

(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

2015年7月16日(16.07.2015)

(10) 国際公開番号

WO 2015/105179 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) G01N 37/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2015/050494

(22) 国際出願日:

2015年1月9日(09.01.2015)

(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 2014-003734 2014年1月10日(10.01.2014) 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36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36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 田谷 敏貴(TAYA, Toshiki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 横田 俊一(KASHIDA, Shunichi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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), エーラシア (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 MICRO-ARRAY FOR DETECTING INTERACTION BETWEEN PROTEIN AND CONFORMATION-CONTAINING RNA

(54) 発明の名称: タンパク質と高次構造を含むRNAとの相互作用を検出するためのRNAマイクロアレイ

(57) Abstract: Interaction with protein is detected using an RNA probe containing the following sequences: (i) complementary strand to DNA bar-code sequence; (ii) sequence of first stem portion; (iii) the sequence of a second stem portion that is complementary to the first stem portion, to hybridize with the first stem part and form a double-strand stem; and (iv) the sequence of a loop portion contained in RNA that concatenates the first and second stem portions.

(57) 要約: 以下の配列を含むRNAプローブを用いてタンパク質との相互作用を検出する; (i) DNAバーコード配列への相補鎖配列、(ii) 第一のステム部分の配列、(iii) 第一のステム部分とハイブリダイズし、二本鎖ステムを形成するために、第一のステム部分に対して相補的な、第二のステム部分の配列、および(iv) 第一および第二の2つのステム部分を連結するRNAに含有されるループ部分の配列。

明 細 書

発明の名称 :

タンパク質と高次構造を含むRNAとの相互作用を検出するためのRNAマイクロアレイ

技術分野

[0001] 本発明は、任意のタンパク質と相互作用するPre-miRNAを検出するためのRNAマイクロアレイに関する。

[0002] RNA—タンパク質（RNP）相互作用は遺伝子発現における主要な制御因子であり、特異的なRNP相互作用が細胞運命や疾患を決定することが示されている（非特許文献1）。

[0003] 例えば、Pre-let7 miRNAのloop-stem-loop構造の2のloop部位とLin28Aタンパク質は2か所で結合するように（非特許文献2）、10塩基以上の鎖長を持つRNAは、DNAよりも複雑な立体構造を自己形成する性質を持ち、多くの場合、この構造形成されたRNAがタンパク質との特異的な相互作用に必須となる。

[0004] 最近のRNAタンパク質相互作用解析研究によって、7~9塩基程度のランダム配列から既知のRNA結合タンパク質に対して結合親和性の高い配列を特定する網羅的な研究がされているが、これらの短いRNA配列に結合するタンパク質はハウスキーピング遺伝子が多く、特異的な応答をもたらすような特性は少ないことが確認されている（非特許文献3）。細胞運命制御の因子としての潜在性がある10塩基以上の構造を持ったRNA配列とタンパク質の大規模相互作用解析は依然進んでいない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Keene, J. D. (2007) Nature reviews. Genetics 8, 533-543.

非特許文献2 : Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I. et al. (2011) Cell 147, 1080-1091.

非特許文献3 : Ray, D., Kazan, H., Cook, K. B. et al. (2013) Nature 499,

172-177.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 任意のタンパク質と高次構造を含むRNAの相互作用を網羅的に解析する方法が望まれている。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、既存の方法で予想されたPre-miRNAの二次構造のうちループ部位を有するRNAプローブを網羅的に作製し、これらのRNAプローブを有するRNAマイクロアレイによって、対象タンパク質と相互作用するPre-miRNAを特定することができるを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、以下を提供する。

[1]以下の配列を含むRNAプローブ；

(i) DNAバーコード配列への相補鎖配列、

(ii) 第一のステム部分の配列、

(iii) 第一のステム部分とハイブリダイズし、二本鎖ステムを形成するために、第一のステム部分に対して相補的な、第二のステム部分の配列、および
(iv) 第一および第二の2つのステム部分を連結するループ部分の配列。

[2]前記ループ部分の配列が、Pre-miRNAに含有されるループ部分の配列である、[1]に記載のRNAプローブ。

[3]3'末端を蛍光標識された、[1]または[2]に記載のRNAプローブ。

[4]前記Pre-miRNAが、ヒトまたはマウスのPre-miRNAである、[2]または[3]に記載のRNAプローブ。

[5]DNAバーコード配列を付加されたスライドおよび[1]から[4]のいずれか1項に記載のRNAプローブをハイブリダイズさせることを含む、RNAと結合するたんぱく質を検出するために用いられるRNAマイクロアレイの製造方法。

[6]DNAバーコード配列を付加されたスライドおよび[1]から[4]のいずれか1項に記載のRNAプローブをハイブリダイズさせることによって製造される、

RNAマイクロアレイ。

[7]前記(i)の配列が異なり、前記(ii)の配列、(iii)および(iv)の配列が同一である2種以上のRNAプローブを有する、[6]に記載のRNAマイクロアレイ。

[8]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) [6]または[7]に記載のRNAマイクロアレイおよびRNAプローブをハイブリダイズしていないDNAバーコード配列を付加されたスライドと蛍光標識された対象タンパク質と接触させる工程、

(2) 当該対象タンパク質と結合したRNAプローブおよびDNAバーコード配列を特定する工程、および

(3) 工程(2)で特定されたDNAバーコード配列と対応する相補鎖を有するRNAプローブを工程(2)で特定されたRNAプローブから削除して得られたRNAプローブに含まれるループ部分の配列を含む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。

[9]前記RNAが、Pre-miRNAである、[8]に記載の方法。

[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) [1]から[4]のいずれか1項に記載のRNAプローブおよび対象タンパク質を接触させる工程、

(2) 工程(1)で得られた対象タンパク質をRNAプローブとの結合を保持したまま単離する工程、

(3) 工程(2)で得られた対象タンパク質からRNAプローブを抽出する工程、

(4) 工程(3)で得られたRNAプローブとDNAバーコード配列を付加されたスライドを接触させる工程、

(5) 前記DNAバーコード配列を付加されたスライド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プローブに含まれる(iv)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。

[11]前記RNAが、Pre-miRNAである、[10]に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、DNAバーコード配列を利用して既存のマイクロアレイ技術を利用したままRNAをスライドの所望の位置に設置することができるため、網羅的に任意のタンパク質と相互作用するRNAを特定することができる。本発明による方法は、Pre-miRNAのループ部位の二次構造を保持したまま当該ループ部位と相互作用するタンパク質を検出することができる点で特に有利である。

[0010] さらに、本発明では、DNAバーコード配列に対して対象となるタンパク質が結合することによるノイズが発生することを防ぐため、当該タンパク質が結合するDNAバーコード配列を検出結果から除去することにより、所望のタンパク質が結合するRNAの二次構造のみを正確に検出することを可能にする。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、RNAプローブを転写する鑄型DNAの設計の模式図を示す。

[図2]図2は、Pre-miRNAのループ部位の設計の模式図を示す。

[図3]図3は、RNAアレイの作製方法のプロトコールの模式図を示す。

[図4]図4は、PoP_00001_KtとCy3-L7Aeの相互作用をゲルシフトアッセイにて確認した結果を示す。

[図5]図5は、PoP_00001およびPoP_000018-28とCy3-L7Aeの相互作用をRNAマイクロアレイで検出した結果を示す。

[図6]図6は、PoP_00024とCy3-L7Aeの相互作用をゲルシフトアッセイにて確認した結果を示す。

[図7]図7は、PoP_00010_U1A2、PoP_00014_U1Aなど18種のRNAプローブとCy3-U1Aの相互作用をRNAマイクロアレイで検出した結果を示す。

[図8]図8は、RNAプローブ(RNP_00001-06500)とDNA鑄型のハイブリダイズを調べた結果を示す。

[図9]図9は、Cy3-L7Aeとの相互作用するRNAプローブ(RNP_00001-06500)をマイクロアレイで検出した結果を示す。

[図10]図10は、共沈法によるタンパク質-RNA相互作用の検出方法の模式図を示す。

[図11]図11は、Lin28Aと相互作用するRNAプローブ(RNP_00001-06500)をLin28Aと共に沈させてマイクロアレイで検出した結果を示す。縦軸は、Lin28Aと共に沈させた場合のCy5の蛍光強度を示し、横軸は、beadsのみと共に沈させた場合のCy5の蛍光強度を示す。

[図12]図12は、U1Aと相互作用するRNAプローブ(RNP_00001-06500)をU1Aと共に沈させてマイクロアレイで検出した結果を示す。縦軸は、U1Aと共に沈させた場合のCy5の蛍光強度を示し、横軸は、beadsのみと共に沈させた場合のCy5の蛍光強度を示す。

発明を実施するための形態

[0012]以下に、本発明を、実施形態を挙げて詳細に説明する。以下の実施形態は本発明を限定するものではない。

[0013]本発明は、以下の配列を含むRNAプローブを提供する；
(i) DNAバーコード配列への相補鎖配列、
(ii) 第一のステム部分の配列、
(iii) 第一のステム部分とハイブリダイズし、二本鎖ステムを形成するために、第一のステム部分に対して相補的な、第二のステム部分の配列、および
(iv) 2つのステム部分を連結するRNAに含有されるループ部分の配列。

[0014]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核酸分子、より好ましくは、RNA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。当該RNAプローブは、検出に用いるため、放射性同位体、ジゴキシゲニン (DIG)、蛍光色素（例えば、FITC、PE、Cy3およびCy5）、ビオチンなどの分子（抗原）を取り込ませることで標識しても良い。標識に際しては、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も可能であり、例えば、第一のステム部分の5'側に設置されたG基（グアニン基）に対して相補的であるC基（シチジン基）を標識した後（例えば、3'， 5' -cytidine bisphosphate-Cy5 (pCp-Cy5)

)) 、3'末端に取り込ませることによって標識する方法である。

- [0015] 本発明において、RNAプローブは、上記に従って配列が決定されれば、遺伝子工学的に既知の任意の方法により当業者が合成することができる。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 (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N 6-メチルアデノシンが例示される。
- [0016] 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) 技術を用いて行なうことが好ましく、この場合、全てのRNAプローブ配列を含有するDNAを特定の塩基長 (200塩基以下が望ましく、例えば、180塩基) にて合成するため、RNAプローブおよび前記プロモーター配列以外に、調節配列を有していても良い。当該調節配列は、機能的な配列、例えば、プロモーター配列、ポリA配列、他の配列と相補的な配列でなければ良く、例えば、配列番号1から適宜選択される所望の塩基長分の配列を用いても良い。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。
- [0017] 本発明のDNAバーコード配列とは、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., Schlabach, M.R., Hannon, G.J. et al. (2009) PNAS 106, 2289-2294)などと呼ばれる配列であり、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塩基の配列であり、好ましくは、25塩基である。本発明では、マイクロビーズまたはスライドガラス等の固定化用支持体上に当該DNAバーコード配列をスポットしたマイクロアレイに対してハイブリダイズさせることによって、特定の部位にRNAプローブを設置することを目的とするため、当該RNAプローブには、DNAバーコード配列に対する相補鎖の配列を有することが好ましい。

[0018] 本発明において、システムとは、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が、二重らせん構造を取る部位を意味し、第一のシステムとは、任意の核酸配列であり、第二のシステムとは当該第一のシステムと相補的な配列を言う。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、本発明において、第二のシステムが第一のシステムに相補的であるとは、第二のシステム部分は第一のシステム部分に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の配列相補性を持てば良い。第一のシステム部分は、配列番号3が例示され、第二のシステム部分は、配列番号4が例示される。本発明では、上記のとおりRNAプローブの3'末端に蛍光色素標識されたシチジン(pCp-Cy5)を付加させることが好適であることから、第一のシステムの5'末端にはグアニン基を付加することが望ましい。蛍光色素標識をシチジン以外の塩基に対して標識する場合、第一のシステムの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。

[0019] 本発明において、「2つのシステム部分を連結する」とは、第一のシステムの3'末端と第二のシステムの5'末端の間を連結させることを意味し、当該連結させる配列は、タンパク質との相互作用を検出すべき配列であれば、任意の配列からなるRNAであってよく、例えば、ステムループ構造を持つRNAのループ部分であり、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塩基以下のRNAが例示される。好ましいRNAは、任意のPre-miRNAに含有されるループ部分である。

[0020] 本発明において、Pre-miRNAとは、miRNAとその相補鎖を含むヘアピンループ構造を取ることが可能な一本差のRNAである。本発明において、miRNAとは、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与する、細胞内に存在する短鎖（20-25塩基）のノンコーディングRNAである。このmiRNAは、Pri-miRNAとして転写され、核内にあるDroshaと呼ばれる酵素により一部が切断されPre-miRNAとなって核外に輸送された後、さらにDicerによって切断され、ステム構造が解けたのち一本鎖RNA（mature miRNA）として機能する。従って、本発明において、Pre-miRNAに含有されるループ部位には、Pri-miRNAに含有されるループ部位と区別されるものではない。Pre-miRNAは、データベースの情報（例えば、<http://www.mirbase.org/>又は<http://www.microRNA.org/>）などにおいて、stem-loop配列として、その配列が入手できる。本発明において好ましいPre-miRNAは、ヒトまたはマウス由来の配列である。

[0021] 本発明において、任意のPre-miRNAに含有されるループ部分とは、Pre-miRNAのうちmature miRNAとその相補鎖となる部分の一部を除く配列を有する一本鎖RNA部分を意味し、例えば、次の通り定義された方法によって抽出することができる。

(I) Pre-miRNAにmature miRNAが1つ含まれている場合

(1) mature miRNAがループの5'側の場合、Pre-miRNAに含有されるループ部分は、当該mature miRNAの3'側から4塩基目を始点とし、当該始点の塩基と対合する塩基を終点とする（図1（a）下段参照のこと）。このとき、ミスマッチにより対合する塩基がない場合は、始点から3'側の次の塩基目に対合する塩基を終点とする。

(2) mature miRNAがループの3'側の場合、Pre-miRNAに含有されるループ部分は、当該mature miRNAの5'側から4塩基目を終点とし、当該始点の塩基と対合する塩基を始点とする（図1（a）上段参照のこと）。このとき、ミスマ

ツチにより対合する塩基がない場合は、終点から5' 側の次の塩基に対合する塩基を始点とする。

(II) Pre-miRNAにmature miRNAが2以上含まれている場合

(1) ループ側からより離れたmature miRNAに着目し、当該mature miRNAループの5' 側の場合、Pre-miRNAに含有されるループ部分は、当該mature miRNAの3' 側から4塩基目を始点とし、当該始点の塩基と対合する塩基を終点とする。このとき、ミスマッチにより対合する塩基がない場合は、始点から3' 側の次の塩基目に対合する塩基を終点とする。

(2) ループ側からより離れたmature miRNAに着目し、当該mature miRNAがループの3' 側の場合、Pre-miRNAに含有されるループ部分は、当該mature miRNAの5' 側から4塩基目をループ部分の終点とし、当該始点の塩基と対合する塩基をループ部分の始点とする。このとき、ミスマッチにより対合する塩基がない場合は、終点から5' 側の次の塩基に対合する塩基を始点とする。

[0022] 本発明では、上述したRNAプローブをDNAバーコード配列を付加されたマイクロビーズまたはスライドガラス等の固定化用支持体とハイブリダイズさせる工程を含む、RNAマイクロアレイを製造する方法を提供する。本発明においては、固定化用支持体としては、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が挙げられ、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。

[0023] 固定化用支持体に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、固定化用支持体にも該核酸と反応し得る官能基（例：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したり、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などの方法が挙げられるが、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ー法を用いて核酸プローブを基板（ガラス、シリコンなど）上で1ヌクレオチドずつ合成するA f f y m e t r i x方式と、マイクロスポットティング法、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トティングする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。

- [0024] 上述のように用意したDNAバーコード配列を付加された固定化用支持体とRNAプローブとをハイブリダイズすることによって、固定化用支持体とRNAプローブを特異的に結合させることができる。当業者は、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、洗浄の温度等を適宜変更することにより、実施することができる。
- [0025] 本発明の方法を用いることで、100以上のRNAプローブを同一の固定化用支持体（例えば、1インチ×3インチのガラススライド）にスポットすることができますであり、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。
- [0026] 本発明において、当該RNAプローブを有するRNAマイクロアレイに対して、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相互作用するRNAプローブを検出することができる。このとき用いる溶媒は、例えば、Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20を含有する水溶液が例示される。当該タンパク質は、検出を行うため、放射性同位体、ジゴキシゲニン (DIG)、蛍光色素（例えば、FITC、PE、Cy3およびCy5）などで標識してもよく、RNAプローブに対して行った標識とは異なる標識を行うことが好ましい。RNAプローブはCy5で標識され、当該タンパク質はCy3で標識される

ことがより好ましい。本発明において相互作用とは、タンパク質とRNAプローブとが結合することを意味し、ここでの結合とは、2つの分子を機能的に接続する（これは、「物理的に結合された」と呼ばれる）ための当該分野で公知の任意の状態を指し、これには、非共有結合、共有結合（例えば、ジスルフィド結合および共有結合）、水素結合、静電結合ならびに高次構造結合（例えば、鍵-鍵穴結合）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、当該RNAマイクロアレイに対してタンパク質を供した後、同溶媒で洗浄しても結合している場合を相互作用すると言い換えることができる。

[0027] 本発明において、タンパク質とRNAプローブの相互作用を検出する第一の方法は、以下の工程を含むことを特徴とする；

- 1) 前記RNAプローブを含むRNAマイクロアレイと、前記タンパク質とを接触させる工程、
- 2) 工程1におけるRNAプローブと前記タンパク質の相互作用を、前記タンパク質に対する標識物質に基づく測定手段により測定する工程、および
- 3) 工程2で得られる測定結果に基づき、前記RNAマイクロアレイ上の前記タンパク質の量を計算する工程。

[0028] 前記測定手段は、前記標識物質の存在を検出し、その存在量を測定できる機能を備える分析機器が使用される。前記標識物質が蛍光物質であれば光学的な検出装置を備えた機器が使用される。

[0029] 前記「計算」は、予め検出に用いた前記タンパク質と相互作用しないことが確認されたRNAプローブに対する前記タンパク質の標識物質量を使用することにより当該RNAプローブにおけるタンパク質量を計算することである。

[0030] 本発明では、前記の予め相互作用しないことが確認されたRNAプローブに対するタンパク質の標識物質量よりも高値であった場合、当該高値を示したRNAプローブに対してタンパク質が相互作用するとして検出することができる。

[0031] 本発明において、タンパク質とRNAプローブの相互作用の検出において誤認識を防ぐため、(ii) 第一のステム部分の配列、(iii) 第一のステム部分とハイブリダイズし、二本鎖システムを形成するために、第一のステム部分に対

して相補的な、第二のステム部分の配列、および(iv) 2つのステム部分を連結するPre-miRNAに含有されるループ部分の配列 ((ii)、(iii) および(iv) を合わせて、タンパク質認識部位という) が同一であり、(i) DNAバーコード配列への相補鎖配列が異なる2種以上のRNAプローブを含むRNAマイクロアレイであることが好ましい。同一のタンパク質認識部位を有し、異なる(i) DNAバーコード配列への相補鎖配列を有する2種以上のRNAプローブ含むRNAマイクロアレイに対して対象タンパク質を供した場合、20%以上、25%以上、33%以上、50%以上、66%以上、75%以上、100%の割合で当該同一のタンパク質認識部位を有するRNAプローブと対象タンパク質が相互作用したことが検出できたとき、当該タンパク質認識部位は対象タンパク質と相互作用すると言える。

[0032] 本発明の方法を用いて行うことで、35塩基以上のタンパク質認識部位を有するRNAプローブに対して同時に相互作用を検出することが可能であり、例えば、40塩基以上、50塩基以上、60塩基以上、70塩基以上のタンパク質認識部位を有するRNAプローブに対して実施し得る。

[0033] 本発明では、DNAバーコード配列にタンパク質が相互作用することが確認されたため、上述の第一の方法では、RNAプローブのタンパク質認識部位のみに相互作用するタンパク質を特異的に検出するために、以下の第二の方法を用いることができる；

- 1) RNAプローブを含むRNAマイクロアレイと前記対象タンパク質を含む試料を接触させる工程、
- 2) RNAプローブを含まないDNAバーコード配列を含むDNAマイクロアレイと前記対象タンパク質を含む試料を接触させる工程、
- 3) 工程1におけるRNAプローブと前記タンパク質の相互作用を、前記タンパク質に対する標識物質に基づく測定手段により測定する工程、
- 4) 工程3で得られる測定結果に基づき、前記RNAマイクロアレイ上の前記タンパク質の量を計算する工程。
- 5) 工程2におけるDNAバーコード配列と前記タンパク質の相互作用を、前記

タンパク質に対する標識物質に基づく測定手段により測定する工程、
6) 工程5で得られる測定結果に基づき、対応するDNAバーコード配列を抽出する工程、および
7) 工程4の計算によって前記対象タンパク質と相互作用すると検出されたRNAプローブから工程6で抽出されたDNAバーコード配列に対応するRNAプローブを削除する工程。

[0034] すなわち、当該第二の方法は、以下の工程を含む方法である；

(1) RNAプローブを含むRNAマイクロアレイおよびRNAプローブをハイブリダイズしていないDNAバーコード配列を付加されたスライドと蛍光標識された対象タンパク質と接触させる工程、
(2) 当該対象タンパク質と結合したRNAプローブおよびDNAバーコード配列を特定する工程、および
(3) 工程(2)で特定されたDNAバーコード配列と対応する相補鎖を有するRNAプローブを工程(2)で特定されたRNAプローブから削除して得られたRNAプローブに含まれる配列を含むPre-miRNAを当該対象タンパク質と結合するPre-miRNAとして検出する工程。

[0035] 本発明において、第二の方法を用いることによって、対象タンパク質がDNAバーコード配列に対して相互作用するノイズを消去し、RNAプローブと前記対象タンパク質が特異的に相互作用するRNAプローブを検出することを可能とする。

[0036] 本発明の第一の方法および第二の方法において、検出において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で行うことができる。より好ましくは、40 nM以下である。

[0037] 本発明において、タンパク質とRNAプローブの相互作用を検出する第三の方法は、以下の工程を含むことを特徴とする；

(1) 前記RNAプローブおよび対象タンパク質を接触させる工程、
(2) 工程(1)で得られた対象タンパク質をRNAプローブとの結合を保持し

たまま単離する工程、

(3) 工程(2)で得られた対象タンパク質からRNAプローブを抽出する工程

、

(4) 工程(3)で得られたRNAプローブとDNAバーコード配列を付加されたスライドを接触させる工程、

(5) 前記DNAバーコード配列を付加されたスライド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プローブに含まれる(iv)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。

[0038] 本発明の第三の方法において、対象タンパク質は、工程(2)において、RNAプローブとの結合を保持したまま単離するために、レジン等の担体と結合させても良い。本発明において、担体は、磁性ビーズであっても良い。対象タンパク質と結合させるため、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）、ビオチンまたはグルタチオンと交差結合または、コーティングされていることが好ましい。対象タンパク質は、担体等と結合させるため、HisタグまたはGSTタグを付しても良く、対象タンパク質に特異的な抗体を用いても良い。

[0039] 本発明の第三の方法において用いる、RNAプローブは、100 μg以下の量にて行うことができる。より好ましくは、1 μgである。

[0040] 本発明の第三の方法の工程(5)には、RNAプローブの蛍光色素標識を検出し、当該蛍光色素が検出されたスライドの位置に対応するDNAバーコード配列を特定し、当該DNAバーコード配列を有するRNAプローブを検索することによってRNAプローブを特定することができる。

[0041] 本発明の第三の方法において、検出においてマイクロアレイに供する対象タンパク質の濃度は、100 pM以下にて行うことができ、例えば、1 pM、2 pM、3 pM、4 pM、5 pM、10 pM、20 pM、30 pM、40 pM、50 pM、60 pM、70 pM、80 pM、90 pM、100 pMの濃度が挙げられる。より好ましくは、20 pM以下である。

[0042] 以下、本発明の代表的な実施態様について本願に添付される図面を参照して説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれら具体的な態様に限定されるものではない。

実施例 1

[0043] 1. 鎌型DNAのPCR増幅

RNAプローブの鎌型DNA配列は、5'末端から順に、(i) Adjuster Sequence、(ii) CC + T7 promoter + G (24塩基)、(iii) Complementary sequence of 25mer DNA Barcode (25塩基)、(iv) G + Stem forward sequence (18塩基)、(v) Designed RNA coding Sequenceおよび(vi) Stem reverse Sequence (17塩基)を有するように設計した(図1(a))。各配列は以下に示す。

(i) Adjuster Sequence

OLIGONUCLEOTIDE LIBRARY SYNTHESIS (OLS) (Agilent Technologies社) を用いて鎌型DNAの全長を180塩基にて合成するため、Adjuster Sequenceの塩基数は、96塩基からDesigned RNA coding Sequenceの塩基数を差し引いた長さとして設計した。配列は、5' -CAGAGCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATAGTTATTAAATAGTAAT-3' (配列番号：1) の5'末端から必要な塩基数を用いた。

(ii) CC + T7 promoter + G (24塩基)

5' - CCGCGCTAATACGACTCACTATAG-3' (配列番号：2)

(iii) Complementary sequence of 25mer DNA Barcode (25塩基)

Xu, Q., Schlabach, M.R., Hannon, G.J. et al. (2009) PNAS 106, 2289-2294に開示された240000種の25塩基長のDNA配列(bc25mer_1-240000)のうちbc25mer_1からbc25mer_6500までの相補鎖を用いた。

(iv) G + Stem forward sequence (18塩基)

5' - GGTGTACGAAGTTTCAGC-3' (配列番号：3)

(v) Designed RNA coding Sequence

miRBase release 20 (<http://www.mirbase.org/>) に開示されたヒト1872種類およびマウス1186種類のAccession番号に対応する配列(Pre-miRNA配列)か

らStem loop構造、及びmature miRNAの配列を取得し、Designed RNA coding Sequence（ループ部位）を以下のように定義し、抽出した。ここで、hsa-mir-3652 (MI0022909)、hsa-mir-6753 (MI0016052)、hsa-mir-6892 (MI0022598)、mmu-mir-7060 (MI0022739) の4つのPre-miRNAのループ部位は96 塩基よりも鎖長が長く、180塩基の鑄型DNA配列鎖長を超えるため、この4つのループはライブラリから除いた。従って、ヒト1869種類、マウス1185種類のループ部位よりライブラリを作製した。

- (1) Pre-miRNAのループ部位は5' 末端側から始まり、3' 末端側で終わる。
- (2) Designed RNA coding Sequenceの始点と終点は塩基対を形成しているか否かに関わらず、miRBaseにて予想されたStem loop二次構造図上で同じ列の塩基とする。
- (3) Pre-miRNAに1つmature miRNA配列が含まれている場合は(図2(a))、mature miRNA(実線のBox)のループ側から4塩基目の列をループ部位(点線のBox)の始点、終点の位置とし、Pre-miRNAに2つのmature miRNA配列が含まれている場合は(図2(b))、mature miRNAのループ部位側がよりループ部位から離れている方の配列を選択し、当該選択したmature miRNAのループ部位側から4塩基目の列をループ部位(点線のBox)の始点、終点の位置とする。

(vi) Stem reverse sequence (17塩基)

5' - GCTGAAGCTTCGTGCAC-3' (配列番号：4)

このように設計した鑄型DNA配列は、相補鎖を一本鎖DNAとしてAgilent Technologies社にOLIGONUCLEOTIDE LIBRARY SYNTHESISを用いて合成するよう委託した(図1(b))。この一本鎖DNAをテンプレートとして、Forward primer (5' -CCGCGCTAATACGACTCACTATAGG-3' (配列番号：5))およびReverse primer (5' -GTGCACGAAGCTTCAGC-3' (配列番号：6))を用いて、PCRにより鑄型DNA二重鎖(Template dsDNA)を増幅した。

[0044] なお、本発明において、RNAプローブの表記は、以下の規則に則り命名した；

RNP_xxxxx中のxxxxxは25mer barcode DNA番号を表記する。

[0045] また、1869種のヒトPre-miRNAのループ部位は、以下の通り、同一のループ部位に対して、異なる3種または2種のComplementary sequence of 25mer DNA Barcodeを有するように作製した；

第一のヒトPre-miRNAループライブラリ：RNP_00018からRNP_00028およびRNP_00030- RNP_01887、

第二のヒトPre-miRNAループライブラリ：RNP_01888- RNP_03756、および

第三のヒトPre-miRNAループライブラリ：RNP_03757- RNP_05315。

[0046] 参考までに、RNP_00001からRNP_00029の配列を表1に例示する。

[0047]

[表1A]

RNA プロ ーブ ID	ループ 配列名	Template ssDNA 配列	配列番号
RNP_000 01	Kt	GTGCACGAAGCTTCAGCATCACGCCCTTCGGGTCAGCT GAAACTTCGTACACCTATGAGGACGAATCTCCGCTTAT ACTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGTAACATTTGGAAA GTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	7
RNP_000 02	1xKloo p	GTGCACGAAGCTTCAGCGGGTATCACCGTTACACCCC GCTGAAACTTCGTACACCGGTCTTGACAAACGTGTGCTT GTACCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGACTATTTGGAA AAGTCCCCTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGG TTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	8
RNP_000 03	2xKloo p	GTGCACGAAGCTTCAGCGGGTATCACCGTTACACCCC GGATCTCGGGTATCACCGTTACACCCGCTGAAACTTC GTACACCGTTATCGGGCGTGGTGTGCTCGCATACTATAGT GAGTCGTATTAGCGCGGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGG GTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	9
RNP_000 04	3xKloo p	GTGCACGAAGCTTCAGCGGGTATCACCGTTACACCCC GGATCTCGGGTATCACCGTTACACCCGCTGAAACTTCGTACACCCG TGATCACCGTTACACCCGCTGAAACTTCGTACACCCG ATGTTGACGGACTAACCTGACCTATAGTGAGTCGTATTA GCGCGGAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	10
RNP_000 05	2xMS2 SL	GTGCACGAAGCTTCAGCCGATGGGTATCCTCACCGGA TCTCGATGGGTATCCTCACCGCTGAAACTTCGTACACC TAGTAGTTCAGACGCCGTTAAGCGCCTATAGTGAGTCGT ATTAGCGCGGGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGG TTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	11
RNP_000 06	CLIP3 4nt_U G6	GTGCACGAAGCTTCAGCTTATGCACCAACACACAC ACGCGCTCTCGCTGAAACTTCGTACACCCGCTACCTA GATACACTCAATTGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCG GGTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGG TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	12

[表1B]

[表1C]

RNA プロ ーブ ID	ループ 配列名	Template ssDNA 配列	配列番号
RNP_000 13	U1A	GTGCACGAAGCTTCAGCGGAGTCAATGCTGAAACTTC GTACACCGATTCAATATGTGCGTCTATCCTCCTATAGTG AGTCGTATTAGCGCGGTACTATTAAATAACTATTTGGAAA GTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	19
RNP_000 14	U1A	GTGCACGAAGCTTCAGCGGAGTCAATGCTGAAACTTC GTACACCGGTAAGTGCAGTGGCTCTATCTATAGT GAGTCGTATTAGCGCGGTACTATTAAATAACTATTTGGAAA AGTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	20
RNP_000 15	dU1A	GTGCACGAAGCTTCAGCGGACCGTAATGCTGAAACTTCG TACACCGCGTTAACGGTCACATCGCATGAATCTATAGTG AGTCGTATTAGCGCGGTACTATTAAATAACTATTTGGAAA GTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	21
RNP_000 16	dU1A	GTGCACGAAGCTTCAGCGGACCGTAATGCTGAAACTTCG TACACCGCCCAGGAAGTGTGAGGATATACCCCTATAGTG AGTCGTATTAGCGCGGTACTATTAAATAACTATTTGGAAA GTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	22
RNP_000 17	MRPL 9 3'UTR IGF2B P	GTGCACGAAGCTTCAGCTGGATACAAATGTTCAAGTTG GATGATGAGAATGAGGCAAGTAGTGGAGACAGCTGAAA CTTCGTACACCGCTCTAAACTGGTATCACCTGACCTAT AGTGAGTCGTATTAGCGCGGAAGCCAGTAAGCAGTGGG TTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	23
RNP_000 18	hsa-let -7a-1	GTGCACGAAGCTTCAGCTGGATACAAATGTTCTCCAGTGGTGG TGTGACCCTAAACTATGCTGAAACTTCGTACACCGGGT GGTTAGTGATTTGCCGTACCTATAGTGAGTCGTATTA GCGCGGGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	24

[表1D]

RNA プロ ーブ ID	ループ 配列名	Template ssDNA 配列	配列番号
RNP_000 19	hsa-let -7a-2	GTGCACGAAGCTTCAGCACAGTTATCTCCCTTGATGTAA TTCTAAACTATGCTGAAACTCGTACACCTAGTTGGTGG GTTTCCCTACCGTGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGG AGTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	25
RNP_000 20	hsa-let -7a-3	GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCCCATAGCAGGGCA GAGCCCCAAACTATGCTGAAACTTCGTACACCGGTACAG TAAGTGAGAATCCTCTCTATAGTGAGTCGTATTAGCG CGGCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	26
RNP_000 21	hsa-let -7b	GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCGAGGGGCAA CATCACTGCCCTGAAACCACGCTGAAACTTCGTACACCG GTTCTAAGTTAGCGTAGCCGGTTCTATAGTGAGTCGTA TTAGCCGGGGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	27
RNP_000 22	hsa-let -7c	GTGCACGAAGCTTCAGCAGTTAACCTCCAGGGGTGTA CTAAACCGCTGAAACTTCGTACACCCCTTAGGTGGGTGC GATTGCCAGTTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGGAA AGTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	28
RNP_000 23	hsa-let -7d	GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTACCTCCTGTGGGCAA AATCCCTGCCCTAAAACATGCTGAAACTTCGTACACCG CCACCTTAACACCGCGATGATATTGCTATAGTGAGTCGTA TTAGCCGGGGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	29
RNP_000 24	hsa-let -7e	GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTGATCTCCTGGGTGTC TCCTCAACTATGCTGAAACTTCGTACACCGCTATTACGA GCGCTTGGATCCCGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGG AGTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	30

[表1E]

RNA プローブ ID	ループ配列名	Template ssDNA 配列	配列番号
RNP_000 25	hsa-let -7f-1	GTGCACGAAGCTTCAGCATAAGTTATCTCCTGAACAGGGT AAAATCACTACCCCCACAACATATGCTGAAACTTCGTACACC TATGTTGTGCCTTACGCCCTCGATTACTATAGTGAGTCGTA TTAGCGCGGTTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT TCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	31
RNP_000 26	hsa-let -7f-2	GTGCACGAAGCTTCAGCATAAGTTATCTCCAAGATGGGGT ATGACCCTAAAACATATGCTGAAACTTCGTACACCTTAACC GAACTGACGGCCATCAAGGCTATAGTGAGTCGTATTAGC GCGGCCTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	32
RNP_000 27	hsa-let -7g	GTGCACGAAGCTTCAGCACAGTTATCTCCTGTACCGGGT GGTATCATAGACCCCTAAACACTGTGCTGAAACTTCGTACA CCGGGTACATGCCCTTACTCCTTGCTATAGTGAGTC GTATTAGCGCGGTTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT TCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	33
RNP_000 28	hsa-let -7i	GTGCACGAAGCTTCAGCGCAGTTATCTCCACAGCGGGC AATGTCACAACCCGACCAACAGCGCTGAAACTTCGTACA CCTTCTATTCTAACGCCGGCGGTATATCTATAGTGAGTC GTATTAGCGCGGTTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT TTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	34
RNP_000 29	let7 consensus	GTGCACGAAGCTTCAGCGGGCTCCTTGCCCCGCTGAAAC TTCGTACACCGCTTGATGCTTACAAGATCGCGTTCTATA GTGAGTCGTATTAGCGCGGTATTAATAACTATTTGGAAA GTCCCGTTGATTTGGTATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTT CTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG	35

[0048] 2. 二重鎖DNAからのin vitro転写によるRNAプローブ合成

得られたTemplate dsDNAからin vitro転写系 (MEGAscript™ T7 Transcription Kit, Life Technologies) を用いて製造者のプロトコールに従ってRNAプローブを転写した (図1(c))。

[0049] 3. RNAプローブのCy5蛍光ラベル

得られたRNAプローブの3'末端にT4 RNA ligaseを用いてpCp-Cy5を修飾した。

[0050] 4. マイクロアレイ上のDNA BarcodeとRNAプローブのハイブリダイゼーション

Xu, Q., Schlabach, M.R., Hannon, G.J. et al. (2009) PNAS 106, 2289-2294に開示されたされた240,000種の25塩基長のDNA配列 (bc25mer_1-240000) のうちbc25mer_1からbc25mer_10667をスポットしたスライドをAgilent Technologies社に作製委託した。このスライドへRNAプローブを加えてスライド製造者のプロトコール (8x15K, 8x60K Agilent Oligo microarray Protocol) に従って、ハイブリダイゼーションを行った。

[0051] 5. 蛍光ラベルされたタンパク質との結合

Cy3蛍光標識されたNHS (N-Hydroxysuccinimide) エステルと目的タンパク質を反応させ、Cy3ラベルされた目的タンパク質を用意した。このタンパク質を適切なバッファーで希釈し、4で得たマイクロアレイスライドに添加・洗浄してRNAプローブに特異的に結合させた。

[0052] 6. マイクロアレイスライドの2色法スキャン (Cy3/Cy5)

マイクロアレイスキャナーを用いてCy3及びCy5の蛍光強度を測定し、それぞれの蛍光強度からRNAタンパク質相互作用の有無、強度を概算した。

実施例 2

[0053] L7AeまたはU1Aタンパク質とRNAプローブの相互作用の確認

1. 鎔型DNA配列の設計

古細菌のリボソームタンパク質L7Ae (AAB90466) と結合するKt配列および結合ミュータント配列dKt、ヒトU1Aタンパク質 (NP_004587) に結合する2種類の配列U1AまたはU1A2およびそれぞれの結合ミュータント配列dU1AまたはdU1A2、実施例1の手法でmiRBaseから取得したhsa-Pre-let7 ファミリー (hsa-Pre-let7 a-1 (miRBase Accession番号 : MI0000060) 、 a-2 (miRBase Accession番号 : MI0000061) 、 a-3 (miRBase Accession番号 : MI0000062) 、 b (miRBase Accession番号 : MI0000063) 、 c (miRBase Accession番号 : MI0000064) 、 d (miRBase Accession番号 : MI0000065) 、 e (miRBase Accession番号 : MI0000066) 、 f-1 (miRBase Accession番号 : MI0000067) 、 f-2 (miRBase Accession番号 : MI0000068) 、 g (miRBase Accession番号 : MI0000433) i (miR

Base Accession番号：MI0000434)) のループ配列ならびにlet7ファミリー共通配列（consensus）をDesigned RNA coding Sequenceとした鑄型DNA配列を設計した（表2）。なお本実施例では、hsa-Pre-let7ファミリーとlet7共通配列の鑄型DNA配列配列のみ全長130塩基となるようAdjuster Sequenceを加えた。

◦
[0054]

[表2A]

RNA プロ ーブ名	Template ssDNA 配列 (鑄型 DNA 配列の相補鎖)	配列番号
PoP_000 01_Kt	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATCACGCCCTTCCGGTCAGCTGAAA CTTCGTACACCTATGAGGACGAATCTCCGCTTACTATAGTGA GTCGTATTAGCGCGG-3'	36
PoP_000 08_dKt	5'-TCCGGGAATATAGGCCATGACGCCCTTCCGGCAGGCCTAT ATTCCCAAACATCCCCGTGAAGCTTGAGTGGAACTCTATAGTGAG TCGTATTAGCGCGG-3'	37
PoP_000 10_U1A2	5'-TCCGGGAATATAGGCCGGTGCAATGTCCCAGGACTCGGC ACTATATTCCCAAACGGTATGGCACGCCTAATCTGGACACCTATA GTGAGTCGTATTAGCGCGG-3'	38
PoP_000 11_dU1A 2	5'-TCCGGGAATATAGGCCGGCCGTAATGTCCCAGGACTCGGC ACTATATTCCCAAACGGATGCATGATCTAGGGCCTCGTCTCTATA GTGAGTCGTATTAGCGCGG-3'	39
PoP_000 14_U1A	5'-TCCGGGAATATAGGCCGGAGTGCAATGGCACTATATTCCCAA ACGGTAAGTGCATAGTTGGCTCTATCTATAGTGAGTCGTATTA GCGCGG-3'	40
PoP_000 16_dU1A	5'-TCCGGGAATATAGGCCGGACCGTAATGGCACTATATTCCCAA ACGCCCGGGAAAGTGTGAGGATATACCCCTATAGTGAGTCGTATTA GCGCGG-3'	41
PoP_000 18_hsa-le t-7a-1	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCAGTGGTGGGTGTG ACCTAAACTATGCTGAAACTTCGTACACCGGGTGGTTAGTGAT TTGCCCGTCACCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGAGCTCTG-3'	42
PoP_000 19_hsa-le t-7a-2	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCACAGTTATCTCCCTGATGTAATTCTA AACTATGCTGAAACTTCGTACACCTAGTTGGTGGGTTCCCTACC GTGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGCCAGAGAGCTCTG-3'	43
PoP_000 20_hsa-le t-7a-3	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCATAGCAGGGCAGAGC CCCAAACATGCTGAAACTTCGTACACCGGTACAGTAAGTGAGAA TCCTCTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGGAGAGCTCTG-3'	44
PoP_000 21_hsa-le t-7b	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCGAGGGGCAACATC ACTGCCCTGAAACCACGCTGAAACTTCGTACACCGGTCTAAGTT TAGCGTAGCCGGTTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGTCTG-3'	45

[表2B]

RNA プローブ名	Template ssDNA 配列 (鑄型 DNA 配列の相補鎖)	配列番号
PoP_000 22_hsa-le t-7c	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCAGTTAACCTCCAGGGTGTAACTCTAA ACCGCTGAAACTTCGTACACCCTTAGGTGGGTGCGATTGCCAGT TCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGTTAGCCAGAGAGCTCTG-3'	46
PoP_000 23_hsa-le t-7d	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTACCTCCTGTGGGCAAAATC CCTGCCCTAAAACATGCTGAAACTTCGTACACCGCCACCTAAC ACGCGATGATATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGTCTG-3'	47
PoP_000 24_hsa-le t-7e	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTGATCTCCTGGGTGTCCTCCT CAACTATGCTGAAACTTCGTACACCGCTATTACGAGCGCTTGGAT CCCGTCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGCCAGAGAGCTCTG-3'	48
PoP_000 25_hsa-le t-7f-1	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCTGAACAGGGTAAAA TCACTACCCCACAACATGCTGAAACTTCGTACACCTATGTTGTG CCTTACGCCCTCGATTACTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGTG-3'	49
PoP_000 26_hsa-le t-7f-2	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCATAGTTATCTCCAAGATGGGGTATGA CCCTAAAACATGCTGAAACTTCGTACACCTTAACCGAACTGACG GCCATCAAGGCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGGAGCTCTG-3'	50
PoP_000 27_hsa-le t-7g	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCACAGTTATCTCCTGTACCGGGTGGTA TCATAGACCCCTAAACACTGTGCTGAAACTTCGTACACCGGGTACAT GCGCCTTACTCCTGTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGG-3'	51
PoP_000 28_hsa-le t-7i	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCGCAGTTATCTCCACAGCGGGCAATGT CACAACCGACCAACAGCGCTGAAACTTCGTACACCTTCTATTCT AAGCCGGCGGTCATATCTATAGTGAGTCGTATTAGCGCGGTG-3'	52
PoP_000 29_consensus	5'-GTGCACGAAGCTTCAGCGGGCTCCTGCCCGCTGAAACTTCGT ACACCGCTTGATGCTTACAAGATCGCGTTCTAGTGAGTCGTA TTAGCGCGGGCAGTGGTTCTCTAGTTAGCCAGAGAGCTCTG-3'	53

[0055] 2. Template dsDNAのPCR増幅

RNAプローブ (PoP_00001_Kt) のTemplate ssDNA (配列は表1参照、Greinerによる受託合成) を鑄型として、PCR法を用いてTemplate dsDNAの増幅を行った。

PCRプライマーにはForward primerおよびReverse primerを用いた。50 μL 反応溶液の組成は1x KOD -Plus- Neo buffer (TOYOB0)、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO4、0.5 μM DNA primers、2 nM Template ssDNA、0.02 U/μL KOD -Plus- Neo polymerase (TOYOB0) とし、反応は初めに94°C 2分間インキュベー

トした後、98°C 10秒間、68°C 20秒間のインキュベートを15サイクルで行った。生成したPCR産物はPCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製した。ただし溶出の際には超純水15 μLを用いた。その他のRNAプローブについても同様の操作を行った。また、複数種類のRNAプローブを合成する際には各Template ssDNAの総和が終濃度2nMとなるように混合してPCRを行った。

[0056] 3. Template dsDNAからのin vitro転写

in vitro転写系 (MEGAscript™ T7 Transcription Kit, Life Technologies) を用いてTemplate dsDNAからの転写反応を行った。10 μL反応溶液の組成は1x T7 Reaction Buffer (Life Technologies) 、7.5 mM GTP Solution 、7.5 mM ATP Solution、7.5 mM CTP Solution、7.5 mM UTP Solution、150 nM Template dsDNA、1x T7 Enzyme Mix (Life Technologies) として、37°C 、4時間インキュベートした。その後、反応溶液にTURBO DNase (Life Technologies) 1 μLを加えて混合し、37°C、30分間インキュベートした。生成した転写産物はRNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を用い、Kitプロトコルを改変して精製した。転写産物に超純水を加えて100 μLに調整し、Buffer RLを350 μL (QIAGEN) 加えて混合し、続いてエタノールを700 μL加えて混合した。混合物575 μL を2 mLコレクションチューブ (QIAGEN) にセットしたRNeasy MinElute Spin Column (QIAGEN) にアプライし、10,000 xg、15秒間遠心操作し、ろ液を棄てた。残りの混合物も同様にアプライし、遠心操作を繰り返した。続いて、Spin ColumnにBuffer RPE (QIAGEN) 500 μLを添加し、10,000 xg、15秒間遠心操作し、ろ液を棄てた。Spin Columnに80%エタノールを500 μL添加し、20,400 xg、2分間遠心操作し、ろ液を棄てた。このSpin Columnを新しいコレクションチューブにセットし、蓋を開けた状態で20,400 xg、5分間遠心操作した。Spin Columnを1.5 mLチューブにセットし、超純水20 μLを加えて20,400 xg、1分間遠心操作しRNAプローブを溶出した。RNA濃度は260 nmの吸光度をNanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) で計測して決定した。

[0057] 4. RNAプローブのCy5蛍光ラベル

転写合成したRNAプローブの3' 末端にpCp-Cy5 (Jena Bioscience) をT4 RNA ligase (cloned) 5 U/ μ L (Life Technologies) で修飾した。20 μ L反応溶液の組成は1x T4 RNA Ligase Buffer (Life Technologies) 、50 μ M pCp-Cy5 (Jena Bioscience) 、6 μ M RNAプローブ、0.5 U/ μ L T4 RNA Ligase (Life Technologies) とし、16°C、20時間インキュベートした。生成したCy5ラベルRNAプローブはRNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) を用い、上記と同様の方法により精製した。ただし、溶出の際には超純水15 μ Lを加えて20,400 xg、1分間遠心する操作を2回繰り返し、RNAプローブを溶出した。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) で計測して決定した。この操作を用いることで、約90%のRNAプローブにCy5がラベル化された。

[0058] 5. タンパク質L7Ae、U1AのCy3ラベル

L7Ae、U1Aの大腸菌精製は、先の報告の通りに行った (L7Ae: Saito H, Fujita Y, Kashida S, et al. 2011. Nat. Commun. 2: 160.、U1A: Kashida S, Inoue T and Saito H. 2012. Nucleic Acids Res. 40: 9369-78.)。

[0059] L7Ae、U1AをCy3 Mono-Reactive Dye, protein array grade (GE Healthcare) を用いてCy3ラベル反応を行った。まず、1.0 mg/mLのタンパク質溶液0.20 mL をOscillatory Microdialysis System (8K MWCO) (COSMO Bio Ltd.)の透析カップに加え、0.1M Sodium-Carbonate Sodium-Bicarbonate (SCSB) buffer (pH 9.3)でバッファー交換した。Cy3 Mono-Reactive Dye (GE Healthcare) のチューブにジメチルスルホキシド30 μ Lを加えて溶解し、この色素溶液6 μ Lを直ちにタンパク質溶液に加えて、暗所で室温30分間インキュベートした。その際10分置きに上下振盪による攪拌を行った。また、この反応時間中に回収チューブ (Millipore) にセットしたAmicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters (Millipore) にTBST buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, 0.1 % Tween-20)を0.5 mL加え、4°C 14,000 xg 15分間遠心して、ろ液を棄て、フィルタを平衡化した。反応後のタンパク質溶液を平衡化したフィルタに添加した。続いてTBSTを0.4 mLになるまで加えてマイクロピペットで混合した

後に、4°C、14,000 xg、15分間遠心し、ろ液を棄てる操作を3回繰り返した。このフィルタを新しい回収チューブに上下逆向きにセットして4°C、1,000 xg、2分間遠心してタンパク質溶液を回収した。回収したタンパク質溶液に等量のグリセロールを加え、-30°Cで保存して以降の実験に使用した。ラベルされたCy3の濃度は552 nmの吸光度から決定し、タンパク質濃度はプロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いてBradford法で決定した。

[0060] 6. ゲルシフトアッセイによるCy3-L7AeとCy5-RNAプローブの結合確認

DNA Barcode (bc25mer_00001)とCy5-RNAプローブ(PoP_00001)の結合、さらにこのDNA/RNA複合体とCy3-L7Aeとの結合をEMSA(Electro Mobility Shift Assay)で以下のように確認した。まず、bc25mer_00001とPoP_00001_Ktを混合し、アニーリングを行った。11 μL の反応溶液の組成は500 nM bc25mer _00001、500 nM PoP_00001_Kt、1x Annealing Buffer (50 mM HEPES-KOH(ph7.8)、100 mM KCl) とし、反応は98°C 2分間、55°C 1分間インキュベートした後、毎分1°C、30分間温度を低下させながらインキュベートした。次に、アニーリングしたDNA/RNA複合体とL7Aeを以下のように混合して結合させた。15 μL反応溶液の組成は0、100、200、500または1000 nM Cy3-L7Ae、50 nM DNA/RNA複合体、1x Annealing Bufferとして、氷上で30分間インキュベートした。この溶液に5x色素液 (0.25%プロモフェノールブルー、30%グリセロール) 3.75 μLを加えて混合し、この混合液10 μLを非変性15%ポリアクリルアミド (1/30ビスアクリルアミド) ゲルに重層し、4°C、200Vで60分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを室温で15分間、SYBR Green I及びIIで染色し、Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare) のSYBR Greenモード (600 pmt) 、Cy5モード (900 pmt) でスキャンし、バンドを確認した。結果を図4に示す。その結果、DNA BarcodeとCy5-RNAプローブがDNA/RNA複合体を形成し、さらにL7Aeと複合体も結合することが示された。

[0061] 7. 25 mer DNA Barcodeをスポットしたカスタムアレイの設計

CGHカスタムアレイ8x15K (Agilent)に25 mer DNA Barcodeのスポットを配置してDNA Barcodeマイクロアレイをデザインした。bc25mer_00001からbc25m

er_00500までのDNA Barcodeが結合するスポット、bc25mer_1からbc25mer_500は10スポットずつ配置し、bc25mer_501からbc25mer_10667までは1スポットずつ配置した。

[0062] 8. 12種類のRNAプローブとL7AeのRNPマイクロアレイ

DNA Barcodeマイクロアレイ上でCy5-RNAプローブ(PoP_00001および、PoP_00018-28)とCy3-L7AeのRNP相互作用が検出可能かを検証した。1.5 mLチューブに120 ng Cy5-RNAプローブPoP_00001_Kt、120 ng Cy5-RNAプローブPoP_00018-28及び超純水を混合して18 μLとし、10x Gene Expression Blocking Agent (Agilent) 4.5 μLと2x Hi-RPM Hybridization Buffer (Agilent) 22.5 μLを加えて混合した。混合液を100°C、5分間インキュベートした後、氷上で5分間インキュベートした。ハイブリチャンバー (Agilent) の下枠にガスケットスライド (Agilent) を載せ、ガスケットスライドの1つのウェル上に混合液45 μLを加えた後、DNA Barcodeマイクロアレイスライドを被せてハイブリチャンバーを組み立てた。ハイブリチャンバーを55°Cのハイブリオーブンのローター (Agilent) にセットし、毎分20回転で20時間インキュベートした。オーブンから取り出したハイブリチャンバーを分解してマイクロアレイスライドを取り出し、Gene Expression Wash Buffer 1 (Agilent) 内でガスケットと分離し、Gene Expression Wash Buffer 1 で室温5分間洗浄した。さらに Gene Expression Wash Buffer 2 (Agilent) で37°C、5分間洗浄した。乾燥させたマイクロアレイスライドをマイクロアレイスキャナ (Agilent) の8x 15K, c scan, AgilentHD_miRNA, two color, XDR Hi and Lo (0.05) モードでスキャンし、目的のスポットにRNAプローブが結合していることをCy5シグナルで確認した。

[0063] 続いて、ハイブリチャンバー上でガスケットスライドに5 nM Cy3-L7Ae 70 μL (TBSMT buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20)で濃度調製) を加え、スキャンしたマイクロアレイスライドを載せて、ハイブリチャンバーを組み立て、室温で30分間インキュベートした。ハイブリチャンバーを分解してマイクロアレイスライドを取り出し、TBSMT buffer

内でガスケットと分離し、TBSMT bufferで室温5分間洗浄した。さらにTBSM buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, 5 mM MgCl₂)で室温5分間洗浄した。乾燥させたマイクロアレイスライドを再度スキャンした。その結果、図5のように、ポジティブコントロールであるPoP_00001_KtのスポットでCy3シグナルを検出しただけでなく、PoP_00024_hsa-let-7eのスポットでPoP_00001_Kt より1.5倍程度強いCy3シグナルを検出した。他の10本のプローブのスポットではCy3シグナルは検出されなかった。

[0064] 9. ゲルシフトアッセイによるL7AeとPoP_00024プローブの結合確認

DNA Barcode (bc25mer_00001)とCy5-RNAプローブ(PoP_00001_Kt)の特異的な結合、さらにCy5-RNAプローブ(PoP_00001_Kt、PoP_00024_hsa-let-7e)とL7Aeとの結合をEMSAで以下のように確認した。まず、bc25mer_00001とPoP_00001_KtまたはPoP_00024_hsa-let-7eを混合し、アニーリングを行った。11 μLの反応溶液の組成は500 nM bc25mer_00001、500 nM Cy5-RNAプローブ、1x Annealing Buffer (50 mM HEPES-KOH(ph7.8)、100 mM KCl) とし、反応は95°C 5分間、室温 10分間インキュベートした。次に、アニーリングしたDNA/RNA複合体とL7Aeを以下のように混合して結合させた。15 μL反応溶液の組成は0、100、200、500または1000 nM Cy3-L7Ae、50 nM DNA/RNA複合体、1x Annealing Bufferとして、氷上で1時間インキュベートした。この溶液に5x色素液 (0.25%プロモフェノールブルー、30%グリセロール) 3.75 μLを加えて混合し、この混合液10 μLを非変性15%ポリアクリルアミド (1/30ビスアクリルアミド) ゲルに重層し、4°C、200Vで60分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを室温で15分間、SYBR Green I及びIIで染色し、Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare) のSYBR Greenモード (600 pm) でスキャンし、バンドを確認した。結果を図6に示す。その結果、bc25mer_00001とPoP_00001_Ktは結合して複合体を作るが、PoP_00024_hsa-let-7eとは結合しないこと、PoP_00001_Kt、PoP_00024_hsa-let-7eはL7Aeと結合するが、PoP_00024_hsa-let-7eはPoP_00001_Ktより10倍程度強く結合することが示された。以上より、hsa-let-7eの Pre-miRNAのループ配列がL7Aeと結合し、その親和性は既知のKtルー

よりも強いことが発見された。このことから、本申請技術のRNPマイクロアレイによって、特定のタンパク質に結合する新規のRNA配列を取得可能であることが示唆された。

[0065] 10. 18種類のRNAプローブとU1AのRNPマイクロアレイ

DNA Barcodeマイクロアレイ上でCy5-RNAプローブ(PoP_00001、00008、00010、00011、00014、00016および、PoP_000018-28)とCy3-U1AのRNP相互作用が検出可能かを検証した。

[0066] 1.5 mLチューブに120 ng Cy5-RNAプローブPoP_00001_Kt、120 ng Cy5-RNAプローブPoP_00001、00008、00010、00011、00014、00016、PoP_00018-28及び超純水を混合して18 μLとし、以降前記8.と同様の操作で目的のスポットにRNAプローブが結合していることをCy5シグナルで確認した。

[0067] 続いて、ハイブリチャンバー上でガスケットスライドに40 nM Cy3-U1A 70 μLを加え、RNAプローブの結合したマイクロアレイスライドを載せて、ハイブリチャンバーを組み立て、室温で30分間インキュベートした。ハイブリチャンバーを分解してマイクロアレイスライドを取り出し、TBSMT buffer内でガスケットと分離し、TBSMT bufferで室温5分間洗浄した。さらにTBSM bufferでリーンスした。その後、乾燥させたマイクロアレイスライドをスキャンした。その結果、図7のように、U1A結合配列を持つPoP_00010_U1A2、PoP_00014_U1Aのスポットで他のスポットと比較して10倍以上強いCy3シグナルを検出した。以上より、RNPマイクロアレイによってU1Aと結合するRNA配列を検出可能であることが示唆された。

実施例 3

[0068] 実施例2の結果を踏まえ、6500種類のRNAプローブ(RNP_00001-06500)の錆型DNAの相補鎖である、OLSで受託合成したTemplate ssDNAライブラリをもとに、ヒト、マウスのPre-miRNAループ配列とL7Aeの相互作用をRNPマイクロアレイで検出可能かを検証した。

[0069] 1. Template dsDNAのPCR増幅

OLSで受託合成したTemplate ssDNAライブラリを錆型として、実施例2の2.

と同様の操作でTemplate dsDNAのPCR増幅を行った。ただし、その際反応スケールは100 μL で行い、超純水15 μL を用いて2回溶出を行った。

[0070] 2. Template dsDNAからのin vitro転写

実施例2の2. と同様の操作でTemplate dsDNAからの転写反応を行った。ただし、その際反応スケールは20 μL で行い、超純水15 μL を用いて2回溶出を行った。

[0071] 3. RNAプローブのCy5蛍光ラベル

実施例2の3. と同様の操作で転写合成したRNAプローブの3'末端にpCp-Cy5を修飾した。ただし、その際反応スケールは100 $\mu\text{L} \times 2$ で行った。

[0072] 4. 6500種類のRNAプローブとL7AeのRNPマイクロアレイ

DNA Barcodeマイクロアレイ上でCy5-RNAプローブ(RNP_00001-06500)とCy3-U1AのRNP相互作用が検出可能かを検証した。

[0073] 1.5 mLチューブにCy5-RNAプローブ(RNP_00001-06500) 5 μg 及び超純水を混合して18 μL とし、以降は実施例2の8. と同様の操作で目的のスポットにRNAプローブが結合していることをCy5シグナルで確認した。また、コントロールとして240 ng Cy5-RNAプローブ(PoP_00001、00008、00010、00011、00014、00016および、PoP_000018-28)に関しても同様の操作を行った。実験はRNP_00001-06500及びコントロールともに2サンプルずつ行った。その結果、図8のようにRNP_00001-06500の2の15乗から20乗付近の強いCy5シグナルを検出した。また同様の操作を行った2サンプル間のCy5シグナル強度のはらつきは2倍以内に収まっていることが示された。

[0074] 続いて、ハイブリチャンバー上でガスケットスライドに5 nM Cy3-L7Ae 70 μL を各ウェルに加え、RNAプローブの結合したマイクロアレイスライドを載せて、ハイブリチャンバーを組み立て、室温で30分間インキュベートした。ハイブリチャンバーを分解してマイクロアレイスライドを取り出し、TBSMT buffer内でガスケットと分離し、TBSMT bufferで室温5分間洗浄した。さらにTBSM bufferで室温1分間洗浄した。その後、乾燥させたマイクロアレイスライドをスキャンした。結果のデータから、DNA Barcodeに直接結合するCy3-L7Ae

のシグナルをノイズとして除去するため、以下のデータ操作を行った。コントロールサンプルのデータの、RNAプローブが結合せずBarcode DNAしかないスポット(18種類のRNAプローブが結合するスポット以外のスポット)のCy3シグナルをRNP_00001-06500サンプルのCy3シグナルを引いた値が0以上のスポット(図9の三角形の太枠内)のみを陽性のシグナルとして解析した。2サンプルのシグナルを平均した後にCy3のシグナルをスポットへのRNAプローブの結合量(Cy5のシグナル)で補正するため、

$$\text{L7Aeの結合量 (2log値)} = \text{Cy3}-\text{Cy5}+20$$

として、シグナルを補正した。さらに同じループを持つRNAプローブのCy3シグナルを平均化して、シグナルの高いRNA配列(RNA loop)を算出した(表3)。その結果、実施例2と同様にKt、hsa-let-7eの配列を含むRNA配列がL7Aeと相互作用することが確認された。

[0075] [表3]

rank	loop name	loop redundancy	data redundancy	L7Ae-Cy3/Cy5	cv
1	mmu-mir-466p	1	1	13.33902	0.006802
2	hsa-mir-363	2	2	12.49431	0.010773
3	mmu-mir-6995	1	1	12.17153	0.003218
4	hsa-let-7e	3	3	12.04553	0.005745
5	mmu-mir-7061	1	1	11.75058	0.016772
6	hsa-mir-204	3	2	11.74292	0.005552
7	mmu-mir-6338	1	1	11.64983	0.005225
8	hsa-mir-6834	3	2	11.51643	0.013116
9	hsa-mir-16-2	3	3	11.49918	0.007827
10	mmu-mir-7220	1	1	11.47272	0.001773
11	Kt	1	1	11.39947	0.008828
12	hsa-mir-4479	3	2	11.34248	0.029844
13	hsa-mir-6773	3	2	11.3198	0.010137
14	hsa-mir-1-2	3	2	11.31454	0.006393
15	hsa-mir-34a	3	3	11.25819	0.00778

実施例 4

[0076] RNAとの結合を検出する対象となるタンパク質に対してエステル共有結合による蛍光標識せず検出する方法を検討した。Lin28Aを対象タンパク質として用いた場合の方法を例示する(図10)。簡潔には、次の通りである。20 pmolのHis6タグを付したLin28A、上記の方法で得られた1 μg Cy5-RNAプローブ(RNP_00001-06500)および20 μL TALON Magnetic Beads (Clonetech) をProtein Binding buffer (20 mM Hepes pH7.8、80 mM KCl、20 mM NaCl、10% glycerol、2 mM DTTおよび0.1 μg/μL BSA)に溶解させ、4°Cで30分間混合した。混合後、磁気を利用して、TALON Magnetic Beadsを容器内に保持し、溶液を除去した。当該TALON Magnetic BeadsをProtein Binding bufferを用いて洗浄後、200 μL Elution buffer (1% SDS、10 mM Tris-HClおよび2 mM EDTA)を加え95°Cで3分間熱し、RNAを溶出させた。得られたRNA溶液へ等量のフェノールを加え、水層を抽出し、さらに、等量のクロロホルムを加え、水層を中抽出した。当該水層へ、6.6 μL 3M NaOAcおよび2 μL Ethachinmateを加え混合し、さらに500 μL Ethanolを加えた後、遠心分離によりRNAを単離した。回収されたRNAを純水に溶解し、18 μLとし、以降は実施例2の8.と同様の操作でDNA Barcodeマイクロアレイとハイブリダイズした。Cy5を指標として、マイクロアレイ上に存在するRNAプローブを検出し、Lin28Aと混合せずに同様の方法で検出されたRNAプローブの結果(陰性対照)と比較した(図11)。なお、Cy5の蛍光強度(Cy5 Intensity)は、Cy5-RNAプローブとDNA Barcodeマイクロアレイとハイブリダイズして得られたCy5の蛍光強度(陽性対照)との比較値として算出した。Lin28Aと特異的に結合したヒトRNAプローブのうちCy5 Intensityが強いものから上位20位を表4に示す。ここで、Lin28Aと結合することが既知であるLet-7dが検出されたことから、対象タンパク質を蛍光標識することなくタンパク質とpull-down(共沈)させることによっても相互作用の検出できることが示された。

[0077] 本実施例で用いたRNAプローブのコピー数は、マイクロアレイにスポットされたDNA Barcodeのコピー数と比較してより少ないとから、蛍光強度は、Li

n28Aと結合したRNAプローブのコピー数と比例している。従って、蛍光強度が高いほどLin28Aへの結合の高いRNAプローブであったと考えられる。

[0078] [表4]

Rank	loop name	loop redundancy	Cy5 Intensity	SD(標準偏差)
1	hsa-let-7d	3	6.812	0.205
2	hsa-let-7f-1	3	6.647	0.236
3	hsa-let-7i	3	6.607	0.297
4	hsa-mir-1233-1	3	6.549	0.066
5	hsa-let-7b	3	6.543	0.158
6	hsa-mir-4453	3	6.54	0.208
7	hsa-mir-598	3	6.473	0.344
8	hsa-mir-6775	3	6.436	0.7
9	hsa-mir-1233-2	3	6.433	0.033
10	hsa-mir-98	3	6.406	0.136
11	hsa-mir-6839	3	6.387	0.81
12	hsa-mir-5004	3	6.376	0.328
13	hsa-mir-6884	3	6.368	0.076
14	hsa-mir-6758	3	6.351	0.696
15	hsa-let-7g	3	6.332	0.01
16	hsa-mir-940	3	6.325	0.36
17	hsa-mir-4524b	3	6.325	0.045
18	hsa-mir-4296	3	6.29	0.368
19	hsa-mir-4730	3	6.28	0.791
20	hsa-mir-638	3	6.271	0.719

実施例 5

[0079] 実施例4と同様の方法を用いて、U1Aタンパク質への結合するRNAプローブの検出を行った。簡潔には、次の通りである。20 pmolのHis6タグを付したU1A、上記の方法で得られた1 μg Cy5-RNAプローブ(RNP_00001-06500)および20 μL TALON Magnetic Beads (Clonetech) をProtein Binding buffer (20 mM Hepes pH7.8、80 mM KCl、20 mM NaCl、10% glycerol、2 mM DTTおよび0.1 μg/μL BSA)に溶解させ、4°Cで30分間混合した。混合後、磁気を利用して、TALON Magnetic Beadsを容器内に保持し、溶液を除去した。当該TALON Magnetic BeadsをProtein Binding bufferを用いて洗浄後、200 μL Elution buffer (1% SDS、10 mM Tris-HClおよび2 mM EDTA) を加え95°Cで3分間熱し、RNA

を溶出させた。得られたRNA溶液へ等量のフェノールを加え、水層を抽出し、さらに、等量のクロロホルムを加え、水層を中抽出した。当該水層へ、 $6.6 \mu\text{L}$ 3M NaOAcおよび $2 \mu\text{L}$ Ethachinmateを加え混合し、さらに $500 \mu\text{L}$ Ethanolを加えた後、遠心分離によりRNAを単離した。回収されたRNAを純水に溶解し、 $18 \mu\text{L}$ とし、以降は実施例2の8. と同様の操作でDNA Barcodeマイクロアレイとハイブリダイズした。ただし、本実施例では、マイクロアレイスライドは、 $8\times 60\text{K}$ を使用した。Cy5を指標として、マイクロアレイ上に存在するRNAプローブを検出し、U1Aと混合せずに同様の方法で検出されたRNAプローブの結果（陰性対照）と比較した（図12）。なお、Cy5の蛍光強度（Cy5 Intensity）は、Cy5-RNAプローブとDNA Barcodeマイクロアレイとハイブリダイズして得られたCy5の蛍光強度（陽性対照）との比較値として算出した。検出されたU1Aと特異的に結合するヒトRNAプローブのうちCy5の蛍光強度（Cy5 Intensity）が強いものから上位20位を表5に示す。ここで、U1Aと結合することが既知であるU1A2またはU1Aが検出されたことから、本方法によってLin28A以外のタンパク質と相互作用するRNA構造体を検出できることが示された。

[0080]

[表5]

Rank	loop name	loop redundancy	Cy5 Intensity	CV(変動係数)
1	U1A2	2	10.33199055	0.351522509
2	U1A	2	9.3229175	0.499427398
3	hsa-mir-6845	3	9.0601633	0.358264439
4	hsa-mir-3661	3	9.0506756	0.483975065
5	hsa-mir-412	2	8.94592815	4.327160949
6	hsa-mir-422a	2	8.783980302	5.453123071
7	hsa-mir-6796	3	8.7166514	2.003630924
8	hsa-mir-7848	3	8.692771883	4.398626947
9	hsa-mir-5196	3	8.671111833	4.177130187
10	hsa-mir-1302-6	3	8.554318233	1.406353369
11	hsa-mir-4723	3	8.477823733	2.762932569
12	hsa-mir-493	2	8.40725935	0.421654774
13	hsa-mir-637	3	8.397386267	2.906612852
14	hsa-mir-378c	2	8.3716097	1.132052925
15	hsa-mir-4499	3	8.282939433	0.617810759
16	hsa-mir-4315-2	3	8.281862167	3.429650103
17	hsa-mir-6807	3	8.277919367	2.629366889
18	hsa-mir-658	3	8.2730408	1.536251719
19	hsa-mir-2682	3	8.265432467	1.61336172
20	hsa-mir-1273h	3	8.203573133	2.68889337

請求の範囲

- [請求項1] 以下の配列を含むRNAプローブ；
(i) DNAバーコード配列への相補鎖配列、
(ii) 第一のステム部分の配列、
(iii) 第一のステム部分とハイブリダイズし、二本鎖システムを形成するために、第一のステム部分に対して相補的な、第二のステム部分の配列、および
(iv) 第一および第二の2つのステム部分を連結するループ部分の配列。
- [請求項2] 前記ループ部分の配列が、Pre-miRNAに含有されるループ部分の配列である、請求項1に記載のRNAプローブ。
- [請求項3] 3'末端を蛍光標識された、請求項1または2に記載のRNAプローブ。
。
- [請求項4] 前記Pre-miRNAが、ヒトまたはマウスのPre-miRNAである、請求項2または請求項3に記載のRNAプローブ。
- [請求項5] DNAバーコード配列を付加されたスライドおよび請求項1から請求項4のいずれか1項に記載のRNAプローブをハイブリダイズさせることを含む、RNAと結合するタンパク質を検出するために用いられるRNAマイクロアレイの製造方法。
- [請求項6] DNAバーコード配列を付加されたスライドおよび請求項1から請求項4のいずれか1項に記載のRNAプローブをハイブリダイズさせることによって製造される、RNAマイクロアレイ。
- [請求項7] 前記(i)の配列が異なり、前記(ii)の配列、(iii)および(iv)の配列が同一である2種以上のRNAプローブを有する、請求項6に記載のRNAマイクロアレイ。
- [請求項8] 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6または請求項7に記載のRNAマイクロアレイおよびRNAプローブをハイブリダイズしていないDNAバーコード配列を付加され

たスライドと蛍光標識された対象タンパク質と接触させる工程、

(2) 当該対象タンパク質と結合したRNAプローブおよびDNAバーコード配列を特定する工程、および

(3) 工程(2)で特定されたDNAバーコード配列と対応する相補鎖を有するRNAプローブを工程(2)で特定されたRNAプローブから削除して得られたRNAプローブに含まれるループ部分の配列を含む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。

[請求項9] 前記RNAが、Pre-miRNAである、請求項8に記載の方法。

[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1から4のいずれか1項に記載のRNAプローブおよび対象タンパク質を接触させる工程、

(2) 工程(1)で得られた対象タンパク質をRNAプローブとの結合を保持したまま単離する工程、

(3) 工程(2)で得られた対象タンパク質からRNAプローブを抽出する工程、

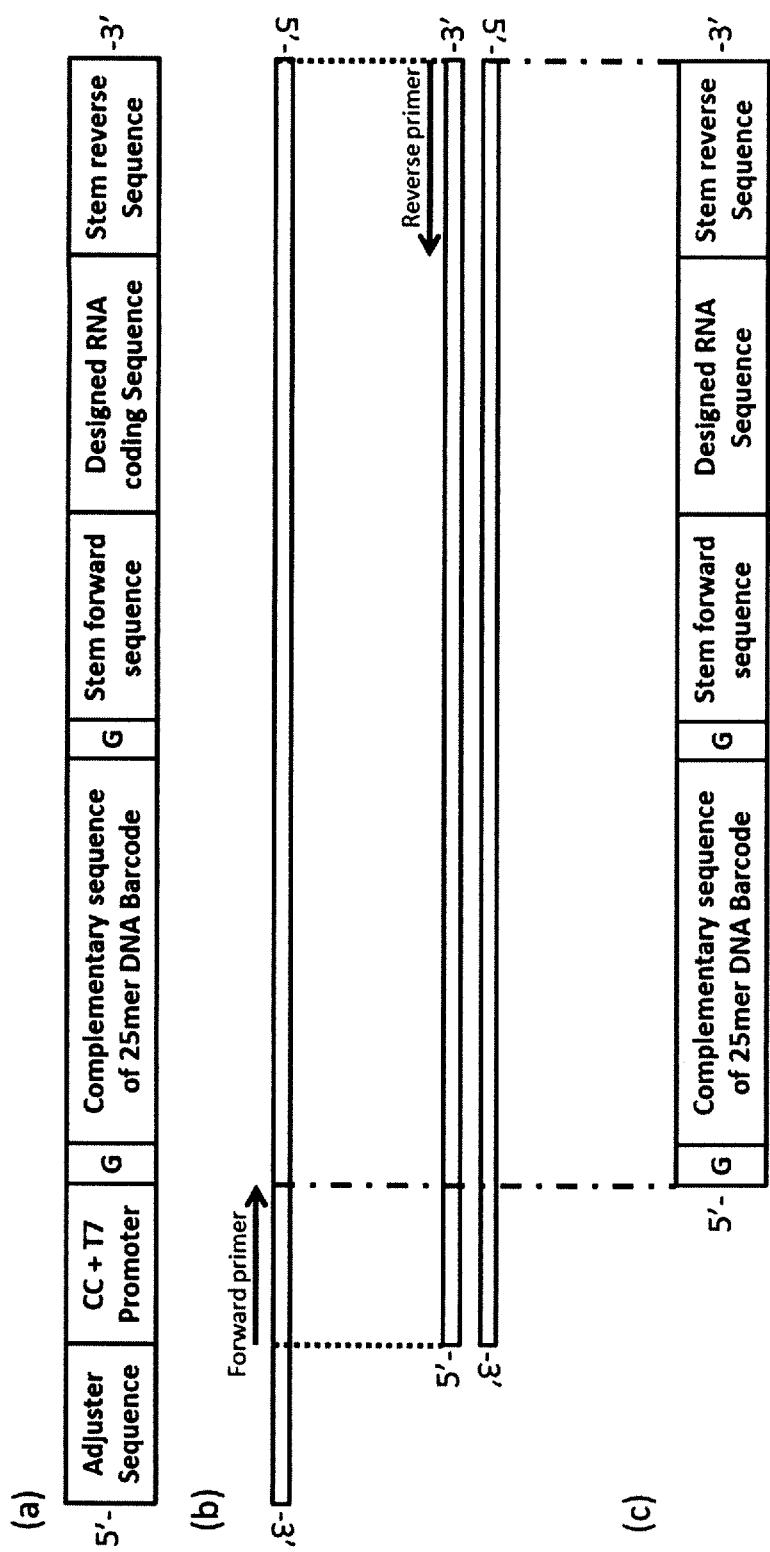
(4) 工程(3)で得られたRNAプローブとDNAバーコード配列を付加されたスライドを接触させる工程、

(5) 前記DNAバーコード配列を付加されたスライド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プローブに含まれる(iv)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。

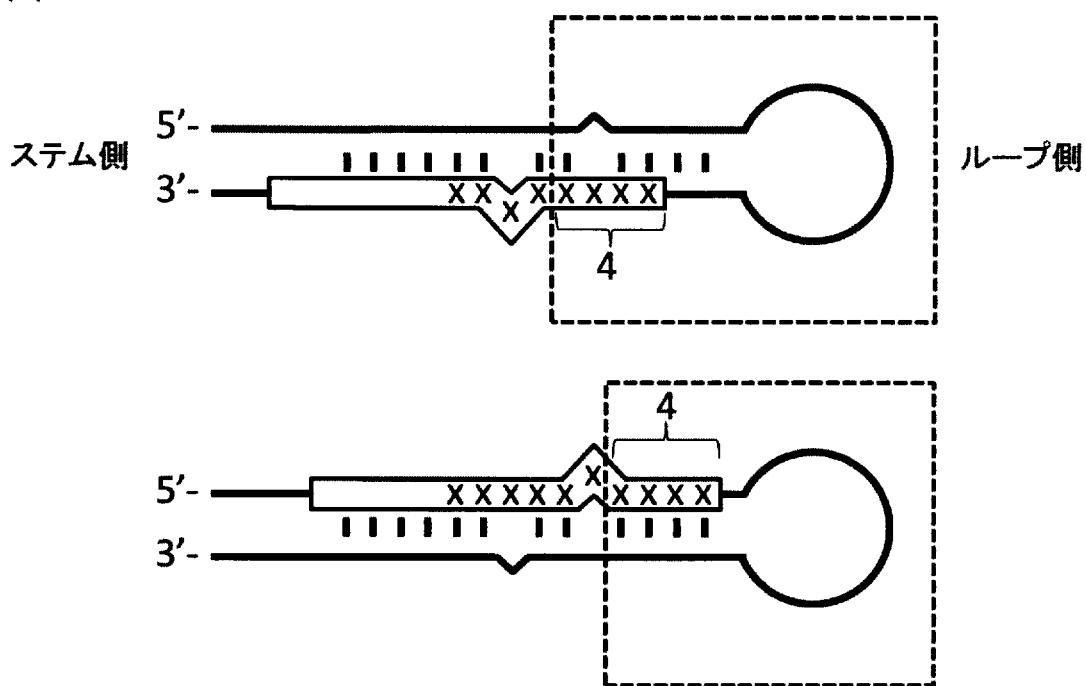
[請求項11] 前記RNAが、Pre-miRNAである、請求項10に記載の方法。

[図1]

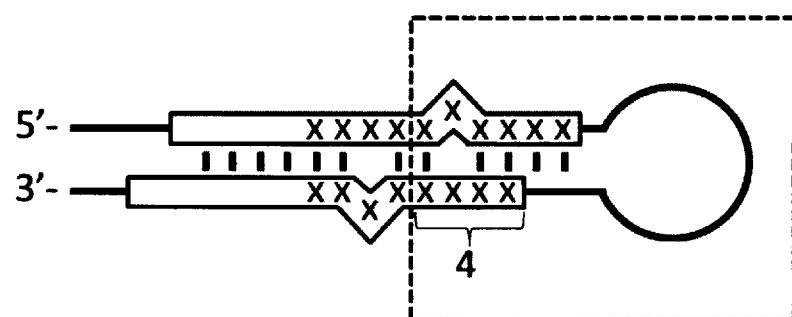


[図2]

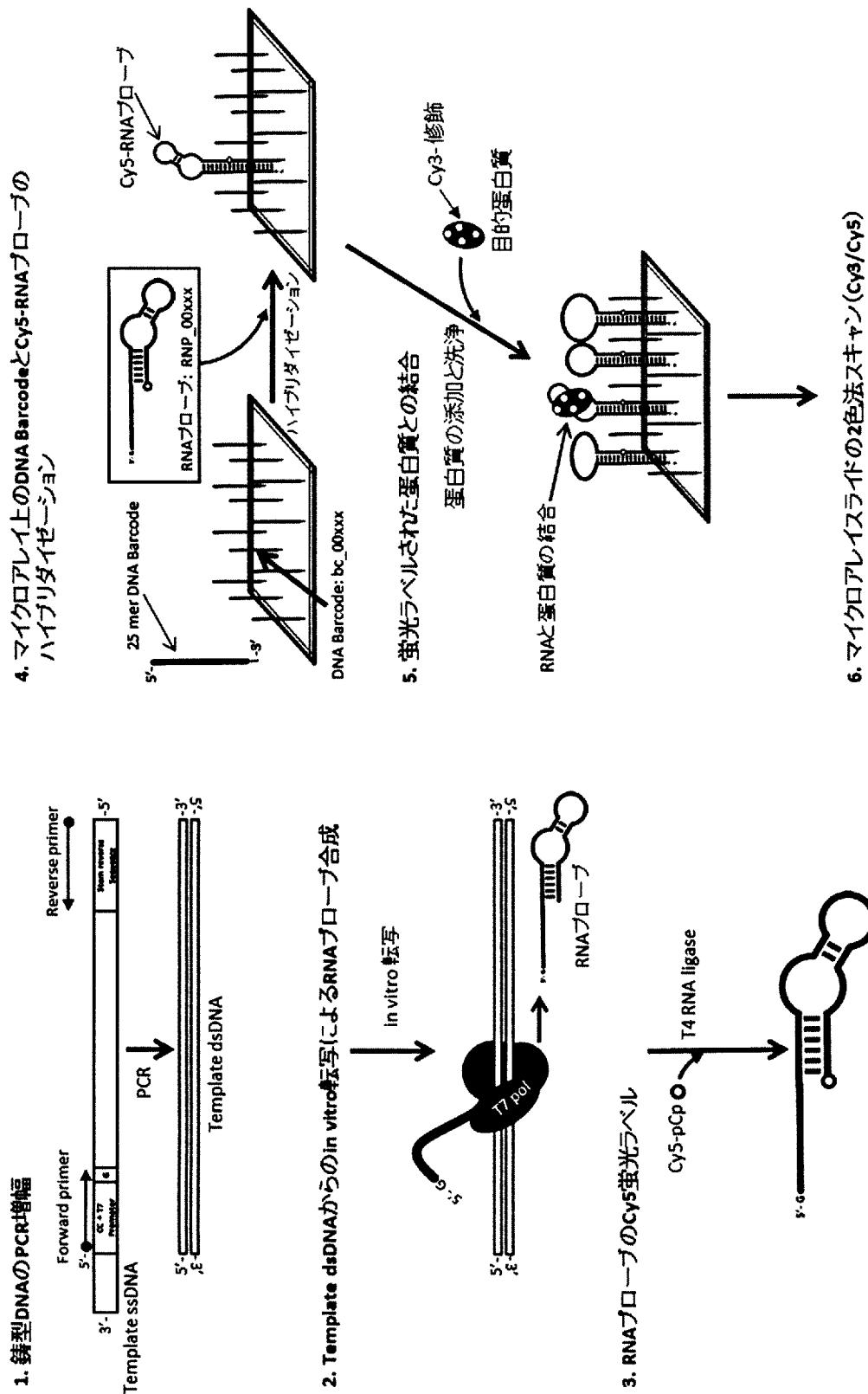
(a)



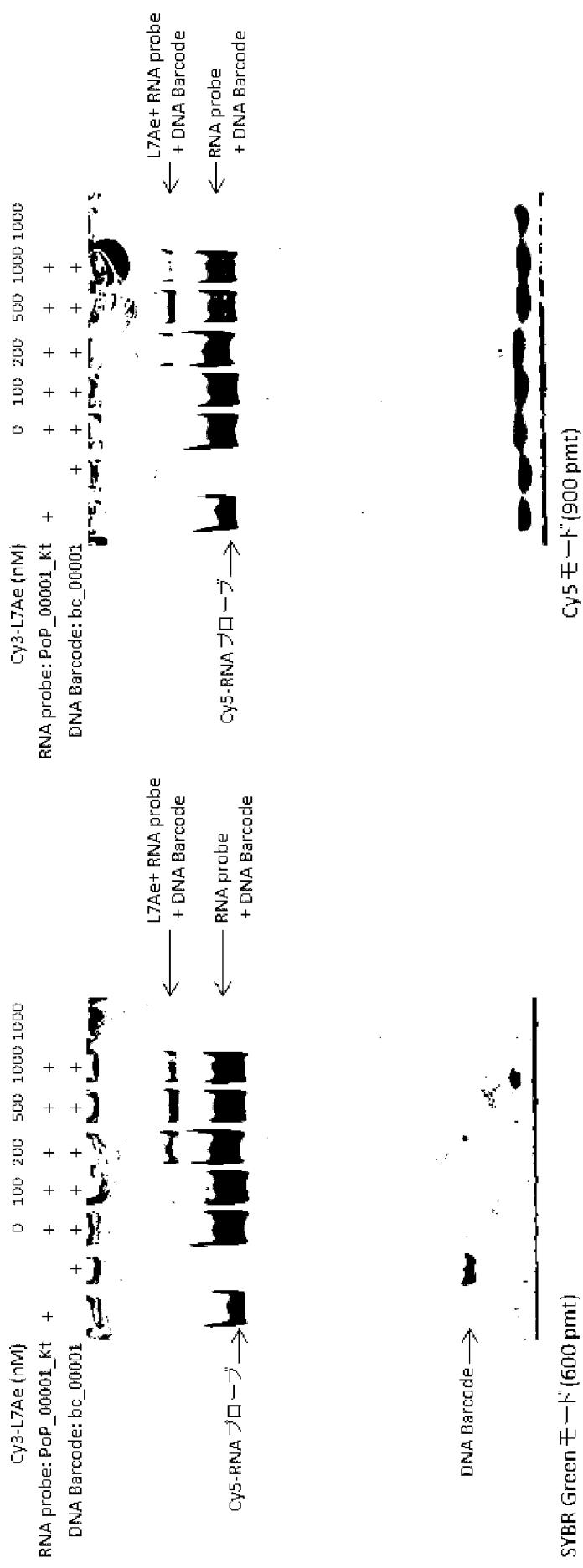
(b)



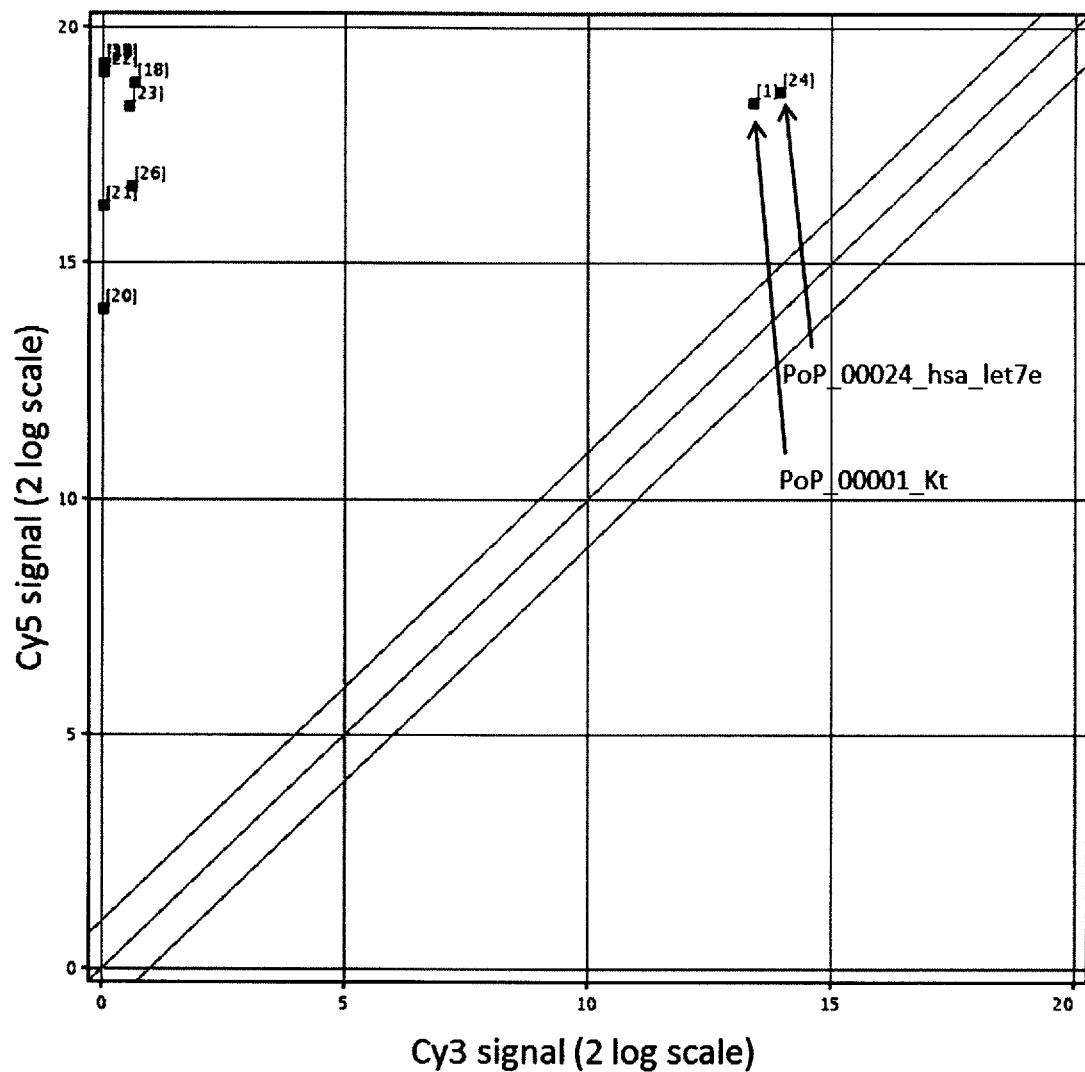
[図3]



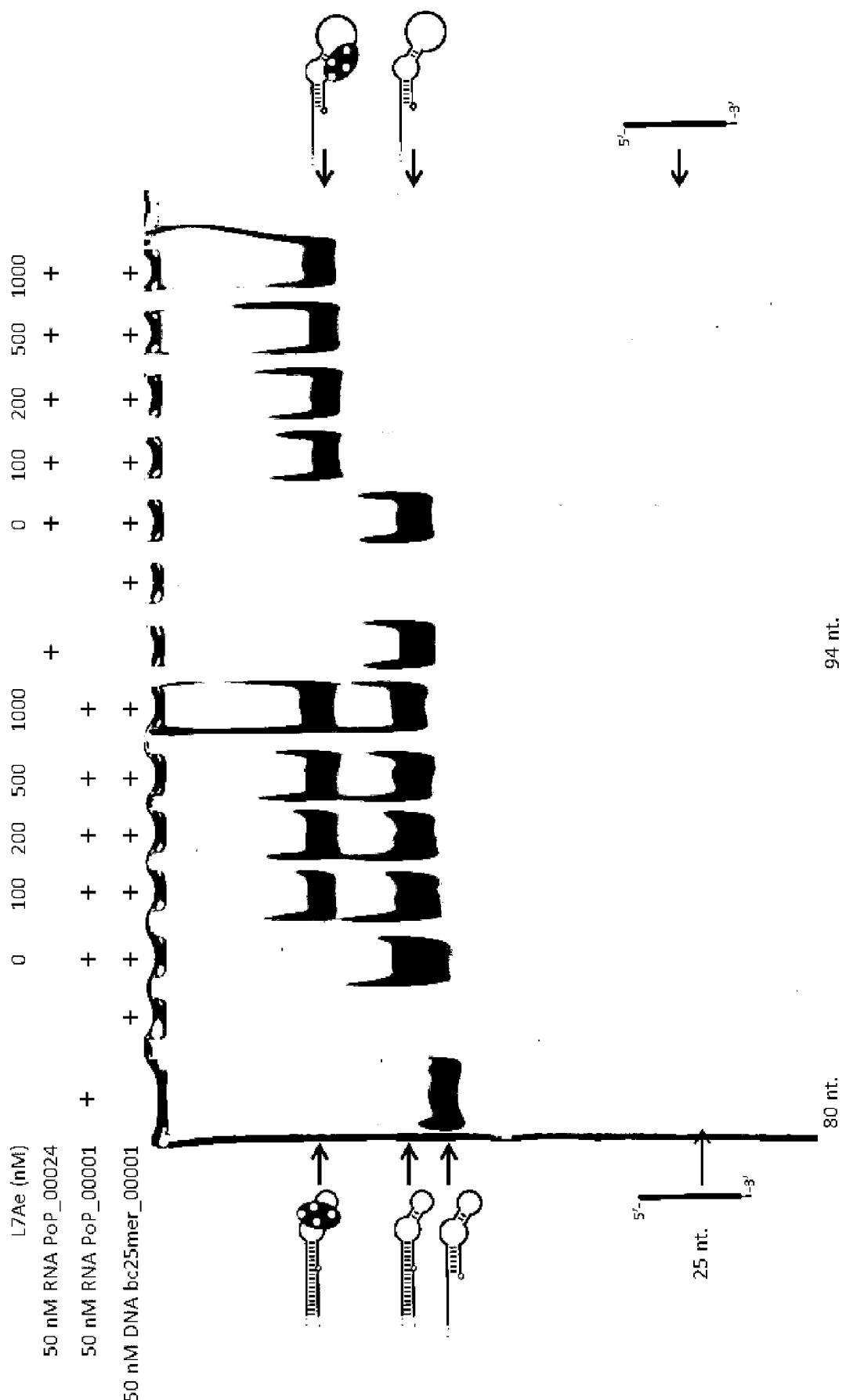
[図4]



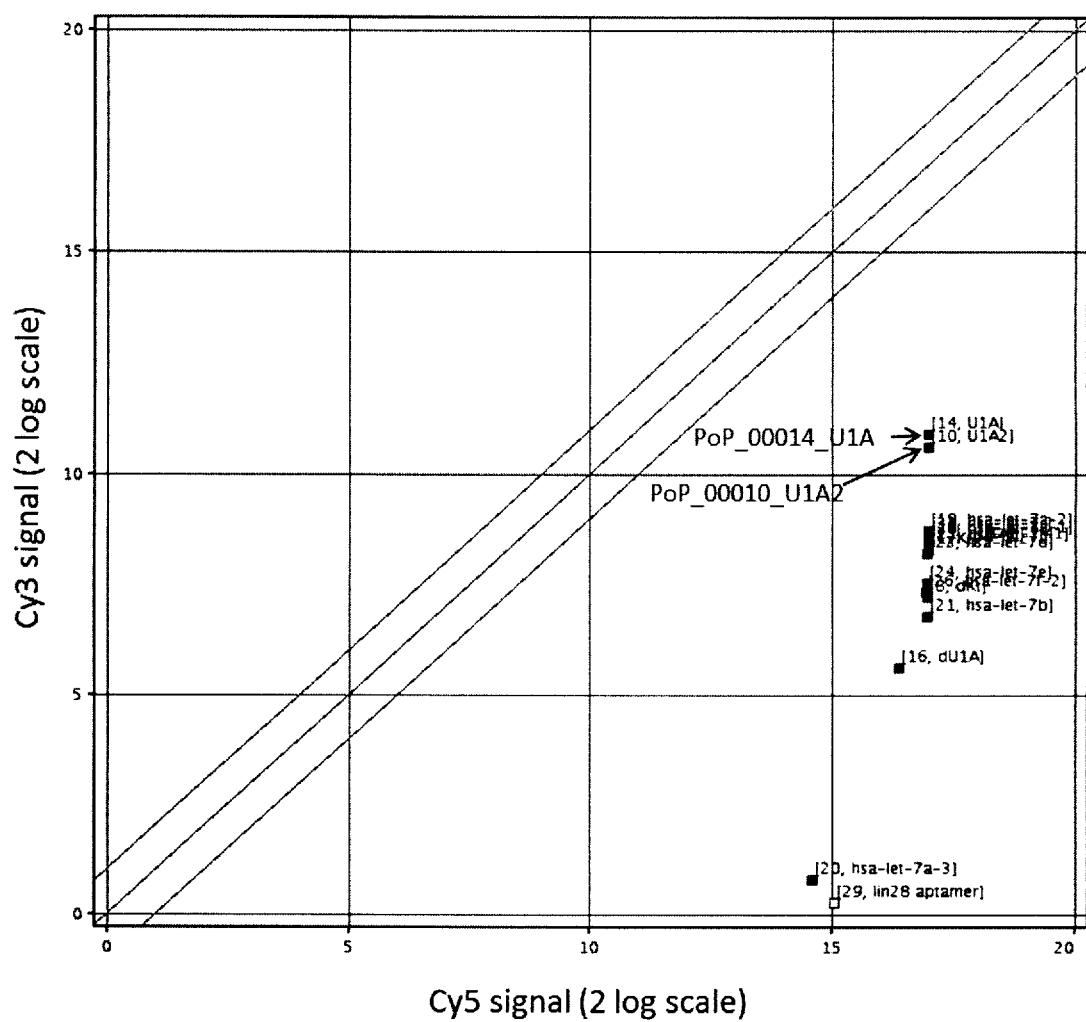
[図5]



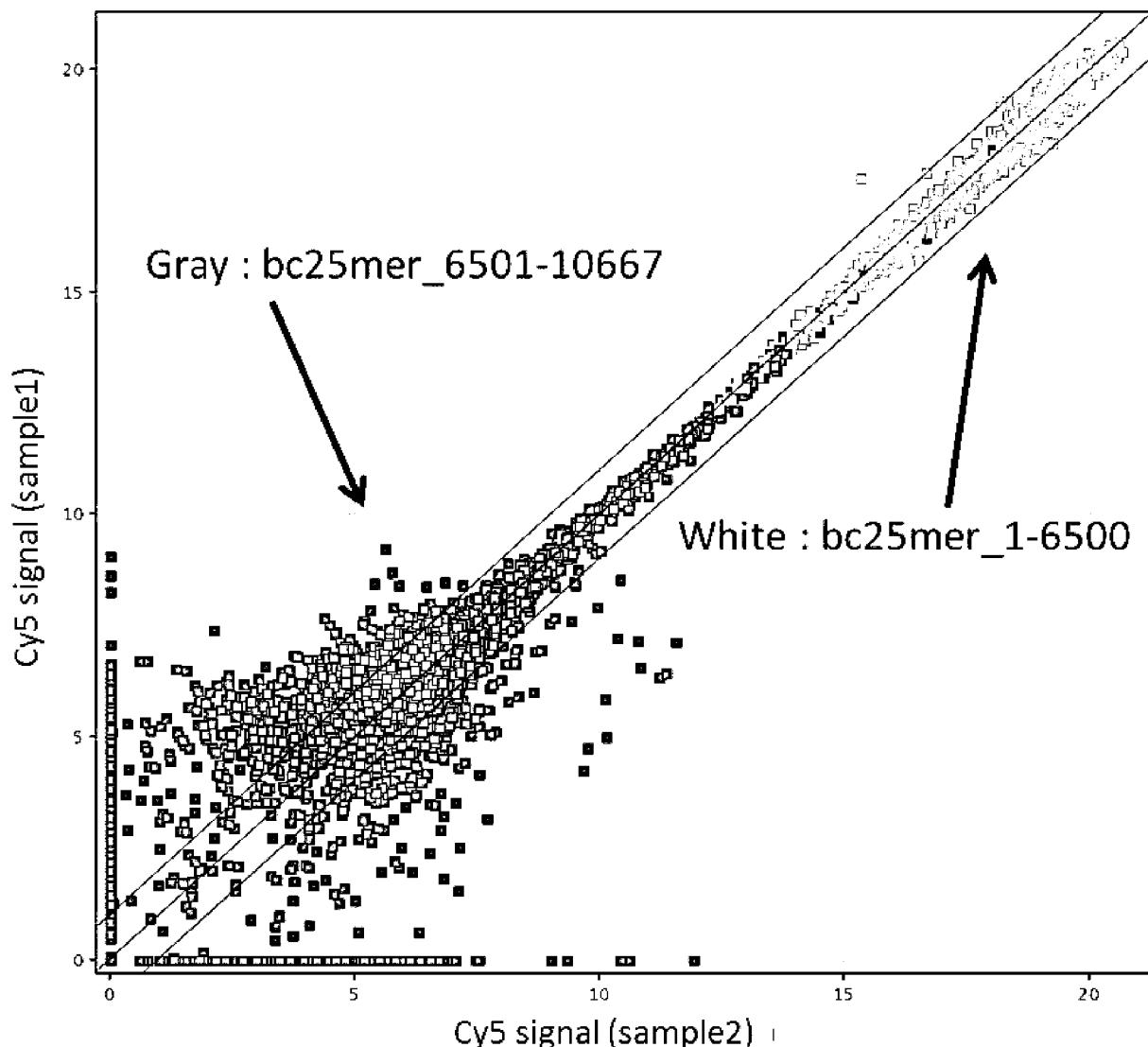
[図6]



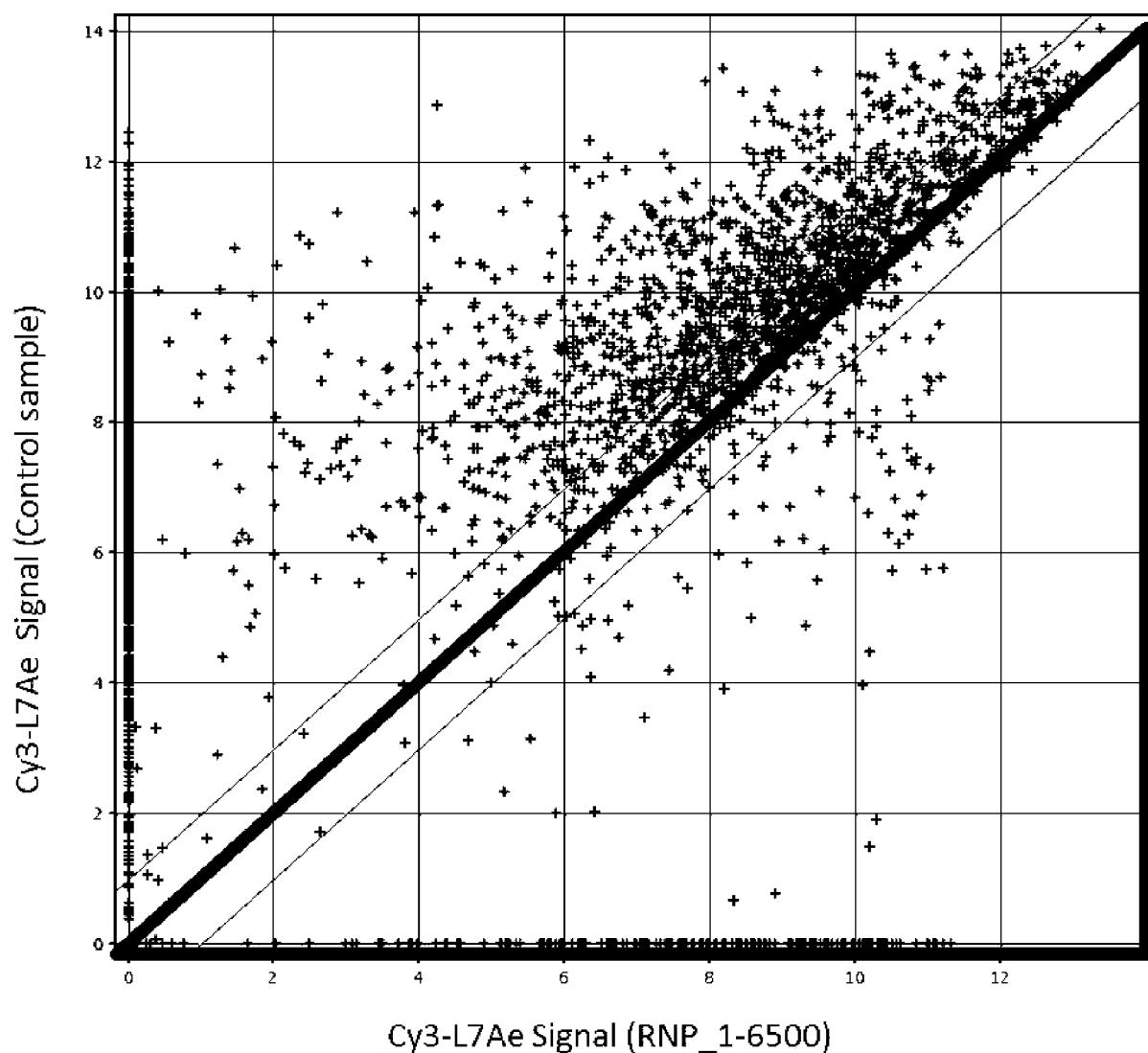
[図7]



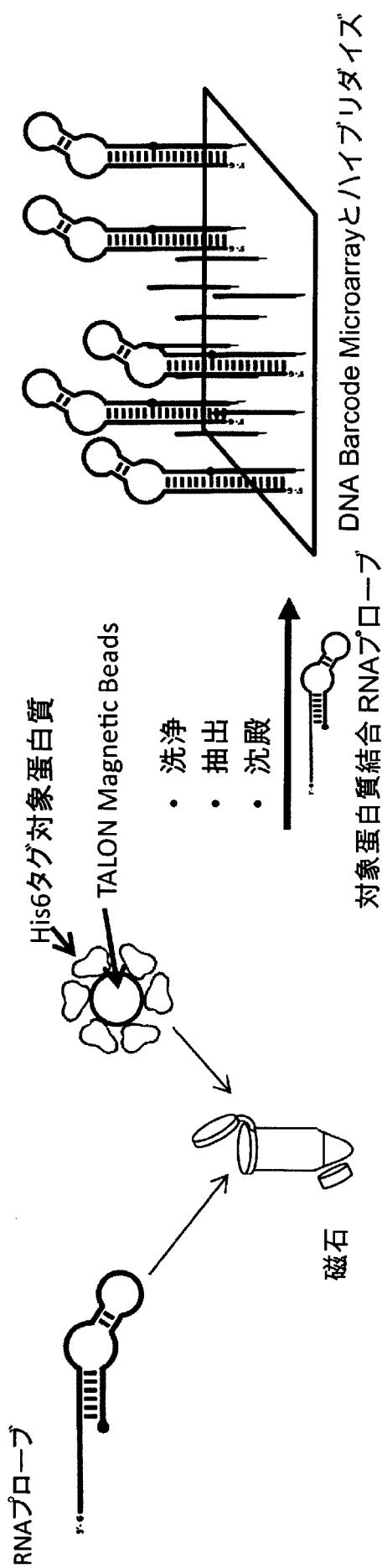
[図8]



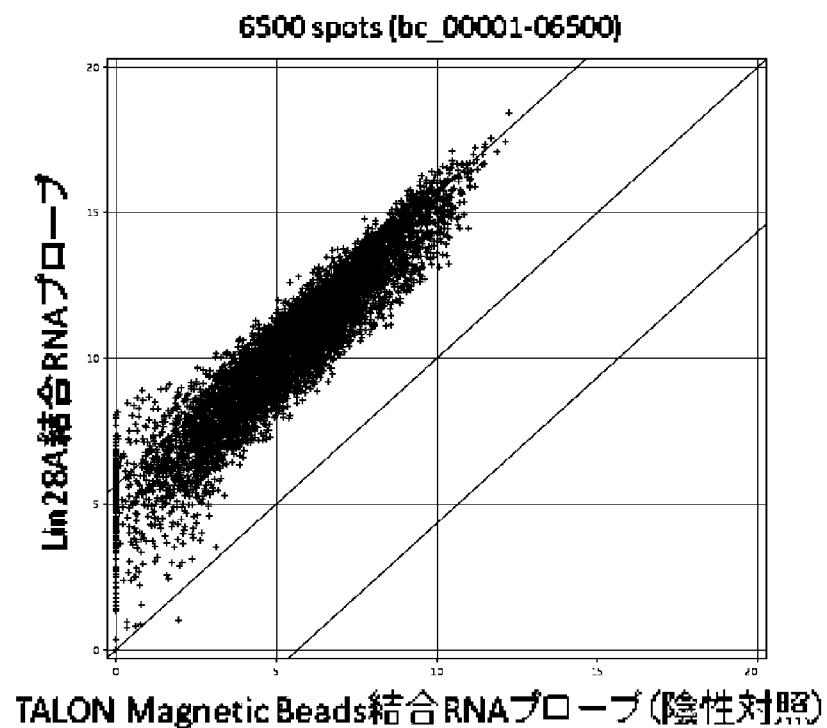
[図9]



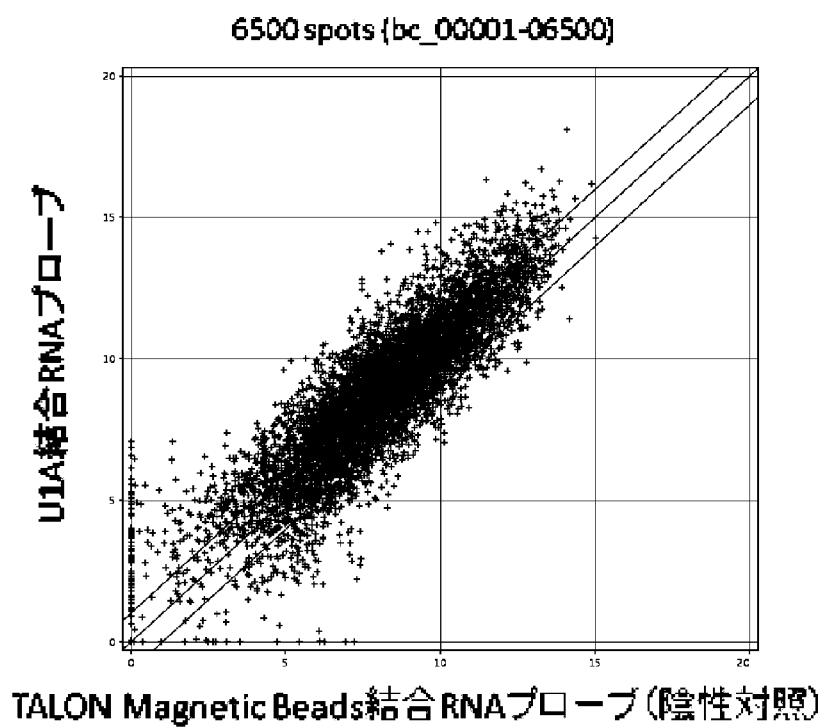
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/050494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N37/00
(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, C12M1/00, C12Q1/68, G01N37/00

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2007-529994 A (One Cell Systems, Inc.), 01 November 2007 (01.11.2007), entire text; particularly, abstract; claims; examples & US 2005/0059049 A1 & WO 2005/007815 A2 & EP 1668157 A	1,8,10/1-11
X/Y	JP 2006-520206 A (Valat, Christophe), 07 September 2006 (07.09.2006), entire text; particularly, fig. 1B; paragraphs [0037], [0051] & US 2006/0199183 A1 & WO 2004/083225 A2 & EP 1601798 A	1,8,10/1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 April 2015 (02.04.15)

Date of mailing of the international search report

14 April 2015 (14.04.15)

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/JP2015/050494

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0230367 A1 (JAEHOON Yu, Seoul), 22 September 2011 (22.09.2011), entire text; particularly, abstract & WO 2011/049264 A1	1-11
A	WO 2009/066758 A1 (Japan Science and Technology Agency), 28 May 2009 (28.05.2009), entire text; particularly, fig. 1 & US 2014/0030707 A1 & WO 2009/066758 A1 & EP 2221371 A1	1-11
A	WO 2010/067811 A1 (Japan Science and Technology Agency), 17 June 2010 (17.06.2010), entire text; particularly, fig. 2 & US 2011/0263026 A1 & WO 2010/067811 A1 & EP 2390324 A1	1-11
A	JP 2009-142273 A (Japan Science and Technology Agency), 02 July 2009 (02.07.2009), entire text; particularly, fig. 1; paragraphs [0008] to [0026] (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(I.P.C.))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N37/00(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(I.P.C.))

Int.Cl. C12N15/09, C12M1/00, C12Q1/68, G01N37/00

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	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015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)

Cplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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	JP 2007-529994 A (ワン セル システムズ インコーポレイテッド) 2007.11.01, 全文、特に要約、特許請求の範囲、実施例 & US 2005/0059049 A1 & WO 2005/007815 A2 & EP 1668157 A	1, 8, 10/1-11
X/Y	JP 2006-520206 A (ヴァラ, クリストフ) 2006.09.07, 全文、特に図1B、[0037]、[0051] & US 2006/0199183 A1 & WO 2004/083225 A2 & EP 1601798 A	1, 8, 10/1-11

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 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」国際出願目前で、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 02. 04. 2015	国際調査報告の発送日 14. 04. 2015
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 松原 寛子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 4N 4154

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求項の番号
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	
Y	US 2011/0230367 A1 (JAEHOON Yu, Seoul) 2011.09.22, 全文、特に要約 & WO 2011/049264 A1	1-11
A	WO 2009/066758 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2009.05.28, 全文、特に図1 & US 2014/0030707 A1 & WO 2009/066758 A1 & EP 2221371 A1	1-11
A	WO 2010/067811 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2010.06.17, 全文、特に図2 & US 2011/0263026 A1 & WO 2010/067811 A1 & EP 2390324 A1	1-11
A	JP 2009-142273 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2009.07.02, 全文、特に図1、[0008]-[0026] (ファミリーなし)	1-11