

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2018年1月4日(04.01.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/003809 A1

(51) 国際特許分類:  
*C12N 15/09* (2006.01) *C40B 40/06* (2006.01)  
*C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/023607

(22) 国際出願日: 2017年6月27日(27.06.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2016-127002 2016年6月27日(27.06.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 齊藤 博英 (SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 小松 リチャード 馨 (KOMATSU, Richard Kaoru); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 奥山 尚一, 外 (OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目13番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: RNA STRUCTURE LIBRARY

(54) 発明の名称: RNA構造ライブラリ

(57) Abstract: An RNA probe including a functional structural unit of an RNA is prepared according to the following steps: (1) a step for recognizing one or more stem structures included in an RNA on the basis of sequence information of the RNA; (2) a step for extracting a motif region with reference to said one or more stem structures that has/have been recognized; (3) a step for adding an auxiliary stem region to the extracted motif region; and (4) a step for adding, to the auxiliary stem region, a barcode region which is a complementary sequence to the DNA barcode sequence. Also provided is a method for detecting a protein-binding RNA by employing an RNA probe including a functional structural unit of an RNA.

(57) 要約: 以下の工程により、RNAの機能構造単位を含むRNAプローブを調製する: (1) RNAの配列情報に基づいてRNA中に含まれる1または複数のステム構造を認識する工程、(2) 認識された前記1または複数のステム構造を基準としてモチーフ領域を抽出する工程、(3) 抽出された前記モチーフ領域に、補助ステム領域を付加する工程、および(4) 前記補助ステム領域に、DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域を付加する工程。また、RNAの機能構造単位を含むRNAプローブを用いたタンパク質結合性RNAの検出方法を提供する。



WO 2018/003809 A1

## 明 細 書

発明の名称：RNA構造ライブラリ

### 技術分野

[0001] 本発明は、RNAの二次構造単位に基づいたRNAライブラリおよびそれを用いたスクリーニング方法に関する。

### 背景技術

[0002] 近年、タンパク質に翻訳されることなく、それ自身が機能性分子として働くRNA、いわゆる非コードRNAまたは機能性RNAが注目を集めている。例えば、機能性RNAは、タンパク質と特異的に相互作用し、RNA-タンパク質 (RNP) 複合体を形成し、遺伝子発現やスプライシングなどの分子機構を制御することが知られる (非特許文献1)。機能性RNAは、タンパク質と同様に、立体構造がその機能に重要であると考えられており、RNP相互作用は、RNAの構造変化によって大きく影響される。そのため、RNAの構造異常によって生じるRNAの機能の破綻が、疾患発症のリスクにも関係するとも報告されている。また、例えば、mRNAの非コード領域に存在するタンパク質発現制御配列として、内部リボソーム進入部位 (IRES) が知られるが、IRESの機能も、その立体構造により制御されており、立体構造の変化によって大きく影響される。このように、特定の構造を有する非コードRNAは生命の機能に重要な種々の役割を果たしており、RNAの構造に着目したRNAの機能解析は、医学・生物学の研究において必須であるといえる。

[0003] 近年、RNA Bind-n-Seq法 (非特許文献2) やRNAcompete法 (非特許文献3、4) などに基づくRNAライブラリを用いたRNP相互作用の解析が行われている。しかし、これらの方法では、ランダムに生成された短い人工合成RNA配列を解析対象としており、実際に生体内に存在する複雑高次のRNA構造については解析できないという問題があった。また、ヒトおよびウイルスのゲノム配列に含まれるIRESを同定する研究も行われているが (非特許文献5)、この研究では、ライブラリに含まれるRNAの長さの制限により、解析対象のRNA

が短いランダム配列に分割されている。そのため、元のRNA構造が保存されない一方で、実在しないRNA構造が多数ライブラリに含まれてしまい、その結果として、偽陰性・擬陽性が多く生じ、正確なRNA機能構造解析が行えないという問題があった。

[0004] そこで、本発明者らは、生体内に実在するRNA構造を反映した機能性RNAの解析方法として、miRBaseに登録されているPre-miRNAの構造情報に基づくRNAライブラリを用いたRNP相互作用の解析方法を確立した（特許文献1）。しかし、この方法では、miRBaseに登録されているmiRNA前駆体のループ構造以外のRNA構造をライブラリに含めることができないため、ごく限られたRNA構造についてしか解析できず、汎用性が低いことが問題となっていた。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2015/105179号

#### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Keene, J.D., Nat. Rev. Genet., Vol. 8, pp. 533-543 (2007)

非特許文献2：Lambert, N. et al., Mol. Cell, Vol. 54, pp. 887-900 (2014)

非特許文献3：Ray, D. et al., Nat. Biotechnol., Vol. 27, pp. 667-670 (2009)

非特許文献4：Ray, D. et al., Nature, Vol. 499, pp. 172-177 (2013)

非特許文献5：Weingarten-Gabbay, S. et al., Science, Vol. 351, aad4939-aad4939 (2016)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、従来技術の諸問題を解消し、広範なRNAから抽出された機能構造単位を含むRNAライブラリを提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意研究の結果、RNAの配列情報のみに基づいてRNAの機能構造単位を正確に抽出し、生体内に実在するRNA構造を再現したRNAライブラリを作製することに成功した。

[0009] すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1] 以下の工程を含むRNAプローブの調製方法：

(1) RNAの配列情報に基づいてRNA中に含まれる1または複数のステム構造を認識する工程、

(2) 認識された前記1または複数のステム構造を基準としてモチーフ領域を抽出する工程、

(3) 抽出された前記モチーフ領域に、第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを付加する工程、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する、および、

(4) 前記補助ステム領域に、DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域を付加する工程。

[2] 前記工程(2)が、

(2a) 認識された前記ステム構造から1または複数を選択する工程、

(2b) 選択されたステム構造を仮想ループ構造に置き換える工程、および、

(2c) 選択するステム構造を変更して前記(2a)～(2b)を繰り返す工程

を含む、[1]に記載の調製方法。

[3] 以下の(1)～(3)の領域を含むRNAプローブ：

(1) DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域、

(2) 第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを含み、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して

相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する補助ステム領域、および、

(3) 第一の補助ステム部分と第二の補助ステム部分とを連結する領域であって、多分岐ループ部分を有する高次構造を形成する配列を含むモチーフ領域。

[4] 前記DNAバーコード配列に対する相補配列が、補助ステム領域および／またはモチーフ領域との間で塩基対または擬似ノット形成をしない配列である、[3]に記載のRNAプローブ。

[5] 前記DNAバーコード配列に対する相補配列の5'末端が、ウラシル以外の塩基である、[3]または[4]に記載のRNAプローブ。

[6] 3'末端を蛍光標識された、[3]～[5]のいずれか1項に記載のRNAプローブ。

[7] [3]～[6]のいずれか1項に記載のRNAプローブを複数含み、前記複数のRNAプローブがそれぞれ異なる配列のモチーフ領域を含む、RNAプローブライブラリ。

[8] 支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイと、[7]に記載のRNAプローブライブラリとを含む、RNA分析用キット。

[9] 支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイと、[7]に記載のRNAプローブライブラリとをハイブリダイズさせることにより製造される、RNAマイクロアレイ。

[10] 以下の工程を含む、タンパク質と結合するRNAを検出する方法：

(1) 請求項[3]～[6]のいずれか1項に記載のRNAプローブと対象タンパク質とを接触させる工程、

(2) 工程(1)で得られたRNAプローブと対象タンパク質との結合体を単離する工程、

(3) 工程(2)で単離された結合体からRNAプローブを抽出する工程、

(4) 工程(3)で抽出されたRNAプローブを、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイに接触させる工程、

(5) 工程(4)でDNAバーコード配列とハイブリダイズしたRNAプローブを特定する工程、および、

(6) 工程(5)で特定されたRNAプローブのモチーフ領域の配列を含むRNAを、当該対象タンパク質と結合するRNAとして検出する工程。

## 発明の効果

[0010] 本発明によれば、RNAの機能構造単位が分断されることなくRNAライブラリに含まれるため、従来では解析が困難であった、複数のループ構造を含む大きなRNA構造単位の機能を解析することが可能となる。また、RNAの機能構造単位をRNAの配列情報のみに基づいて抽出できることから、広範なRNAから抽出された機能構造単位を解析することができる。

## 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、従来公知のRNAライブラリ調製方法の概要を示す図である。  
[図2]図2は、本発明のRNA構造ライブラリ調製方法の概要を示す図である。  
[図3]図3は、LIN28A結合性モチーフの構造解析の結果を示す図である。  
[図4]図4は、新規および公知のLIN28A結合性モチーフの構造を示す図である。  
[図5]図5は、新規LIN28A結合性モチーフのLIN28A結合親和性を評価したゲルシフトアッセイの結果を示す図である。  
[図6]図6は、HEK293FT細胞から得た細胞懸濁液について、抗eIF3b抗体を用いて行った共免疫沈降の結果を示す図である。  
[図7]図7は、抗eIF3b抗体を用いた共免疫沈降により濃縮されたRNA構造の傾向を示す図である。  
[図8]図8は、LIN28Aを用いた免疫沈降により濃縮されたRNA構造の傾向を示す図である。  
[図9]図9は、eIF3複合体に対する結合親和性ランキング上位のRNAの二次構造を示す図である。  
[図10]図10は、eIF3複合体に対する結合親和性ランキング下位のRNAの二次構造を示す図である。

[図11]図 1 1 は、2回の独立したスクリーニングにより検出された、各RNA構造に対応する蛍光強度をプロットした散布図である。

[図12]図 1 2 は、HIV-1 gag IRESの構造を示す図である。

[図13]図 1 3 は、スクリーニングで上位にランクされたRNAのeIF3複合体に対する結合親和性を確認したプルダウンアッセイの結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0013] 本発明は、以下の工程を含むRNAプローブの調製方法を提供する：

(1) RNAの配列情報に基づいてRNA中に含まれる1または複数のステム構造を認識する工程、

(2) 認識された前記1または複数のステム構造を基準としてモチーフ領域を抽出する工程、

(3) 抽出された前記モチーフ領域に、第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを付加する工程、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する、および、

(4) 前記補助ステムに、DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域を付加する工程。

[0014] 従来公知のRNAライブラリ調製方法の概要を図1に、本発明のRNAプローブの調製方法の概要を図2aに示す。図2aに示すように、本発明のRNAプローブの調製方法は、任意のRNAの配列情報からRNAの機能構造単位であるモチーフ領域を抽出して、RNAの機能構造単位に基づいたRNAプローブを調製するものである。

[0015] 本発明のRNAプローブとは、対象となる物質と相互作用する可能性がある配列を有するRNAを含む核酸分子、好ましくは、RNAからなる核酸分子である。本発明において、対象となる物質は、好ましくは、タンパク質である。

- [0016] 本発明のRNAプローブの調製方法では、RNAの配列情報に基づいて、RNA中に含まれる1または複数のステム構造を認識する。
- [0017] 本発明において、「ステム構造」とは、RNAに含まれる任意の核酸配列と当該核酸配列に対して相補的な配列とにより形成される二重らせん構造を意味する。本発明において、「相補的」とは、2つの核酸配列がハイブリダイズする能力を意味し、2つの配列がハイブリダイズすればよいことから、ステム構造を構成する2つの核酸配列は、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列相補性を有していればよい。
- [0018] 本発明のRNAプローブの調製方法において、RNA中のステム構造は、例えばCentroidFold (Hamada, M. et al., *Bioinformatics*, Vol. 25, pp 465-473, 2009) やIPknot (Sato, K. et al., *Methods Biochem. Anal.*, Vol. 27, pp. i85-i93, 2011) などのRNA二次構造予測ソフトを用いて認識することができる。
- [0019] 本発明のRNAプローブの調製方法において、RNAの配列情報には任意のものを使用することができ、例えば、UTRdb (Grillo, G. et al., *Nucl. Acids Res.*, Vol. 38, D75-D80, 2010)、IRESite (Mokrejs, M. et al., *Nucl. Acids Res.*, Vol. 38, D131-D136, 2010)、GenBank (Benson, D. et al., *Nucl. Acids Res.*, Vol. 41, D36-D42, 2013)、RNAcentral (RNAcentral Consortium, *Nucl. Acids Res.*, Vol. 43, D123-D129, 2015) などのRNA配列データベースからダウンロードしたものを使用することができる。また、RNAの配列情報だけでなく構造情報も含むデータベースからRNAの配列情報を入手してもよく、例えば、Rfam (Nawrocki, E. P. et al., *Nucl. Acids Res.*, Vol. 43, D130-D137, 2015)、Structure Surfer (Berkowitz, N. D. et al., *BMC Bioinformatics*, Vol. 17, p. 215, 2016) などからダウンロードしたものを使用することができる。
- [0020] 次いで、認識されたRNA中のステム構造を基準として、当該RNAにおけるモチーフ領域を抽出する。
- [0021] 本発明において、「モチーフ領域」とは、RNAが対象となる物質と相互作用

するための機能構造単位を意味する。本発明のRNAプローブの調製方法において抽出されるモチーフ領域は、単一のステムループ構造（ヘアピンループ構造）からなる場合もあれば、複数のステムループ構造（多分岐ループ構造）を含む場合もある。本発明のRNAプローブの調製方法では、ステム構造を基準としてモチーフ領域を抽出するため、モチーフ領域を分断することなく、RNA中に実在する機能構造単位を反映したRNAプローブを調製することができる。モチーフ領域は、その機能が維持されていることを限度として、任意の配列長であってよく、例えば500塩基以下、400塩基以下、300塩基以下、200塩基以下、150塩基以下、100塩基以下、50塩基以下であってよい。

[0022] ここで、モチーフ領域が複数のステムループ構造を含む場合、モチーフ領域を分断せずに抽出するためには、認識されたRNA中のステム構造の1または複数を選択する工程と、選択されたステム構造を仮想ループ構造に置き換える工程とを、選択するステム構造を変更して繰り返すことが好ましい。本発明において「仮想ループ構造」とは、本来ステム構造を構成する核酸配列およびその相補的な配列が、ハイブリダイズせずに一本鎖ループとして存在するとして仮定された構造である。選択するステム構造を変更して上記工程を繰り返すことにより、複数のステムループ構造を含み複雑な高次構造を形成するモチーフ領域についても正確に抽出することが可能となる。

[0023] 次に、抽出された前記モチーフ領域に、第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを付加する（図2bおよび2c）。第一の補助ステム部分と第二の補助ステム部分はハイブリダイズし、二本鎖補助ステムを形成する。ここで、第一の補助ステム部分配列は任意の核酸配列であってよく、第二の補助ステム部分配列は、当該第一のステムと相補的な配列であれば、任意の核酸配列であってよい。例えば、第一の補助ステム部分配列としては配列番号2に示される配列を、第二の補助ステム部分配列としては配列番号3に示される配列を、それぞれ使用することができる。以下に記載するように、本発明では、RNAプローブの3'末端に蛍光色素標識されたシチジン（3',5' -cytidine bisphosphate-Cy5 (pCp-Cy5)）を付加させることが好適であ

ることから、第一の補助ステム部分配列の5'末端にはグアニン（G）を付加することが望ましい。蛍光色素標識をシチジン（C）以外の塩基に対して標識する場合は、第一の補助ステム部分配列の5'末端には、対合する塩基を選択して付加することが望ましい。

[0024] さらに、前記補助ステムに、DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域を付加する（図2bおよび2c）。本発明のDNAバーコード配列には、タグ（特表平10-507357号公報、特表2002-518060号公報）、ジップコード（特表2001-519648号公報）もしくは正規直交化配列（特開2002-181813号公報）、バーコード配列（Xu, Q. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 106, pp. 2289-2294, 2009）などを使用できる。DNAバーコード配列は、交差反応性（クロスハイブリダイゼーション）が少ないことが望ましい。また、DNAバーコード配列は、20～30塩基の配列であることが好ましく、特に好ましくは25塩基である。

[0025] 本発明のRNAプローブは、上記工程によりその配列が決定されれば、従来公知の任意の遺伝子工学的的方法により合成されることができ、好ましくは、RNAプローブは、合成の受託業者に委託して合成された鋳型DNAを転写することによって作製することができる。DNAからのRNAへの転写を行うため、RNAプローブの配列を含むDNAは、プロモーター配列を有していても良い。特に限定されないが、好ましいプロモーター配列として、T7プロモーター配列が例示される。T7プロモーター配列を用いた場合、例えば、ライフテクノロジーズ社より提供されるMEGAscript<sup>®</sup>（商標） T7 Transcription Kitを用いて所望のRNAプローブ配列を有するDNAよりRNAを転写行うことができる。本発明において、RNAは、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルのみならず、修飾RNAであってもよい。修飾RNAは、例えば、プソイドウリジン、5-メチルシトシン、5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、2-チオウリジン、およびN6-メチルアデノシンが例示される。

[0026] 本発明のRNAプローブの調製方法によれば、モチーフ領域を分断することなくRNAプローブ中に含めることができ、RNAプローブ中のモチーフ領域は、RNA

中に実在する高次構造を再現することができる。

[0027] すなわち、本発明は、以下の（１）～（３）の領域を含むRNAプローブを提供する：

（１）DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域、

（２）第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを含み、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する補助ステム領域、および、

（３）第一の補助ステム部分と第二の補助ステム部分とを連結する領域であって、多分岐ループ部分を有する高次構造を形成する配列を含むモチーフ領域。

[0028] 本発明のRNAプローブに含まれるモチーフ領域には、上記のRNAプローブの調製方法により、任意のRNA配列情報から抽出したものをを用いることができる。または、本発明のRNAプローブに含まれるモチーフ領域には、RNAストラクチュローム研究によりすでに特定された任意のRNA二次構造データから選択されたものをを用いてもよい。

[0029] 本発明のRNAプローブは、DNAバーコード配列に対する相補配列が、補助ステム領域および／またはモチーフ領域との間で塩基対または擬似ノット形成をしない配列であることが好ましい。塩基対または擬似ノット形成をしない配列は、例えば、IPknot (Sato, K. et al., *Methods Biochem. Anal.*, Vol. 27, pp. i85-i93, 2011) などのRNA二次構造予測ソフトを用いることにより選択することができる。

[0030] 本発明のRNAプローブは、DNAバーコード配列に対する相補配列の5'末端が、ウラシル以外の塩基であることが好ましい。これにより、鋳型DNAからRNAプローブへの転写効率のばらつきを防ぐことができるため、RNAプローブライブラリを調製するために複数のRNAプローブを同時に合成する上で、好ましい。

[0031] 本発明のRNAプローブは、検出のために、蛍光色素（例えば、FITC、PE、Cy

3、Cy5など）、放射性同位体、ジゴキシゲニン（DIG）、ビオチンなどにより標識されてよい。標識は、予め標識した核酸をプローブ合成時に取り込ませることによって行うことができ、例えば、第一の補助ステム部分配列の5'側に設置されたグアニン（G）に対して相補的であるシチジン（C）を蛍光標識し（例えばpCp-Cy5）、3'末端に取り込ませることで標識することができる。

[0032] また、本発明は、それぞれ異なる配列のモチーフ領域を含む複数のRNAプローブを含むRNAプローブライブラリを提供する。本発明では、RNAプローブを有するマイクロアレイを準備するためには、多種類のRNAプローブを同時に用意することが好ましく、効率的にRNAプローブを含有するオリゴ核酸ライブラリ合成（Oligonucleotide Library Synthesis）技術を用いて行うことが好ましい。本発明において特に限定されないが、Oligonucleotide Library Synthesisは、Agilent Technologies社に委託することによって作製することができる。

[0033] 本発明のRNAプローブライブラリは、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイと組み合わせて、RNA分析用キットとして提供することができる。RNA分析用キットには、適宜追加の構成、例えば、緩衝液、容器、使用説明書などを含めてもよい。

[0034] または、本発明のRNAプローブライブラリは、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイとハイブリダイズさせて、RNAマイクロアレイとして提供することができる。

[0035] 本発明において、DNAバーコード配列を固定するための支持体としては、シリコンなどの半導体、ガラス、ダイヤモンドなどの無機物、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン等の高分子物質を主成分とするフィルムなどを使用することができる。また、基板の形状としては、スライドガラス、マイクロウェルプレート、マイクロビーズ、繊維型などが挙げられるが、それらに制限されない。

[0036] 支持体にDNAバーコード配列を付加する方法としては、予めDNAバーコード

配列を有する核酸にアミノ基、アルデヒド基、SH基、ビオチンなどの官能基を導入しておき、一方、支持体にも該核酸と反応し得る官能基（例えば、アルデヒド基、アミノ基、SH基、ストレプトアビジンなど）を導入し、両官能基間の共有結合で固定化用支持体と核酸を架橋する方法や、ポリアニオン性の核酸に対して、固定化用支持体をポリカチオンコーティングして静電結合を利用して核酸を固定化する方法などが挙げられるが、これらに限定されない。DNAバーコード配列の調製法としては、フォトリソグラフィ法を用いて核酸プローブを基板（例えば、ガラス、シリコンなど）上で1ヌクレオチドずつ合成するAffymetrix方式と、マイクロスポッティング法、インクジェット法、バブルジェット（登録商標）法などを用いて、予め調製されたDNAバーコード配列を有する核酸を基板上にスポッティングするStanford方式とが挙げられるが、30mer以上のプローブを用いる場合にはStanford方式、あるいは両者を組み合わせた手法を用いることが好ましい。DNAバーコード配列を付加された固定化用支持体は、受託業者に委託して作製することができる。

[0037] 本発明のRNAプローブライブラリは、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイとハイブリダイズさせることによって、支持体とRNAプローブを特異的に結合させることができる。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイズ用の溶液の塩濃度、温度、プローブ濃度、反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度などを適宜変更して実施することができる。

[0038] 本発明のRNAプローブライブラリを同一の支持体（例えば、1インチ×3インチのガラススライド）上にスポットすることが可能であり、例えば、500以上、1000以上、2000以上、3000以上、4000以上、5000以上、10000以上など、DNAマイクロアレイと同様の密度でRNAプローブ有するRNAマイクロアレイを提供することができる。

[0039] 本発明のRNAマイクロアレイに対し、溶媒中で任意のタンパク質を供することで、当該タンパク質に対して結合するRNAプローブを検出することができる。この際、溶媒は、例えば、Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Tween-20を含有する水溶液などであってよい。また、マイクロアレイに供

する対象タンパク質の濃度は、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nMであってよく、好ましくは、40 nM以下である。タンパク質の結合を検出するために、タンパク質は蛍光色素（例えば、FITC、PE、Cy3、Cy5など）、放射性同位体、ジゴキシゲニン（DIG）、ビオチンなどにより標識されていてよい。また、タンパク質に対する標識は、RNAプローブに対する標識とは異なることが好ましい。例えば、RNAプローブはCy5で標識され、タンパク質はCy3で標識されることができ。

[0040] また、本発明は、以下の工程を含む、タンパク質と結合するRNAを検出する方法を提供する：

- (1) 本発明のRNAプローブと対象タンパク質とを接触させる工程、
- (2) 工程(1)で得られたRNAプローブと対象タンパク質との結合体を単離する工程、
- (3) 工程(2)で単離された結合体からRNAプローブを抽出する工程、
- (4) 工程(3)で抽出されたRNAプローブを、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイに接触させる工程、
- (5) 工程(4)でDNAバーコード配列とハイブリダイズしたRNAプローブを特定する工程、および、
- (6) 工程(5)で特定されたRNAプローブのモチーフ領域の配列を含むRNAを、当該対象タンパク質と結合するRNAとして検出する工程。

[0041] 本発明の方法では、前記RNAプローブと対象タンパク質とを接触させる。この工程は、上記のRNAマイクロアレイとタンパク質との結合と同様の条件で行うことができる。この工程で使用するRNAプローブの量は、100  $\mu$ g以下でよく、好ましくは、1  $\mu$ gである。この工程で使用する対象タンパク質の量は、1 pmol、2 pmol、3 pmol、4 pmol、5 pmol、10 pmol、20 pmol、30 pmol、40 pmol、50 pmol、60 pmol、70 pmol、80 pmol、90 pmol、100 pmolであってよく、好ましくは20 pmol以下である。

[0042] 次いで、RNAプローブと対象タンパク質との結合体を単離する。結合体の単離を容易にするために、対象タンパク質をレジンや磁性ビーズなどの担体に

結合させてもよい。対象タンパク質を結合させるため、当該担体は、プロテイン A、G、または L、金属イオン（例えば、銅、ニッケル、亜鉛、コバルトのイオン）、ビオチン、グルタチオンなどと交差結合またはコーティングされていることが好ましい。対象タンパク質を担体と結合させるために、対象タンパク質にHisタグまたは GSTタグを付してもよいし、対象タンパク質に特異的な抗体を用いてもよい。

[0043] 次いで、単離された結合体からRNAプローブを抽出する。RNAプローブの抽出は、従来公知の核酸抽出法により行うことができる。

[0044] 次いで、抽出されたRNAプローブを、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイに接触させ、DNAバーコード配列とハイブリダイズしたRNAプローブを特定する。この工程は、上で記載したのと同様にして行うことができる。

[0045] 本発明のRNAプローブは、モチーフ領域を分断することなくRNAプローブ中に含み、元のRNAの機能を反映している。そのため、本発明の方法によれば、DNAバーコード配列とハイブリダイズしたRNAプローブのモチーフ領域の配列を含むRNAを、当該対象タンパク質と結合するRNAとして検出することができる。

## 実施例

[0046] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0047] <実施例 1. RNA構造ライブラリの作製>

以下に示す手順により、ヒト5' UTRについてのRNA構造ライブラリと、HIV-1ゲノムについてのRNA構造ライブラリとを作製した。

[0048] <1-1. ヒト5' UTRのRNA構造ライブラリの作製>

### A. RNA構造配列の選択

UTRdb (Grillo, G. et al., Nucl. Acids Res., Vol. 38, D75-D80, 2010) に登録されているヒトの5' UTRの全配列情報をダウンロードした。RNAの二次構造予測の正確性および以下の検証実験においてレポーターmRNAを作製す

る際のコストと難易度を考慮して、5' UTRの全長が400ヌクレオチド以下の配列のみを選択した。選択した配列について、RNAの二次構造予測を行った。ソフトウェアとしてはCentroidFold (Hamada, M. et al., Bioinformatics, Vol. 25, pp 465-473, 2009) を使用した。なお、オプションのgammaは4に設定した。

[0049] RNAの二次構造を、以下のアルゴリズムにより認識した。

(1) 入力されたRNA配列から予測された二次構造に含まれるヘアピンループ構造を認識する。

(2) 認識されたヘアピンループ構造を中心として、RNA構造を分割する。この作業を認識されたすべてのヘアピンループ構造について繰り返す。その結果、 $n$ 個のヘアピンループ構造が認識された場合には、 $n+1$ 個のRNA断片が形成される ( $n$ は自然数)。

(3)  $n$ 個目のヘアピンループ構造に着目する。 $n$ 個目のヘアピンループ構造は、第一のステム部分を含む $n$ 個目のRNA断片と、第一のステム部分に相補的な第二のステム部分を含む $n+1$ 個目のRNA断片とから構成される。すなわち、 $n$ 個目のRNA断片と $n+1$ 個目のRNA断片とを結合させることにより、末端にステム構造を持つRNA構造が選択される。この構造を記録する。

(4) 上記選択されたRNA構造中の二本鎖構造 (ステム部分) を一本鎖構造 (仮想ループ) に置き換える。

(5) (1) ~ (4) を繰り返す。

(6) 一本鎖構造に置き換えた部分を二本鎖構造に戻す。これにより、多分岐ループを持つRNA構造が選択される。

(7) ライブラリのサイズ上限 (116塩基) に収まるようにステム構造を短くする。

[0050] ライブラリのスケールを調整するために、以下の基準により、ライブラリに含まれるRNA構造の総数を9,000種類以下になるように選別した。

(1) UTRdbから、種間で保存された配列の情報を得た。

(2) 種間で保存された配列のうち、選択されたRNA構造配列と重複がないも

のを排除した。

(3) 配列の位置座標を定義した。RNA構造の5' 末端をL、3' 末端をR、種間で保存された配列の5' 末端をLc、3' 末端をRcとした。これらの値は、元の5' UTR配列の5' 末端から数えた数値で表される。

(4) 種間で保存された配列よりもRNA構造配列の方が長い場合:  $L \leq Lc+2$ 塩基かつ  $Rc-2 \leq R$  かつ  $(Rc-Lc) / (R-L)$  が0.13より大きい場合に採用する。

(5) RNA構造配列よりも種間で保存された配列の方が長い場合:  $Lc \leq L+4$ 塩基かつ  $R-4$ 塩基  $\leq Rc$  かつ  $(R-L)/(Rc-Lc)$  が0.5865より大きい場合に採用する。

(6) RNA構造配列と種間で保存された配列の長さが等しい場合:  $Lc \leq L+4$ 塩基かつ  $R-4$ 塩基  $\leq Rc$  かつ  $(Rc-Lc) / (R-L)$  が0.13より大きい場合に採用する。

(7) 最終的に選ばれたRNA構造の中にはIRE (Iron response element) やBTG 1の5' UTRに存在する細胞内でeIF3に相互作用する既知の機能を有するRNA構造が含まれた。

(8) ライブラリの余った枠には、LIN28A、MS2、Roquine、L7Ae、U1AなどのRNA結合性タンパク質が結合するRNA構造をポジティブコントロールとして採用した。

#### [0051] B. RNAプローブの調製

選別したRNAに、マイクロアレイでの解析のための補助配列を付加し、RNAプローブを調製した。RNAプローブは、鋳型DNAをin vitro転写することにより調製した。鋳型DNAは、5' 末端から順に、(i) CC + T7 promoter + G (24塩基)、(ii) バーコード配列 (25塩基)、(iii) G + Stem forward sequence (18塩基)、(iv) RNA構造配列 (6~116塩基)、および(v) Stem reverse sequence (17塩基) を含むように設計された。

#### [0052] (i) CC + T7 promoter + G (24塩基)

5' -CCGCGCTAATACGACTCACTATAG- 3' (配列番号1)

(ii) バーコード配列 (25塩基)

バーコード配列は、先行技術文献 (Xu, Q. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 106, pp. 2289-2294, 2009) に開示された240,000種の25塩基長のDNA配列のうち、5'末端の1塩基目がUである配列を除いた配列から、以下の

(1) ~ (3) に基づいて選択したものをを用いた。バーコード配列は、各RNA構造配列につき3種類選択して使用した。3種類の異なるバーコード配列を使用することによって、バーコード配列がRNA構造配列とタンパク質との結合に与える影響およびハイブリダイゼーション効率の蛍光強度に対する影響を、統計処理により考慮することができる。

(1) RNA構造配列に補助配列を付加したRNA配列に対してIPknot (オプション: -g4 -g8) を適用する。

(2) RNA構造配列とバーコード配列とが塩基対・疑似ノットを形成しないことを確認する。

(3) バーコード配列とStem forward sequenceとが塩基対・疑似ノットを形成しないことを確認する。

(iii) G + Stem forward sequence (18塩基)

5' -GGTGTACGAAGTTTCAGC- 3' (配列番号2)

(iv) RNA構造配列 (6~116塩基)

上記アルゴリズムにより選択された配列を使用した。

(v) Stem reverse sequence (17塩基)

5' -GCTGAAGCTTCGTGCAC- 3' (配列番号3)

[0053] 上記のように設計した鋳型一本鎖DNAを、Agilent Technologies社に委託して合成した。鋳型DNAは、Library forward Primer (配列番号4) およびLibrary reverse Primer (配列番号5) を用いたPCRにより、適宜増幅した。鋳型一本鎖DNAについて、in vitro転写系 (MEGAscript™7 Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific) における転写反応を行い、RNAプローブを調製した。20 μLの反応溶液 (1×T7 Reaction Buffer、7.5 mM GTP Solution、7.5 mM ATP Solution、7.5 mM CTP Solution、7.5 mM UTP Solution、1×T

7 Enzyme Mix、37.5 nM鋳型一本鎖DNA、2.5  $\mu$ M CC-T719-G ssDNA (5' -CCGC GCTAATACGACTCACTATAG- 3' : 配列番号1) ) を、37  $^{\circ}$ Cで20時間インキュベートした。その後、反応溶液にTURBO DNase (Thermo Fisher Scientific) を2  $\mu$ L加えて混合し、37  $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。15  $\mu$ LのAmmonium Acetate Stop Solution (5M酢酸アンモニウム, 100 mM EDTA) を加え、反応を停止した。RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を用いて反応液を精製し、最終的に30  $\mu$ L弱のRNAプローブ溶液を得た。

[0054] C. RNAプローブのCy5蛍光ラベル

T4 RNA ligase (Thermo Fisher Scientific) により、RNAプローブの3' 末端にpCp-Cy5 (Jena Bioscience) を付加した。Cy5ラベルされたRNAプローブを、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を用いて精製した。RNA濃度は260 nmの吸光度を、ラベルされたCy5濃度は650 nmの吸光度を、それぞれNanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) により測定して決定した。

[0055] D. 25 mer DNAバーコードをスポットしたカスタムアレイの設計

各RNAプローブに対して付加されたバーコード配列に対する相補鎖一本鎖DNAを調製し、CGH カスタムアレイ 8 $\times$ 60K (Agilent) にスポットを配置した。各RNAプローブにつき、2スポットずつ配置した。

[0056] E. DNAマイクロアレイによるRNA構造ライブラリのスキャン

Cy5ラベルされたRNAプローブ16 ngを超純水18  $\mu$ Lに溶解し、4.5  $\mu$ Lの10 $\times$ Blocking Agent (Agilent) と22.5  $\mu$ LのRPM Hybridization Buffer (Agilent) を加え、混合した。104 $^{\circ}$ Cのヒートブロック上で5分間インキュベート後、氷上で5分間インキュベートした。8 $\times$ 60K アジレントマイクロアレイガasketスライド (Agilent) に反応液の全量をアプライした。ハイブリダイゼーションチャンバ (Agilent) に、ガasketスライドとCGH カスタムアレイ 8 $\times$ 60K (Agilent) を固定し、事前に55.5 $^{\circ}$ Cに加温されたハイブリダイゼーションオープン (Robbins Scientific) に入れ、20 rpm、20時間のハイブリダイゼーション処理を行った。ガasketスライドを取り出し、Gene Expression Wash Buffer 1 (Agilent) で室温にて5分間洗浄し、Gene Expression W

ash Buffer 2 (Agilent) で37°Cにて5分間洗浄した。スライドをスライドホルダーにはめ、SureScan (Agilent) を用いてAgilentG3\_GX\_2colorの設定で画像データを得た。ソフトウェア Feature Extraction (Agilent) でスポット別の蛍光強度のデータを得た。データはGene Spring (Agilent) に加え、Python、Juliaで記述したスクリプトにより解析を行った。Cy5の蛍光が、RNAプローブに対応するバーコード配列のスポットから検出されることを確認することにより、対応するスポットにRNAプローブが結合していることを確認した。

[0057] <1-2. HIV-1ゲノムのRNA構造ライブラリの作製>

ヒト5' UTRに代えてHIV-1ゲノムを用いた以外は、1-1と同様にしてHIV-1ゲノムのRNA構造ライブラリを作製した。HIV-1ゲノムのRNA構造データは、SHAPE-MaP (Siegfried, N. A. et al., Nat. Methods, Vol. 11, pp. 959-965, 2014) により解析されたデータを使用した。RNA Structure (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/index.html>) で公開されているアルゴリズム「RemovePseudoKnots」を用いて、RNA構造情報を疑似ノットを考慮しない二次構造情報に変換し、さらに、同サイトで公開されているアルゴリズム「ct2dot」によりdot-bracket formatに変換した。

[0058] <実施例2. RIP-Chip法によるLIN28A結合性RNA配列の解析>

ヒト5' UTRのRNA構造ライブラリおよびHIV-1ゲノムのRNA構造ライブラリを用いて、RIP-Chip法によりLIN28A結合性RNA配列の解析を行った。

[0059] <2-1. RNA免疫沈降>

TALON Magnetic beads (Clontech) 20  $\mu$ L、Hisタグが付与された精製LIN28Aタンパク質20 pmolおよびCy5-RNAプローブ1  $\mu$ gを、500  $\mu$ LのProtein Binding Buffer (20 mM Hepes pH 7.8, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM DTT, 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L BSA) 中で混合させた。その後、MACSmix Tube Rotator (Miltenyi Biotec) を用いて30分間、4 °Cにて攪拌した。その後、12-Tube Magnet (QIAGEN) を用いてTALON Magnetic beadsを保持し、溶液を除去した。Protein Binding BufferによりTALON Magnetic beadsを3回洗浄後、El

ution Buffer (1 % SDS, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) 200  $\mu$ Lを加え、95  $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートすることにより、LIN28Aタンパク質-RNAを溶出した。

[0060] <2-2. RNAの抽出および精製>

上記溶液にPhenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1 Mixed, pH 5.2 (ナカライテスク) 200  $\mu$ Lを加え、懸濁後、4  $^{\circ}$ C、20,400 $\times$ g で5分間遠心を行い、水層を約150  $\mu$ L回収した。回収した水層にクロロホルム150  $\mu$ Lを加え、懸濁後、4  $^{\circ}$ C、20,400 $\times$ g で5分間遠心を行い、水層を約100  $\mu$ L回収した。回収した水層に100 %エタノールを200  $\mu$ L、エタチンメイト (ニッポンジーン) を1  $\mu$ L、3 M 酢酸ナトリウムを3.3  $\mu$ L加え、-80 $^{\circ}$ Cで15分インキュベート後、4  $^{\circ}$ C、20,400 $\times$ g で15分遠心を行い、RNAを単離した。単離したRNAは80 %エタノールでリンス後乾燥させ、超純水20  $\mu$ Lに溶解させた。

[0061] <2-3. DNAマイクロアレイによるヒト5' UTRのRNA構造ライブラリのスクラン>

得られたRNA溶液18  $\mu$ Lを用いて、上記1-1-Eと同様の手順により、マイクロアレイによるスクランニングを行った。結果の一部を表1に示す。既知のLIN28A結合性RNAであるhsa-let-7dのpre-miRNAのループ構造 (配列番号6) (ランク15位) およびhsa-mir-98のpre-miRNAのループ構造 (配列番号7) (ランク5位) が高順位で検出された一方、LIN28Aに結合しないことが知られているhsa-let-7a-3のpre-miRNAのループ構造 (配列番号8) は、非常に低い順位となった (ランク6278位)。この結果から、本方法によってLIN28Aに対するRNA構造の結合能の評価が正常に実行可能であることが示された。

[0062] 表1. LIN28Aに対する結合親和性ランキング

[表1]

Rank	Name	Cy5 Intensity
1	BA085801_1	7.84
2	BA047565_1_Multi	7.75
3	BA060819_1	7.63
4	BA118290_1	7.55
5	pre-hsa-mir-98	7.53
6	pre-hsa-mir-940	7.50
7	BA109612_1	7.50
8	BA032435_1	7.46
9	BA018470_1	7.42
10	hsa-mir-532	7.39
11	BA105829_1	7.38
12	BA051648_1	7.36
13	BA038726_Multi	7.34
14	BA111275_1	7.31
15	pre-hsa-let-7d	7.30
-	-	-
<b>6278</b>	pre-hsa-let-7a-3	4.31

## [0063] &lt;2-4. RBPmotifによるモチーフ解析&gt;

LIN28Aに対する結合親和性が上位100位にランクされたRNA配列と下位500位にランクされたRNA配列をRBPmotif web server (<http://www.rnamotif.org>)に入力し、モチーフ解析を行った。結果を図3に示す。既知のLIN28A結合性モチーフと類似する結合モチーフとして、例えばGGAGなどが得られた(図3a)。また、これらのモチーフは、一本鎖領域に非常に多く存在することが明らかになった(図3b)。

## [0064] &lt;2-5. 新規に発見したRNA構造のLIN28Aに対する結合親和性&gt;

上記2-3において得られた2位のRNA構造(配列番号9)に着目した。この構造は、GYG1の5' UTRに含まれるRNA構造である(以下、Rank2-GYG1と記載する、図4a)。Rank2-GYG1は、hsa-let-7dのpre-miRNAのループ(図4b)およびhsa-mir-98のpre-miRNAのループ(図4c)と、配列・構造ともに類似してい

ることが明らかになった。Rank2-GYG1のLIN28Aに対する結合親和性を、EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) により確認した。まずRank2-GYG1、hsa-mir-98の前駆体のループ構造、hsa-let-7dの前駆体のループ構造、およびhsa-let-7a-3の前駆体のループ構造に対してステム構造を付与したRNAプローブを設計した。この配列の5'末端にCC + T7 promoter配列を付加し、その相補鎖を鋳型一本鎖DNAとして合成した (Greinerに委託)。T7-19mer (Greinerに委託合成) を用い、in vitro転写合成を上記1-1-Bと同様の手順により行った。

[0065] EMSAは、以下の手順により行った。RNA溶液を95 °Cで5分間インキュベートした後、室温で10分間インキュベートした。次に、反応液 (100 nM RNA、1.2, 0.6, 0.3, 0 μM LIN28A、1×Protein Binding Buffer (20 mM Hepes pH 7.8, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM DTT, 0.2 μg/μL BSA) ) を調製し、室温で60分間インキュベートした。反応後、10× loading dye (0.25 % bromophenol blue、30 % glycerol) を1.2 μL 加えて混合した。15 mAでプレランを5分間行った後、非変性10 %ポリアクリルアミドゲルに混合液をアプライし、15 mA、30分間の電気泳動を行った。泳動後のゲルを、SYBR Green I及びIIで染色した。Gel Doc EZ (Bio-Rad) により撮像し、バンドを確認した。

[0066] 結果を図5に示す。非結合のRNAバンドの退行の程度から結合強度を判断した結果、Rank2-GYG1は、強い親和性をもってLIN28Aに結合することが明らかになった。

[0067] <実施例3. RIP-Chip法によるeIF3b結合性RNA配列の解析>

ヒト5' UTRのRNA構造ライブラリおよびHIV-1ゲノムのRNA構造ライブラリを用いて、RIP-Chip法によりeIF3b結合性RNA配列の解析を行った。

[0068] <3-1. 細胞溶解液の調製>

HEK293FT細胞を10 cm dishに $1.0 \times 10^5$ /mLの濃度で播種した。48~72時間の培養後、培地を除去し、PBSにより洗浄した。PBSを5 mL加えて細胞をセルスクレイパーで剥がし、50 mLチューブに回収した。4 °C、300×gで5分間遠心

し、上清を除去した。細胞のペレットに氷冷したPBSを加えて再懸濁し、4 °C、300×gで5分間遠心し、上清を除去し、細胞のペレットを得た。細胞のペレットに10 mLのCell lysis buffer (NP40 Cell Lysis buffer (Thermo fisher Scientific) 9 mL, Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA) 1 mL, PMSF 174.2 μL) を加え、氷上にて30分間インキュベートした。この間、10分おきに10秒間のボルテックス処理を行った。その後、4 °C、13,000 rpmで10分間遠心した。上清を回収し、それらを-80 °Cにて凍結保存した。

[0069] <3-2. 共免疫沈降とウエスタンブロッティング>

Dynabeads Protein A Immunoprecipitation Kit (Thermo fisher Scientific) を主に使用し、メーカー推奨のプロトコルに準じた手順により共免疫沈降を行った。再懸濁した50 μL のDynabeadsを1.5 mL チューブに分注し、磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除いた。200 μLのAb Binding Bufferと20 μLのウサギ抗eIF3b抗体 (Bethyl, 0.2 mg/mL) を加え、常温で13分間チューブローターにより攪拌した。磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除き、Kit付属のBinding/Washing Bufferを200 μL加えてDynabeads-抗体複合体を洗浄した。Bufferを除去し、回収した細胞溶解液 (700 μg/μL) を1000 μLを加え、4 °Cで1時間チューブローターにより攪拌した。磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除き、Washing BufferによりDynabeads-抗体-結合タンパク質複合体を3回洗浄した。20 μLのElution Bufferと20 μLの還元剤入り 6×SDS Sample Buffer (ナカライテスク) を加え、95 °Cで5分間インキュベートし、室温で15分間インキュベートした。Dynabeadsを取り除き、上清を回収した。

[0070] 回収したサンプルをSDS-PAGEにて泳動後、iBlot (Thermo fisher Scientific) を用いてフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜をBlocking One (ナカライテスク) 中で一晩インキュベートした後、一次抗体を加えたTBS-T (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.5 % Tween) 中で室温にて1時間インキュベートした。一次抗体には、ウサギ抗eIF3a抗体 (Bethyl) (1:1000希釈)、ウサギ抗eIF3b抗体 (Bethyl) (1:2000希釈)

、またはウサギ抗eIF3d抗体 (Bethyl) (1:1000希釈) を用いた。その後、抗体液を取り除き、TBS-Tにより4回洗浄後、二次抗体を加えたTBS-T中で室温にて30分間インキュベートした。二次抗体には、ヤギ抗ウサギ IgG (H + L)-HRP 複合体 (Bio-Rad) (1:2000希釈) を用いた。その後、抗体液を取り除き、TBS-Tにより4回洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) およびLAS4000 (GE Healthcare) を用いてタンパク質を検出した。

[0071] 結果を図6に示す。eIF3a、eIF3b、eIF3dのすべてが検出され、eIF3bがeIF3aおよびeIF3dと結合していることが確認された。この結果から、上記手順により得られたeIF3複合体が、eIF3a、eIF3bまたはeIF3dに結合するRNA構造の検出に利用可能であると判断した。

[0072] <3-3. RNA共免疫沈降とRNAの抽出および精製>

上記3-1および3-2と同様の手順によりDynabeads-抗体-eIF3複合体を得た。1 mLのRNP Binding Buffer (20 mM Hepes pH 7.8, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM DTT, 0.2 μg/μL BSA) で洗浄後、500 μLのRNP Binding BufferおよびCy5ラベルされたRNAプローブ500 ngを加え、4 °Cで1時間チューブローターにより攪拌した。磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除き、500 μLのRNP Binding Bufferにより3回洗浄した。Elution Buffer (1 % SDS, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) 200 μLを加え、95 °Cで3分間インキュベートすることにより、eIF3複合体-RNAを溶出した。その後、上記2-2と同様の手順により精製RNA溶液を調製した。

[0073] <3-4. DNAマイクロアレイによるRNA構造ライブラリのスキャン>

得られたRNA溶液18 μLを用いて、上記1-1-Eと同様の手順により、マイクロアレイによるスキャンを行った。

[0074] <3-5. データ解析: RNAの二次構造予測と最小自由エネルギーの計算>

ViennaRNA package 2.2.5 に含まれるソフトウェアRNAfoldを用いて、RNAの二次構造と、その構造の最小自由エネルギーを計算した。

[0075] 結果を図7に示す。この結果から、eIF3複合体に結合するRNAは、塩基数が

多く長いものが多く（図7a）、かつ、最小自由エネルギーが低い、すなわち分子内で二本鎖構造を形成しているものが多いことが示された（図7b）。なお、これは、実施例2において得られたLIN28Aに結合するRNAにみられる傾向とは全く異なるものである（図8）。

[0076] eIF3複合体に対する結合親和性が上位（1～16位）にランクされたRNA配列と下位（8615～8630位）にランクされたRNAについて、RNA構造を描画した。結果を図9および図10に示す。上位にランクされたRNAはいずれも長く、堅牢な二次構造を形成していた（図9）。これに対し、下位にランクされたRNAは、短く、単調なヘアピンループ構造をとるものが多かったが、長いRNAであっても結合親和性が低いものもあった（図10）。この結果から、結合親和性は、RNA中の配列モチーフやその他の構造的な特徴に依存することが理解された。

[0077] <3-6. HIV-1ゲノムにおけるeIF3b結合性RNA構造モチーフの検出>

マイクロアレイによるスキニングの結果のうち、HIV-1ゲノムに関連するeIF3b結合性RNA構造モチーフの上位の結果を表2に示す。HIV-1ゲノムの5'上流側に存在するHIV-1 gag IRES (Internal Ribosome Entry Site) 領域に含まれるRNA構造が、高い結合親和性を示すものとして検出された（17位（上位0.2%）および568位（上位6.6%））。この結果から、本方法によってIRESなどの翻訳開始を制御する機能性RNA構造モチーフのスクリーニングが可能であることが示された。

[0078] 表2. eIF3b結合性RNA構造モチーフとHIV-1ゲノムにおける領域

[表2]

Rank	上位 (%)	Name	HIV-1 Genome Region
6	0.07	HIV_2014_Siegfried_nucs_1395_1714_1	
17	0.20	HIV_2014_Siegfried_nucs_1_753_9	HIV-1 gag IRES
252	2.92	HIV_2014_Siegfried_nucs_1395_1714_2	
468	5.42	HIV_2014_Siegfried_nucs_1_753_1_Multi	5'TAR
568	6.58	HIV_2014_Siegfried_nucs_1_753_2_Multi	HIV-1 gag IRES
1071	12.41	HIV_2014_Siegfried_nucs_8807_8914_1	
1088	12.61	HIV_2014_Siegfried_nucs_1177_1351_4	
1115	12.92	HIV_2014_Siegfried_nucs_8501_8785_Multi	PPT
1163	13.48	HIV_2014_Siegfried_nucs_1395_1714_2_Multi	
1346	15.60	HIV_2014_Siegfried_nucs_1177_1351_Multi	
1684	19.51	HIV_2014_Siegfried_nucs_7244_7603_Multi	RRE
1763	20.43	HIV_2014_Siegfried_nucs_4678_4773_2	3'TARの一部
1804	20.90	HIV_2014_Siegfried_nucs_8982_9173_4	
2258	26.16	HIV_2014_Siegfried_nucs_5449_6017_3	

[0079] <実施例4. 機能性RNA構造モチーフのスクリーニング系の実用性の確認 (1)>

上記スクリーニング手法の再現性を評価するために、実施例3と同様の手順による再現実験を独立に2回行い、その結果について相関分析を行った。

[0080] 25  $\mu$ L のDynabeads、10  $\mu$ Lの抗eIF3b抗体、HEK293FT細胞溶解液 (1100  $\mu$ g/ $\mu$ L) を用いた以外は、上記3-1および3-2と同様の手順により、Dynabeads-抗体-eIF3複合体を調製した。さらに、3-3と同様の手順により、eIF3b結合性RNAを精製した。精製されたRNAを18  $\mu$ Lの超純水に溶解し、上記1-1-Eと同様の手順により、マイクロアレイによるスキャンを行い、蛍光強度のデータを取得し、解析した。

[0081] 結合親和性の評価のために、抗体を結合させていない Dynabeads Protein A を用いて調製したサンプルについて取得した蛍光強度により上記データを標準化した。2回の独立した再現実験結果から相関係数を算出した。なお、3種類の RNA 構造プローブの平均値と標準偏差を用いて各 RNA 構造について結合親和性と変動係数 (CV) を算出し、変動係数の値が 1 以上であった RNA 構造については解析から除外した。

[0082] 結果を図11に示す。横軸は1回目の、縦軸は2回目の再現実験により得られた各RNA構造に対応する蛍光強度を示し、スケールの値は頻度を示す。図11に示すように、相関係数( $r$ )=0.96という高い再現性によりRNA構造を取得することができた。また、本再現実験により、eIF3-40Sリボソームサブユニット複合体と強く結合することが知られており、上記3-6においても検出されたHIV-1 gag IRESを再度検出することができた(図12)。これらの結果から、本実験系がスクリーニング手法として十分な実用性を有するものであることが確認された。

[0083] <実施例5. 機能性RNA構造モチーフのスクリーニング系の実用性の確認(2)>

上記スクリーニング手法によりeIF3複合体に対する結合親和性が上位にランクされたRNAについて、以下の手順によりプルダウンアッセイを行い、各RNAの結合親和性を比較した。

[0084] <5-1. プルダウン用DNA/RNAプローブの調製>

#### A. RNAプローブの調製

eIF3複合体に対する結合親和性が上位にランクされたRNAに、補助配列を付加し、RNAプローブを調製した。RNAプローブは、上記1-1-Bと同様の手順により、鋳型DNAをin vitro転写することにより調製した。鋳型DNAには、5'末端から順に、(i) T7 promoter + G、(ii) バーコード配列(25塩基)、(iii) Stem forward sequence、(iv) RNA構造配列、および(v) Stem reverse sequenceを含むように構成された配列を逆相補鎖変換した配列からなるDNAを用いた。

[0085] 表3. RNAプローブの鋳型DNAの配列

[表3]

ID	DNA 配列	配列番号
Rank1_Pulldown_RNA_Probe_template	GGTGCACGAGGGACCCGCACCACCTCTCGCTCCTCCCCTCGTACAC CCCAGACTCACAGCCGCGCTAGTATCCTATAGTGAGTCGTATTAG C	10
Rank8531_Pulldown_RNA_Probe_template	GGTGCACGAGCAGGTTAGTCCAAACACCTGCTCGTACACCCAGA CTCACAGCCGCGCTAGTATCCTATAGTGAGTCGTATTAGC	11
Rank5_Pulldown_RNA_Probe_template	GGTGCACGAGCGGGCCCGCAGCGTGGCCCCGCCCTCCCGCGCGC CATCGCCCCGCCGCTCGTACACCCAGACTCACAGCCGCGCTAG TATCCTATAGTGAGTCGTATTAGC	12
Rank10_Pulldown_RNA_Probe_template	GGTGCACGAGGGCCTTTCTGTATCATTATGGTAGCTGGATTTGTT ACTTGGCTCATTGCTTCAGCCAAAACCTCTTGCTTTATGGCCTCGT ACACCCAGACTCACAGCCGCGCTAGTATCCTATAGTGAGTCGTA TTAGC	13
Rank19(PC, -4stem)_Pulldown_RNA_Probe_template	GGTGCACGAGGGCCAGGATTAAGTCCGAATCGTTCTAGCTCCCTG CTTGCCATACTATATGTTTGTAGTTTATATTGTTTCTTTCCCCT GGCCCTCGTACACCCAGACTCACAGCCGCGCTAGTATCCTATAG TGAGTCGTATTAGC	14

[0086] 表4. RNAプローブの配列

[表4]

ID	RNA 配列	配列番号
Rank1_Pulldown_RNA_Probe	GGAUACUAGCGCGGUCUGAGUCUGGGGUGUACGAGGGAGGAGCG AGAGGUGGUGCGGGUCCUCUGGCACC	15
Rank8531_Pulldown_RNA_Probe	GGAUACUAGCGCGGUCUGAGUCUGGGGUGUACGAGCAGGUGUUU GGACUAACCGUCUGGCACC	16
Rank5_Pulldown_RNA_Probe	GGAUACUAGCGCGGUCUGAGUCUGGGGUGUACGAGCGGGCGGGG CGAUGGCGCGGGAGGGGCGGGCCACGUCGGGCCCGCUCGU GCACC	17
Rank10_Pulldown_RNA_Probe	GGAUACUAGCGCGGUCUGAGUCUGGGGUGUACGAGGCCAUAAG CAAGAGUUUUGGUGAAGCAAUGAGCCAAAGUAACAAUCCAGCUA CCAUAUAGUAACAGAAAGGCCUCUGGCACC	18
Rank19(PC, -4stem)_Pulldown_RNA_Probe	GGAUACUAGCGCGGUCUGAGUCUGGGGUGUACGAGGGCCAGGGG GAAAGAAACAAUAUAAACUAAAACUAUAGUAUGGGCAAGCAGGG AGCUAGAACGAUUCGAGUUAUCCUGGCCUCUGGCACC	19

[0087] B. ビオチン化DNAバーコードプローブの調製

RNAプローブを磁気ビーズに固定するためのビオチン化DNAバーコードプローブを調製した。5' 末端から順に、(i) バーコード配列の相補配列 (25塩基)、(ii) C (1塩基)、(iii) スペーサー (3塩基)、および (iv) 3' 末端ビオチン修飾を含むビオチン化DNAバーコードプローブを設計した。ビオチン化DNAバーコードプローブは、ファスマック社に委託して合成した (ノーマルスケール、HPLC 精製)。

[0088] 3' -biotinylated DNA Probe Barcode 25mer + C + 3spacer

CCGACTCACAGCCGCGCTAGTATCCAAG-(Biotin) (配列番号20)

[0089] C. プルダウン用DNA/RNAプローブの調製

0.2 ml チューブに、2  $\mu$ Lの5×Hybridization Buffer (100 mM HEPES pH 7.8, 400 mM KCl, 100 mM NaCl)、1  $\mu$ Lのビオチン化DNAバーコードプローブ (100  $\mu$ M)、120 pmolのRNAプローブを加え、超純水により10  $\mu$ Lに調製した。得られたプローブ液をサーマルサイクラーにて95°Cで5分間熱処理し、その後、-0.1°C/秒にて4°Cまで冷却し、10分間静置することにより、プルダウン用DNA/RNAプローブを得た。

[0090] <5-2. プルダウンアッセイ>

以下の手順により、プルダウン用DNA/RNAプローブを磁気ビーズに固定化した。Streptavidin Mag Sepharose (GE Healthcare) を1.5 ml チューブに50  $\mu$ L分注した。磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除いた後、500  $\mu$ LのBinding Buffer (20 mM HEPES pH 7.8, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM DTT, 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L BSA) を加え、転倒混和した。磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除き、500  $\mu$ LのBinding Bufferと、上記5-1で調製されたプルダウン用DNA/RNAプローブを10  $\mu$ L加え、4°Cで3時間、チューブローテーターで攪拌した。その後、磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除き、600  $\mu$ LのBinding Bufferによる洗浄を2回行った。

[0091] 得られた磁気ビーズに600  $\mu$ LのBinding Bufferと2  $\mu$ LのRNase inhibitor Murine (NEB、40 U/ml) を加え、さらに200  $\mu$ LのHEK293FT細胞溶解液 (110

0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を加えた。4°Cで12 時間、チューブローテーターで攪拌した後、磁気ラックにチューブを設置して上清を取り除いた。900  $\mu\text{L}$ のBinding Bufferによる洗浄を4回行った。最後に、20  $\mu\text{L}$ の5×Sample Buffer 2 (ProteinSimple) を加え、95°Cで5分間加熱した後、室温で10分間静置した。ビーズをスピンドウンし、サンプルを回収した。

[0092] 回収したサンプルを0.1×Sample Buffer 2 (ProteinSimple) で5倍に希釈した後、5×fluorescent master mix と 1:4 の比率で混合した。その後、3秒間ボルテックスし、95°Cで5分間加熱した。Antibody Diluent 2 (ProteinSimple) にて1:20希釈したウサギ抗eIF3b抗体 (Bethyl) を用いて、標準プロトコルのWes (ProteinSimple) により、DNA/RNAプローブ-磁気ビーズによりプルダウンされたeIF3複合体を検出した。

[0093] 結果を図13に示す。eIF3複合体に対する結合親和性が上位にランクされたRNA (Rank 1、Rank 5、Rank 10) は、いずれもHIV-1 gag IRES (陽性対照) と同様の結合親和性を示した。一方、eIF3複合体に対する結合親和性が下位にランクされたRNAは、eIF3複合体に対する結合親和性を示さなかった。この結果から、上記スクリーニング手法により、機能性RNA構造を正確に選別できていることが裏付けられた。

## 請求の範囲

### [請求項1]

以下の工程を含むRNAプローブの調製方法：

(1) RNAの配列情報に基づいてRNA中に含まれる1または複数のステム構造を認識する工程、

(2) 認識された前記1または複数のステム構造を基準としてモチーフ領域を抽出する工程、

(3) 抽出された前記モチーフ領域に、第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを付加する工程、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する、および、

(4) 前記補助ステム領域に、DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域を付加する工程。

### [請求項2]

前記工程(2)が、

(2a) 認識された前記ステム構造から1または複数を選択する工程、

(2b) 選択されたステム構造を仮想ループ構造に置き換える工程、および、

(2c) 選択するステム構造を変更して前記(2a)～(2b)を繰り返す工程

を含む、請求項1に記載の調製方法。

### [請求項3]

以下の(1)～(3)の領域を含むRNAプローブ：

(1) DNAバーコード配列に対する相補配列であるバーコード領域

(2) 第一の補助ステム部分配列と第二の補助ステム部分配列とを含み、ここで、第二の補助ステム部分配列は、第一の補助ステム部分配列に対して相補的な配列であって、第一の補助ステム部分配列とハイブリダイズして二本鎖補助ステムを形成する補助ステム領域、およ

び、

(3) 第一の補助ステム部分と第二の補助ステム部分とを連結する領域であって、多分岐ループ部分を有する高次構造を形成する配列を含むモチーフ領域。

[請求項4] 前記DNAバーコード配列に対する相補配列が、補助ステム領域および／またはモチーフ領域との間で塩基対または擬似ノット形成をしない配列である、請求項3に記載のRNAプローブ。

[請求項5] 前記DNAバーコード配列に対する相補配列の5'末端が、ウラシル以外の塩基である、請求項3または4に記載のRNAプローブ。

[請求項6] 3'末端を蛍光標識された、請求項3～5のいずれか1項に記載のRNAプローブ。

[請求項7] 請求項3～6のいずれか1項に記載のRNAプローブを複数含み、前記複数のRNAプローブがそれぞれ異なる配列のモチーフ領域を含む、RNAプローブライブラリ。

[請求項8] 支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイと、請求項7に記載のRNAプローブライブラリとを含む、RNA分析用キット。

[請求項9] 支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイと、請求項7に記載のRNAプローブライブラリとをハイブリダイズさせることにより製造される、RNAマイクロアレイ。

[請求項10] 以下の工程を含む、タンパク質と結合するRNAを検出する方法：

(1) 請求項3～6のいずれか1項に記載のRNAプローブと対象タンパク質とを接触させる工程、

(2) 工程(1)で得られたRNAプローブと対象タンパク質との結合体を単離する工程、

(3) 工程(2)で単離された結合体からRNAプローブを抽出する工程、

(4) 工程(3)で抽出されたRNAプローブを、支持体上にDNAバーコード配列を固定したマイクロアレイに接触させる工程、

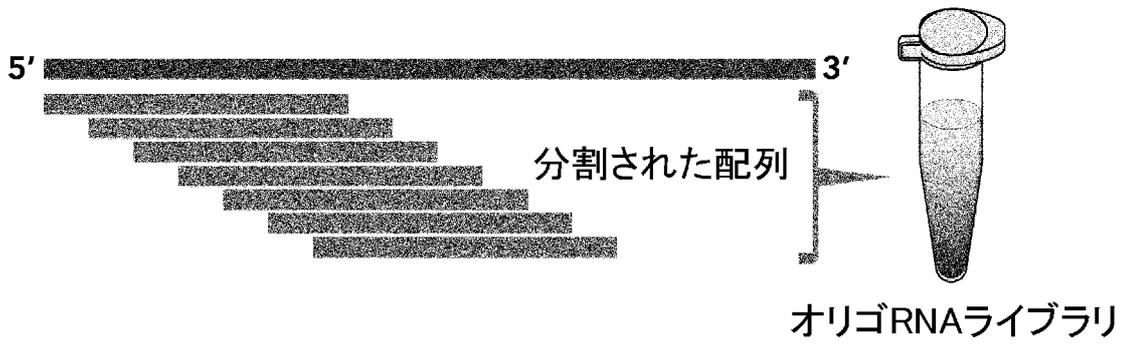
(5) 工程(4)でDNAバーコード配列とハイブリダイズしたRNAプローブを特定する工程、および、

(6) 工程(5)で特定されたRNAプローブのモチーフ領域の配列を含むRNAを、当該対象タンパク質と結合するRNAとして検出する工程

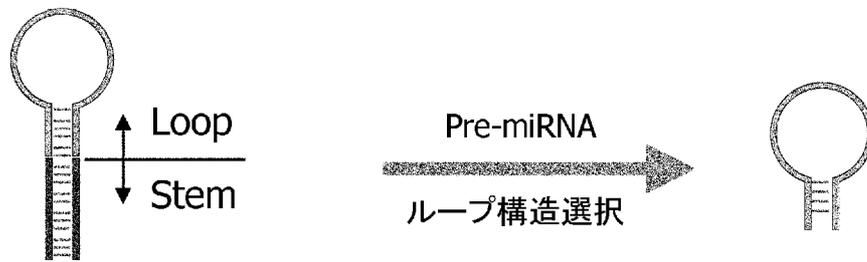
。

[図1]

(a)



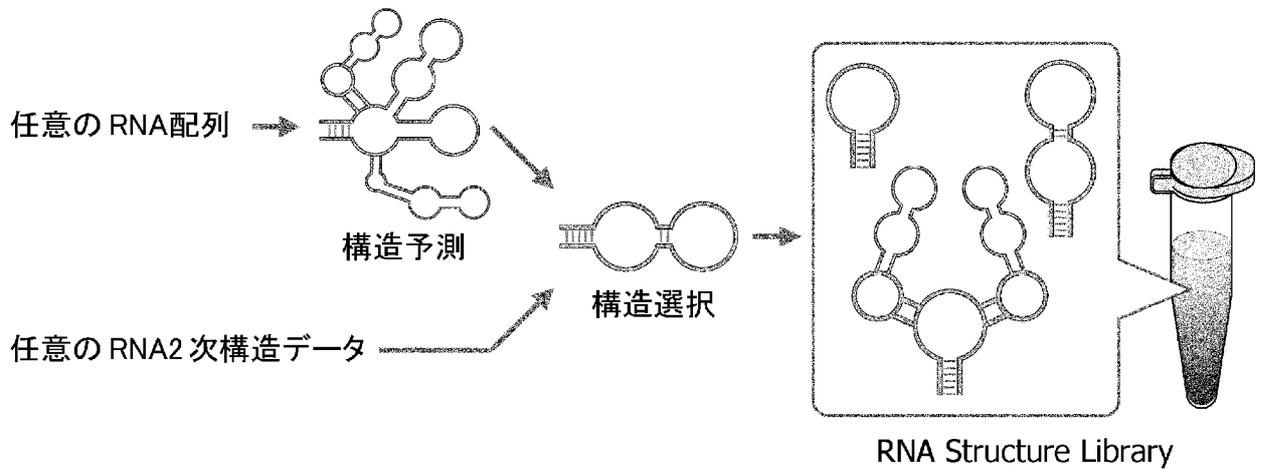
(b)



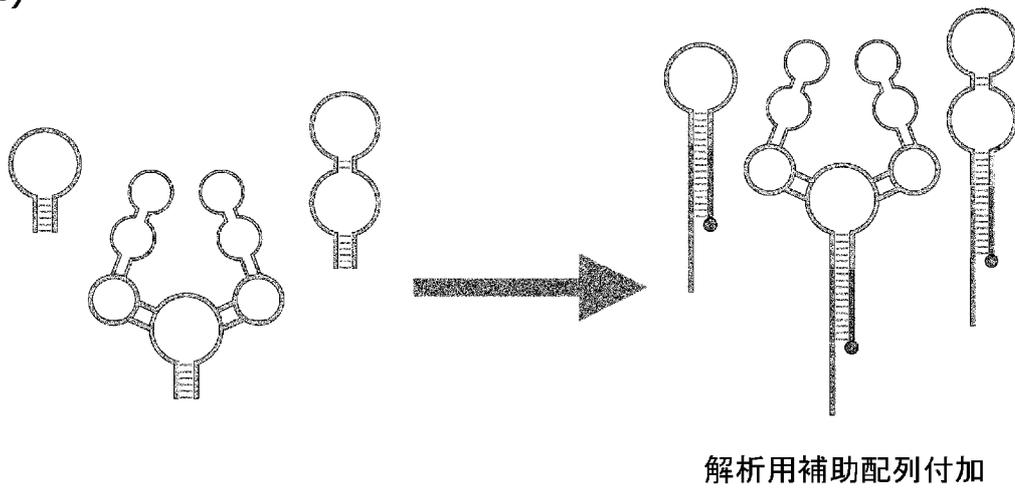
miRBaseに記載された Pre-miRNA の構造情報

[図2]

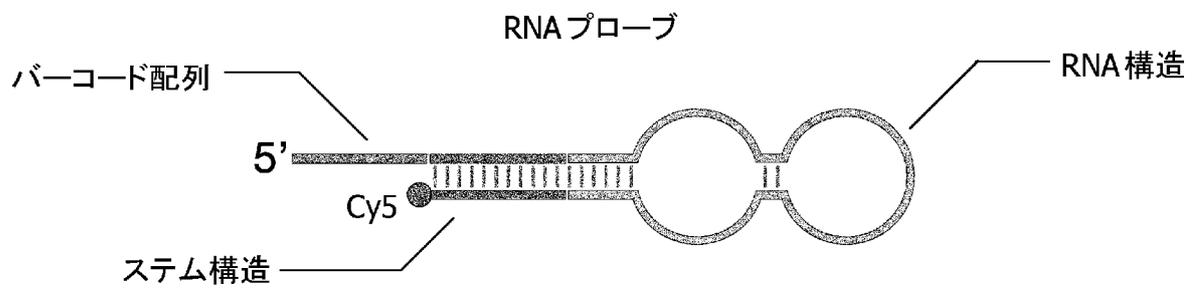
(a)



(b)



(c)

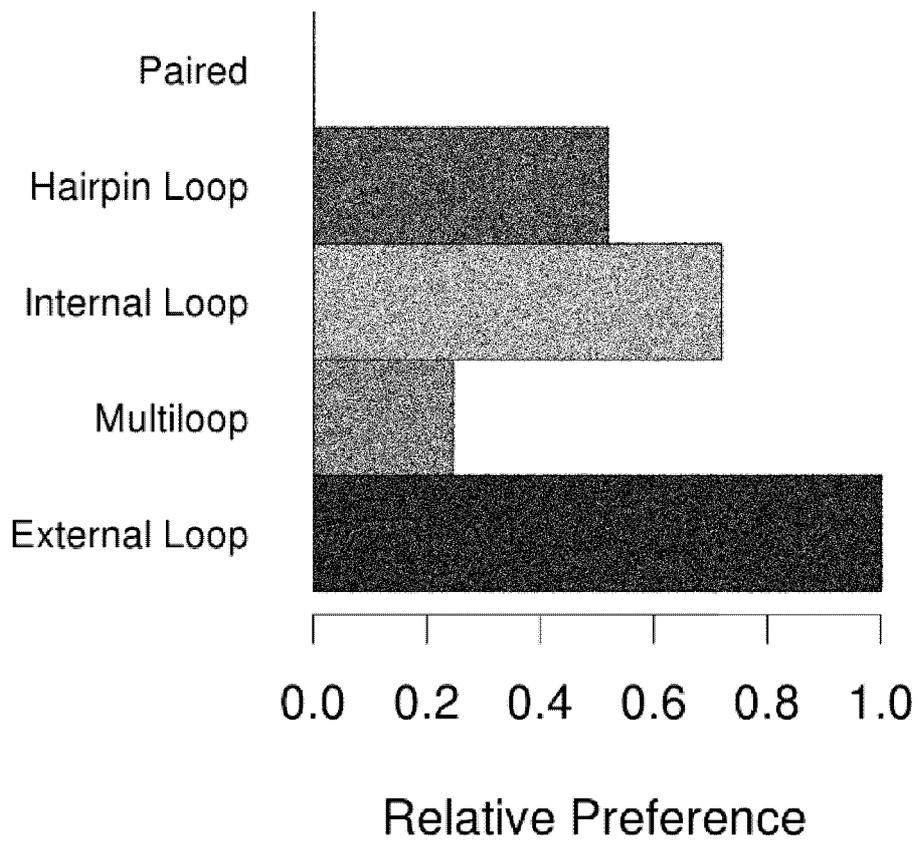


[図3]

(a)



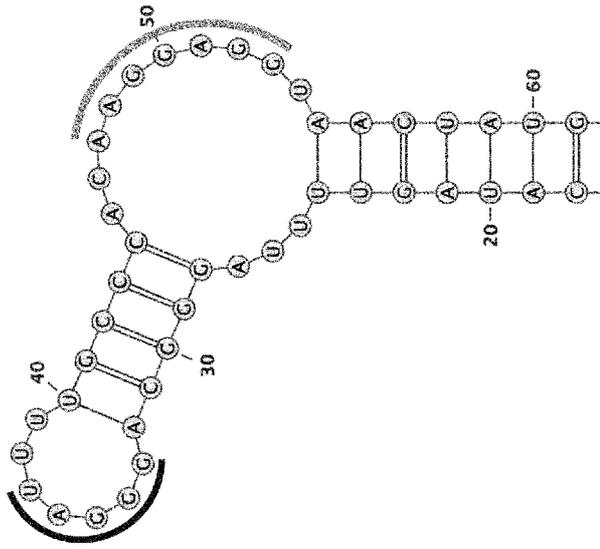
(b)



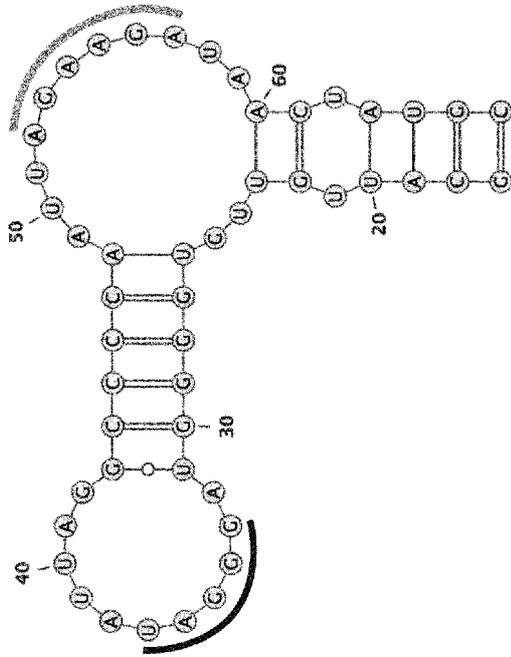
[図4]

— GNGAY(Y=C or U)

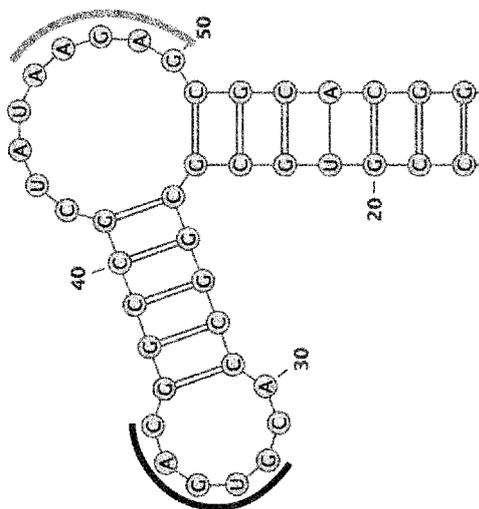
AGに富む配列



RANK15  
pre-hsa-let-7d



RANK5  
pre-hsa-mir-98

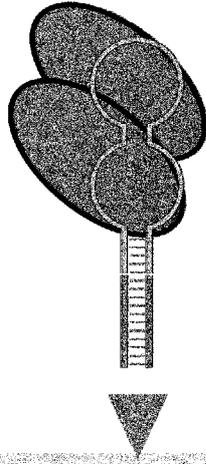
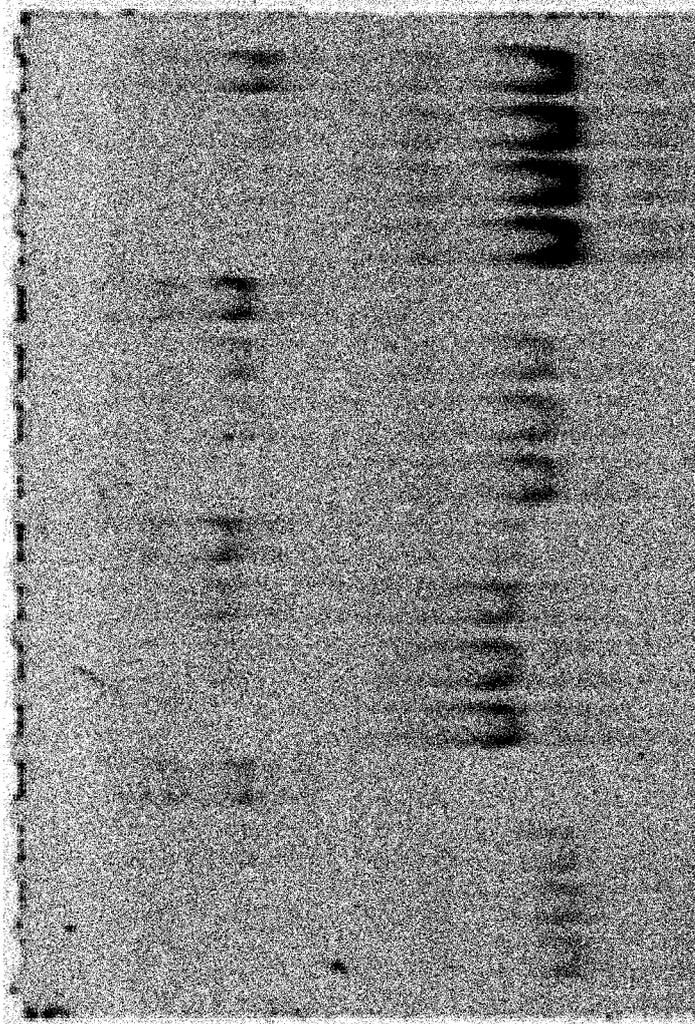


RANK2  
5' UTR of GYG1

[5]

Protein, LIN28A  
Final Conc. (nM)

0 300 600 1200 0 300 600 1200 0 300 600 1200



RNA-Protein complex

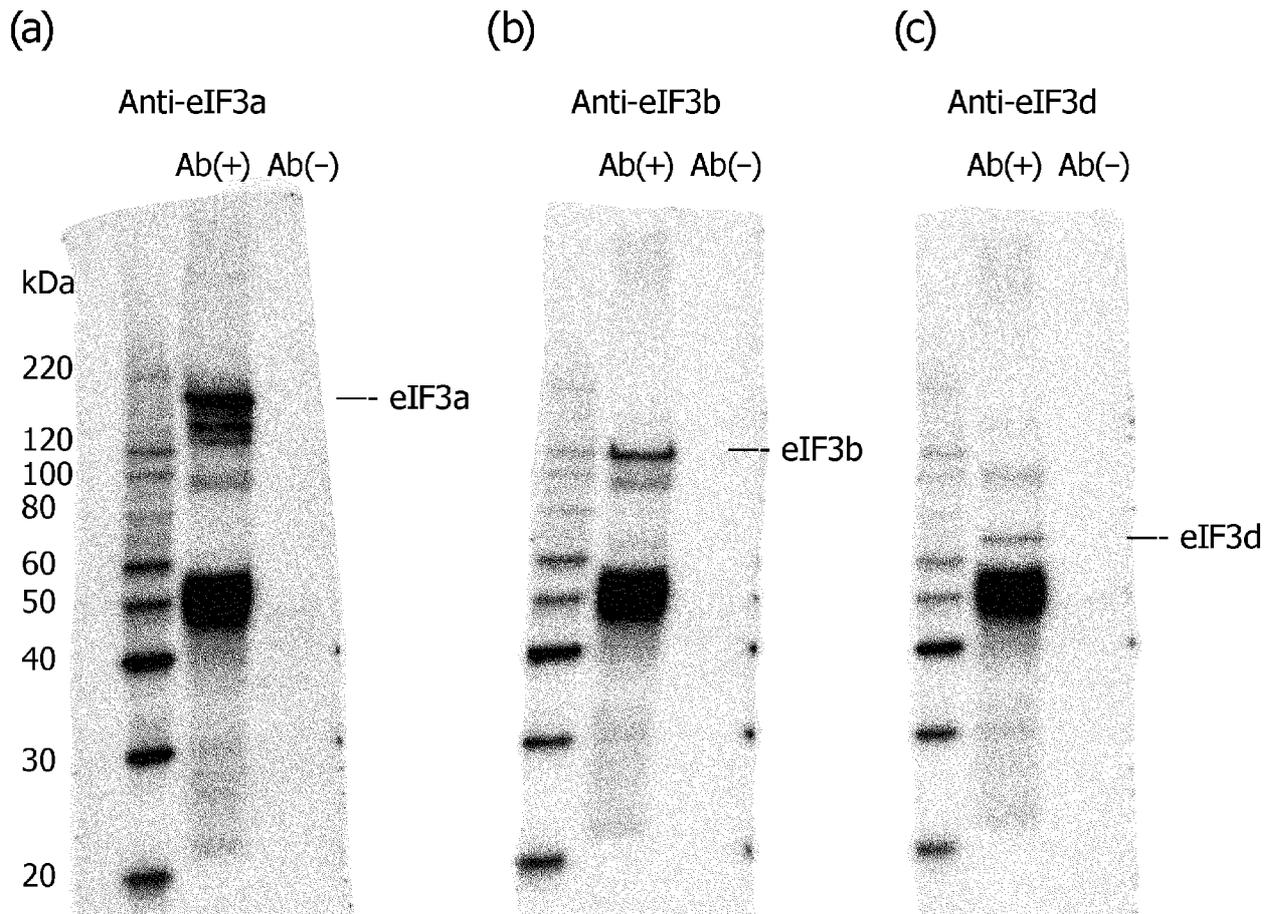


RNA

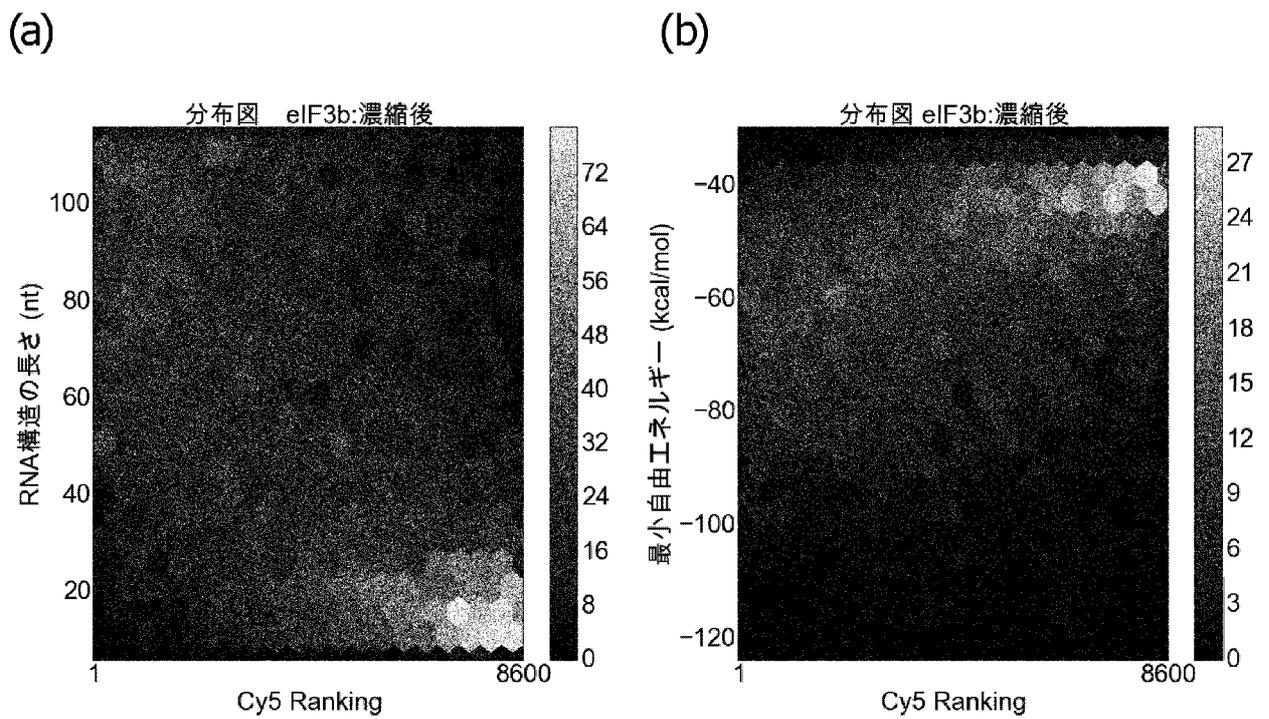
RNA : 100nM

RANK2	RANK5	RANK15	RANK6811
GYG1	pre-hsa-mir-98	pre-hsa-let-7d	pre-hsa-let-7a-3

[図6]

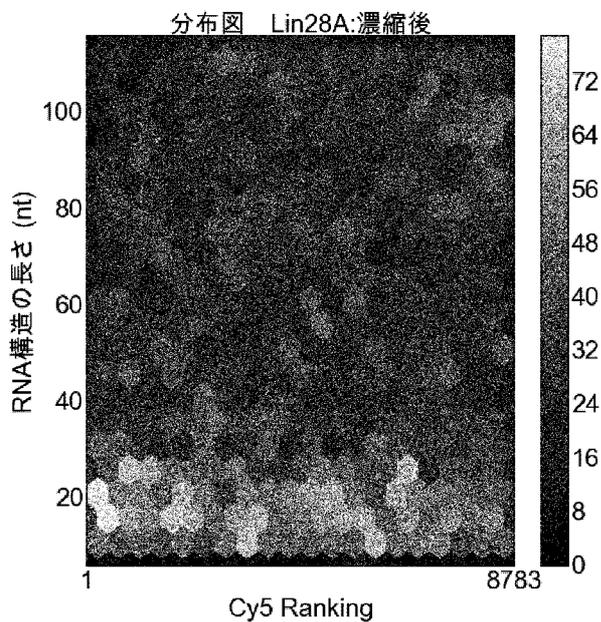


[図7]

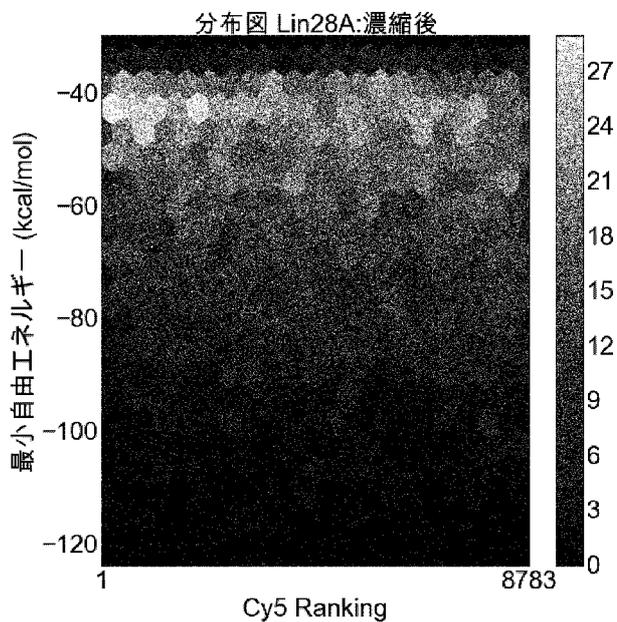


[図8]

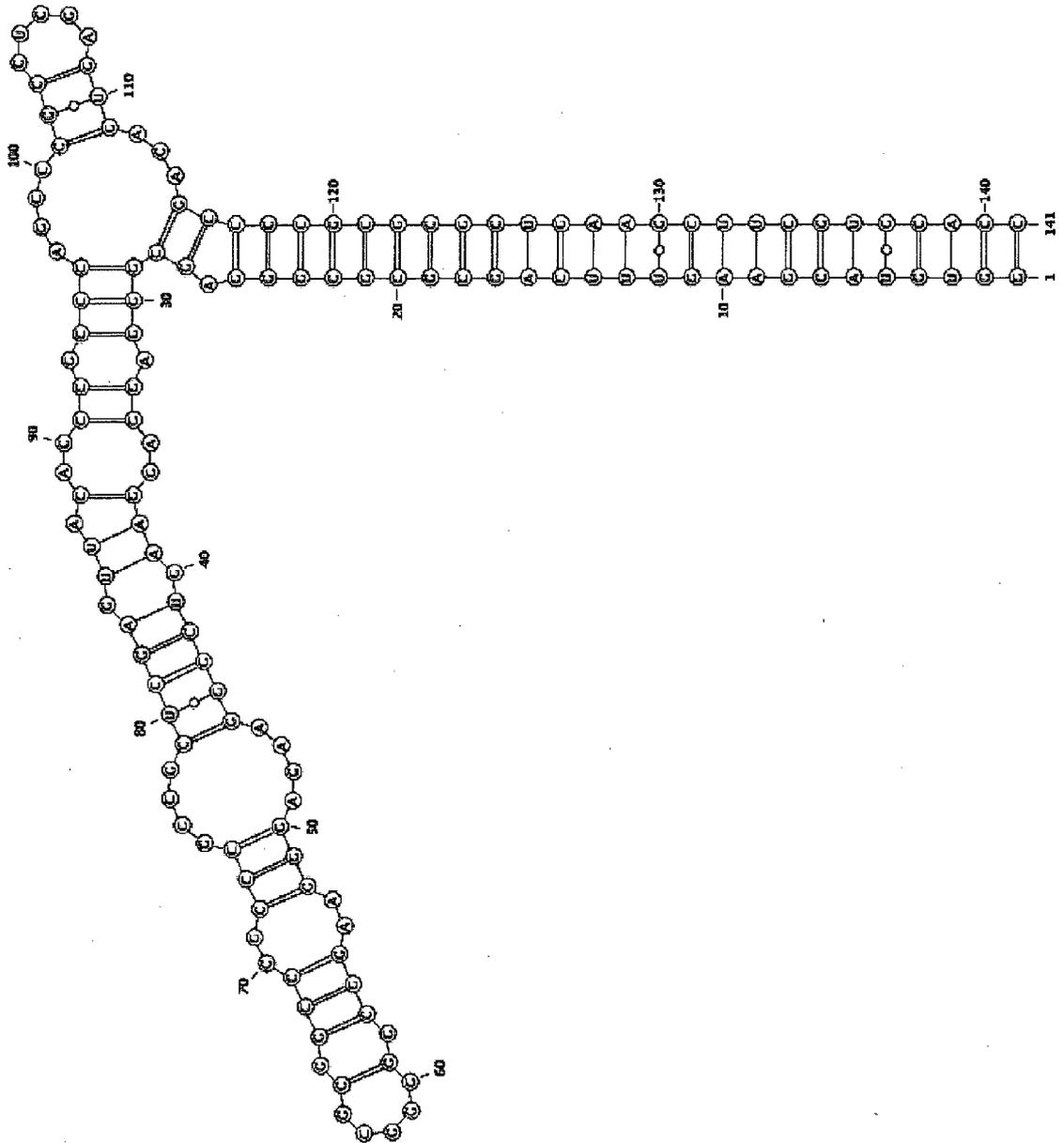
(a)



(b)



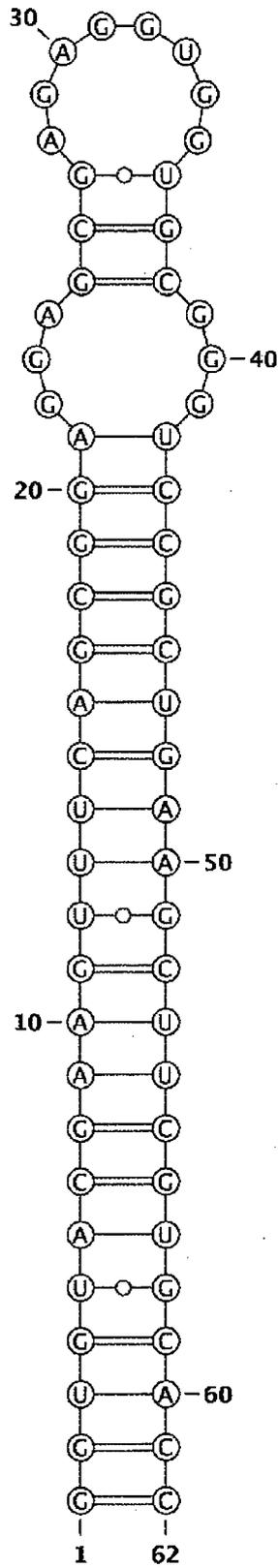
[図9]



Rank1

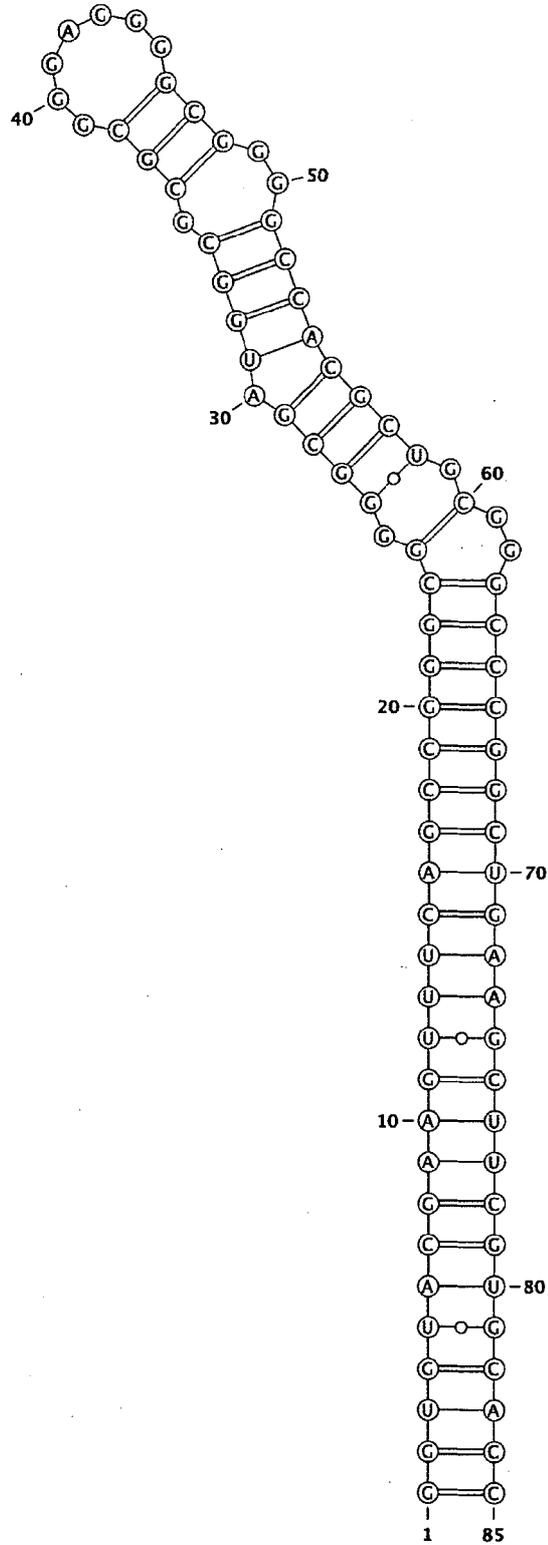
差替え用紙 (規則26)

[図9] 続子



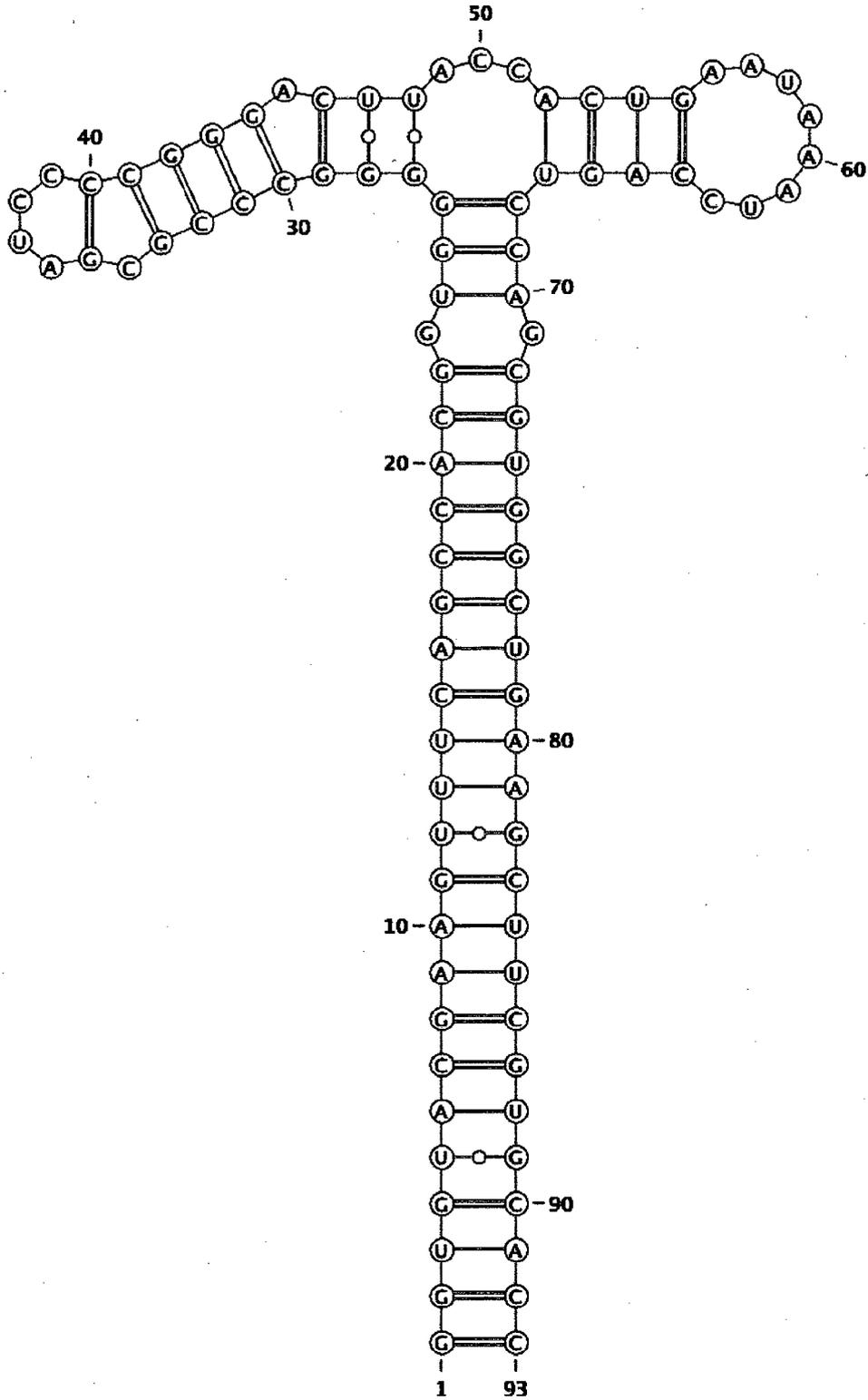
Rank2

[図9] 続き



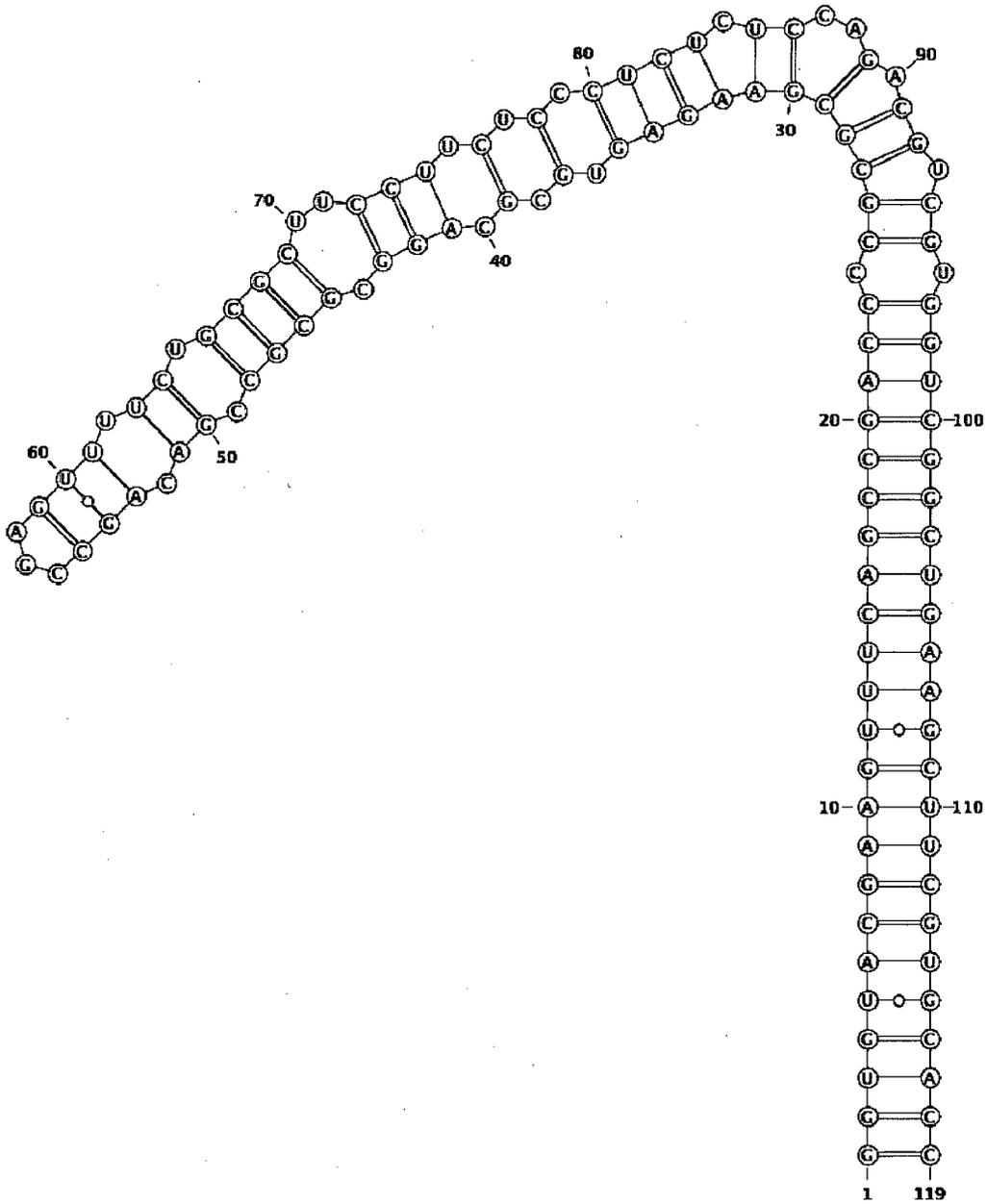
Rank3

[図9] 続前



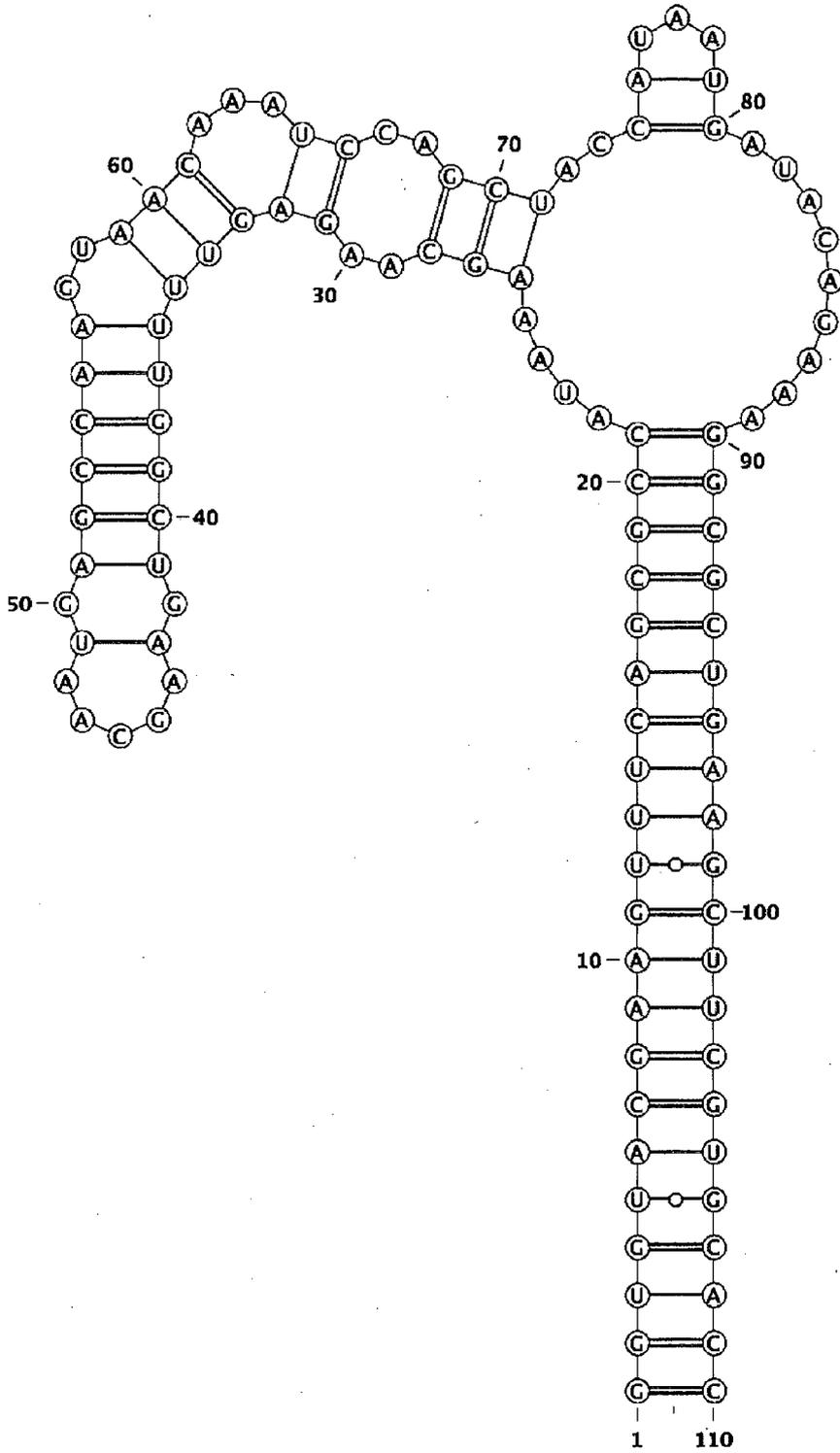
Rank4

[図9] 鎖子



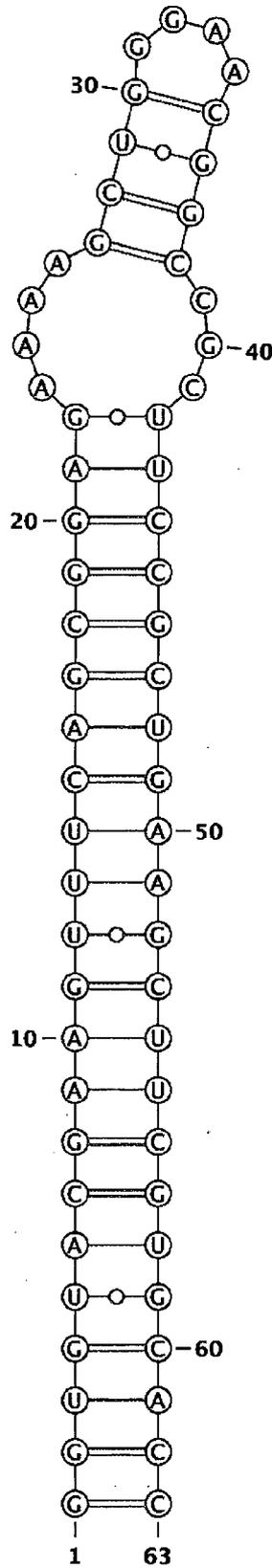
Rank5

[図9] 続



Rank6

[図9] 続子

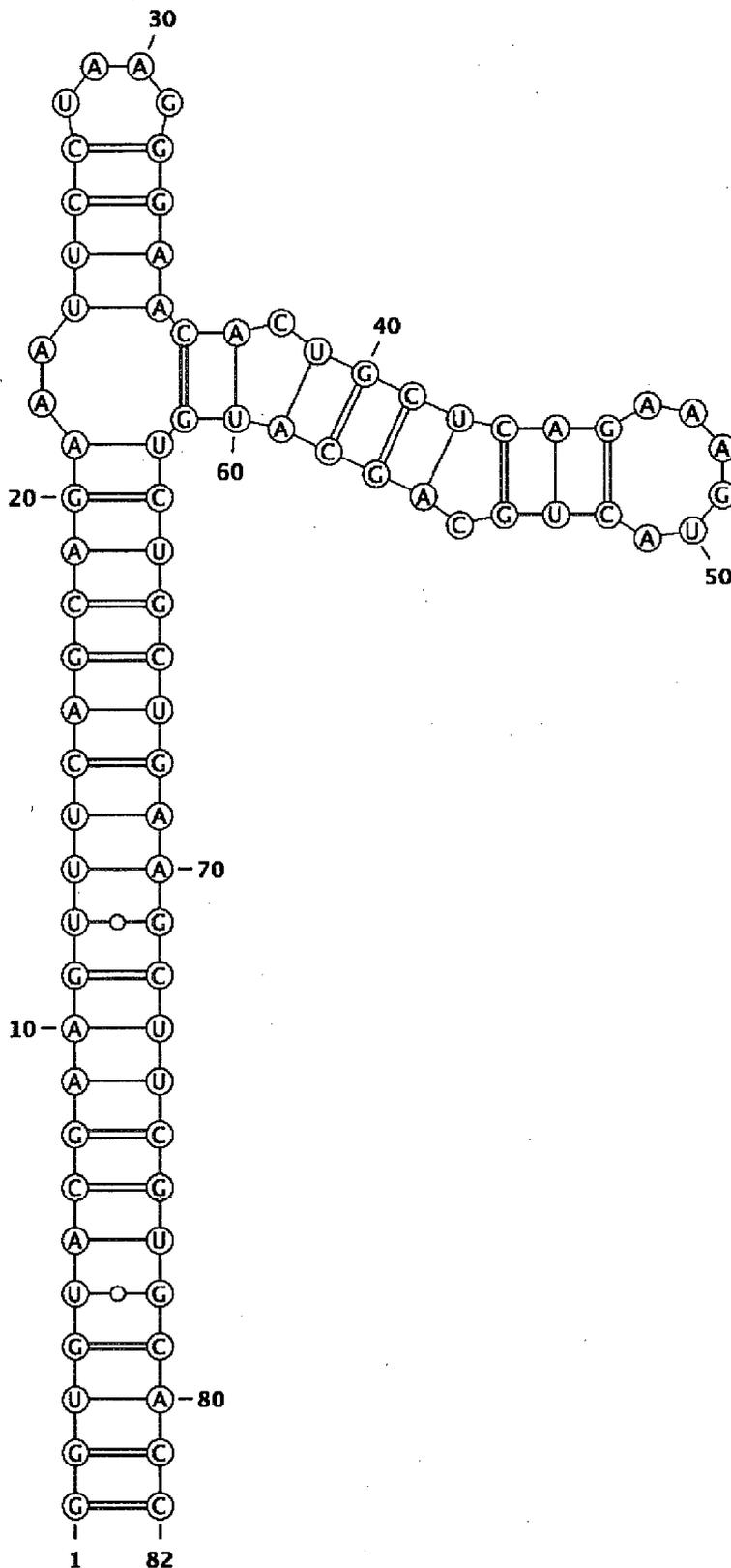


Rank7





[図9] 系統

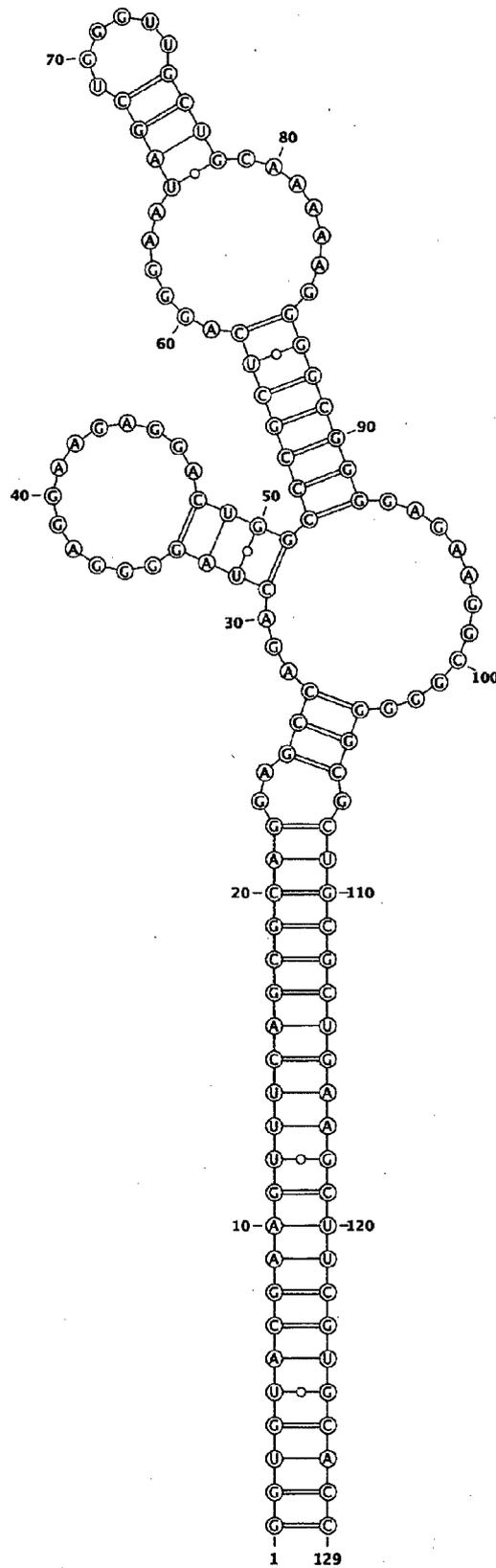


Rank10



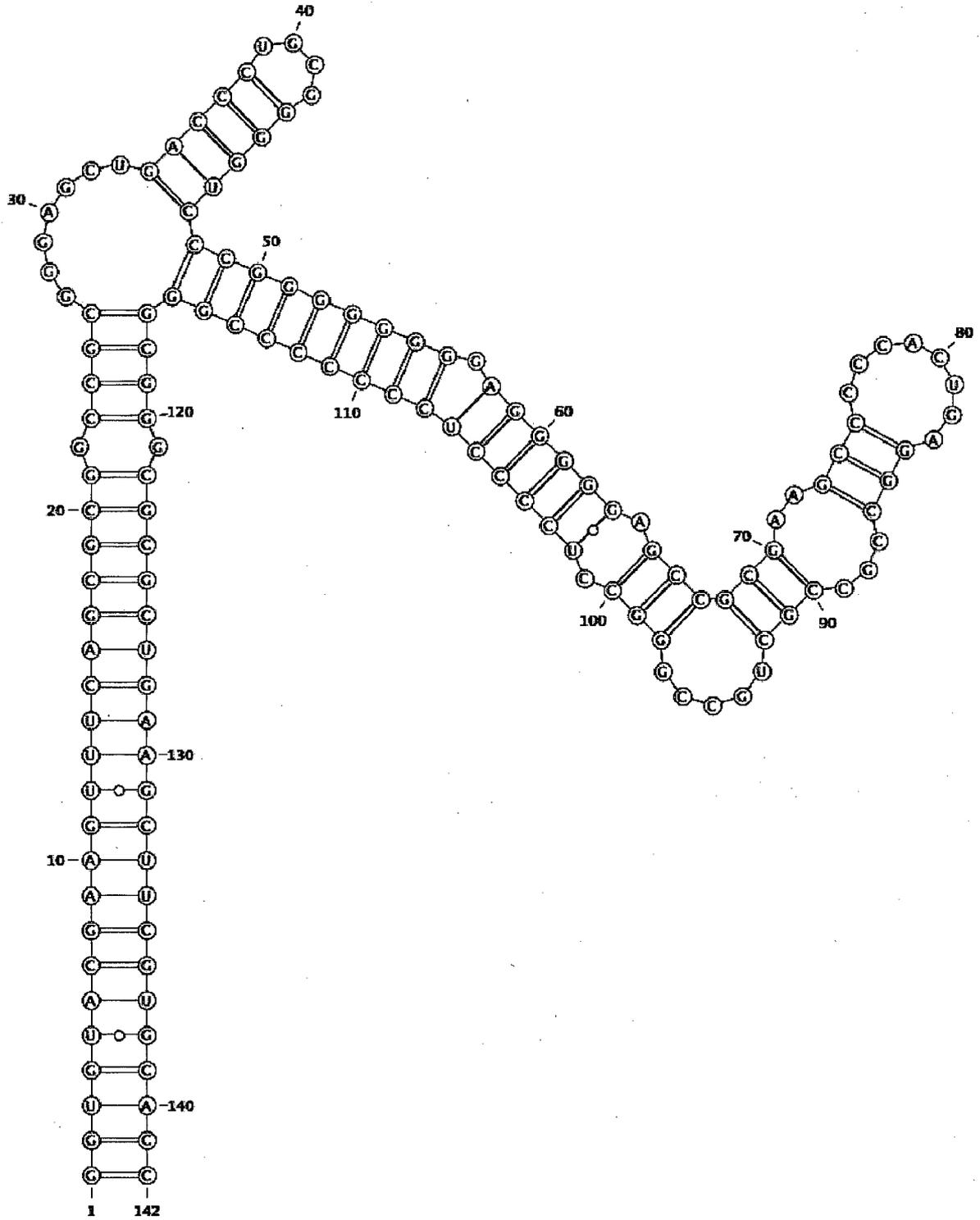


[図9] 糸子



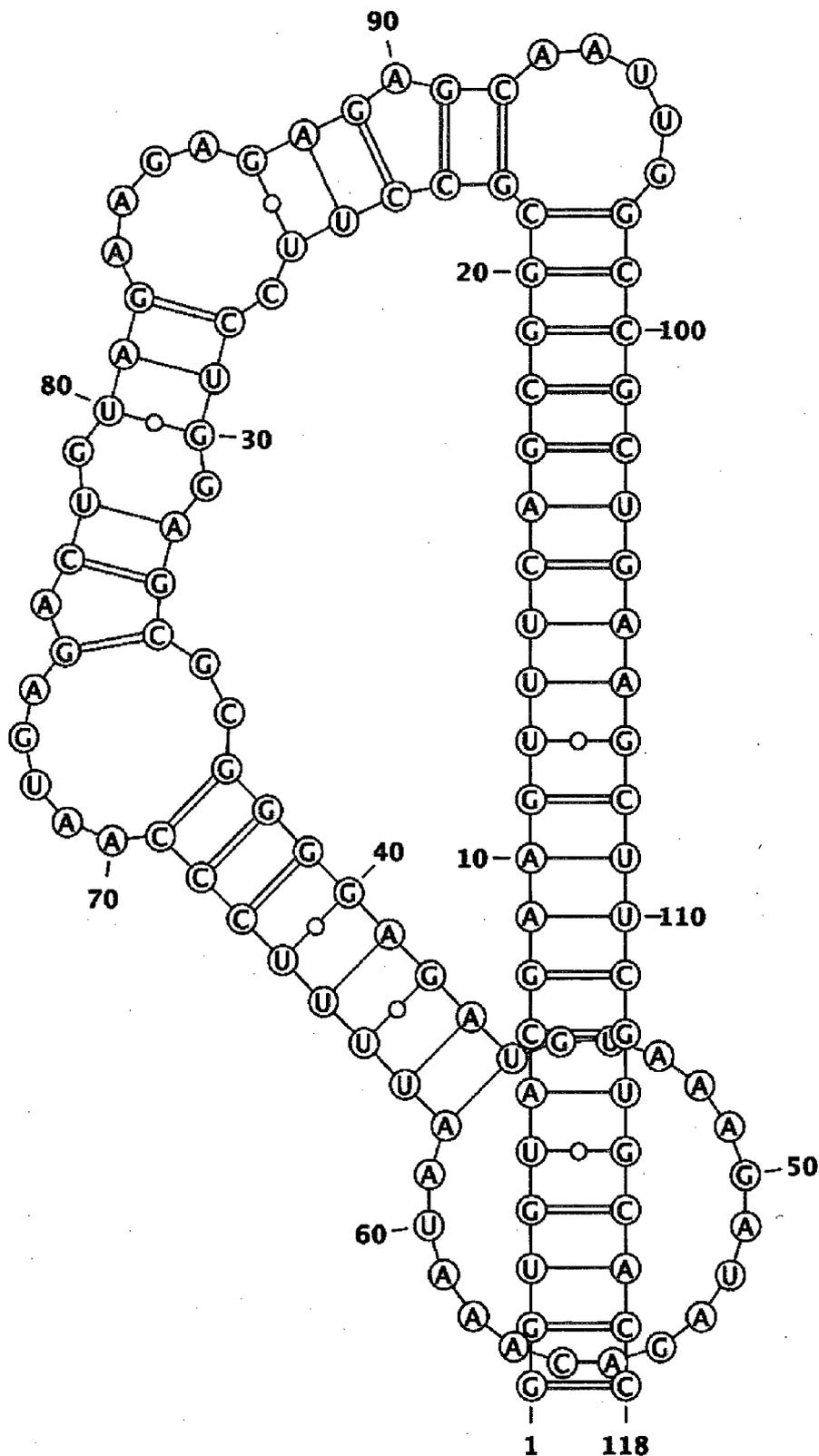
Rank13

[図9] 結晶



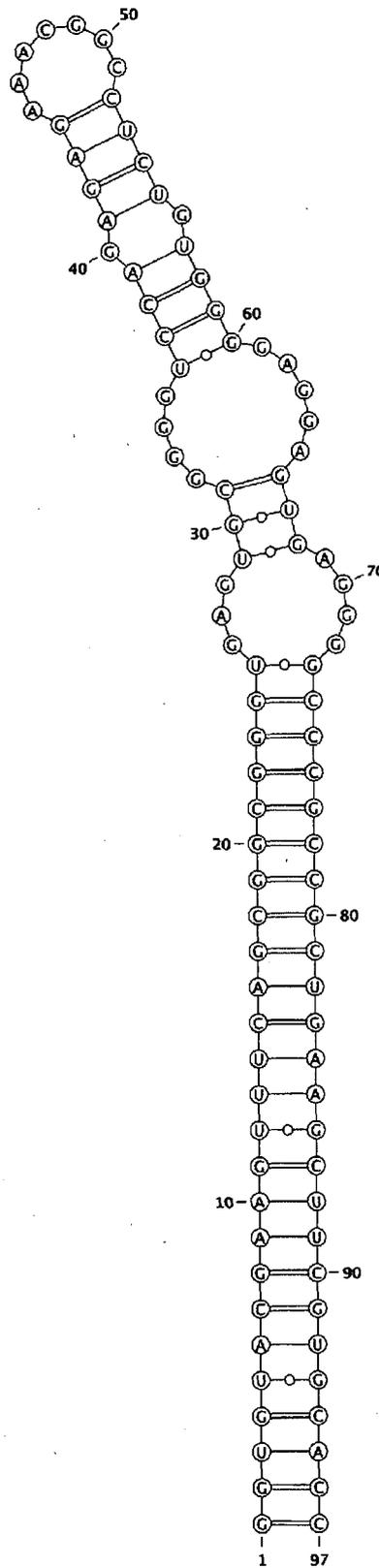
Rank14

[図9] 続き



Rank15

[図9] 続

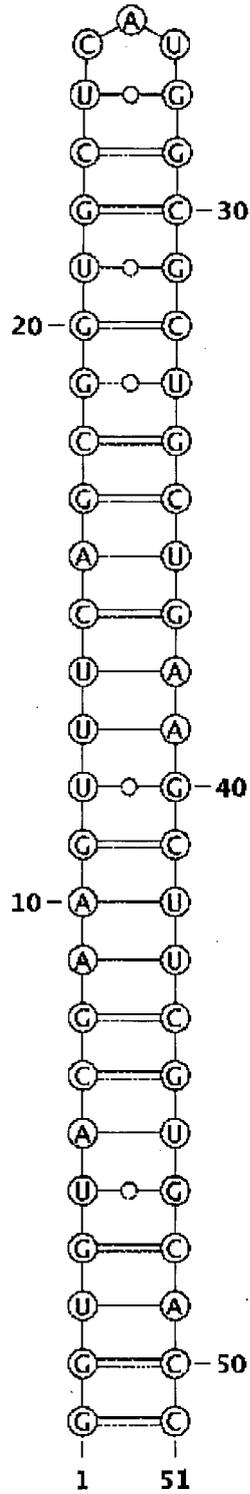


Rank16



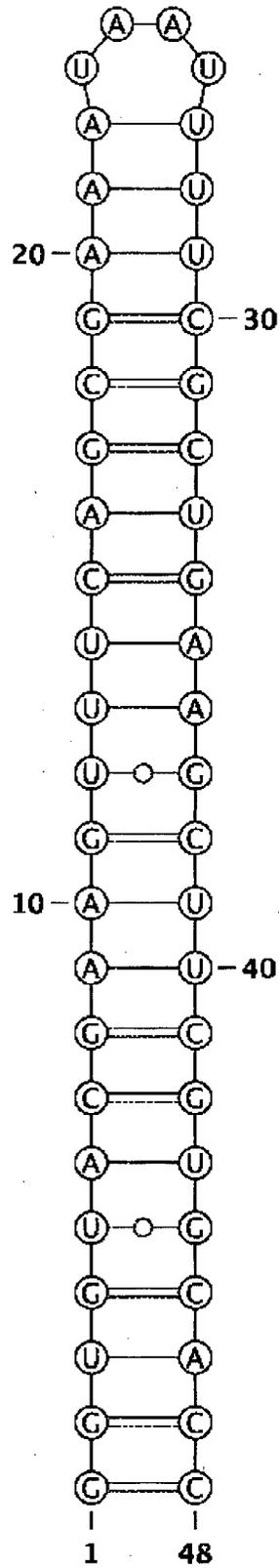


[図10] 続き



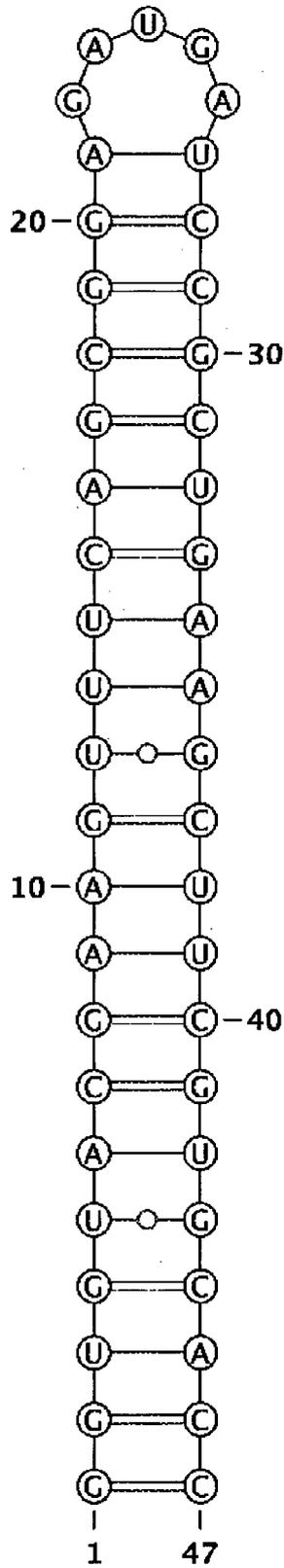
Rank8617

[図10] 続



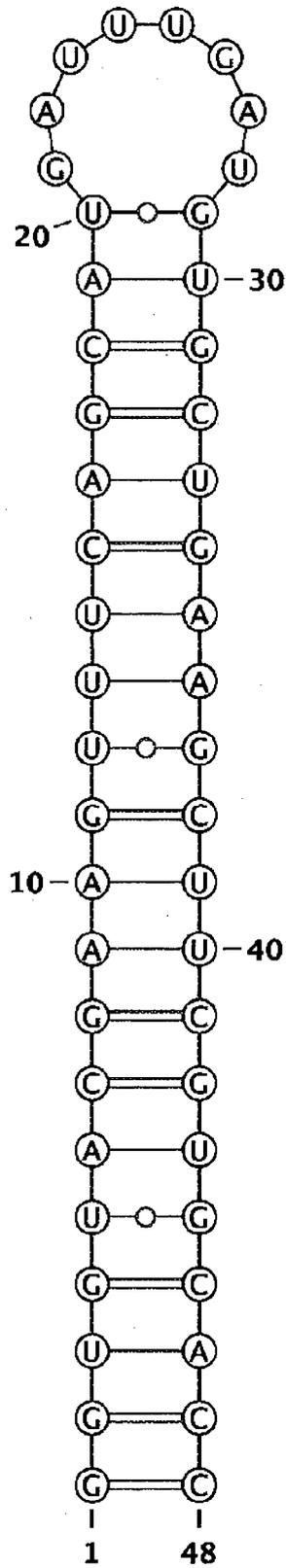
Rank8618

[図10] 糸子



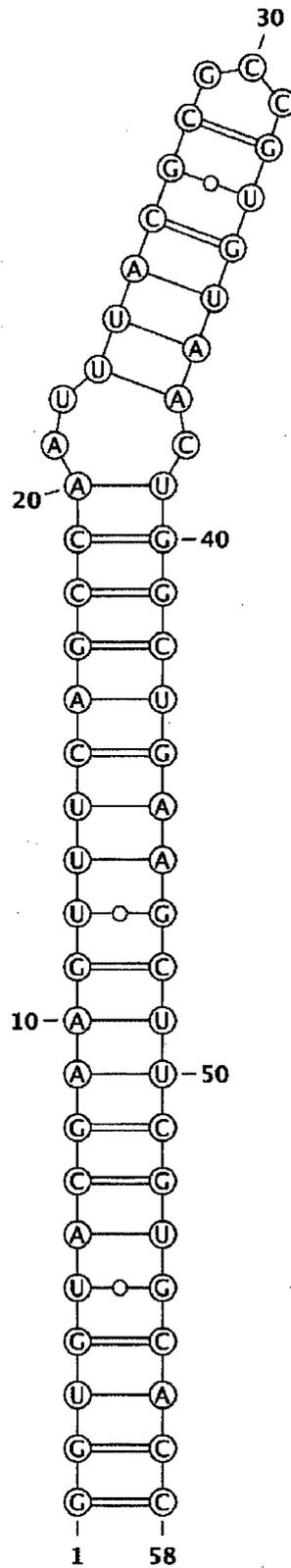
Rank8619

[図10] 続



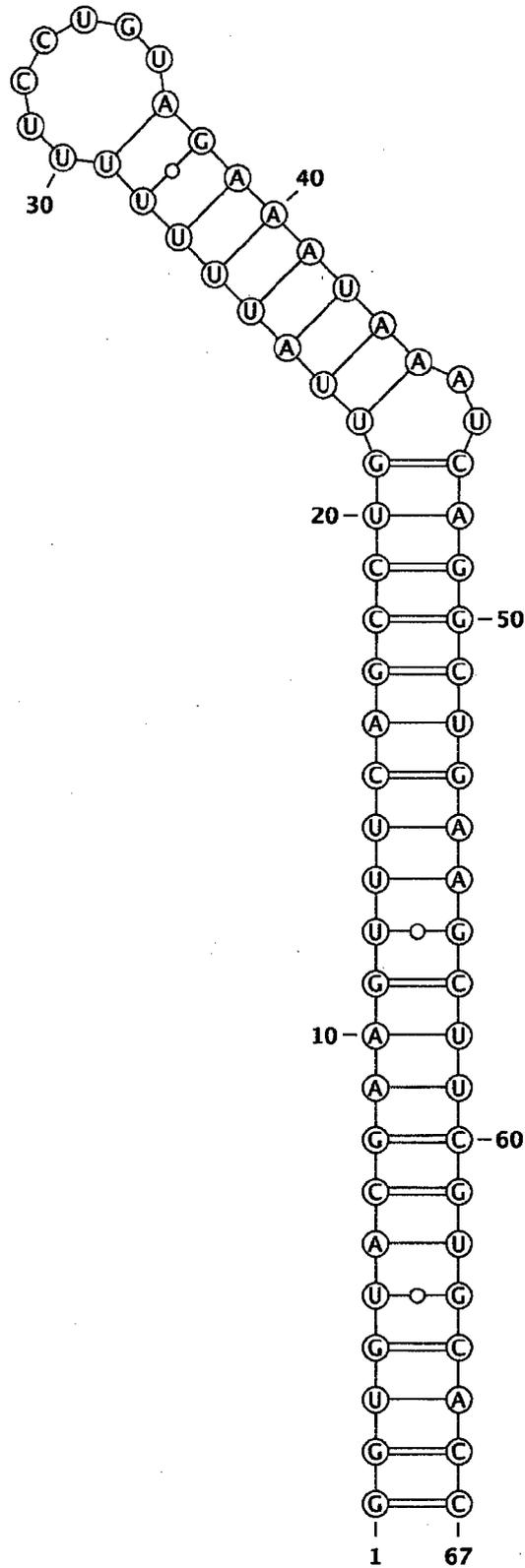
Rank8620

[図10] 続き



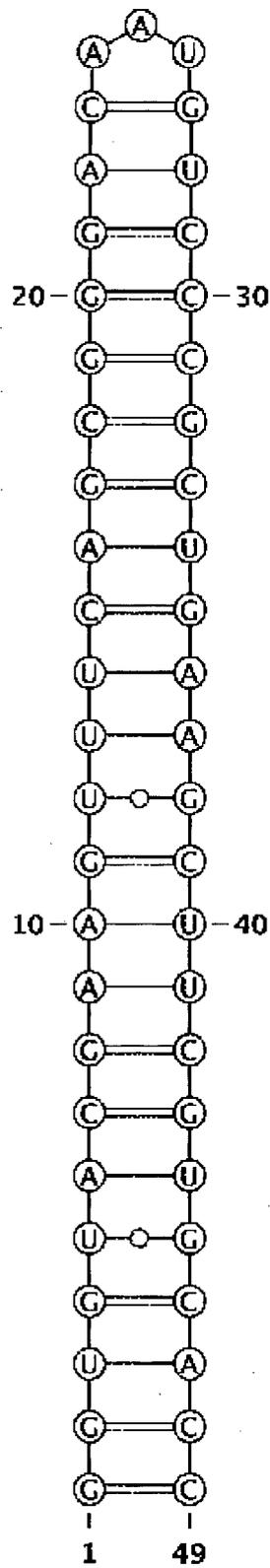
Rank8621

[図10] 続



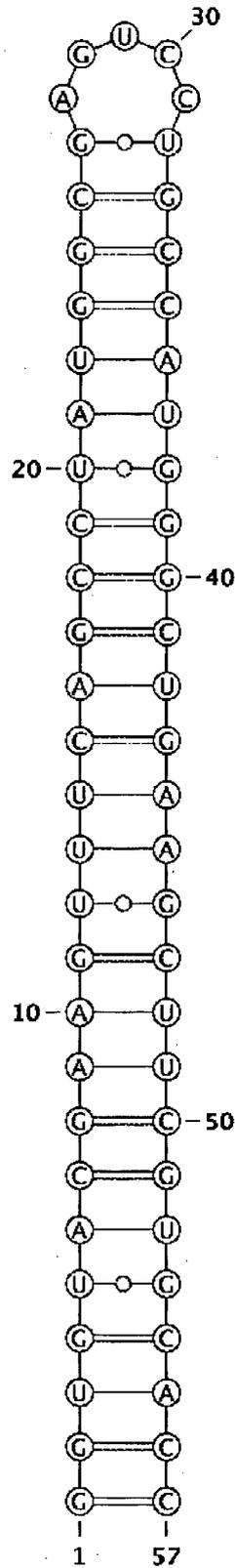
Rank8622

[図10] 続き



Rank8623

[図10] 続



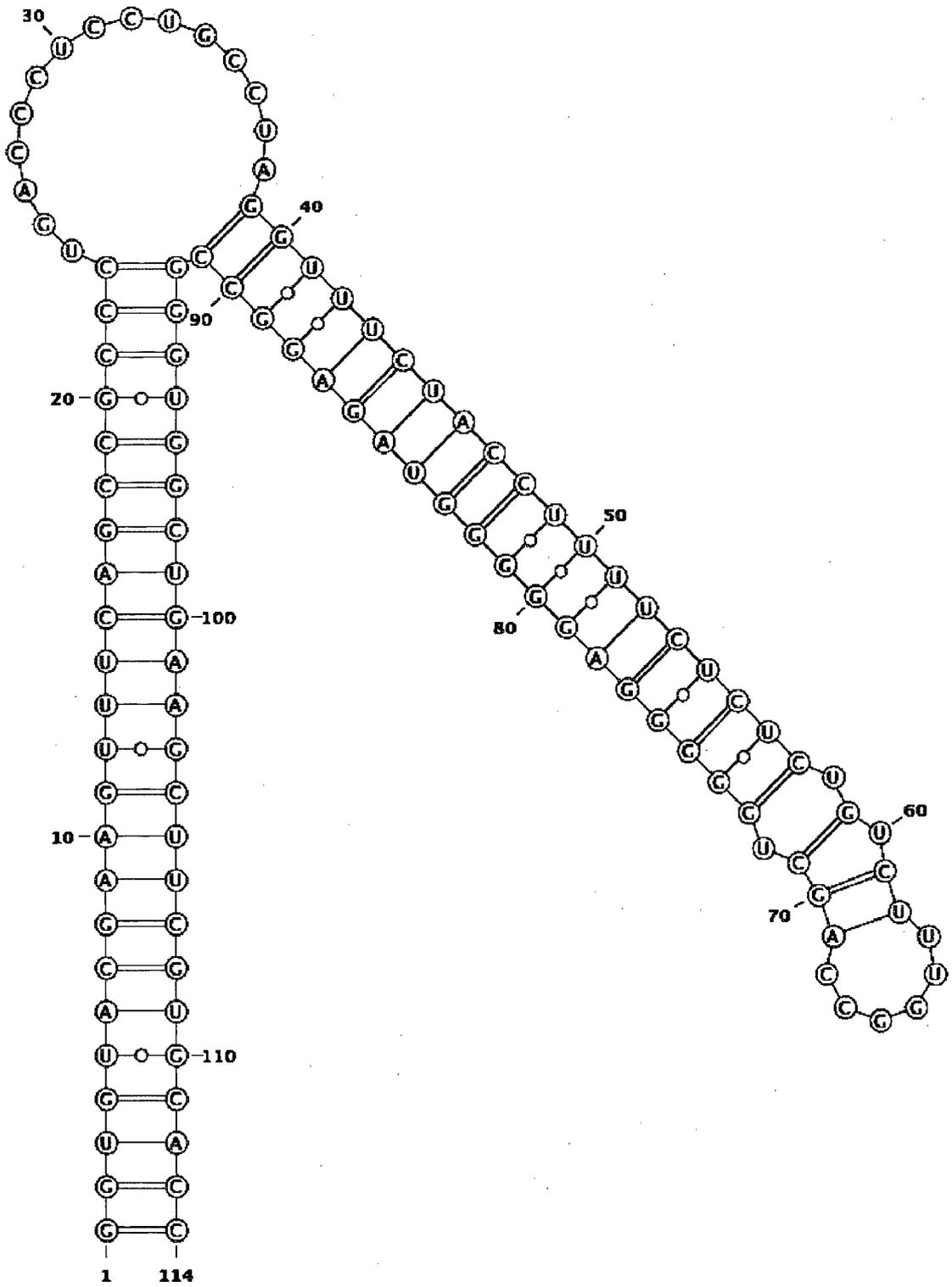
Rank8624





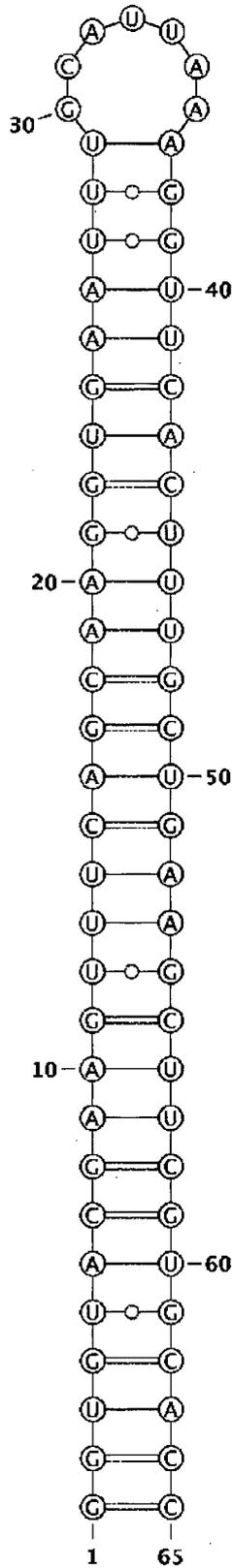


[図10] 続



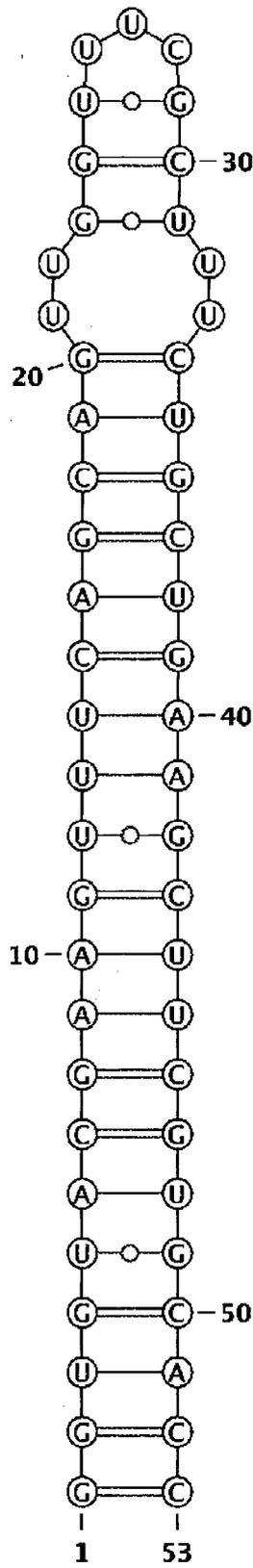
Rank8628

[図10] 糸3



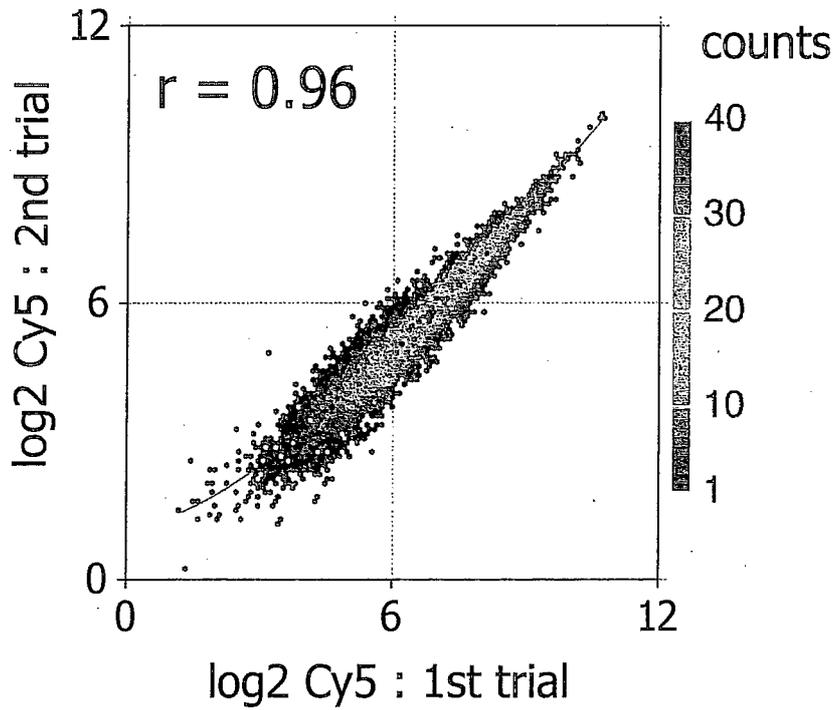
Rank8629

[図10] 続文

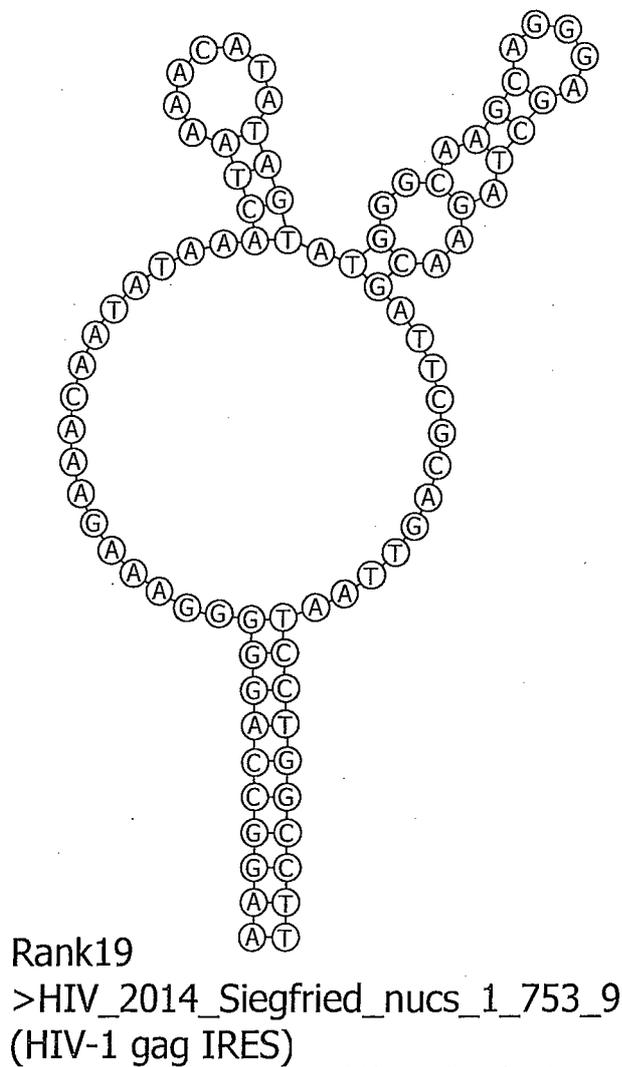


Rank8630

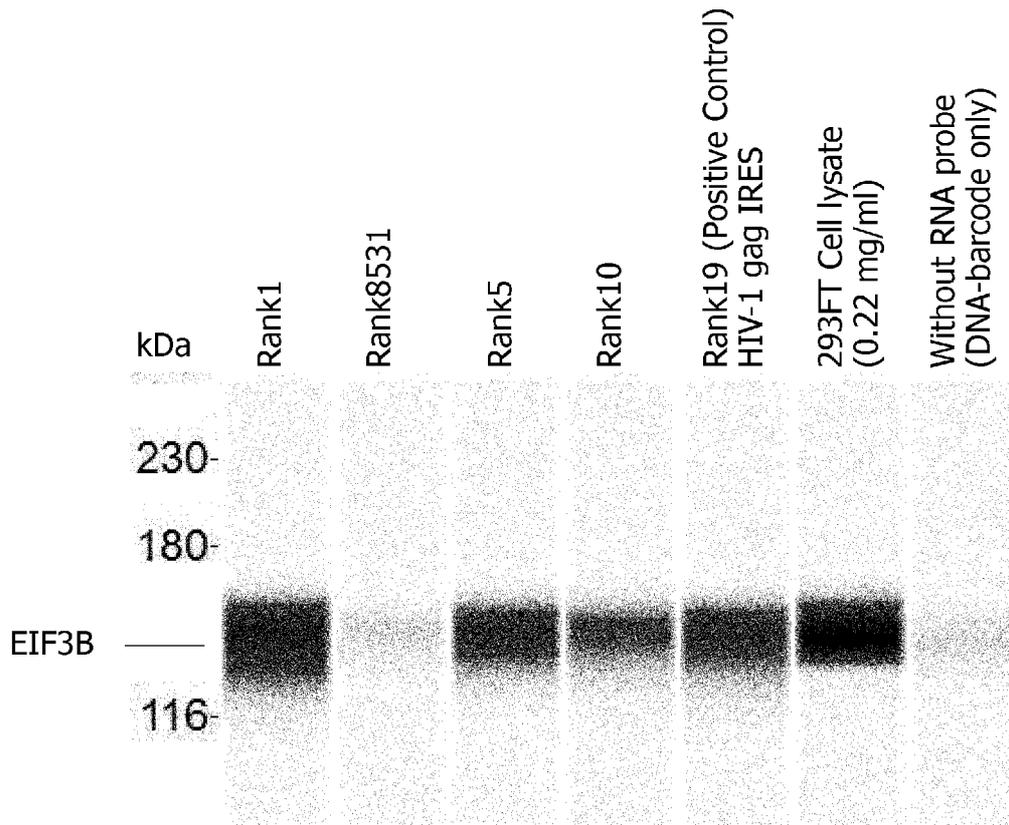
[図11]



[図12]



[13]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2017/023607

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C40B40/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N15/09, C12Q1/68, C40B40/06

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, DWPI(Thomson Innovation), CiNii

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/105179 A1 (Kyoto University), 16 July 2015 (16.07.2015), particularly, claims; fig. 10 & JP 15-105179 A1 & US 2017/0022545 A1 claims; fig. 10 & EP 3093342 A1	3-10 1, 2
X A	JP 2002-191368 A (DNA Chip Research Inc.), 09 July 2002 (09.07.2002), claims; abstract; paragraphs [0081], [0082] & US 2003/0045695 A1 claims; abstract; paragraph [0146]	3-7 1, 2, 8-10

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 September 2017 (13.09.17)	Date of mailing of the international search report 26 September 2017 (26.09.17)
-------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/023607

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2013/161964 A1 (Kirin Holdings Co., Ltd.), 31 October 2013 (31.10.2013), claims; fig. 2-1 & JP 13-161964 A1 & US 2015/0292005 A1 claims; fig. 2-1	3-7 1,2,8-10
Y A	KOMATSU, K. R. et al., The screening system of RNA motif binding to arbitrary proteins by using microarray, Dai 17 Kai The RNA Society of Japan Nenkai Yoshishu, 2015, page 234, P-116, particularly, page 234, 5th to 1st lines from the bottom	1,2 3-10
Y A	SAITO, H., RNA functional/structural motifs that lurk in genome, Cell technology, 2009, Vol.28, No.2, pages 143-148, ISSN 0287-3796, particularly, page 143, right column, line 3 to page 145, left column, line 8	1,2 3-10
Y A	WO 2006/054788 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 26 May 2006 (26.05.2006), particularly, claims & JP 6-54788 A1 & US 2009/0019042 A1 claims & EP 1816191 A1	1,2 3-10
Y A	JP 2007-226700 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 06 September 2007 (06.09.2007), particularly, claims; abstract & WO 2007/097213 A1	1,2 3-10
Y A	HAMADA, M. et al., Mining frequent stem patterns from unaligned RNA sequences, Bioinformatics, 2006, Vol.22, No.20, pages 2480-2487, ISSN 1367-4803, particularly, page 2480, summary	1,2 3-10
Y A	HAMADA, M. et al., Prediction of RNA secondary structure using generalized centroid estimators, Bioinformatics, 2009, Vol.25, No.4, pages 465- 473, ISSN 1367-4803, page 465, summary	1,2 3-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C40B40/06(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68, C40B40/06			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、PubMed、DWPI (Thomson Innovation)、CiNii			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	WO 2015/105179 A1 (国立大学法人京都大学) 2015.07.16, 特に特許請求の範囲, 図10 & JP 15-105179 A1 & US 2017/0022545 A1, 特許請求の範囲, 図10 & EP 3093342 A1	3-10 1,2	
X A	JP 2002-191368 A (株式会社ディーエヌエイチップ研究所) 2002.07.09, 特許請求の範囲, 要約, 段落0081, 0082 & US 2003/0045695 A1, 特許請求の範囲, 要約, 段落0146	3-7 1,2,8-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 13.09.2017		国際調査報告の発送日 26.09.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 白井 美香保	4N 4502
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2013/161964 A1 (キリンホールディングス株式会社) 2013.10.31, 特許請求の範囲, 図2-1 & JP 13-161964 A1 & US 2015/0292005 A1, 特許請求の範囲, 図2-1	3-7 1, 2, 8-10
Y A	KOMATSU, K. R. et al., The screening system of RNA motif binding to arbitrary proteins by using microarray, 第17回日本RNA学会年会要旨集, 2015, p.234, P-116, 特に第234頁下から第5行~第1行	1, 2 3-10
Y A	SAITO, H., RNA functional/structural motifs that lurk in genome, 細胞工学, 2009, Vol.28, No.2, pages 143-148, ISSN 0287-3796, 特に第143頁右欄第3行~第145頁左欄第8行	1, 2 3-10
Y A	WO 2006/054788 A1 (武田薬品工業株式会社) 2006.05.26, 特に特許請求の範囲 & JP 6-54788 A1 & US 2009/0019042 A1, 特許請求の範囲 & EP 1816191 A1	1, 2 3-10
Y A	JP 2007-226700 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.09.06, 特に特許請求の範囲, 要約 & WO 2007/097213 A1	1, 2 3-10
Y A	HAMADA, M. et al., Mining frequent stem patterns from unaligned RNA sequences, Bioinformatics, 2006, Vol.22, No.20, pages 2480-2487, ISSN 1367-4803, 特に第2480頁要旨	1, 2 3-10
Y A	HAMADA, M. et al., Prediction of RNA secondary structure using generalized centroid estimators, Bioinformatics, 2009, Vol.25, No.4, pages 465-473, ISSN 1367-4803, 第465頁要旨	1, 2 3-10