymeraseにより転写合成した。図4の上段はRNAの転写合成のための鋳型
DNAの配列（配列番号32）を、下段は転写されたRNAの配列（配列番

号31)を示している。鋳型の二本鎖DNAは、pNL-TK1.1 (Promega)をPrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio)を用いてPCR反応により増幅することで得た(2.5 ng/μL DNA vector, 1× PrimeSTAR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μM primers, 0.025 units/μL polymerase)。

[0078] 転写反応液(鋳型DNA 2.5 ng/μL, 1×T7 RNA Polymerase buffer (Takara) (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM スペルミジン), 2.5 U/μL T7 RNA polymerase (Takara), 5 mM DTT, 2 mM ATP, 2 mM UTP, 2 mM CTP, 0.4 mM GTP, 2 mM GMP)を調製し、37℃で2時間インキュベートした。反応液にRecombinant DNase (Takara)を0.1 U/μLとなるように加え、37℃で30分間インキュベートすることで鋳型DNAを分解した。

反応後、フェノール・クロロホルム抽出を行った。続いて、Amicon Ultra 10K (Millipore)を用いて限外ろ過を行い、アルコール沈殿を行った。

[0079] 図6は、直鎖状RNAの合成実験の結果を示す図である。図のA)は、直鎖状RNAの鋳型となる二本鎖DNAのPCR反応による合成の結果を示しており、PCR反応後、アガロースゲルにて分析し、Gel Redで染色したゲルの写真である。図のB)は、直鎖状RNAの転写合成の結果を示しており、転写反応後、PAGE分析し、SYBR Greenで染色したゲルの写真である。

[0080] (4) T4 RNA Ligase 2を用いた環化反応

転写合成した直鎖状RNAをT4 RNA Ligase 2 (New England Biolabs)と20-nt DNA (ガイドDNA)を用いて環化した。0.5 μM直鎖状RNAと1.0 μMガイドDNAをT

4 RNA ligase 2 buffer (50mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM MgCl₂, 1mM DTT and 0.4mM ATP) 中でアニーリングした後、0.1U/μL T4 RNA ligase 2と10% PEG8000を加えて37℃で1時間インキュベートした。連結生成物の環状RNAと原料の直鎖状RNAは、5%変性PAGEにより単離した。

[0081] (5) RNase Rを用いた環化の確認

RNA (0.18μg/μL) をRNase R (1unit/μL; Epicenter) と20mM Tris-HCl (pH8.0) 0.1M KCl、0.1mM MgCl₂ 中で37℃、10分インキュベートした。反応液を5%変性PAGEで解析した。

[0082] 図7は、直鎖状RNAの環化実験の結果を示す図である。図のA)は、環状RNAの合成スキームを示している。転写合成した直鎖状RNAをガイドDNAとアニーリングさせて、T4 RNA ligase 2を用いて、環状RNAを合成した。図のB)は、環化体の確認結果を示しており、環化反応したRNAにRNase Rを加えてインキュベートした。PAGEにより解析して、SYBR Green IIにより染色した。転写合成した直鎖状RNAをT4 RNA ligase 2を用いて環化した。環化体の同定は、直鎖状RNAを選択的に分解する酵素 (RNase R) を作用させて、PAGE分析することで行った。環化の効率は、6割程度であった。環化体及び原料の直鎖状RNAをゲルから切り出し、単離精製した。

[0083] (6) アニーリング

0.2μMキャップ化プローブと0.1μM直鎖状又は0.1μM環状RNAを緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl) 中でアニーリングした (90℃、3分)。

[0084] (7) 細胞内における翻訳活性の評価

HeLa細胞 (RIKEN Cell Bank) は10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) を添加し

たDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; WAKO) 中で培養した(37℃、5%CO₂)。トランスフェクション前日に、96wellプレートにHeLa細胞を播種した(1.0×10⁴ cell/well)。翌日培地を除去し、100 μL/well Opti-MEM (登録商標) (Thermo Fisher Scientific) に置換した。0.15 μL Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (登録商標)、20 ng mRNAを10 μL Opti-MEM (登録商標) に希釈して細胞へ導入した。37℃、5時間インキュベートした後、20 μL/well 1×Cell Lysis Buffer (Promega) を加えて細胞を溶解した。Nano-Glo (登録商標) luciferase assay (登録商標) (Promega) を用いて発光測定した。

[0085] 図8は、翻訳活性を相対評価した結果を示す図である。図のA)は、直鎖状RNAの翻訳活性の結果を、図のB)は、環状RNAの翻訳活性の結果を示している。キャップ化RNAプローブとして「キャップ化RNA8」を、キャップ化していないRNAプローブとして「RNA8」を使用している。RNAプローブをハイブリダイゼーションしなかったサンプルの翻訳活性を「1」として相対評価している。いずれのRNAでも、キャップ化RNAをアニリングさせて、HeLa細胞へトランスフェクションした。5時間後に細胞を溶解し、ナノルシフェラーゼの発光を測定した。これらの結果から、直鎖状RNA、環状RNAともにキャップ化RNAをハイブリダイゼーションさせると、RNA単体の場合と比較して、およそ40倍の翻訳活性促進効果が見られた。キャップ構造を付加していないリン酸化RNAをハイブリダイゼーションしたmRNAは、翻訳活性促進効果がみられなかった。このことから、キャップ依存的に翻訳開始段階が促進されていることが示された。

[0086] 図9は、各種のプローブを使用した場合における翻訳活性の評価結果を示す図である。図のA)は、直鎖状RNAの翻訳活性の結果を、図のB)は、環状RNAの翻訳活性の結果を示している。いずれのRNAでも、キャップ

化RNAをアニーリングさせて、HeLa細胞へトランスフェクションした。5時間後に細胞を溶解し、ナノルシフェラーゼの発光を測定した。これらの結果から、直鎖状RNA、環状RNAともに、キャップ化RNAをハイブリダイゼーションさせると、翻訳活性が促進された（キャップ化RNA 1-4, 6-12）。mRNAに相補的でない配列のキャップ化RNAでは、翻訳促進効果が見られなかった（キャップ化RNA 5）ことから、キャップ化RNAがmRNAにハイブリダイゼーションして翻訳促進していることが示された。また、キャップ構造にC4 リンカー及びポリA配列を導入すると促進効果が増大した（キャップ化RNA 8-10）。

[0087] 図10は、ポリA配列の有無による翻訳活性の評価結果を示す図である。図中の上段（Linear）は直鎖状RNAを、下段（Circular）は環状RNAを用いた結果を示している。「cap probe」はキャップ化プローブをアニーリングさせた結果を、「p probe」はキャップ化していないリン酸末端のプローブをアニーリングした結果を示している。これらのグラフから、直鎖状RNAと環状RNAのいずれの場合においても、キャップ化プローブをアニーリングすることにより、キャップ化していない場合と比較して、翻訳活性が向上したことがわかる。また、ポリAを付加した場合はポリAを付加していない場合と比較して、翻訳活性が若干向上することもある。

[0088] キャップ化プローブの濃度を2種類（0.2 μ M、1 μ M）にした以外は上記「（6）細胞内における翻訳活性の評価」と同様にして細胞内における翻訳活性の評価を行った。その結果を図11に示す。図11は、プローブRNAの比率を変えて翻訳活性を評価した結果を示す図である。この図から、mRNA : p r o b e = 1 : 2 よりも 1 : 10の方が、翻訳活性が高いことがわかる。

[0089] 2. キャップ含有環状RNA（分岐鎖タイプ）

（1）RNAの化学合成・精製・化学キャップ化

図12は、キャップ化分岐鎖含有RNAオリゴヌクレオチドの合成スキーマ

ムを示す概略図である。以下、この合成スキームに基づいて、キャップ化分岐鎖含有RNAオリゴヌクレオチドを合成した。

[0090] (a) RNA化学合成

主鎖が54塩基長からなり、5'末端がリン酸化された分岐鎖を含むオリゴリボヌクレオチドは、化合物1（上記式（3）：特願2021-111420参照）、及び市販のホスホロアミダイト試薬〔RNA合成用アミダイトはChemGenes社製品（ANP-3201, ANP-3202, ANP-3203, ANP-3205）、分岐鎖導入にはGlen Research社から購入したAsymmetric Doubler (Lev) Phosphoramidite (10-1981)〕及び固相担体（3'-TOM-ribo Uridine CPG 1000A, ChemGenes）を用い、常法に従い核酸自動合成機（NR-2A 7MX, 日本テクノサービス）を用いて合成した。分岐鎖を含まない環状RNAを合成するためには、主鎖のみからなる54塩基長のRNA配列を合成し、その5'末端を化合物1によりリン酸化した。

[0091] RNAの合成終了後、固相担体に40%メチルアミン水溶液と濃アンモニア水の等量混合液1mLを加えて65℃で20分間加熱した。上清をMillex LHフィルター（0.45μm, メルク）でろ過したのち、遠心エバポレーターで減圧下乾固した。さらに残渣に1Mテトラブチルアンモニウムフルオリド/THF溶液を加え、室温で終夜インキュベートした。NAP-25ゲルろ過カラム（メルク）を用いて脱塩したのち、溶出液に含まれるRNAをアルコール沈殿法により回収した。これを超純水に再溶解し、逆相HPLCにて目的物を単離精製した〔システム, Hitachi Chromaster（ポンプ5110他, 日立ハイテクサイエンス）；カラム, YMC Triart Bio C4（250mm×10mm I.D., ワイエムシィ）；Solvent A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム（pH7.0）, 5% アセトニトリル；Solvent B, アセトニトリル；直線勾配 0-20% Solvent B（0-20分）；流速

：3 mL／分；検出波長，260 nm；カラム温度，50℃]。

[0092] 得られた目的物のリン酸基上の保護基を、365-nm光を照射することで除去した。光照射にはMAX-305光源装置（朝日分光）を使用した。RNA溶液（74 μM RNA，1 mM Tris-HCl（pH 7.5），0.1 mM EDTA）を1ウェル当たり50 μLずつ透明96穴マルチウェルプレートのウェルに加え、4 mW/cm²の光量で365 nm光を10分間照射した。照射後、RNAを回収しアルコール沈殿により単離精製した。リン酸基脱保護前後のRNAいずれについても、LC/MSシステム（Agilent）にて解析し、目的物が得られたことを確認した〔リン酸基保護体の分子量理論値20,110.4、観測値20,114.1（+3.7）：リン酸基脱保護体の分子量理論値19,919.2、観測値19,921.7（+2.5）〕。

[0093] (b) 分岐鎖5'末端へのキャップ付加反応

分岐鎖5'末端のリン酸基に対し、7-メチルグアノシン 5'-ニリン酸イミダゾリドナトリウム塩（1 mM⁷GDP）を反応させ、キャップ化体を得た（特願2021-111420参照）。分岐鎖の5'末端にリン酸基を含む原料RNA 2 nmol（26 μL）に5 μLの200 mM塩化カルシウム水溶液を加え、液体窒素で凍結後、凍結乾燥した。3時間後、乾固したRNAと塩化カルシウムの混合物に45 μLのジメチルスルホキシド（DMSO）を加えて溶解し、ここに50 μLの1 mM⁷GDP/DMSO溶液、及び5 μLの200 mM 2-ニトロイミダゾール/DMSO溶液を添加し、55℃で3時間加温した。122 μLの0.541 M酢酸ナトリウム（pH 5.2）水溶液を添加し、一部を分取し、キャップ化反応の効率を評価した。原料及び反応後のRNA，各5 pmolずつを変性剤として7.5 M尿素を含む10%変性PAGEにより分析し、キャップ化体のバンドシフトを確認した。

[0094] 図13は、分岐鎖の化学キャップ化反応を示す図である。図の(a)は反応の模式図を示している（配列番号33）。図の(b)は、反応前、反応後

のRNAの10%変性PAGEでの分析結果を示している（変性剤として7.5 M尿素含有）。キャップ化反応前の原料RNA及び、反応液から同モル量のRNA（5 pmol）を分析した。泳動後のゲルを核酸染色試薬 SYBR Green IIで染色し、バンドを可視化した。キャップ化反応の生成物は原料より高い泳動位置に観察され、バンド強度比から算出された反応収率は78%であった。

[0095] 酢酸ナトリウム水溶液を添加した後の溶液に、220 μ Lの2-プロパノールを添加、-30℃で終夜冷却し、遠心分離（20,000 g, 25分間）してペレットを得た。これを超純水に再溶解し、目的物を逆相HPLCで単離精製した〔システム, Hitachi LaChrom Elite（ポンプLE-2130他, 日立ハイテクサイエンス）；カラム, YMC Hydrosphere C18（250mm $\times$ 4.6mm I.D.、ワイエムシィ）；Solvent A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム（pH7.0）、5% アセトニトリル；Solvent B, アセトニトリル；直線勾配0-20% Solvent B（0-20分）；流速：1 mL/分；検出波長, 260 nm；カラム温度, 50℃〕。

[0096] 溶出液から目的物をアルコール沈殿にて回収し、1.185 nmolのキャップ化RNAを得た（単離収率59%）。キャップ付加後のRNAは、LC/MSシステム（Agilent）にて解析し、目的物が得られたことを確認した〔分子量の理論値20,360.4、観測値20,361.2（+0.8）〕。

[0097] (c) T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いた主鎖5'末リン酸化

分岐鎖のリン酸基にキャップ構造を付加したもの、していないものの2種類のRNAに関し、同様の条件で主鎖の5'末端を酵素的にリン酸化した。リン酸化反応の組成を次に示す。8 μ M RNA, 1 mM ATP, 50 mM Tris-HCl（pH8.0）、10 mM 塩化マグネシウム, 5 mM ジチオスレイトール, 0.2 U/ μ L T4ポリヌクレオチドキナーゼ（タカラバイオ）。

[0098] 本反応液 50 μ L を 37℃ で 1 時間 インキュベートした後、TE 飽和フェノール：クロロホルム等量混合液を用いて除タンパクし、アルコール沈殿して RNA を回収した。リン酸化後の RNA は、LC/MS システム (Agilent) にて解析し、目的物が得られたことを確認した [未キャップ化 RNA の分子量理論値 19,993.3、観測値 20,002.3 (+9.0) : キャップ化 RNA の分子量理論値 20,434.4、観測値 20,441.4 (+7.0)]。

[0099] (2) 転写 RNA の合成

NanoLuc ルシフェラーゼのコード配列を含む市販のプラスミド DNA, pNL1.1.TK (プロメガ) を鋳型、2 本の合成オリゴ DNA (5' -CCCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTCTTCACACTCGAAGATTTTC-3' (配列番号 25) / 5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGAA TTACGCCAGAATGCG-3' (配列番号 26)) をプライマーとして得た PCR 反応産物を転写鋳型として調製した。PCR 液組成は以下のとおりであった。1 ng/ μ L pNL1.1.TK, 0.3 μ M primers, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 1×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo, 0.02 U/ μ L KOD-Plus-Neo (東洋紡)。T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad) を用い、反応液を次に示す熱サイクル条件に付した。94℃, 2 分 → [98℃, 10 秒 → 55℃, 30 秒 → 72℃, 70 秒] × 25 サイクル。

[0100] 反応液 (50 μ L × 8 本) をまとめ、ここに 0.4 mL の TE 飽和フェノール：クロロホルム等量混合液を添加し激しく混和・遠心分離 (20,000 × g, 1 分) し、水層を分離した。さらに 0.4 mL のクロロホルムを添加し、激しく混和・遠心分離 (20,000 × g, 1 分) し、水層を分離した。ここに 40 μ L の 3M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 5.2), 440 μ L の 2-プロパノールを加え、-30℃ で終夜冷却した後、遠心分離 (2

0,000×g, 20分)し、目的物のDNAをペレットとして得た。ペレットを超純水200μLに再溶解し、NanoDrop2000スペクトロメーターを用いて260nmにおける溶液の吸光度 (A_{260})を測定し、溶液のDNA濃度を算出した (A_{260} 5.632; DNA濃度281.6ng/μL)。

[0101] 上記で得られたDNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用いて5'末端がリン酸化された550塩基長のRNA転写物を調製した。反応液の組成は次のとおりであった。15ng/μL 鋳型DNA, 2mM ATP, 2mM UTP, 2mM CTP, 0.5mM GTP, 2mM GMP, 40mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 2mM スペルミジン, 5mM DTT, 0.001U/μL Pyrophosphatase (New England Biolabs, M2403), 2.34ng/μL T7 RNAポリメラーゼ。1mLの反応液を37℃で2時間インキュベートしたのち、10μLのDNase I (5U/μL、タカラバイオ)を添加しさらに37℃で20分間インキュベートした。

[0102] 反応液を等量の飽和フェノール：クロロホルム等量混合液、クロロホルムで抽出し除タンパクしたのち、水層に100μLの3M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.2), 1.1mLの2-プロパノールを加え、遠心分離しRNA粗精製物を沈殿として得た。得られたRNA粗精製物に含まれるヌクレオチド等を除去するため、さらにRNAを逆相HPLCで単離精製 [システム, Hitachi LaChrom Elite (ポンプL-2130他, 日立ハイテクサイエンス); カラム, YMC Hydrosphere C18 (250mm×4.6mm I.D., ワイエムシィ); Solvent A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0), 5% アセトニトリル; Solvent B, アセトニトリル; 直線勾配5-15% Solvent B (0-20分); 流速: 1mL/分; 検出波長, 260nm; カラム温度, 50℃] し、最終的に420μgのRNA転写物

を得た。

[0103] (3) 環状RNA合成(リガーゼ連結、単離)

主鎖部分が54塩基からなる化学合成RNA断片と550塩基長の転写合成RNAを2種類の鋳型DNA存在下アニールさせ、酵素T4 RNAリガーゼ2を用いて連結・環化した。それぞれ30塩基からなる2種類の鋳型DNAの配列は次のとおりであった。

Splint__1, 5' -ACCTTAATATGCGCCTTTTT
TTTTTTTTTTT-3' (配列番号27); Splint__2, 5'
' -TCGAGTGTGAAGACCATGGTGGCTTTACCC-3'
' (配列番号28)。

[0104] 酵素反応液組成は次に示すとおりであった。

1 μ M 化学合成RNA, 0.5 μ M転写合成RNA, 2 μ M Splint DNA__1, 2 μ M Splint DNA__2, 20 (w/v) % PEG6000, 0.05 μ g/ μ L T4 RNAリガーゼ2。

[0105] ストック溶液用度がそれぞれ60 (w/v) %のPEG6000と1 μ g/ μ LのT4 RNAリガーゼ2を添加する前に、混合物を90℃で3分間加熱し、約20分かけて室温まで徐冷した。その後、上に示す終濃度になるようにPEG6000及びリガーゼを添加し、混合物を37℃で1時間インキュベートした。320 μ Lの反応液に対し、0.4 mLのTE飽和フェノール：クロロホルム等量混合液を添加し激しく混和・遠心分離(20,000 $\times$ g, 1分)し、水層を分離した。さらに0.4 mLのクロロホルムを添加し、激しく混和・遠心分離(20,000 $\times$ g, 1分)し、水層を分離した。ここに40 μ Lの3M 酢酸ナトリウム水溶液(pH5.2), 440 μ Lの2-プロパノールを加え、-30℃で終夜冷却した後、遠心分離(20,000 $\times$ g, 20分)した。

[0106] 得られたペレットを超純水10 μ Lに溶解し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE) [変性剤として7.5M尿素、25 (v/v) %ホルムアミドを含む6%ポリアクリルアミド(アクリルアミド/N, N'-メ

チレンビスアクリルアミド, 19/1) を TBE 緩衝液 (89 mM Tris-ホウ酸, 2 mM EDTA) を用いて作成] にて分離し、目的とする環状 RNA を含むゲル部分を切り出し、破碎した後超純水を加えて抽出した。ゲル抽出液に含まれる RNA をアルコール沈殿法により回収し、超純水に再溶解した。260 nm における吸光度に基づいて RNA 濃度を算出した。用いた転写 RNA の量に基づいて算出した環状 RNA の単離収率は 5-6% であった。精製後の環状 RNA の純度は変性 PAGE 分析により確認した。

[0107] 図 14 は、環状 RNA の合成反応を示す図である。図の A) は反応の模式図を示している。丸で囲んだ P は、RNA 鎖 5' 末端のリン酸基を表す。図の b) は、リガーゼ連結反応産物の 6% 変性 PAGE での分析結果を示している (変性剤として 7.5 M 尿素, 25 (v/v) % ホルムアミド含有)。泳動後のゲルを核酸染色試薬 SYBR Green II で染色し、バンドを可視化した。

[0108] (4) HeLa 細胞での翻訳反応

前日に 96 穴マルチウエルプレートに 1×10^4 個ずつ HeLa 細胞 (理研セルバンク) を播種し、ここに 1 ウェルあたり 10 ng の RNA をトランスフェクション試薬 (Lipofectamine MessengerMAX, Thermo) の推奨条件に基づき HeLa 細胞に導入した。トランスフェクション後 3 時間後に上清を 10 (w/w) % ウシ胎児血清 (HyClone) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wako) 培地に交換し、さらに細胞を 37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養後、溶解した。溶解液中に含まれる NanoLuc ルシフェラーゼ量を Nano-Glo (登録商標) Luciferase Assay System (プロメガ)、Mithras LB 940 プレートリーダー (Berthold) を用いて測定した。

[0109] 図 15 は、キャップ化分岐鎖含有環状 mRNA のヒト由来培養細胞 (HeLa) における翻訳活性評価を示す図である。環状 RNA を用いた翻訳反応の結果を示す図である。図の (a) は、合成した 3 種類の環状 mRNA (6

04塩基長)の構造を示す模式図である。

図の(b)は、NanoLucルシフェラーゼをコードする3種類のRNA(分岐なし、分岐ありキャップ構造なし、分岐ありキャップ構造あり)のHeLa細胞における翻訳活性を比較した結果を示すグラフである。前日に96穴マルチウェルプレートに 1×10^4 個ずつHeLa細胞を播種し、ここに1ウェルあたり10ngのRNAをトランスフェクション試薬(Lipofectamine MessengerMAX, 0.15 μ L per well)を用いて導入した。細胞を24時間培養後、溶解し、溶解液中に含まれるNanoLucルシフェラーゼ量をNano-Glo(登録商標) Luciferase Assay System(プロメガ)を用いて評価した。

図の(c)は、翻訳活性測定に用いた環状RNAの変性ポリアクリルアミド電気泳動分析結果を示す写真である。50ngのRNAを、ホルムアミドを含むローディング液中で加熱し変性後、変性剤として7.5 M尿素を含む5%ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した。泳動後のゲルを核酸染色試薬SYBR Green IIにて染色し、RNAのバンドを可視化した。

[0110] これらの図から、キャップ含有環状RNA(Branch(+))Cap(+)では、分岐鎖もキャップも備えていない環状RNA(Branch(-))と比べて、翻訳活性が2000倍以上と非常に高くなることがわかる。

[0111] 3. マルチキャップRNA

(1) マルチキャップRNAの合成

市販のRNAアミダイト(TOM保護)試薬及びTreble Phosphoramidite, Symmetric Doubler Phosphoramidite, Spacer Phosphoroamidite 9(いずれもGlen Research社製)を用いてRNA鎖及び非ヌクレオチド鎖導入部位を、核酸自動合成機を用いて合成した。この

際、5'末端を化学リン酸化試薬Nb-CPR（化合物1：式（3））を用いて合成機上でリン酸化した。脱保護・精製後のRNAに対し、化学キャップ化試薬（Im-m⁷GDP）を反応させることで、mRNAのキャップ構造を導入した。

- [0112] 図16は、合成したブランチ構造を含む107塩基長のRNAの構造を示す図である。配列は次に示すとおりである。5'末端の「p」はリン酸化されていることを示し、「G_m」はGヌクレオチドの2'-水酸基がメチル化されていることを表す。「X」は3種類の非ヌクレオチドリンカー構造を示した。それぞれの異なる5'末端近傍部位の構造を図中に示した。

5' __p__G_m__X__G_m__AGCCACCAUGGACUACAAGGAC
CGACGACGAUAAGAUAUCGACUAUAAAGACGAC
GACGAUAAACACCACCACCACCACUGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAA__3'

- [0113] （2）翻訳活性の評価

図17は、合成したブランチ構造／複数のキャップ構造を含む107塩基長のHeLa細胞における翻訳活性の評価結果を示す図である。前日に1×10⁵個ずつ12穴プレートに播種したHeLa細胞にリポフェクション法（Lipofectamine MessengerMAX試薬）によりRNA導入し、6時間培養後に溶解し、溶解液中に含まれる発現ペプチド量をELISA法（固定化抗体として抗Hisタグ抗体、検出抗体として抗FLAG抗体HRP複合体を使用し、固定化された抗FLAG抗体HRP複合体）にて定量した。この結果、3つのキャップ構造を含むRNAで、未修飾のコントロール配列に比較し、約1.4倍の翻訳活性向上が確認された。

- [0114] 4. バイシストロニックmRNA（直鎖タイプ：Fluc-Nluc系）

（1）HiFi DNAアッセムブリーによるFluc-NlucプラスミドDNAの作成

下記に示すプラスミドDNAとプライマーを用いてPCRを行い、続いてDpnIにより鋳型プラスミドを消化することで、末端に20塩基の相同配

列を持つFluc (Firefly luciferase) DNA, Nanoluc (Nano luciferase: Nluc) DNA及びベクターDNAを合成した。反応液20 μ L (100ng/ μ L Fluc DNA, 100ng/ μ L Nluc DNA, 100ng/ μ L ベクターDNA, 1 $\times$ NEB Builer (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs), MQ水によりメスアップ) を調製し50 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、氷上で冷却した。反応液2 μ Lを大腸菌コンピテントセル (ECOS (登録商標) Competent E. coli JM109 (ニッポン・ジーン)) に形質転換し、LB寒天培地 (100 μ g/mL アンピシリンナトリウム含有) に塗布した。37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後コロニーをピックし、LB液体培地 (50 μ g/mL アンピシリンナトリウム含有) 5 mLに加えた。37 $^{\circ}$ C、160 rpmで一晩培養し、翌日Wizard (登録商標) Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) によりプラスミドを抽出することで、目的のプラスミドDNAを得た。

[0115] (2) HiFi DNAアッセンブリーによる3 $\times$ FLAG-Fluc-NlucプラスミドDNAの作成

下記に示すプラスミドDNAとプライマーを用いてPCRを行うことで、末端に20塩基程度の相同配列を持つ3 $\times$ FLAG DNAとpGEM-Fluc-Nlucベクターを合成した。0.8%アガロースゲル電気泳動法によりPCR産物の解析を行った。目的バンドを切り出し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) によりゲル抽出を行うことで精製した。反応液10 μ L (20nM 3 $\times$ FLAG DNA, 4nM pGEM-Fluc-Nlucベクター, 1 $\times$ NE Builer (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix, MQ水によりメスアップ) を調製し、50 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした後、氷上で冷却した。反応液5

μL を大腸菌コンピテントセル (ECOS (登録商標) Competent E. coli JM109 (ニッポン・ジーン)) に形質転換し、LB寒天培地 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンナトリウム含有) に塗布した。 37°C で一晩培養した後コロニーをピックし、LB液体培地 ($50\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリンナトリウム含有) 5mL に加えた。 37°C 、 180rpm で一晩培養し、翌日Wizard (登録商標) Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega) によりプラスミドを抽出することで、目的のプラスミドDNAを得た。

[0116] (3) PCRによる3×FLAG-Fluc-Nluc mRNAの転写鋳型DNAの合成

PCR反応液 $50\mu\text{L}$ ($0.3\mu\text{M}$ Forward primer, $0.3\mu\text{M}$ Reverse primer, $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 3×FLAG-Fluc-NlucプラスミドDNA, 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgSO_4 , $1\times\text{PCR Buffer}$, $0.02\text{U}/\mu\text{L}$ KOD-plus-Neo (TOYOBO)) を調製し、PCRにより鋳型DNAを合成した。 0.8% アガロースゲル電気泳動法によりPCR産物の解析を行った。目的バンドを切り出し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) によりゲル抽出を行うことで精製した。

[0117] (4) In vitro転写による3×FLAG-Fluc-Nluc mRNAの合成

転写反応液 ($10\text{ng}/\mu\text{L}$ 鋳型DNA, $1\times\text{T7 RNA Polymerase buffer}$ (Takara) (40mM Tris-HCl (pH 8.0), 8mM MgCl_2 , 2mM スペルミジン), T7 RNA polymerase (Takara) $2.5\text{U}/\mu\text{L}$, 5mM DTT, 2mM ATP, 2mM UTP, 2mM CTP, 2mM GTP又は 0.4mM GTPと 1.6mM ARCA) を調製し、 37°C で1

時間インキュベートした。キャップなしmRNAは2 mM GTPを用い、キャップ化mRNAには、0.4 mM GTPと1.6 mM ARCAを反応液に加え合成した。反応液にRecombinant DNase I (Takara)を0.3 U/μLとなるように加え、37℃で15分インキュベートすることで鋳型DNAを分解した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出、アルコール沈殿により精製を行った。

[0118] (5) RNAの化学合成

5' -GACAGUCUGCUCGAAGCGGCCGCUCUAGAA
GCGTCACCTTAATATGCGCC-3' (配列番号30)

Universal UnyLinker Support 2000 Å
CPG (ChemGenes) を使用し、核酸自動合成機で合成した。5' 末端には光保護基を持つ合成アミダイト (上記の化合物1) により5' 末端のモノリン酸化を行った。化合物1の合成は、「Onda, K. Master Thesis. Master thesis (Nagoya university) 2021.」の内容に基づいて行った。化合物1の合成後、CPGを1.5 mLループ付きスクリュウチューブ (ザルスタット) へ移し、40% aq. methylamine / 28% aq. ammonia (1:1) 1.0 mLを加えて65℃で1時間インキュベートした。室温まで放冷させたのちMillex LH0.45 μmフィルター (Merck, Millipore) を用いてろ過し、滅菌水 (500 μL) で洗い込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1 M TBAF in THF 1.0 mLを加え溶解させ、室温に一晩静置した。1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1.0 mLを加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。NAP-25 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩を行った。逆相HPLCにより、リン酸化合成アミダイトが付加したRNAの精製を行った。アセトニトリル及びTEAA緩衝液を遠心エバポレーターで除去した後に、核酸水溶液の260 nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。HPLCの条件を以下に示す。また、HPLCの

結果を図18に示す。

カラム：Triart C4 (YMC) 10×250 mm、移動相：A) 50 mM TEAA緩衝液 (pH 7.0), 5%アセトニトリル、B) アセトニトリル、グラジエント：0–20 min B conc. 0% to 40%、20–30 min B conc. 80%、流速：3.0 mL/min

[0119] (6) 光照射によるRNAの脱保護

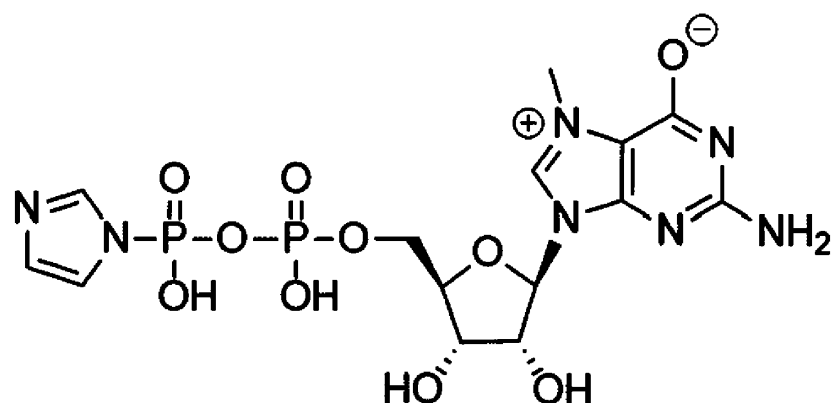
96-wellプレート中の約100 μM RNAにMAX-305 (朝日分光) を用いて4000 μW/cm²の強度で10分間、波長365 nmの光を照射した。光照射後のRNA溶液を化学合成RNAの精製と同条件で、逆相HPLCによる光保護基の除去を確認し、精製を行った。アセトニトリル及びTEAA緩衝液を遠心エバポレーターで除去した後に、核酸水溶液の260 nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。吸光度測定の結果を図19 (a) に示す。

[0120] (7) RNAの化学的キャップ化

1. 5 mLチューブに、それぞれ終濃度10 μM RNA, 10 mM CaCl₂となるように混ぜ合わせ、凍結乾燥により乾固させた。そこへDMSOに溶解したキャップ化試薬 (下記式に示す構造) を終濃度10 mM、2-ニトロイミダゾールを終濃度10 mMとなるように加えてDMSOで20 μLにメスアップした。その反応液を55℃で3時間インキュベートした。反応液を滅菌水により10倍希釈した後に、RNA 5 pmolを2×formamide loading solutionと混合し、8%変性PAGEにより分析を行った。20W定電流で1.5時間泳動し、SYBR Green IIにより染色を行い、バンド強度からキャップ化効率を算出した。滅菌水により希釈した反応液は、Amicon 3K (Merck, Millipore) により限外濾過した。得られたRNA溶液の260 nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。キャップ化したRNAを電気泳動したゲルの写真を図19 (b) に示す。また、キャップ化RNAの吸光

度測定の結果を図20に示す。この結果、キャップ化効率は78%であった。

[化12]



[0121] (8) mRNAとcsRNA又はsRNAのアニーリング

上記で得られたmRNA (3×FLAG-Fluc-Nluc mRNA)、csRNA (capped short RNA: キャップ化RNA)、sRNA (short RNA: キャップ無しRNA) を使用し、アニーリング溶液10 μ L (0.1 μ M mRNA, 0.2 μ M csRNA又はsRNA 2, 50mM NaCl) を調製し、80℃で5分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷やした。アニーリング後のRNAの配列 (配列番号34) を図21に示す。

[0122] (9) HeLa細胞へのトランスフェクションと翻訳反応

トランスフェクション前日に、96wellプレートに1×10⁴ cells/wellの濃度で100 μ LのD-MEM培地 (FUJIFILM, 10% FBS含有) に懸濁したHeLa細胞を播種した。翌日90 μ LのOpti-MEM (登録商標) (Thermo Fisher Scientific) に培地を交換し、Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (登録商標) (Thermo Fisher Scientific) を用いてアニーリングしたmRNA-csRNA又はmRNA-sRNAをトランスフェクションした (Lipofectamin

e (登録商標) MessengerMAX (登録商標) 0.3 μ L, アニリング溶液 1 μ L, Opti-MEM (登録商標) で 10 μ L にメスアップ)。37℃、5% CO₂環境下で3.5時間インキュベートした後に、10% FBS含有D-MEM培地 50 μ L に交換し、37℃で3時間インキュベートした。発光測定はNano-Glo (登録商標) Dual-Luciferase (登録商標) Reporter Assay System (Promega) を用いて行い、Nano luciferase の発光量をFirefly luciferase の発光量で規格化することで翻訳効率を求めた。その結果を図22に示す。この図の(a)はRNAの構成を、(b)はそれに対応する翻訳効率の結果を示している。

[0123] バイシストロニックのmRNAにおいて、後半のコード領域の開始コドン手前に、Capプローブをハイブリダイズさせると、その下流にあるコード領域の翻訳を誘導させることができる。これは、5'末端に通常のキャップがあってもなくても、後半部のコード領域で翻訳を特異的に誘導できることを示している。

[0124] 5. マルチuORF-mRNA (直鎖タイプ: RLuc系)

複数のコード領域を有するmRNA (図23(a)、図24: 配列番号39) にキャップ化プローブ (図23(b) のRNA 5~8) を結合させて、プローブを結合させた下流のコード領域の翻訳活性が向上するか検討した。全長1338 nt のmRNAのORF3の下流にルシフェラーゼの配列が挿入されている。ORF3の上流に相補的なプローブ (RNA 1~8) を設計し、合成した。ルシフェラーゼの発現量で翻訳活性を評価した。以下、実験の詳細を示す。

[0125] (1) PCRによるRLuc mRNAの転写鋳型DNAの合成

PCR反応液 50 μ L (0.3 μ M Forward primer, 0.3 μ M Reverse primer, 1 ng/ μ L RLuc プラスミドDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 1×PCR Buffer, 0.02 U/ μ L KOD-plus-Neo (TOYO

BO))を調製し、PCRにより鋳型DNAを合成した。1%アガロースゲル電気泳動法によりPCR産物の解析を行った。目的バンドを切り出し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)によりゲル抽出を行うことで精製した。

[0126] (2) *in vitro*転写によるRluc mRNAの合成

転写反応液(10ng/μL 鋳型DNA, 1×T7 RNA Polymerase buffer (Takara) (40mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 2mM スペルミジン), 2.5U/μL T7 RNA polymerase (Takara), 5mM DTT, 2mM ATP, 2mM UTP, 2mM CTP, 2mM GTP又は0.4mM GTPと1.6mM ARCA)を調製し、37℃で1時間インキュベートした。反応液にRecombinant DNase I (Takara)を0.3U/μLとなるように加え、37℃で15分インキュベートすることで鋳型DNAを分解した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出、アルコール沈殿、逆相HPLCにより精製を行った。HPLCの条件は以下のとおり。HPLC分取後分析の結果を図25に示す。

—カラム: Hydrosphere C18 (HS12S05-2546WT, 250×4.6mm I.D. S-5μm, 12nm)、移動相: A) 50mM TEAA緩衝液 (pH7.0), 5%アセトニトリル、B) アセトニトリル、グラジエント: 0-20min B conc. 0% to 20%、流速: 1.0mL/min、カラム温度: 50℃

[0127] (3) RNAの化学合成

以下に示すCPG、アミダイトを用いて核酸自動合成機で合成した。合成後、CPGを1.5mLループ付きスクリーチューブ(ザルスタット)へ移し、40% methylamine aq. / 28% ammonia aq. (1:1) 1.0mLを加えて65℃で30分インキュベートした。室温まで放冷させたのちMillex LH 0.45μmフィルター(

Merck, Millipore) を用いてろ過し、滅菌水 (500 μ L) で洗い込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1M TBAF in THF 1.0 mL を加え溶解させ、室温に一晩静置した。1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1.0 mL を加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。NAP-25 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した後、逆相 HPLC により精製を行った。HPLC 分取後分析の結果を図 26 に、LC-MS の結果を下記表に示す。

<CPG>

__3' -TOM ribo Adenosine (n-acetyl) 2' -lcaa CPG 1000Å (N-3201-10, ChemGenes) / 2' -TOM ribo Cytidine (n-acetyl) 3' -lcaa CPG 1000Å (N-3202-10, ChemGenes) / 2' -TOM ribo Guanosine (n-acetyl) CPG 1000Å (N-3203-10, ChemGenes) / 2' -TOM ribo Uridine 2' -lcaa CPG 1000Å (N-3205-10, ChemGenes)

<アミダイト>

__5' -DMT- 2' -TOM ribo Adenosine (ANP-3201, ChemGenes) / 2' -TOM ribo Cytidine (ANP-3202) / 2' -TOM ribo Guanosine (ANP-3203, ChemGenes) / 2' -TOM ribo Uridine (ANP-3205, ChemGenes) / 5' -Phosphate-ON Reagent (CLP-1544, ChemGenes)

<HPLCの条件>

__カラム: Hydrosphere C18 (HS12S05-2546WT, 250×4.6 mm I.D. S-5 μ m, 12 nm)、移動相: A) 50 mM TEAA 緩衝液 (pH 7.0), 5% アセトニトリル、B) アセト

ニトリル、グラジエント：0－20 min B conc. 0% to 30%、流速：1.0 mL/min、カラム温度：室温

[表3]

RNA5 (M.W.)	RNA6 (M.W.)	RNA7 (M.W.)	RNA8 (M.W.)
Calcd. 7465.4855	Calcd. 7466.4695	Calcd. 7422.3535	Calcd. 7438.3525
Obs. 7466.49	Obs. 7467.48	Obs. 7421.77	Obs. 7437.76

[0128] (4) RNAの化学的キャップ化

1. 5 mLチューブに、それぞれ終濃度10 μ M RNA, 10 mM CaCl₂となるように混ぜ合わせ、凍結乾燥により乾固させた。そこへDMSOに溶解したキャップ化試薬（上記の化10）を終濃度10 mM、2-ニトロイミダゾールを終濃度10 mMとなるように加えてDMSOで50 μ Lにメスアップした。その反応液を55℃で3時間インキュベートした。反応後、Amicon Ultra (0.5 mL, 3K, Merck Millipore)、アルコール沈殿により精製を行い、20%変性PAGEにより分析し、バンド強度からキャップ化効率を算出した。その結果を図26に示す。

[0129] (5) mRNAとcsRNA又はsRNAのアニーリング

上記で得られたmRNA (Rluc mRNA)、csRNA (capped short RNA: キャップ化RNA)、sRNA (short RNA: キャップ無しRNA) を使用し、アニーリング溶液10 μ L (0.1 μ M mRNA, 1.0 μ M csRNA又はsRNA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8.0)) を調製し、80℃で5分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷やした。

[0130] (6) HeLa細胞へのトランスフェクションと翻訳反応

トランスフェクション前日に、96wellプレートに1×10⁴ cells/wellの濃度で100 μ LのD-MEM培地 (FUJIFILM, 10% FBS含有) に懸濁したHeLa細胞を播種した。翌日90 μ LのOpti-MEM (登録商標) (Thermo Fisher Scientific

I F I C) に培地を交換し、L i p o f e c t a m i n e (登録商標) M e s s e n g e r M A X (登録商標) (T h e r m o F i s h e r S C I E N T I F I C) を用いてアニーリングしたmRNA-csRNA又はmRNA-sRNAをトランスフェクションした(L i p o f e c t a m i n e (登録商標) M e s s e n g e r M A X (登録商標) 0.3 μ L, アニーリング溶液1 μ L, O p t i - M E M (登録商標) で10 μ Lにメスアップ)。37℃、5% CO₂環境下で3時間インキュベートした後に、10% FBS含有D-MEM培地50 μ Lに交換し、37℃で3時間インキュベートした。発光測定はR e n i l l a L u c i f e r a s e A s s a y S y s t e m (P r o m e g a) を用いて行った。その結果を図28に示す。キャップ構造を持たないmRNA (図の(a)) から、RNA5~8のいずれもキャップ無しのRNA (sRNA) よりもキャップありのRNA (csRNA) の方が発光強度、すなわち翻訳活性が高いことがわかる。また、キャップ構造を持たないmRNA (図の(a)) とキャップ構造を有するmRNA (図の(b)) のどちらにおいても、特にキャッププローブ7又は8を結合させたときに、翻訳活性が向上した。

[0131] 6. Cap化環状RNAとencephalomyocarditis virus (EMCV) IRESの比較

(1) IRESを含むプラスミドの作成

初めに、10 ng/ μ LのIRESを含むプラスミドDNAを1 μ L用意し、1.5 mLチューブに入れた。そこに、ECOS JM109コンピテントセル10 μ Lを入れ、ECOS 6分間プロトコールによって形質転換を行なった。アルコールランプ下で、形質転換後のサンプルをLB/寒天培地(アンピシリン100 μ L/mL含有)に塗布して37℃インキュベーターで一晩インキュベートした。15時間後、コロニーができていることを確認して、シングルコロニーをLB/アンピシリン液体培地10 mLに加えた。そして、37℃条件で一晩振盪した。その後、W i z a r d P l u s S V M i n i p r e p s D N A P u r i f i c a t i o n s y s t

emを用いてプラスミド抽出を行なった。260nmの吸光度でプラスミドの濃度を測定した。

[0132] (2) 精製プラスミドの制限酵素によるIRES断片精製

精製したIRESを含むプラスミドDNA500ngに対して、10×K buffer 1μL、EcoRI (Takara) 0.5μL、BamHI (Takara) 0.5μLを加えて全量が10μLになるようにMQ水を加えた。サンプルを37℃で1時間インキュベートしたのち、1%アガロース電気泳動によって制限酵素処理ができていることを確認した(100V、30分)。645bpのバンドがIRESを含む配列断片であるため、そのバンドをWizard Plus SV Minipreps DNA Purification systemによって単離精製した。

[0133] (3) NanoLucルシフェラーゼを含む断片作成

pNL1.1TKの5' UTRが50nt短縮されたプラスミドDNA 10ngに対して、フォワードプライマーとリバースプライマーをそれぞれ10μMから25pmol分だけ添加した。このサンプルをPCR反応液(10×buffer 5μL, 25mM MgSO₄ 3μL, 2mM dNTPs 5μL, KOD plus neo 1μL)に加え、全量が50μLとなるように調製した。そして、調整後のサンプルに対して、94℃ 2分間→(98℃ 10秒, 55℃ 30秒, 68℃ 3分)×25→68℃ 3分→4℃の条件でPCRを行なった。その結果を1%アガロース電気泳動で確認した(100V、30分)。PCR反応液48μLに対して、反応前のプラスミドを消化するために、制限酵素であるDpnIを0.5μL加え、37℃で1時間インキュベートした。また、PCR反応液はWizard Plus SV Minipreps DNA Purification systemによって精製した。

[0134] (4) Infusion反応

上記で得られたIRES断片とNanoLucルシフェラーゼ断片をそれぞれ260nmの吸光度で測定した。そして、IRES fragment

(13.5 ng/μL) を2.5 μL、NanoLucルシフェラーゼを含む直鎖ベクター (31.1 ng/μL) を1.5 μL、5×In-fusion HD Enzyme Premix (Takara) を1 μL混合して全量を5 μLにした。ネガティブコントロールサンプルとしてNanoLucルシフェラーゼを含む直鎖ベクター (31.1 ng/μL) を1.5 μL、5×In-fusion HD Enzyme Premix (Takara) を1 μL混合し、MQ水で全量を5 μLしたサンプルも作成した。そして、調整したサンプルを50℃で15分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルに対して、再度、ECOS 6分間プルトコールを行なったのちに、ECOS JM109コンピテントセルを50 μL加えた。このサンプルを、アルコールランプ下で、LB/寒天培地 (アンピシリン100 μL/mL含有) に塗布して37℃インキュベーターで一晩インキュベートした。15時間後、コロニーができていることを確認して、シングルコロニーをLB/アンピシリン液体培地10 mLに加えた。そして、37℃条件で一晩振盪した。その後、Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification systemを用いてプラスミド抽出を行なった。260 nmの吸光度でプラスミドの濃度を測定した。

[0135] (5) プラスミドDNAからNanoLucルシフェラーゼ領域の増幅

PCR反応液 (10×buffer 5 μL, 25 mM MgSO₄ 3 μL, 2 mM dNTPs 5 μL, フォワードプライマー 10 μM 1.5 μL, リバースプライマー 10 μM 1.5 μL, プラスミドDNA 0.37 μL, KOD plus neo 1 μL) を50 μLとなるように調製した。そして、調整後のサンプルを、94℃ 2分間→(98℃ 10秒, 55℃ 30秒, 72℃ 90秒) ×25→72℃ 3分間→4℃の条件でPCRを行なった。以上の操作により、プラスミド抽出したものから、必要となるNanoLucルシフェラーゼ領域とIRES配列をPCRによって切り出した。切り出したDNA断片の配列 (配列番号40) を図29に示す。PCRによって増幅した産物をアガロースゲル (1.0%, 1

×TAE, 100V, 30分間)で泳動した。PCR産物については、PCR後に、Wizard SV gel and PCR Clean-up Systemによって精製した。

[0136] (6) 精製DNAのIVT (in vitro transcription)

上記で精製したDNA (3' fragment, full length) に対して、IVT反応を行なった。転写反応液600 μ L (それぞれの精製DNA 4000ng, 10×buffer 60 μ L, 50mM DTT 60 μ L, 20mM ATP, CTP, UTP, GMP 60 μ L, 20mM GTP 15 μ L, T7 RNA polymerase (Takara) 30 μ L, MQ水でメスアップ) を用意して37℃で2時間インキュベートした。その後、このサンプルを、5%変性PAGE (7.5M 尿素, 1×TBE buffer, 26mA, 60分間)で泳動した。その後、SYBR Green II 3 μ LとMQ水 30mLで作成した染色液を使用して、泳動後のサンプルを20分間染色した。Chemidocを用いて、変性PAGEを撮影してIVT産物を確認した。

[0137] (7) IVT産物の精製

3' fragment及びfull lengthのIVT産物600 μ Lに対して、DNase I (Takara) を20 μ L加えて37℃で15分間インキュベートした。これにより、IVT反応で残存しているDNAを取り除いた。次に、中性フェノール600 μ Lとクロロホルム600 μ Lを加え、遠心機で14500rpm15秒の条件で遠心分離をした。その後、600 μ Lのクロロホルムを加え、同様に遠心機で遠心分離を行なった。これによって、酵素をはじめとするタンパク質を除去した。次に、遠心エバポレーターを使用して、室温で5分間遠心分離をした。これによって、アミコンに適さないクロロホルムを除去した。次に、アミコン10Kを用いた。これによって、低分子を除去した。最後にアミコンによって、得られた100 μ Lに対してイソプロパノール100 μ Lと3M酢酸ナトリウム水溶液 (p

H5. 2) を $20\ \mu\text{L}$ 加えて、 -30°C で 1 時間静置した。その後、遠心機で $14500\ \text{rpm}$ 、室温、30 分間の条件で遠心分離した。遠心分離によって得られたペレットを吸わないように上清を取り除いた後に 80% エタノール $1\ \text{mL}$ 加えて洗浄を行なった。同様の条件で 2 分間遠心分離した後に、上清を取り除き、5 分間静置した。最後に、MQ 水 $200\ \mu\text{L}$ で 3 回遠心分離することで溶解させて、3' fragment 及び full length の RNA を精製した。

[0138] (8) I V T 産物の H P L C 精製

上記のように、I V T 反応後にサンプルの精製操作を行なったが、この操作において、二本鎖 RNA やトリリン酸などが除去できていない。これらは、ライゲーション反応や細胞で翻訳反応を検証する際に収率や翻訳活性低下などの効果をもたらすため、H P L C によってそれらを除去した。H I T A C H I H P L C system を用いた。条件は、Hydrps here C18 : 溶媒 A, $50\ \text{mM TEAA (pH 7.0)}$, $5\% \text{ ACN}$; 溶媒 B, ACN ; グラジエント $0-20\% \text{ B}/0-20\ \text{min}$; 流速, $1\ \text{mL}/\text{分}$; カラム温度, 50°C ; カラムサイズ $250\times 4.6\ \text{mm I.D.}$, $5\ \mu\text{L}$, $12\ \text{nm}$; 検出波長, $260\ \text{nm}$ である。H P L C によって分取したのちに、アセトニトリルを減圧下濃縮で取り除いた。そして、アルコール沈殿後、 $260\ \text{nm}$ の吸光度を測定し、今後の実験に用いた。

[0139] (9) I R E S を含む環状 m R N A の単離精製

最適化条件で、目的 RNA の環化反応を行なった。ガイド鎖 $1\ \mu\text{M}$ 、3' fragment $0.4\ \mu\text{M}$ 、RNA $0.4\ \mu\text{M}$ 、 $10\times\text{T4 RNA リガーゼ2 buffer}$ 、 $60\% \text{ PEG}$ 、 T4 RNA リガーゼ2 $0.025\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ を用いて行なった。 $6\% \text{ dPAGE (7.5}\ \mu\text{M 尿素、1}\times\text{TBE buffer, 30 mA, 180 分間)}$ で泳動をした後に、T L C プレート上で紫外線を照射しながら環状 m R N A とされるバンドをカッターで切り取って $1.5\ \text{mL}$ チューブに入れた。その後、合計で $500\ \mu\text{L}$ の MQ 水をチューブに加えて振盪機で一晩振盪した。そして、 14500

rpm, 1 分間, 室温で遠心分離した後に、上清を回収し、残ったゲルに対してMQ水を400 μ L 加えて同様の遠心分離を行い、上清を回収した。続いて、Millex LCR 13 mm を使って上清を2回に分けてフィルター濾過した。そして、ろ過後のサンプルに対してイソプロパノール沈殿によって環状mRNAの精製操作を行なった。精製してきた環状mRNAの濃度測定を260 nmの吸光度で行い、細胞実験用のサンプルを調製した。

[0140] (10) RNA 分解酵素による環状mRNAの確認

上記の単離精製操作によって精製した環状mRNA 10 ng に対して、RnaseR (Epicenter, 20 U/ μ L) を1 U/ μ L になるように加えてMQ水で5 μ L にメスアップした後に37°Cで15分間インキュベートした。そして、フェノール・クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿によって環状mRNAを精製した。その後、5% dPAGE (7.5 μ M 尿素、1×TBE buffer, 30 mA, 240分間) 泳動した。泳動後のゲルをSYBR Green II で染色を30分間して、Chemidocで泳動結果を確認した。

[0141] (11) ヒト培養細胞の播種

ディッシュで培養したヒト培養細胞 (HeLa) をPBS (Phosphate buffered saline, nacalai tesque) 3 mL で2回洗浄し、0.05%トリプシン溶液1 mL を加えて細胞を分解した後、1分間インキュベートした。その後、培地3 mL を加えてトリプシン分解を停止した。サンプルを遠心分離 (Multiripurpose refrigerated centrifuge EX-126, 200 G, 3分) し、上清を除去後、培地に再懸濁して上清20 μ L を用いてセルカウントを行なった。その後、 1.0×10^4 個になるように培地で調整した後に、そこから100 μ L ずつ加えて1ウェルあたり 1.0×10^3 個にした後に、37°C 5%CO₂ 条件化で24時間インキュベートした。

[0142] (12) ヒト培養細胞への環状mRNAのトランスフェクション

初めに、ヒト培養細胞で翻訳量を測定するサンプルを、1ウェルあたり5

ngで、1サンプルあたり3ウェルとして実験を行なった。上記のインキュベート後のサンプルから培地を取り除いた後に、PBS (Phosphate buffered saline, nacalai tesque) 150 μ Lで1回洗浄した。細胞培養用マルチウェルプレート (96well) に対し、細胞を加えた。そして、細胞培養用マルチウェルプレート中でヒト培養細胞を培養した (D-MEM、高グルコース、フェノールレッド含有、37°C, 5%CO₂)。Lipofectamine Messenger MAX transfection reagent (Invitrogen, 0.3 μ L/well) とOpti-MEM (10 μ L/well) とを培養後のサンプルに混合した。その混合液をサンプルRNAにそれぞれ33 μ Lずつ加えた。Opti-MEMを、それぞれのウェルに89 μ Lずつ加えた後に、作成したRNA/Lipo試薬を11.3 μ Lずつ加えた。37°C 5%CO₂条件下で3時間インキュベートした後に、上清を除去してD-MEMに培地を交換した。

[0143] (13) ヒト培養細胞での環状mRNAの発光測定

上記のトランスフェクションから24時間後に、ヒト培養細胞の発光測定を行なった。細胞培養用マルチウェルプレート (96well) から培地を吸い取った後にPBS 150 μ Lで1回洗浄した。Nano Gloルシフェラーゼ Assay System (Promega) を使用し、洗浄後のサンプルの発光測定を行った。まず、1×Go Lysis Bufferを1ウェルあたり20 μ L加えた。これを室温で5時間インキュベートした後に、96well white plateに各細胞のライセートを1ウェルあたり2 μ Lずつ加えた。そこに、1ウェルあたりNano Gloルシフェラーゼ assay substrate 0.1 μ L、Nano Gloルシフェラーゼ assay buffer 10 μ Lずつ加えた。さらに、試薬を加えた後に、プレートリーダーで測定を行なった (比較例)。その結果を図30に示す。

また、上記の「2. キャップ含有環状RNA (分岐鎖タイプ)」における

キャップ含有環状RNA (Branch (+) Cap (+)) を使用して、上記のヒト培養細胞を使用した評価実験も行った。その結果も図中に併せて示す。この図より、既存のIRESを用いる方法と比べてキャップ含有環状RNAでは10倍のルシフェラーゼ発現量を示すことがわかった。

[0144] 6. 化学合成RNA断片 (54塩基長) と転写合成RNA断片 (550塩基長) の2断片からなる環状mRNAの合成 (図31~33)

主鎖が54塩基長からなり、5'末端がリン酸化された分岐鎖を含むオリゴリボヌクレオチドは、光分解性保護基含有化学リン酸化試薬 (特願2021-111420)、及び市販のホスホロアミダイト試薬 [RNA鎖合成にはChemGenes社製品 (ANP-3201, ANP-3202, ANP-3203, ANP-3205)、分岐鎖導入にはGlen Research社から購入したAsymmetric Doubler (Lev) Phosphoramidite (10-1981)] 及び固相担体 (3'-TOM-ribo Uridine CPG 1000A, ChemGenes) を用い、常法に従い核酸自動合成機 (NR-2A 7MX又はNRS-4A1OR7NP, 日本テクノサービス) を用いて合成した。分岐鎖を含まない環状RNAを合成するためには、主鎖のみからなる54塩基長のRNA配列 (配列番号43) を合成した。合成終了後、固相担体に40%メチルアミン水溶液と濃アンモニア水の等量混合液1mLを加え65℃で20分間加熱し固相単体からの切り出しと核酸塩基部を脱保護した。上清をMillex LHフィルター (0.45 µm, メルク) でろ過したのち、遠心エバポレーターで減圧下乾固した。さらに残渣に1M フッ化テトラブチルアンモニウム THF溶液を加え、室温で終夜インキュベートした。NAP-25ゲルろ過カラム (メルク) を用いて脱塩したのち、溶出液に含まれるRNAをアルコール沈殿法により回収した。これを超純水に再溶解し、逆相HPLCにて目的物を単離精製した。

[Hitachi LaChrom Elite又はChromaster システム (日立ハイテクサイエンス); カラム, YMC Triart B

i o C4 (250mm×10mm I. D.、ワイエムシィ) ; S o l
v e n t A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH7.0) ,
5% アセトニトリル ; S o l v e n t B, アセトニトリル ; 直
線勾配 0-20% S o l v e n t B (0-20 分) ; 流速 : 3 m
L / 分 ; 検出波長, 260nm ; カラム温度, 50℃] 。

[0145] 得られた目的物のリン酸基上の保護基を、365-nm光を照射すること
で除去した。光照射にはMAX-305光源装置(朝日分光)を使用した。
RNA溶液を1ウェル当たり50μLずつ透明96穴マルチウェルプレート
のウェルに加え、4mW/cm²の光量で365nm光を10分間照射した。
照射後、RNAを回収しアルコール沈殿により単離精製した。リン酸基脱保
護前後のRNAいずれについても、LC/MSシステム(Agilent)
にて解析し、目的物が得られたことを確認した。次いで、分岐鎖の5'末リ
ン酸基に対し、7-メチルグアノシン 5'-ニリン酸イミダゾリドナトリ
ウム塩(1mM⁷GDP)を反応させ、キャップ化RNA鎖を得た(WO2
021172204A1)。分岐鎖の5'末端にリン酸基を含む原料RNA
2nmol(26μL)に5μLの200mM 塩化カルシウム水溶液を
加え、液体窒素で凍結後、凍結乾燥した。3時間後、乾固したRNAと塩化
カルシウムの混合物に45μLのジメチルスルホキシド(DMSO)を加え
て溶解し、ここに50μLの1mM⁷GDP/DMSO溶液、及び5μLの
200mM 2-ニトロイミダゾール/DMSO溶液を添加し、55℃で3
時間加温した。122μLの0.541M 酢酸ナトリウム(pH5.2)
水溶液を添加し、一部を分取し、キャップ化反応の効率を評価した。原料及
び反応後のRNA、各5pmolずつを変性剤として7.5M 尿素を含む
10% 変性PAGEにより分析し、キャップ化体のバンドシフトを確認し
た。酢酸ナトリウム水溶液を添加した後の溶液に、220μLの2-プロパ
ノールを添加、-30℃で終夜冷却し、遠心分離(20,000g, 25分
間)してペレットを得た。これを超純水に再溶解し、目的物を逆相HPLC
で単離精製した。

[Hitachi LaChrom Elite 又はChromaster システム (日立ハイテクサイエンス) ; カラム, YMC HydroSphere C18 (250mm×4.6mm I.D.、ワイエムシィ) ; Solvent A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0) , 5% アセトニトリル ; Solvent B, アセトニトリル ; 直線勾配 0-20% Solvent B (0-20分) 流速: 1mL/分 ; 検出波長, 260nm ; カラム温度, 50℃] 。

[0146] 溶出液から目的物をアルコール沈殿にて回収しキャップ化RNAを得た。上述のように分岐鎖にキャップ構造を導入した後、主鎖RNAの5'末端を酵素T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した。リン酸化反応の組成を次に示す。8 μ M RNA, 1mM ATP, 50mM Tris-HCl (pH 8.0) , 10mM 塩化マグネシウム, 5mMジチオスレイトール, 0.2 U/ μ L T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (タカラバイオ)。本反応を37℃で1時間インキュベートした後、TE飽和フェノール:クロロホルム等量混合液を用いて除タンパクし、アルコール沈殿してRNAを回収した。

[0147] NanoLucルシフェラーゼ (Nluc) のコード配列を含む市販のプラスミドDNA, pNL1.1. TK (プロメガ) を鋳型とし、2本の合成オリゴDNA (5' -CCCGGATCCTAATACGACTCACTA TAGGTCTTCACACTCGAAGATTTC-3' (配列番号25) / 5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TCTAGAAATTACGCCAGAATGCG-3' (配列番号26)) をプライマーとしてPCR反応を実施した。反応液組成は以下のとおりであった。1 ng/ μ L pNL1.1. TK, 0.3 μ M オリゴDNA , 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgSO₄, 1×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo, 0.02 U/ μ L KOD-Plus-Neo (東洋紡)。T100サーマルサイクラー (Bio-Rad) を用い、反応液を次に示す熱サイクル条件に付した。94℃, 2分→

[98℃, 10秒→55℃, 30秒→72℃, 70秒] × 25サイクル。反応液(50 μL × 8本)をまとめ、ここに0.4 mLのTE飽和フェノール:クロロホルム等量混合液を添加し激しく混和・遠心分離(20,000 × g, 1分)し、水層を分離した。さらに0.4 mLのクロロホルムを添加し、激しく混和・遠心分離(20,000 × g, 1分)し、水層を分離した。ここに40 μLの3M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2), 440 μLの2-プロパノールを加え、-30℃で終夜冷却した後、遠心分離(20,000 × g, 20分)し、目的物のDNAをペレットとして得た。得られたDNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼを用いて5'末端がリン酸化された550塩基長のRNA転写物を調製した。反応液の組成は次のとおりであった。

15 ng/μL 鋳型DNA, 2 mM ATP, 2 mM UTP, 2 mM CTP, 0.5 mM GTP, 2 mM GMP, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM スペルミジン, 5 mM DTT, 0.001 U/μL Pyrophosphatase (New England Biolabs, M2403), 2.34 ng/μL T7 RNA ポリメラーゼ。

1 mLの反応液を37℃で2時間インキュベートしたのち、10 μLのDNase I (5 U/μL、タカラバイオ)を添加しさらに37℃で20分間インキュベートした。反応液を等量の飽和フェノール:クロロホルム等量混合液、クロロホルムで抽出し除タンパクしたのち、水層に1/10量の3M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2), 等量の2-プロパノールを加え、遠心分離しRNA粗精製物を沈殿として得た。得られたRNA転写物は、逆相HPLCで単離精製[Hitachi LaChrom Elite 又はChromaster システム(日立ハイテクサイエンス); カラム, YMC Hydrosphere C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., ワイエムシイ); Solvent A, 50 mM 酢酸トリエチルアンモニウム(pH 7.0), 5% アセトニトリル; Solven

t B, アセトニトリル; 直線勾配 5-15% Solvent B (0-20分); 流速: 1 mL/分; 検出波長, 260 nm; カラム温度, 50°C] し、最終的に420 µgのRNA転写物を得た。

[0148] 主鎖部分が54塩基からなる化学合成RNA断片と550塩基長の転写合成RNAを2種類の鋳型DNA存在下アニールさせ、酵素T4 RNAリガーゼ2を用いて連結・環化した。それぞれ30塩基からなる2種類の鋳型DNAの配列は次のとおりであった。Splint__1, 5'-ACCTTAAATATGCGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (配列番号27); Splint__2, 5'-TCGAGTGTGAAGACCATGGTGGCTTTTACCC-3' (配列番号28)。

酵素反応液組成は次に示すとおりであった。1 µM 化学合成RNA, 0.5 µM転写合成RNA, 2 µM Splint DNA__1, 2 µM Splint DNA__2, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 400 µM ATP, 10 (w/v)% PEG 6000, 0.05 µg/µL T4 RNAリガーゼ2。ストック溶液用度がそれぞれ60 (w/v)%のPEG 6000と1 µg/µLのT4 RNAリガーゼ2を添加する前に、混合物を90°Cで3分間加熱し、約20分かけて室温まで徐冷した。その後、上に示す終濃度になるようにPEG 6000及びリガーゼを添加し、混合物を37°Cで1時間インキュベートした。反応液に対し、等量のTE飽和フェノール:クロロホルム等量混合液を添加し激しく混和・遠心分離(20,000×g, 1分)し、水層を分離した。さらに等量のクロロホルムを添加し、激しく混和・遠心分離(20,000×g, 1分)し、水層を分離した。ここに水層の1/10量の3M 酢酸ナトリウム水溶液(pH 5.2), 等量の2-プロパノールを加え、-30°Cで1時間以上冷却した後、遠心分離(20,000×g, 20分)し、RNAを回収した。得られたペレットを少量の超純水に溶解し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE) [変性剤として7.5 M尿素、25 (v/v)%ホルムアミドを含む6% ポリアク

リルアミド（アクリルアミド／N，N′－メチレンビスアクリルアミド，19／1）をTBE緩衝液（89mM Tris－ホウ酸，2mM EDTA）を用いて作成]にて分離した。目的とする環状mRNAを含むゲル部分をUV shadowing法で検出して切り出し、ゲル片を破碎した後、50mM酢酸ナトリウム水溶液（pH5.2）を加えてRNAをゲルから抽出した。抽出液に含まれるRNAをアルコール沈殿法により回収し、超純水に再溶解した。260nmにおける吸光度に基づいてRNA濃度を算出した。単離精製後の環状RNAの純度は変性PAGE分析により確認した（>90%）。

[0149] 7. 化学合成RNA断片（54塩基長）と転写合成RNA断片（550塩基長）の2断片からなる5′末端キャップ化直鎖状mRNAの合成（図33）

主鎖が54塩基長からなり、分岐鎖を含まない5′末端リン酸化化学合成RNAオリゴマーを上述の分岐鎖を含む化学合成と同様に常法に従い核酸自動合成機を使用して合成した。その5′末端のリン酸基に対し、化学キャップ化試薬 7－メチルグアノシン 5′－ニリン酸イミダゾリドナトリウム塩（1m－m⁷GDP）を反応させ、キャップ化RNA鎖を得た（WO2021172204A1）。5′末端リン酸化RNA 2nmol（26μL）に5μLの200mM 塩化カルシウム水溶液を加え、液体窒素で凍結後、凍結乾燥した。3時間後、乾固したRNAと塩化カルシウムの混合物に45μLのジメチルスルホキシド（DMSO）を加えて溶解し、ここに50μLの1m－m⁷GDP／DMSO溶液、及び5μLの200mM 2－ニトロイミダゾール／DMSO溶液を添加し、55℃で3時間加温した。122μLの0.541M 酢酸ナトリウム（pH5.2）水溶液を添加し、一部を分取し、キャップ化反応の効率を評価した。原料及び反応後のRNA，各5pmolずつを変性剤として7.5M尿素を含む10%変性PAGEにより分析し、キャップ化体のバンドシフトを確認した。酢酸ナトリウム水溶液を添加した後の溶液に、220μLの2－プロパノールを添加、－30℃で終夜冷却し、遠心分離（20,000g，25分間）してペレットを得た。こ

れを超純水に再溶解し、目的物を逆相HPLCで単離精製した。[Hitachi LaChrom Elite 又はChromaster システム (日立ハイテクサイエンス) ; カラム, YMC Hydrosphere C18 (250mm×4.6mm I.D.、ワイエムシィ) ; Solvent A, 50mM 酢酸トリエチルアンモニウム (pH7.0) , 5% アセトニトリル; Solvent B, アセトニトリル; 直線勾配 0-20% Solvent B (0-20分) ; 流速: 1mL/分; 検出波長, 260nm; カラム温度, 50℃]。

溶出液から目的物をアルコール沈殿にて回収しキャップ化RNAを得た。得られたキャップ化RNAを、上述の分岐鎖含有環状mRNAの合成で用いたものと同じ転写RNAと、Splint DNA__2のみの存在下、T4 RNA リガーゼ2により連結した。酵素反応液組成は次に示すとおりであった。1 μ M 化学合成5' キャップ化RNA, 0.5 μ M転写合成RNA, 2 μ M Splint DNA__2, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 400 μ M ATP, 10 (w/v) % PEG6000, 0.05 μ g/ μ L T4 RNA リガーゼ2。連結反応の進行は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) [変性剤として7.5M尿素、25 (v/v) %ホルムアミドを含む6% ポリアクリルアミド (アクリルアミド/N, N'-メチレンビスアクリルアミド, 19/1) をTBE緩衝液 (89mM Tris-ホウ酸, 2mM EDTA) を用いて作成] により確認し、分離精製した。目的連結体である直鎖状mRNAを含むゲル部分をUV shadowing法で検出して切り出し、ゲル片を破碎した後、50mM酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.2) を加えてRNAをゲルから抽出した。抽出液に含まれるRNAをアルコール沈殿法により回収し、超純水に再溶解した。260nmにおける吸光度に基づいてRNA濃度を算出した。単離精製後のRNAの純度は変性PAGE分析により確認した。

[0150] 8. 内部リボソーム侵入部位 (IRES) 配列を含む直鎖状及び環状mRN

Aの合成 (図33)

市販のプラスミドDNA pIRES Vector (タカラバイオ631605) から、IRES配列を含む配列を2か所の制限酵素部位 (EcoRI/BamHI) で切り出し、これをpNL1.1 TK Vector (プロメガ N1501) に挿入したプラスミドDNAを作成した。PCR反応の鋳型として以降使用した、本プラスミドDNA (4396-bp, pIRES_NL) の配列は配列番号41のとおりである。

- [0151] 上述のpIRES_NLを鋳型とし、2本の合成オリゴDNA (5' -CCGGATCCTAATACGACTCACTATAGGCGCATATTAAGGTGACGCGT-3' (配列番号42) / 5' -TTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTAGAATTACGCCAGAATGCG-3' (配列番号43)) をプライマーとしてPCR反応を実施した。反応液組成は以下のとおりであった。1 ng/μL pIRES_NL, 0.3 μM オリゴDNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 1×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo, 0.02 U/μL KOD-Plus-Neo (東洋紡)。T100サーマルサイクラー (Bio-Rad) を用い、反応液を次に示す熱サイクル条件に付した。94℃, 2分→98℃, 10秒→55℃, 30秒→72℃, 90秒] ×25サイクル。反応液に除タンパク操作を行った後、アルコール沈殿によりDNAを回収した。得られたDNAを鋳型として、IRES配列不含配列と同様の方法にて、T7 RNAポリメラーゼを用いた転写反応を行い、直鎖状mRNAを調製した。得られた直鎖状mRNAは同様に逆相HPLCを用いて精製した。IRES配列を含む環状mRNAは、1種類のスプリントDNA Splint DNA_1のみの存在下、IRESを含まない環状mRNAと同様の方法にて環状化反応を行い [0.5 μM転写合成IRES含有RNA, 2 μM Splint DNA_1, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 400 μM ATP, 10 (w/v) % P

EG6000, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ T4 RNA リガーゼ2]、同様に変性PAGEで単離精製した。単離精製後の環状RNAの純度は変性PAGE分析により確認した(>90%)。

[0152] 9. 培養HeLa細胞を用いたmRNAの翻訳活性評価実験(図31~33)

前日に96ウェル細胞培養用プレートに 1×10^4 個ずつ培養HeLa細胞(理研セルバンク)を播種した。ここに1ウェルあたり10ngのRNAをトランスフェクション試薬(Lipofectamine MessengerMAX, サーマフィッシャー, 0.15 μL /ウェル)の推奨条件に基づきHeLa細胞に導入した。トランスフェクション後3時間後に上清を10(w/w)% ウシ胎児血清(FBS, Hyclone)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 和光純薬工業)培地に交換し、さらに細胞を37°C、5% CO₂条件下で24時間培養後、溶解した。溶解液中に含まれるNanoLucルシフェラーゼタンパク質量をNano-Glo(登録商標) Luciferase Assay System(プロメガ)、Mithras LB 940プレートリーダー(ベルトールド)を用いて測定した。

[0153] 10. 実験動物(マウス)を用いたmRNAの翻訳活性評価実験(図33)

pH応答性脂質(ALC-0315, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)、リン脂質(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DSPC, Fujifilm Wako, Osaka, Japan)、コレステロール(Sigma Aldrich)、ALC-0159(MedChemExpress)をmol比 46.3 : 9.4 : 42.7 : 1.6でエタノール溶媒に調製した。mRNAを、50mM citrate buffer(pH3)に溶解した。mRNAと脂質を2:1のvolume比でマイクロ流路(NanoAssem

blr (登録商標) Spark, Precision Nanosystems, Vancouver, Canada) にて混合した。その後、PBSで40倍希釈し、Amicon Ultra-15-30K centrifugal units (Merck Millipore) で限外濾過をおこなった。mRNAが0.33ug/mouseになるように、尾静脈よりLNPを投与した。4時間後に各臓器を回収した。Passive lysis buffer (Promega) 中でホモジェナイズしたのち、Nano-Glo (登録商標) Luciferase Assay System (Promega) とLumat3 LB9508 luminometer (Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いて、ルシフェラーゼ量を定量した。

[0154] 11. 培養HEK293-NF kappa Bレポーター細胞を用いたmRNAの免疫原性評価実験 (図33)

NF- κ Bレポーター (Luc) -HEK293細胞はBPSバイオサイエンス社から購入した。トランスフェクション前日に、トリプシン処理した同細胞を48-ウェル細胞培養用プレートに 3×10^5 個ずつ播種した。トランスフェクション直前に、生育培地 (10% FBS, $100 \mu\text{g/mL}$ ハイグロマイシンBを含むDMEM培地) を除去し、1ウェルあたり240 μL のOpti-MEM (登録商標) I Reduced Serum Medium (サーモフィッシャー) に置換した。1ウェルあたり、20 ngのmRNA を0.15 μL のLipofectamine MessengerMAX (サーモフィッシャー)、10 μL のOpti-MEM I 培地と混合し、これをウェルに加え、細胞を3時間培養した。上清を生育培地 (250 μL) に交換し、合計で24時間、細胞を培養した。1ウェル50 μL のGlo Lysis Buffer (プロメガ) を用いて細胞を溶解した。細胞溶解液中の総タンパク質濃度をPierce BCA Protein Assay Kit (サーモフィッシャー)、ルシフェラーゼ

タンパク質発現量をOne-Glo Luciferase Assay System（プロメガ）を用いて測定した。ルシフェラーゼ発現量を総タンパク質濃度で標準化し、各mRNA導入によるNF- κ B情報伝達経路活性化量の相対値を算出した。

[0155] 図31は、分岐鎖にキャップ構造を導入した環状mRNAの翻訳活性が、これを含まないものを比較して大きく向上したことを示す実験結果を示している。（a）は、分岐鎖に5'キャップ構造を含む環状mRNAの合成方法を示す概念図を示している。54塩基長の化学合成RNA断片（配列番号44～48）と、転写合成RNA断片（配列番号49）を酵素リガーゼにより連結し、環状mRNAを調製した。図中に化学合成RNA断片及び酵素合成RNA断片の配列及び構造を示した。（b）は、（a）に示した方法で合成した環状mRNAの培養HeLa細胞中における翻訳活性評価結果を示している。環状mRNAは、リポフェクション法により培養HeLa細胞に導入し、24時間培養した後、細胞を溶解し、溶解液のナノルシフェラーゼ活性を測定した。3種類の鎖長の異なる分岐鎖を持つ環状mRNAの活性を比較した。分岐鎖にキャップ構造を持つ環状mRNAの翻訳活性は、持たないものに比較して大きく向上したことが分かる。

[0156] 図32は、分岐鎖にキャップ構造を導入した環状mRNAの分岐鎖長と翻訳活性の関係（分岐鎖長が可変であること）を示す実験結果を示している。（a）は、分岐鎖に5'キャップ構造を含む化学合成RNA断片（配列番号48, 50, 51）の構造を示す図である。分岐鎖の鎖長及び配列が異なる3種類のRNA鎖を調製した。（b）は、（a）で示す断片を基質として合成した環状mRNAの培養HeLa細胞中における翻訳活性評価結果を示している。分岐鎖の5'末端にキャップ構造を導入する前のRNA鎖を用いて調製した環状mRNAとその活性を比較し、分岐鎖末端へのキャップ構造導入の重要性を示した結果である。環状mRNAは、リポフェクション法により培養HeLa細胞に導入し、24時間培養した後、細胞を溶解し、溶解液のナノルシフェラーゼ活性を測定した。3種類の鎖長の異なる分岐鎖を持つ

環状mRNAの活性を比較したところ、いずれも活性は大きくは異ならなかったものの6塩基長の分岐鎖を持つ環状mRNAが最も高い翻訳活性を示した。

[0157] 図33は、分岐鎖にキャップ構造を持つ環状mRNAの翻訳活性が、EMCV由来IRES配列を含むmRNA等に比較して高いことを示す実験結果を示している。全てのRNAは共通のNano luciferaseコード配列、3' UTR及びpoly A30テイルを含む。(a)は、用いたmRNAの配列及び構造を示す模式図である。(b, c)は、培養HeLa細胞中における翻訳活性評価結果である。mRNAは、リポフェクション法により培養HeLa細胞に導入し、24時間(b)又は18, 24, 48, 72時間(c)培養した後、細胞を溶解し、溶解液のナノルシフェラーゼ活性を測定した。(d)は、マウス脾臓における発現量測定結果である。(e)は、HEK293-NF kappa B-luciferaseレポーター細胞系におけるmRNAの免疫原性評価の実験結果である。mRNAはリポフェクション法により細胞に導入した。

[0158] (b-e)から、分岐鎖にキャップ構造をもつ環状mRNA(E)の翻訳活性は、ヒト由来培養細胞系(b)、マウス動物実験(d)のいずれにおいてもEMCV-IRESを含む直鎖(A)及び環状mRNA(B)や、キャップ構造をもつ直鎖状mRNA(C)、キャップ構造をもたない環状mRNA(D)より高かった(b)。また、培養細胞系において、キャップ構造を持つ環状RNA(E)はキャップ構造をもつ直鎖状mRNA(C)と比較し、より長時間にわたり持続的な翻訳活性を示した。分岐鎖にキャップ構造をもつ環状mRNA(E)の免疫原性がキャップ構造をもつ直鎖状mRNA(C)に比較して低いことを示す実験結果である。

[0159] 12. ATF4-Renilla mRNA及びATF4-csRNA5～8のHeLa細胞における翻訳反応(図43, 図44)

(1) PCRによるATF4-Renilla mRNAの転写鋳型DNAの合成

PCR反応液 (0.3 μ M Forward primer, 0.3 μ M Reverse primer, 1 ng/ μ L プラスミドDNA (psiCHECK2__ATF4-Renilla), 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 1×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo (TOYOBO), 0.02 U/ μ L KOD-Plus-Neo (TOYOBO), MQ水でメスアップ) を調製し、サーマルサイクラーを用いて、PCR法により鋳型DNAを合成した。PCR条件は、初期変性を94℃で2分、98℃で10秒、56℃で30秒、72℃で60秒のサイクルを30サイクルとした。1%アガロースゲル (Agarose S (ニッポン・ジーン), 1×TAE buffer) を作成し、PCR反応液に6×Loading Buffer (takara) を加えてアプライし、100Vで30分間電気泳動を行った。EtBrによる染色後、目的バンドを切り出し、Wizard (登録商標) SV Gel and PCR Clean-Up System Promega) を用いて転写型DNAを抽出・精製した。得られたDNA溶液の260nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。

[0160] (2) ATF4-Renilla mRNAのin vitro転写による合成

5'末端にキャップ構造を導入するために、ARCAとGTPの比率を4:1にした以下の組成でin vitro転写反応を行った。転写反応液 (10 ng/ μ L 鋳型DNA, 1×T7 polymerase buffer (takara) (40 mM Tris-HCl (pH8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM スペルミジン), 5 mM DTT, 2 mM ATP, 2 mM CTP, 2 mM UTP, 0.4 mM GTP, 1.6 mM ARCA, 2.5 U/ μ L T7 RNA polymerase, MQ水でメスアップ) を調製した。また、キャップ構造を導入しない場合は、以下の組成で転写反応液を調製した (10 ng/ μ L 鋳型DNA, 1×T7 polymerase buffer (takara

) (40mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM MgCl₂, 2mMスベルミジン), 5mM DTT, 2mM ATP, 2mM CTP, 2mM UTP, 2mM GTP, 2.5U/μL T7 RNA polymerase, MQ水でメスアップ)。37℃で1時間インキュベートした後、反応液にRecombinant DNase I (takara)を0.1U/μLとなるように加え、37℃で15分間インキュベートすることで鋳型DNAを分解した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出によりタンパク質を除き、Amicon Ultra (0.5 mL, 10K) (Merck Millipore)を用いて濃縮した。その後、アルコール沈殿、逆相HPLCによる精製を行った。アセトニトリルを遠心エバポレーターで除去した後に、アルコール沈殿を行った。核酸水溶液に260nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。その結果を図34に示す。

[0161] (3) RNAの化学合成

Universal UnyLinker Support 2000Å CPG (ChemGenes)、3'-TOM ribo Adenosine (n-acetyl) 2'-lcaa CPG 1000Å (ChemGenes)、2'-TOM ribo Cytidine (n-acetyl) 3'-lcaa CPG 1000Å (ChemGenes)、2'-TOM ribo Guanosine (n-acetyl) CPG 1000Å (ChemGenes)、2'-TOM ribo Uridine 2'-lcaa CPG 1000Å (ChemGenes)のいずれかを使用し、核酸自動合成機で合成した。5'末端は5'-Phosphate-ON Reagent (ChemGenes)を用いてリン酸化した。合成語、CPGを1.5mLループ付きスクリーチューブ(ザルスタット)へ移し、40% aq. methylamine/28% aq. ammonia (1:1) 1mLを加えて65℃で30分間インキュベートした。氷上で冷却した後、Millex LH 0.45 μ

mフィルターを用いてろ過し、MQ水0.75 mLで洗い込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1 M T B A F i n T H F 1 mLを加え、室温に一晩静置した。1 M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 7.5) 1 mLを加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。N A P - 25 カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いて脱塩した後、アルコール沈殿と逆相 H P L C による精製を行った。アセトニトリルを遠心エバポレーターで除去した後に、アルコール沈殿を行い、260 nmにおける吸光度測定から核酸水溶液の濃度を決定した。その結果を図35に示す。

[表4]

LC-MS

<u>ATF4-sRNA1</u>	<u>ATF4-sRNA2</u>	<u>ATF4-sRNA3</u>	<u>ATF4-sRNA4</u>
Calcd. 7465.4855	Calcd. 7498.4675	Calcd. 7448.5025	Calcd. 7489.5115
Obs. 7466.46	Obs. 7499.49	Obs. 7449.53	Obs. 7490.41
<u>ATF4-sRNA5</u>	<u>ATF4-sRNA6</u>	<u>ATF4-sRNA7</u>	<u>ATF4-sRNA8</u>
Calcd. 7465.4855	Calcd. 7466.4695	Calcd. 7422.3535	Calcd. 7438.3525
Obs. 7466.49	Obs. 7467.48	Obs. 7421.77	Obs. 7437.76
<u>ATF4-sRNA8-polyA</u>	<u>ATF4-sRNA8-polyA_OMe</u>	<u>ATF4-sRNA8-polyA-LNA</u>	
Calcd. 18012.6081	Calcd. 18157.3559	Calcd. 18207.3309	
Obs. 18016.39	Obs. 18156.25	Obs. 18206.12	

[0162] (4) RNAの化学的キャップ化

1. 5 mL チューブにRNA水溶液, CaCl_2 水溶液を入れ、凍結乾燥により乾固させた。そこへDMSOに溶解したキャップ化試薬と2-nitroimidazoleを加え、DMSOでメスアップした。最終的なキャップ化反応液の組成は以下のとおりである (20 μM RNA, 10 mM CaCl_2 , 10 mM キャップ化試薬, 10 mM 2-nitroimidazole, DMSOによりメスアップ)。反応液を55°Cで3時間インキュベートした後、Amicon Ultra (Merck Millipore, 0.5 mL, 3 K) とアルコール沈殿により精製を行い、260 nmにおける吸光度測定から核酸水溶液の濃度を決定した。その後、変性PAGEによる解析を行った。RNA 3 pmolを2×formam

ide loading solutionと混合し、80℃で5分間加熱した後にゲルにロードした。25mAで2時間又は20mAで2.5時間泳動し、SYBR Green IIによる染色後Chemidocによりゲルを撮影した。キャップ化効率はバンド強度から算出した。その結果を図36に示す。

[表5]

LC-MS

<u>ATF4-csRNA1</u>	<u>ATF4-csRNA2</u>	<u>ATF4-csRNA3</u>	<u>ATF4-csRNA4</u>
Calcd. 7904.6991	Calcd. 7937.6811	Calcd. 7887.7161	Calcd. 7928.7251
Obs. 7905.57	Obs. 7938.40	Obs. 7888.59	Obs. 7929.46
<u>ATF4-csRNA5</u>	<u>ATF4-csRNA6</u>	<u>ATF4-csRNA7</u>	<u>ATF4-csRNA8</u>
Calcd. 7904.6991	Calcd. 7905.6831	Calcd. 7861.5671	Calcd. 7877.5661
Obs. 7905.50	Obs. 7906.58	Obs. 7861.10	Obs. 7876.90
<u>ATF4-csRNA8-polyA</u>	<u>ATF4-csRNA8-polyA_OMe</u>	<u>ATF4-csRNA8-polyA-LNA</u>	
Calcd. 18456.2994	Calcd. 18596.5694	Calcd. 18646.5444	
Obs. 18456.01	Obs. 18596.14	Obs. 18645.35	

[0163] (2) アニーリング・発光測定

アニーリング溶液 (0.1 μ M ATF4_Renilla mRNA, 1 μ M csRNA (配列番号52~55), 10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA (pH8.0)) を調製し、80℃で5分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷やすことで、mRNAとcsRNAのアニーリングを行った。トランスフェクション前日に、96wellプレートに、 1.5×10^4 cells/wellで10% FBS含有D-MEM (Wako) 100 μ Lに懸濁したHeLa細胞を播種した。翌日培地を除去し、Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (登録商標) (Thermo Fisher Scientific) を用いてアニーリングしたmRNAをトランスフェクションした (Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (登録商標) 0.3 μ L, アニーリング溶液1 μ L, Opti-MEM (登録商標) (Thermo Fish

er SCIENTIFIC)で100 μ Lにメスアップ)。37℃、5% CO₂環境下で3時間インキュベートした後に、培地を除去し10% FBS含有D-MEM (Wako) 100 μ Lを添加した。再び37℃、5% CO₂環境下で3.5時間インキュベートした後に培地を除去し、1×Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer (Promega) 20 μ Lを加えライセート化した。ライセート10 μ LをRenilla Luciferase Assay Reagent (Promega) 30 μ Lと混合し、発光測定を行った。

[0164] 図43の(a)は、新たに設計したcsRNAの配列を示している。mRNAとの相補鎖領域は下線で示した。配列はすべて5'→3'の方向で記載した。(b)は、ATF4-Renilla mRNA 5' UTRの二次構造を示している。csRNAの結合位置を図中にマーカーで示した。

図44は、csRNAの結合位置の最適化を示す図である。(a)は、翻訳に用いたmRNA及びcsRNAの模式図である。図中の赤丸はキャップ構造を示す。(b)は、HeLa細胞におけるルシフェラーゼ発光測定を示す図である。mRNA (cap (-))又はmRNA (cap (+))の発光強度を1としたときの相対値を示した。エラーバーは3回の実験平均の標準誤差とした。

これらの結果から、mRNAが分子内で二本鎖を形成していないと思われる領域に結合するようcsRNAを設計することで、翻訳促進効果が向上した(mRNA cap (-), mRNA cap (+)の両方で大きく翻訳量が増加した)。

[0165] 13. 化学修飾(OMe、LNA)を導入したcsRNAのHeLa細胞抽出液における翻訳反応(図45)

[0166] (1) 環状NanoLuc mRNAのin vitro転写による合成

5'末端にモノリン酸基を導入するために、GMPとGTPの比率を4:1にした以下の組成でin vitro転写反応を行った。転写反応液(10 ng/ μ L 鋳型DNA, 1×T7 polymerase buff

er (takara) (40mM Tris-HCl (pH 8.0), 8mM $MgCl_2$, 2mM スペルミジン), 5mM DTT, 2mM ATP, 2mM CTP, 2mM UTP, 2mM GTP, 10mM GMP, 2.5U/ μ L T7 RNA polymerase, MQ水でメスアップ) を調製し、37℃で2時間インキュベートした。反応液にRecombinant DNase I (takara) を0.1U/ μ Lとなるように加え、37℃で15分間インキュベートすることで鋳型DNAを分解した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出によりタンパク質を除き、Amicon Ultra (Merck Millipore, 0.5mL, 10K) を用いて濃縮した。その後、アルコール沈殿、逆相HPLCによる精製を行った。アセトニトリルを遠心エバポレーターで除去した後に、アルコール沈殿を行った。核酸水溶液に260nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。その結果を図37に示す。

[0167] (2) 環状NanoLuc mRNAの環化反応

反応液 (0.5 μ M mRNA, 1.0 μ M splint DNA, T4 RNA ligase I, 1×T4 RNA ligase I buffer, 10% PEG8000, MQ水でメスアップ) 1mLを調製し、37℃で1時間インキュベートした。反応液にRecombinant DNase I (takara) を0.1U/ μ Lとなるように加え、37℃で15分間インキュベートすることでsplint DNAを分解した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出によりタンパク質を除き、Amicon Ultra (0.5mL, 10K) (Merck Millipore) を用いて濃縮した。続いてアルコール沈殿を行い、5%変性PAGEにより環化反応の進行を確認した。その後、変性PAGEによる環状mRNAの単離精製を行った。UVシャドウイングにより目的バンドを含むゲルを切り出し、切り出したゲルをよく砕いた。ゲル片を2mLのMQ水に浸し、4℃で一晩浸透することにより、RNAを抽出した。4℃、10000rpmで5分間遠心し、上清を回収した。再びゲル片にMQ水

500 μ Lを加え、同様に遠心し、上清を回収した。回収したすべての上清をフィルターろ過 (Milliex-LCR, 0.45 μ m (Merck Millipore)) することで、混入したゲル片を除いた。ろ液を限ろ過 (Amicon Ultra (0.5 mL, 10K) (Merck Millipore)) によって脱塩、濃縮した後アルコール沈殿を行った。核酸水溶液に260 nmにおける吸光度測定を行い、濃度を決定した。その結果を図38に示す。

[0168] (3) 環状Nluc mRNAに対するcsRNA (Nluc-csRNA__polyA, Nluc-csRNA__polyA__OMe, Nluc-csRNA__polyA__LNA) の合成

(a) RNA合成

RNA合成は 0.2 μ molスケールで行い、日本テクノサービス株式会社 NTS M-2-MX DNA/RNA合成機又はNRs-4A10R7 DNA/RNA合成機を使用した。RNA固相合成に用いたホスホアミダイトには、rA (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Adenosine (n-acetyl) OP), rC (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Cytidine (n-acetyl) OP), rG (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Guanosine (n-acetyl) OP), U (5'-DMT-2'-TOM-ribo-Uridine OP) (ChemGenes) を使用した。リン酸化試薬には、5' phosphate-ON Reagent (ChemGenes) を使用した。2'-OMe RNAアミダイトには、2'-OMe-C-CE-phosphoramidite、2'-OMe-G(iBu)-CE-phosphoramidite (ChemGenes) を使用した。LNAアミダイトには、MBN-Ganosine (N, N-DMF)-phosphoramidite (ChemGenes)、MBN-5'-Methyl-Cytidine (N-bz)-phosphoramidite (ChemGenes) を使用した。CPGは3'-TOM-rib

o Cytidine (n-acetyl) 2'-lcaa CPG 1000Å, 3'-TOM-ribo Adenosine (n-acetyl) 2'-lcaa CPG 1000Å (ChemGenes)、3'-phosphate ON lcaa CPG 1000Åを使用した。合成後、CPGを1.5mLループ付きスクリーチューブ（ザルスタッ）へ移し、40% aq. methylamine/28% aq. ammonia (1:1) 1.0mLを加えて65℃で20分インキュベートした。Millex LH 0.45μmフィルターを用いてろ過し、滅菌水（500μL）で洗い込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1M TBAF in THF 1.0mLを加え溶解させ、室温に一晩静置した。1M Tris-HCl緩衝液（pH7.5）1.0mLを加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。NAP-25カラム（GE Healthcare）を用いて脱塩を行った。逆相HPLCにより精製した。HPLC（HITACHI）条件；カラム：hydroisphere C18 column（4.6×250mm；YMC）、移動相：A）50mM TEAA緩衝液（pH7.0）、5%アセトニトリル、B）アセトニトリル、グラジエント：0-20min B conc. 0% to 20%、流速：1.0mL/min

15% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）（アクリルアミド：ビスアクリルアミド=19:1（wt/wt）、7.5M 尿素）にて分析した。PAGEには、TBE緩衝液（89 mM Tris-borate, 2mM EDTA, pH8.3）を用いた。LC/MSに分析した。LC/MS（agilent）条件；ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 0.3 mL/min, A；8.6 mM TEA/100mM HFIP solution, B；MeOH, 0-30%/20min その結果を図39に示す。

LC-MS

Nluc-sRNA__polyA； calcd. 16259.1, o

bs. 16261.4

Nluc-sRNA_polyA_OMe; calcd. 16287.

1, obs. 16289.5

Nluc-sRNA_polyA_LNA; calcd. 16373.

2, obs. 16375.2

[0169] (4) リン酸化RNAのキャップ化反応

1. 5mLチューブに、それぞれ終濃度20 μ M RNA, 10mM CaCl₂となるように混合し、凍結乾燥により乾固させた後、DMSOに溶解した。そこへDMSOに溶解した1m(m7GDP)·Na (Hongo ne Biotech)を終濃度10mM、2-ニトロイミダゾールを終濃度10mMとなるように加えた。その反応液を55℃で3時間インキュベートした。反応液を滅菌水により2倍希釈した後に、イソプロパノール沈殿を行った。HPLC精製した。HPLC条件; カラム: hydrosphere C18 column (4.6 $\times$ 250mm; YMC)、移動相: A) 50mM TEAA緩衝液(pH7.0), 5%アセトニトリル、B) アセトニトリル、グラジエント: 0-20min B conc. 0% to 20%、流速: 1.0mL/min

LC/MSに分析した。LC/MS (agilent) 条件; ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 0.3mL/min, A; 8.6mM TEA/100mM HFIP solution, B; MeOH, 0-30%/20min

HPLC精製したキャップ化RNAは、イソプロパノールと酢酸ナトリウム(pH5.2)を用いて沈殿させた。

LC-MS

Nluc-csRNA_polyA; calcd. 16699.3,
obs. 16701.0

Nluc-csRNA_polyA_OMe; calcd. 16727.
4, obs. 16728.7

Nluc-sRNA_polyA_LNA; calcd. 16813.5, obs. 16814.9

[0170] (5) RNAの化学合成

Universal UnyLinker Support 2000 Å CPG (ChemGenes) を用いて、核酸自動合成機で合成した。5' 末端は5' -Phosphate-ON Reagent (ChemGenes) を用いてリン酸化した。合成語、CPGを1.5 mL ループ付きスクリーチューブ (ザルスタット) へ移し、40% aq. methylamine / 28% aq. ammonia (1:1) 1 mL を加えて 65°C で30分間インキュベートした。氷上で冷却した後、Millex LH 0.45 µm フィルターを用いてろ過し、MQ水1 mL で洗込み、遠心エバポレーターで乾固させた。1M TBAF in THF 1 mL を加え、室温に一晩静置した。1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1 mL を加え、遠心エバポレーターで有機溶媒を留去した。NAP-25 カラム (GE Healthcare) を用いて脱塩した後、アルコール沈殿と逆相HPLCによる精製を行った。アセトニトリルを遠心エバポレーターで除去した後に、アルコール沈殿を行い、260 nm における吸光度測定から核酸水溶液の濃度を決定した。その結果を図40に示す。

[表6]

LC-MS

<u>Nluc-sRNA_natural</u>	<u>Nluc-sRNA_LNA_10/20_3' type</u>	<u>Nluc-sRNA_LNA_5/20_3' type</u>
Calcd. 8052.8091	Calcd. 8243.0541	Calcd. 8154.9451
Obs. 8051.69	Obs. 8241.99	Obs. 8153.64
<u>Nluc-sRNA_LNA_10/20 type</u>	<u>Nluc-sRNA_LNA_5/20 type</u>	<u>Nluc-sRNA_LNA_6/20 type</u>
Calcd. 8243.0541	Calcd. 8126.8911	Calcd. 8152.9291
Obs. 8242.05	Obs. 8125.75	Obs. 8151.74

[0171] (6) RNAの化学的キャップ化

1.5 mL チューブにRNA水溶液, CaCl₂ 水溶液を入れ、凍結乾燥により乾固させた。そこへDMSOに溶解したキャップ化試薬と2-nitroimidazoleを加え、DMSOでメスアップした。最終的なキャッ

プ化反応液の組成は以下のとおりである（ $20\text{ }\mu\text{M}$ RNA, 10 mM CaCl_2 , 10 mM キャップ化試薬, 10 mM 2-nitroimidazole, DMSOによりメスアップ）。反応液を 55°C で3時間インキュベートした後、アルコール沈殿と逆相HPLCによる精製を行った。アセトニトリルを遠心エバポレーターで除去した後に、凍結乾燥により濃縮し、 260 nm における吸光度測定から核酸水溶液の濃度を決定した。その後、変性PAGEによる解析を行った。RNA 10 pmol を2×formamide loading solutionと混合し、 80°C で5分間加熱した後にゲルにロードした。 25 mA で2時間時間泳動し、SYBR Green IIによる染色後ChemiDocによりゲルを撮影した。キャップ化効率はバンド強度から算出した。その結果を図41、図42に示す。

[表7]

LC-MS

<u>Nluc-csRNA_natural</u>	<u>Nluc-csRNA_LNA_10/20_3' type</u>	<u>Nluc-csRNA_LNA_5/20_3' type</u>
Calcd. 8490.0077	Calcd. 8680.2527	Calcd. 8592.1437
Obs. 8491.40	Obs. 8680.93	Obs. 8592.84
<u>Nluc-csRNA_LNA_10/20 type</u>	<u>Nluc-csRNA_LNA_5/20 type</u>	<u>Nluc-csRNA_LNA_6/20 type</u>
Calcd. 8680.2527	Calcd. 8564.0897	Calcd. 8590.1277
Obs. 8681.02	Obs. 8564.98	Obs. 8590.83

[0172] アニーリング溶液（ $0.2\text{ }\mu\text{M}$ 環状NanoLuc mRNA, $0.4\text{ }\mu\text{M}$ csRNA（配列番号56～58）, 10 mM Tris-HCl（ $\text{pH}7.5$ ）, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA（ $\text{pH}8.0$ ））を調製し、 80°C で5分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷やすことで、mRNAとcsRNAのアニーリングを行った。Mixture-2 w/o DTT $4.85\text{ }\mu\text{L}$, 50 mM DTT $1.648\text{ }\mu\text{L}$, HeLa細胞抽出液 $8.7\text{ }\mu\text{L}$ を混合し、室温で10分間インキュベートした後、Mixture-3 $1.8\text{ }\mu\text{L}$ とアニーリング溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ を添加した。 32°C で4時間インキュベートした後に、反応液 $1\text{ }\mu\text{L}$ を1×Glo Lysis Buffer（Promega）で希釈したNa

no-Glo (登録商標) Luciferase Assay Substrate (Promega) 20 μ Lと混合し、発光測定を行った。

[0173] 図45 (a) は、化学修飾を導入したcsRNAの配列を示している。mRNAとの相補鎖領域は下線で示した。N_m, 2' OMe; bold letters, LNA。配列はすべて5' → 3' の方向で記載した。(b) は、HeLa細胞抽出液におけるルシフェラーゼ発光測定の図である。circ. Nluc mRNAの発光強度を1としたときの相対値を示した。エラーバーは3回の実験平均の標準誤差とした。

これらの結果から、アニーリングをした場合 (w/ annealing) では、どのcsRNAでもキャップ構造依存的な翻訳促進が見られた。LNAを導入することで効果は増大した。一方、アニーリングをしなかった場合 (w/o annealing)、Nluc-csRNA__polyA__LNAの翻訳促進効果が高く、LNAを含むことによりアニールなしでも優れた効果を発揮することがわかった。

[0174] 14. LNA修飾を導入したcsRNAと環状mRNAのHeLa細胞における翻訳反応 (図46)

[0175] (1) アニーリング・発光測定

アニーリング溶液 (0.1 μ M 環状NanoLuc mRNA, 1 μ M csRNA (配列番号59~64), 10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 1mM EDTA (pH8.0)) を調製し、80℃で5分間加熱した。その後、室温になるまで徐々に冷やすことで、mRNAとcsRNAのアニーリングを行った。トランスフェクション前日に、96wellプレートに、 1.5×10^4 cells/wellで10% FBS含有D-MEM (Wako) 100 μ Lに懸濁したHeLa細胞を播種した。翌日培地を除去し、Lipofectamine (登録商標) MessengerMAX (登録商標) (Thermo Fisher Scientific) を用いてアニーリングしたmRNAをトランスフェクションした (Lipofectamine (登録商標) M

essengerMAX (登録商標) 0.3 μ L, アニール溶液 1 μ L, Opti-MEM (登録商標) (Thermo Fisher SCIENTIFIC) で100 μ Lにメスアップ)。37℃、5% CO₂ 環境下で3時間インキュベートした後に、培地を除去し10% FBS含有 D-MEM (Wako) 100 μ Lを添加した。再び37℃、5% CO₂ 環境下で3時間インキュベートした後に培地を除去し、1×Glo Lysis Buffer (Promega) 20 μ Lを加えライセート化した。ライセート10 μ Lを1×Glo Lysis Buffer (Promega) で希釈したNano-Glo (登録商標) Luciferase Assay Substrate (Promega) 20 μ Lと混合し、発光測定を行った。

[0176] 図46 (a) は、翻訳に用いたcsRNAの配列。mRNAとの相補鎖領域は下線で示した。Bold letters, LNA。配列はすべて5' → 3' の方向で記載した。(b) は、HeLa細胞におけるルシフェラーゼ発光測定。mRNA (cap (-)) 又はmRNA (cap (+)) の発光強度を1としたときの相対値を示した。エラーバーは3回の実験平均の標準誤差とした。

これらの結果から、Nluc-csRNA__LNA__6/20 type では天然のcsRNAと比較して本格活性の向上がみられる。

請求の範囲

- [請求項1] 開始コドンから始まりタンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の上流領域と、を有し、前記上流領域にキャップ構造を有する分岐部を備えることを特徴とするキャップ化RNA。
- [請求項2] 前記分岐部が下記（a）～（c）のいずれか少なくとも1つの構造を有することを特徴とする請求項1に記載のキャップ化RNA
- （a）前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつ前記キャップ構造を有するキャップ化プローブが前記上流領域にハイブリダイズされている、
- （b）前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられている、
- （c）前記RNAが直鎖状RNAであり、前記上流領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有し、かつ各枝分かれに前記キャップ構造が設けられている。
- [請求項3] 前記（a）において、前記RNAが環状RNAであり、
- 該環状RNAの前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記環状RNAの前記上流領域にハイブリダイズされていることを特徴とする請求項2記載のキャップ化RNA。
- [請求項4] 前記（a）において、前記RNAが直鎖状RNAであり、
- 該直鎖状RNAの前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記直鎖状RNAの前記上流領域にハイブリダイズされていることを特徴とする請求項2に記載のキャップ化RNA。
- [請求項5] 前記（b）において、前記RNAが環状RNAであり、
- 該環状RNAの前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ

構造が設けられていることを特徴とする請求項 2 に記載のキャップ化 RNA。

[請求項6]

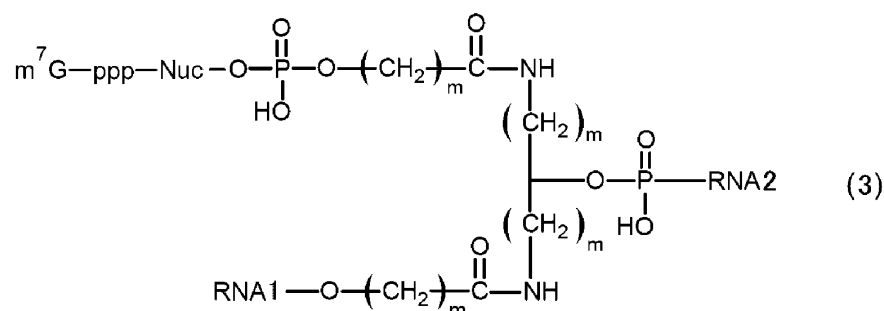
前記 (b) において、前記 RNA が直鎖状 RNA であり、

該直鎖状RNAの前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられていることを特徴とする請求項2に記載のキャップ化RNA。

[請求項7]

前記（b）において、下記式（3）で示される構造を有することを特徴とする請求項2に記載のキャップ化RNA。

[化1]

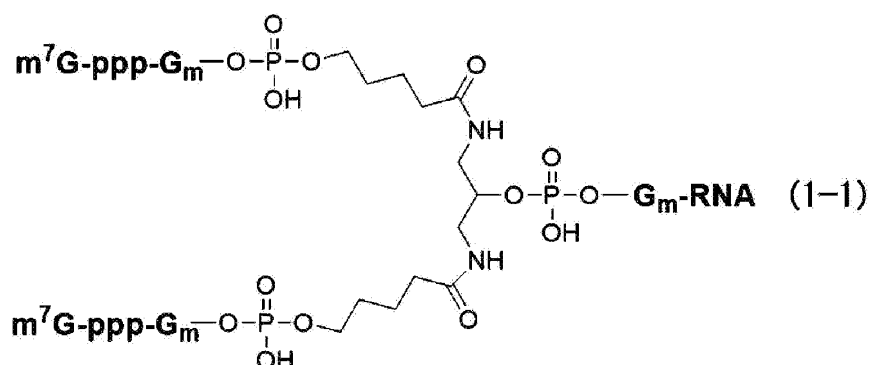


(ここで、 m^iG はキャップを示し、 p はリン酸基を示す。Nucは天然型又は非天然型のヌクレオチドが1つ以上連結したポリヌクレオチドを示す。 m は1~5の整数を示し、複数の m は互いに同一であっても異なってもよい。RNA1とRNA2は主鎖を構成するRNAを示し、RNA1は3'末端側で、RNA2は5'末端側で、それぞれ分岐構造の部分と連結されている。式(3)のRNAは、RNA1の5'末端とRNA2の3'末端が連結して環状構造を形成した環状RNAでもよく、連結せずに直鎖状RNAでもよい。)

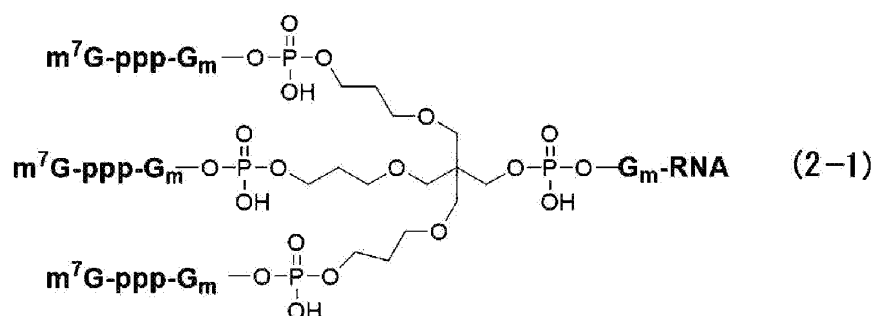
[請求項8]

前記(c)において、下記式(1)又は式(2)で示される構造を有することを特徴とする請求項2に記載のキャップ化RNA。

[化4]



[化5]



[請求項10] 前記RNAが、複数の翻訳領域を有することを特徴とする請求項1に記載のキャップ化RNA。

[請求項11] 請求項1に記載のキャップ化RNAの製造方法であって、下記(a)～(c)のいずれか少なくとも1つの工程を有することを特徴とするキャップ化RNAの製造方法

(a) 前記上流領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブを前記上流領域にハイブリダイズさせる、又は、

(b) 前記上流領域の一部に前記RNAを構成する主鎖から分岐する分岐鎖を有する前記RNAを合成したのち、前記分岐鎖に前記キャップ構造を結合させる、

(c) 前記RNAが直鎖状RNAであり、前記上流領域の主鎖の5'末端が2以上に枝分かれするブランチ構造を有するRNAを合成した

のち、各枝分かれに前記キャップ構造を結合させる。

[請求項12] 請求項1に記載のキャップ化RNAと、該キャップ化RNAを鋳型として前記翻訳領域がコードする前記タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、を備えることを特徴とするタンパク質の製造装置。

[請求項13] 請求項1に記載のキャップ化RNAを、該キャップ化RNAを鋳型として前記翻訳領域がコードする前記タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系に添加して、前記タンパク質を発現させることを特徴とするタンパク質の製造方法。

[請求項14] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出装置であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の上流領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する前記上流領域と、を有する環状RNAからなる検出用プローブと、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状RNAの前記上流領域に前記目的RNAをハイブリダイズさせてキャップ化RNAを生成させる手段と、

前記キャップ化RNAを添加することで前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する手段と、を備えることを特徴とする目的RNAの検出装置。

[請求項15] RNAの5'末端にキャップ構造を有する目的RNAの検出方法であって、

開始コドンから始まり標識タンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の上流領域であって検出対象となる前記目的RNAの配列の一部又は全部と相補的な配列を有する上流領域と、を有する環状RNAからなる検出用プローブを用意する工程と、

前記目的RNAを含む試料に前記環状RNAを添加して前記環状R

N A の前記上流領域に前記目的 R N A をハイブリダイズさせてキャップ化 R N A を生成させる工程と、

前記標識タンパク質を発現可能な真核細胞の発現系に該キャップ化 R N A を添加して前記標識タンパク質を発現させる工程と、

前記発現系で発現した前記標識タンパク質を検出する工程と、を備えることを特徴とする目的 R N A の検出方法。

[請求項16] 開始コドンから始まりタンパク質をコードする翻訳領域と、前記開始コドンの上流側の非翻訳領域と、を有する R N A の前記非翻訳領域にキャップ構造を有するキャップ化 R N A であって、下記 (a) ~ (c) のいずれか少なくとも 1 つの構造を有することを特徴とするキャップ化 R N A

(a) 前記非翻訳領域の一部又は全部の配列と相補的な配列を有し、かつキャップ構造を有するキャップ化プローブが前記非翻訳領域にハイブリダイズされている、

(b) 前記非翻訳領域の一部に前記 R N A を構成する主鎖の途中から分岐する分岐鎖が設けられており、該分岐鎖に前記キャップ構造が設けられている、

(c) 前記 R N A が直鎖状 R N A であり、前記非翻訳領域の主鎖の 5' 末端が 2 以上に枝分かれするブランチ構造を有し、かつ各枝分かれに前記キャップ構造が設けられている。