

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3595841号

(P3595841)

(45) 発行日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(24) 登録日 平成16年9月17日(2004.9.17)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

Z

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 15/09

G O 1 N 33/50

P

G O 1 N 33/50

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A A

請求項の数 32 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願平6-514281
 (86) (22) 出願日 平成5年12月3日(1993.12.3)
 (65) 公表番号 特表平8-507202
 (43) 公表日 平成8年8月6日(1996.8.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1993/011775
 (87) 国際公開番号 W01994/013833
 (87) 国際公開日 平成6年6月23日(1994.6.23)
 審査請求日 平成12年11月15日(2000.11.15)
 (31) 優先権主張番号 985,308
 (32) 優先日 平成4年12月4日(1992.12.4)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 サーナ セラピューティクス、インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国 コロラド 80301,
 ボールダー、ワイルダーネスプレイス 2
 950
 (73) 特許権者
 エール ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0651
 1, ニューヘイブン、カレッジス
 トリート 451
 (74) 代理人
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リボザイム増幅診断用薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

溶液中の標的核酸分子を検出する方法であって、以下の工程：

溶液中に、2つの相補的なヌクレオチド分子がハイブリダイズする条件下で：リボザイム分子、標的核酸分子、およびリボザイムに対する開裂部位を含む標識された共標的核酸分子、を提供する工程であって、ここで、該共標的分子および標的分子は異なる配列を有し、そして該リボザイム分子は、該標識された共標的核酸分子に相補的な領域および該標的核酸分子に相補的な領域を含み、ここで、該相補的な領域は、少なくとも、該リボザイム分子と該共標的核酸分子と該標的核酸分子との間の結合を得るために最小限の数の相補的ヌクレオチドを含む工程、

該リボザイム分子を、該標識された共標的核酸分子および該標的核酸分子と反応させる工程、ならびに

該標的核酸分子が溶液中に存在する場合、該標的核酸分子が溶液中に存在しない場合と比較して遊離の標識の存在を検出する工程；

を包含する、方法。

【請求項2】

前記リボザイムが、テトラヒメナリボザイム、RNAase P、イモリのサテライトリボザイム由来のリボザイム、植物ウイルス由来のハンマーヘッドリボザイム、およびデルタ肝炎ウイルス由来のアクスヘッド(axehead)リボザイムからなる群に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸分子が共標的の第 1 の核酸分子により結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的核酸分子がタンパク質をコードする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標識された共標的核酸分子が固体支持体上に固定化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記標識された共標的核酸分子が、染料、発色性基質と反応性の酵素、蛍光標識、化学発光標識、および放射性標識からなる群から選択される標識で標識される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記リボザイムが、該リボザイムが前記標的核酸分子に結合するときに、コンホメーション的に活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記リボザイムが、該リボザイムが前記標的核酸分子および前記標識された共標的核酸分子の両者に結合するときに、コンホメーション的に活性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記リボザイムの酵素活性を変える分子に対する結合に基づいて該リボザイム分子を選択する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、以下の工程：

前記リボザイム分子を繰り返し合成する工程；

該リボザイム分子と、活性を変える分子とを、いくつかのリボザイム分子が該分子に結合する条件下で反応させる工程；

該活性を変える分子と結合しないリボザイムを除去する工程、

該リボザイムの活性について結合分子の影響をスクリーニングする工程、

該活性を変える分子に結合し、そしてそれによってその活性が変化し得るリボザイム分子を単離する工程、および

該分子と結合し、そしてその活性が該分子との結合により変化し得るリボザイム分子が単離されるまで、このプロセスを繰り返す工程；

30

を包含する、方法。

【請求項 11】

前記リボザイムが 37 を超える高温で安定で、そして前記標的核酸分子が 37 を超える条件下で結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標的核酸分子が前記リボザイム分子により結合されるときに、該標的核酸分子が結合されない場合に比べ検出される標識がより少ない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的核酸分子が前記リボザイム分子により結合されるときに、該標的核酸分子が結合されない場合に比べ検出される標識がより多い、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 14】

リボザイム分子、標的核酸分子、および該リボザイムに対する開裂部位を含む標識された共標的核酸分子を含む組成物であって、ここで、該共標的分子および該標的分子は異なる配列を有し、そして該リボザイム分子は、該標識された共標的核酸分子に相補的な領域および該標的核酸分子に相補的な領域を含み、

ここで、該相補的な領域は、少なくとも、該リボザイム分子と共標的核酸分子と標的核酸分子との間の結合を得るために最小限の数の相補的ヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 15】

前記共標的核酸分子が、前記標的核酸分子に結合し、そして前記リボザイム分子により結

50

合されおよび開裂される、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記標的核酸分子がタンパク質をコードする、請求項14に記載の組成物。

【請求項17】

前記リボザイムが、テトラヒメナリボザイム、RNAase P、イモリのサテライトリボザイム、植物ウイルス由来のハンマーヘッドリボザイム、およびデルタ肝炎ウイルス由来のアクスヘッドリボザイムからなる群に由来する、請求項14に記載の組成物。

【請求項18】

前記リボザイムが、前記共標的核酸分子上の第1の部分に結合するときに、コンホメーション的に活性である、請求項14に記載の組成物。

10

【請求項19】

前記リボザイムが、第1の相補的な領域が前記共標的分子に結合し、そして第2の相補的な領域が前記標的分子上の第2の部分に結合するときに、コンホメーション的に活性である、請求項14に記載の組成物。

【請求項20】

前記リボザイムの酵素的活性が、該リボザイムへの制御性分子の結合により変えられる、請求項14に記載の組成物。

【請求項21】

前記リボザイム分子が、37 と60 との間の温度でコンホメーション的に活性である、請求項14に記載の組成物。

20

【請求項22】

前記標識された共標的核酸分子が、固体支持体上に固定化されている、請求項14に記載の組成物。

【請求項23】

前記標識された共標的核酸が、染料、発色性基質と反応性の酵素、蛍光標識、化学発光標識、および放射性標識からなる群から選択される標識で標識される、請求項14に記載の組成物。

【請求項24】

前記標的核酸分子が、前記リボザイムまたは前記共標的分子のいずれかにハイブリダイズする場合、該標的核酸分子が結合されない場合に比べ検出される標識がより少ない、請求項14に記載の組成物。

30

【請求項25】

前記標識核酸が、前記リボザイムまたは第2の分子のいずれかにハイブリダイズする場合、該標識核酸が結合されない場合に比べ検出される標識がより多い、請求項14に記載の組成物。

【請求項26】

リボザイム分子を選択する方法であって、該リボザイム活性が制御性分子との結合により変えられ得、以下の工程；

該リボザイム分子を繰り返し合成する工程、

該リボザイム分子と、活性を変える分子とを、いくつかのリボザイム分子が該分子に結合する条件下で反応させる工程、

40

該活性を変える分子と結合しないリボザイムを除去する工程、

該リボザイムの活性について結合分子の影響をスクリーニングし、該リボザイム分子を単離する工程であって、ここで、該分子が該リボザイムを結合しそしてその活性に影響を与える工程、および

該分子と結合し、そしてその活性が該分子との結合により変えられ得るリボザイム分子が選択されるまで、このプロセスを繰り返す工程、
を包含する、方法。

【請求項27】

溶液中の標的核酸分子を検出するためのキットであって、該キットは以下：

50

染料、発色性基質と反応性の酵素、蛍光標識、化学発光標識、および放射性標識からなる群から選択される標識で標識され、そして標的分子に相補的な2つの領域を有するリボザイムを含み、ここで、該標識は、該リボザイムが該標的分子に結合する場合、該リボザイムから開裂される、トランスに作用するリボザイム、を含む、キット。

【請求項28】

前記標識リボザイムが、テトラヒメナリボザイム、RNAase P、イモリのサテライトリボザイム、植物ウイロイド由来のハンマーヘッドリボザイム、およびデルタ肝炎ウイルス由来のアクスヘッドリボザイムからなる群に由来する、請求項27に記載のキット。

【請求項29】

溶液中の標的された核酸分子を検出する方法であって、以下の工程：

トランスに作用するリボザイム診断システムを提供する工程であって、該システムは、染料、発色性基質と反応性の酵素、蛍光標識、化学発光標識、および放射性標識からなる群から選択される標識で標識され、そして該標的された分子に相補的な2つの領域を有するリボザイムを含み、ここで、該標識は、該リボザイムが該標的された分子に結合するときに該リボザイムから開裂される、工程；ならびに

該リボザイムから開裂された該標識を検出することにより該標的された分子を検出する工程、

を包含する方法。

【請求項30】

溶液中の標的された核酸分子を検出する方法であって、前記リボザイムが、テトラヒメナリボザイム、RNAase P、イモリのサテライトリボザイム、植物ウイロイド由来のハンマーヘッドリボザイム、およびデルタ肝炎ウイルス由来のアクスヘッドリボザイムからなる群に由来する、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

リボザイムであって、該リボザイムは、染料、発色性基質と反応性の酵素、蛍光標識、化学発光標識、および放射性標識からなる群から選択される標識で標識され、そして標的分子に相補的な2つの領域を有し、ここで、該標識は、該リボザイムが該標的分子に結合するときに該リボザイムから開裂される、リボザイム。

【請求項32】

テトラヒメナリボザイム、RNAase P、イモリのサテライトリボザイム、植物ウイロイド由来のハンマーヘッドリボザイム、およびデルタ肝炎ウイルス由来のアクスヘッドリボザイムからなる群に由来する、請求項31に記載のリボザイム。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本発明は、リボザイムを含む結果として、増幅されるまたは分差応答を有する診断用薬を設計するためのシステムである。

感染因子、または、代謝産物、核酸、およびタンパク質を含む病気の指標となる分子の検出は、医学的疾患の診断および治療、ならびに研究における基本的な要素である。多くの方法論が現在検出に使用されている。これらの方法論は、一般に、病気を引き起こす因子または病気の副産物のいずれかの成分であるタンパク質に対する抗体をベースにした診断アッセイ、および病気を引き起こす因子の成分をコードする遺伝物質のような、核酸に対する診断アッセイに分けられる。

タンパク質に対するアッセイは、さらに、分子（通常抗体）と、検出されるタンパク質との結合反応、または、酵素の活性化をもたらす、検出可能な色の変化を生じる基質を開裂し得る、酵素と酵素に結合する標的された分子間の反応を含む方法に分けられる。多くの結合アッセイは、染料、酵素または放射性または蛍光標識を含み、検出を増強する。タンパク質に対する抗体は、患者、免疫化動物、または抗原特異的モノクローナル細胞株から得られ得る。これらの抗体アッセイは、サンドイッチELISAアッセイ、ウェスタンブロット、放射性イムノアッセイ、および免疫拡散アッセイのようなアッセイを包含する。その他のアッセイは、分子の固定化および検出のためにアビジンおよびビオチンのよう

10

20

30

40

50

な分子を用いる。これらの試薬を調製する技術およびそれを使用する方法は、当業者に公知である。

拡散配列アッセイは、核酸分子の存在を検出するための放射性標識プローブを用いるノザンプロットハイブリダイゼーションのような単純な方法から、ハイブリダイゼーション技術による配列の検出に使用され得るところまで非常に少量の特定の核酸配列を増幅するためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の使用までの範囲にわたる。ヌクレオチドプローブは、市販の染料、または酵素、蛍光、化学発光、あるいは放射性の標識を用いて標識され得る。これらのプローブは、ハイブリダイゼーションにより細胞中または組織試料中の遺伝子または関連配列(そこではその遺伝子は通常の成分である)の発現を検出するために、および生物の感染から生じる疾患を有すると疑われるヒトからの血清または組織試料をスクリーニングするために、または催腫瘍性細胞中に見い出されるような新規または改変遺伝子を検出するために使用され得る。核酸プライマーがまた、逆転写酵素、またはDNAポリメラーゼおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて調製され得、組織または液体中に非常に少量で存在する核酸分子の検出のために使用され得る。

酵素をベースにした方法論およびPCR(ポリメラーゼを使用する)のみが、信号の増幅に連結した検出を用いて、固有に触媒的である。PCRは、非常に少量のDNAを検出し得るがいくつかの欠点を有する:信頼性について高度の技術的能力を必要とし;偽陽性を生じる汚染に顕著に感受性であり;定性的より定量的に使用することが困難である。その他の方法は、酵素が、通常、アッセイの付加的成分への結合により、信号生成および増幅を増加する。これらの付加的リガンドの使用は、より高いバックグラウンドおよび偽陽性を生じ、システムのノイズを増加させ、そして対照反応のいくつかのレベルを必要とする。

リボザイムは、酵素様の活性を有するRNA分子として定義される。RNAで触媒される開裂には3つの一般経路がある:(1)ウイロイド様RNAによる開裂;(2)RNAase PまたはRNAase PのRNA成分による開裂、Yale UniversityのSidney Altmanの研究;および(3)テトラヒメナリボザイムによる開裂、University of ColoradoのThomas Cechの研究。現在まで知られている天然に存在するリボザイムは、RNAase Pを除いて、シスに作用しそしてトランスに、即ち、他の分子に作用するためには加工されなければならない。このことは、酵素活性を有するRNA分子の部分を基質として供される部分から分離すること、および、開裂されるべき標的分子に基質様性質、これは適切な2次および3次構造を含むが、を付与するにより達成される。特異性は、標的分子上の開裂されるべき部位の近傍でハイブリダイズする相補的核酸配列を添加することにより付与され得る。

各クラスのリボザイムは、異なる作用メカニズムでヌクレオチドの異なる配列を開裂する。その上、各クラスは、酵素的活性に必須なヌクレオチド塩基の数に基づいてさらに区別され得、そしておよび意図される標的の範囲までリボザイムは特異性を変えるために操作され得る。

テトラヒメナリボザイムは、発見された最初のリボザイムであった。このリボザイムは、その開裂について、グアノシン依存性である。天然にシスで作用するのは大きなリボザイムである。より小さな内部部分は、トランスに、即ち、別の分子に作用するために加工され得、特定の4種のヌクレオチド配列を標的とする。

M1 RNAは、*E. coli* RNAase PのRNAリボザイムサブユニットであり、約400塩基のRNA分子である。このRNA分子は細胞中の、全種類の別の他の分子を開裂し、tRNA前駆体から成熟tRNAを生成する。その他の分子は、M1 RNAの基質に転換され得るが、それは外部ガイド配列の使用を通して行われる。この外部ガイド配列はその5'末端に、開裂されるべきRNA中の開裂部位の3'側のヌクレオチドに相補的な少なくとも7つのヌクレオチド、およびその3'末端に、その相補的なヌクレオチドに直接結合するヌクレオチドNCCAを有する、単離オリゴリボヌクレオチドとして特徴付けられる。ここで、Nは、任意のヌクレオチドであり、そしてオリゴリボヌクレオチド中の相補的ヌクレオチドは、これは開裂されるべきRNA中の相補的ヌクレオチドにハイブリダイズする。ForsterおよびAltman、*Science* 249:783-786 (1990)、「RNA酵素のための外部ガイド配列」に記載されている。Altmanら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (17):8006-8010 (1992)、「ヒトRNase PによるメッセンジャーRNAの

10

20

30

40

50

標的された開裂」は、最近、前駆体TRNAに由来する構造に基づき、*E.coli* RNAase Pの真核性相当物に対する外部ガイド配列の構築について記載した。RNAase P反応およびテトラヒメナ反応の両者は、5'ホスフェートおよび3'ヒドロキシル末端を作製するように作用する。

植物および動物中で見い出されたいくつかの種類のウイロイド様RNAリボザイムがある。ハンマーヘッド (hammerhead) リボザイムは、このカテゴリーの1つのクラスであり、そしてデルタ肝炎リボザイムは、第2のクラスである。RNAase Pおよびテトラヒメナリボザイムとは異なり、設計されたトランス作用性植物ウイロイド様リボザイムは、等しく短い基質を有するほんの18~20ヌクレオチド塩基長である。中心的な主題は、特徴的な保存配列であり、Uhlenbeckが1987年に説明し、そしてNature 328:596 - 600 (1987) で公開された。その中で、彼は、すべてのハンマーヘッドは特定の特徴を共有することを提案した。ウイロイド様リボザイムの開裂反応は、2'、3'環状ホスフェートおよび5'ヒドロキシル末端を作製する。従って、M1 RNA反応またはテトラヒメナ反応と比較して、これらウイロイド様RNA反応について基本的におよびメカニズム的に異なる化学が存在する。しかし、最終結果は同一、即ち、別のRNA分子の開裂である。

いくつかのグループにより、リボザイムが、除かれるのではなく除くべき遺伝子から転写されるウイルスRNAまたはmRNAのような、標的RNAを開裂することにより病気または遺伝疾患を治療するために使用される能力を有することが提案された。しかし、それらを診断に使用することは誰にも提案しなかった。

従って、本発明の目的は、リボザイムを用いる診断応答の増幅または生成のための手段を提供することである。

本発明のさらなる目的は、核酸、タンパク質、およびその他の分子の検出において、リボザイムを触媒として作用するように利用することである。検出は、リボザイムによる基質の開裂の結果である。

発明の要旨

核酸、タンパク質、またはその他の分子の存在を検出する診断道具としてリボザイムを使用するシステムが記載され、このシステムでは、活性リボザイムの形成およびアッセイ可能なマーカークの開裂が、特定の標的分子の存在に依存する。必須の成分は、リボザイムであり、このリボザイムは、好ましくは支持体構造上に固定化された、標識された共標的と組み合わせて選択された標的と特異的であるが可逆的に結合する。標的および共標的が結合する場合、リボザイムが共標的から標識を開裂し、それは次いで定量される。このリボザイムは標的および共標的により可逆的に結合されるので、別の共標的と再結合し得、より多くの標識を開裂し、それによって、反応シグナルを増幅する。1つの実施態様では、標的は、リボザイムの部分を形成する相補的配列にハイブリダイズする核酸であり；第2の実施態様では、標的は、リボザイム分子の部分との相互作用により結合されるタンパク質またはその他の高分子である。別の実施態様では、熱安定性のリボザイムが使用され、不適切に結合したリボザイムは、脱安定化されそして高温で不活性化される。

制御可能なリボザイムを単離する方法がまた記載される。制御可能なリボザイムは、特定の高分子の存在を検出する方法において有用であり、または標的RNA分子の開裂の不活性化または活性化のための方法としてインビトロまたはインビボで使用され得る。

【図面の簡単な説明】

図1A、1B、および1Cは、リボザイム増幅診断用組成物の略図である。これは標識したNUX開裂部位を持つ標識したRNA分子であって、固体支持体にしっかりと固定され、「共標的」RNAというRNA分子と塩基対を形成するために設計された1本のアーム、および「標的」RNAとして検出されるRNA上の予め定められた配列と塩基対を形成するために設計されたもう1本のアームを持つリボザイムである。

図2Aおよび2Bは、非核酸分子検出のためのリボザイム増幅診断用組成物である。これは、リガンド結合部位が、検出されるべきリガンド、および活性リボザイムによって開裂され検出可能な標識された配列を遊離する共標的分子と結合した時に、酵素的に活性なコンホメーションを形成するリボザイムである。図2Aは、リボザイムがリガンドに結合して活性

10

20

30

40

50

なコンホメーションをとっている場合；図2Bは、リボザイムがリガンドに結合せず、不活性なコンホメーションをとっている場合である。

図3Aおよび3Bは、熱安定性リボザイム増幅診断システムの略図である。ここで、標的および共標的と適切に適合し、コンホメーション的にも活性であるこのリボザイムを、図3Aに示し、不安定化し、コンホメーション的にも不活性なりボザイムを図3Bに示す。

図4Aおよび4Bは、RNAase Pを適切なEGSと接触させて細菌のRNAase P（図4A）またはヒトのRNAase P（図4B）のどちらかに誘導することをを用いる標的の開裂の略図である。

図5Aおよび5Bは、共標的および標的に結合した活性リボザイム（図5A）および共標的のみに結合した不活性リボザイム（図5B）の略図である。

図6は、15%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルを1×TBE中で800ボルトで電気泳動したものである。反応は、50mMトリス、30mM Mg⁺⁺で行い、37℃で2時間インキュベートした。各組成物：酵素（E）、共標的（CT）、および疾患標的（DT）を、およそ同等の比活性で添加した。レーン1では、反応物の3つ全てが存在したがMg⁺⁺は存在しなかった；レーン2では反応物の3つ全てがMg⁺⁺とともに存在した；そしてレーン3では、酵素および共標的のみが存在した。開裂産物（CP）は、レーン2で見ることができ、そしてレーン3でそれよりは少なく見える。

図7Aおよび7Bは、リボザイム/共標的システムの略図である。このシステムは、疾患標的が存在するときの方がそれが存在しないときよりはるかに活性である。図7Cは、4%ポリアクリルアミド/7M尿素ゲルを1×TBE中で800ボルトで電気泳動したものである。反応物は、図7Aおよび7Bにおけるそれらに対応する。反応は、50mMトリス中で30mM Mg⁺⁺を伴うかまたは伴わないかのどちらかで37℃で3時間行った。反応物は以下の量存在した：リボザイム7pmole；共標的（CT）11.4pmole；疾患標的（DT）0.37pmole。

発明の詳細な説明

リボザイムをもとにした診断方法は、既存の診断方法に比べていくつかの利点を有する。本方法は、高度に特異的なリガンドの相互作用を固有の触媒性の性質と組み合わせしており、従って単純で感度が良く、そして定量性である。この特異性は、リボザイムのアームと標的RNA間の特異的な相補性だけでなく、開裂認識部位の存在と正しい空間的な配向、例えばトリプレット（NUX）、に依存する。さらに、リボザイムは主として他のRNA分子と相互作用しているように見えるが、最近の研究は、インビトロでRNAおよびDNAが選択されて結合するかまたは薬剤および代謝物を含む他の分子、または核酸およびタンパク質を含むマクロ分子の反応を触媒することを示している。Joyce, *Gene* 82:83, 1989; Robertson and Joyce, *Nature* 344:467, 1990; Ellington and Szostak, *Nature* 346:818, 1990; Piccirilliら、*Science* 256:1420, 1992; Nollerら、*Science*, 256:1416, 1992; Ellington and Szostak, *Nature* 355:850, 1992; Bockら、*Nature* 355:564 1992を参照されたい。これらの教示を特にここで援用する。

リボザイム診断システムは、単一分子、シス-作用性リボザイムを2分子または3分子のトランス作用性システムに分割する能力を利用する：2分子システムでは、活性リボザイムはリボザイム分子と疾患標的分子との複合体により形成され、このリボザイム分子には開裂部位があり；あるいは3分子システムでは、活性リボザイムは、リボザイム分子、開裂部位を有する共標的分子、および疾患標的分子の複合体により形成される。

リボザイム増幅診断検出法

図1Aで示したように、リボザイム増幅診断（RAD）の方法論は、3つの重要な構成物を含む：リボザイム10、NUX開裂部位を有し、「共標的」と呼ばれ、固体支持体16に固定されている標識されたRNA分子14と塩基対を形成するように設計された1本のアーム12、および検出されるRNA上の予め定められた配列、「標的」RNA20と塩基対を形成するためのリボザイムのもう1本のアーム18。

リボザイム10が共標的RNA14を開裂する場合、共標的の部分22は、支持体16に結合したまま残り、標識されたNUXを持つ部分24は解離される。未知のサンプルから標識をはずすことにより存在するおよその分子数を決定し得る；すなわち、種々の量の標的的存在下で共標的の開裂の検量線を引くことにより、サンプル中のおよその標的分子数を決定し得る。

10

20

30

40

50

図1Bに見られる変化において、3つの塩基対形成が関与している。1つは、リボザイム10と支持体16に結合した共標的26の間の26bであり、1つは、リボゾーム10と標的28の間であり、そして1つは、共標的26と標的28の間の26aである。標的RNA28が存在し、リボザイム10および共標的26がそれに結合している場合にのみ、触媒的に活性なりボザイムコンホメーションを形成する。リボザイム10、共標的26および標的28の活性3分子複合体は、標識された共標的26がNUX部位で開裂し、標識オリゴヌクレオチド26aが固体支持体16から溶液中に解離する。塩基対形成は可逆的なので、リボザイム10、開裂した共標的26および標的28は、お互いに自由に解離して、リボザイム、開裂していない新しい共標的分子、および標的分子の間で新しい活性複合体を形成する。この再循環によってラベル、そして従ってシグナルの解離が増幅し、システムの感度を高め、そして疑陰性のレベルを低くする

10

ることにつながる。システムの高い特異性は、疑陽性のレベルを低くすることになる。本方法のさらなるバリエーションを図1Cに示す。デルタ肝炎ウイルス由来の設計したリボザイムは、2つのサブドメインに分離し得、これらは再構築された場合、開裂の結果得られたドメインの一つを用いて活性リボザイムを再形成する (Branch and Robertson, Proc. Natl. Acad. Sci. 88:10163 (1991) この文献の教示はここに取り入れている)。デルタリボザイムは、ドメインI中の指定した配列を、標的RNA34中の選ばれた配列に相補的な配列32および36と置き換えることによって再び標的とされ得る。指定した部位38での開裂の結果、リボザイム30の活性なコンホメーションを再構築するために適切な標的RNA 34と複合体化するまで、再び標的となったドメインI 30は不活性なまま残る。

リボザイムのドメインI 30が固体支持体16に固定され、検出可能なラベル (例えば、放射活性ラベル、蛍光物質ラベル、染色、化学発光ラベル、発色性物質と反応性の酵素) で標識される場合、それを臨床サンプルに存在する標的RNA 34の存在を検出するために用い得る。活性リボザイムのコンホメーションは、次に標的RNA 34と結合し、標識されたオリゴヌクレオチド36aの開裂と解離に終わる。この方法は、デルタリボザイムのみならず同様の形式で分離し得るいかなるリボザイムにも適用し得る。

20

反応は、マイクロタイターウェルプレートのようなアッセイ用の標準反応容器で行い得る。好ましい実施態様においては、固体物質はマイクロタイタープレートの壁、マイクロビーズ、あるいはその他の診断アッセイに一般用いる不活性な物質であり得る。固定方法は、例えば Nature 357:519 - 520 (1992) に記載のように、当業者には公知であり、この教示はここに取り入れる。

30

上記の方法論は、病原性の分子、または核酸以外的高分子、例えばタンパク質、を検出し得るように変更し得、これを図2に示す。図2Aを参照して、設計した共標的42に完全に関係している (すなわちリボザイムの両方のアーム40aおよび40bは、共標的42aおよび42bに相補的である) リボザイム配列40を構築する。次いでリボザイム40を配列44に結合させる。この配列44は、タンパク質のような非核酸リガンド46と結合するため、そして結合した場合にはリボザイム40の全配列およびリガンド結合部位44をリボザイムが活性であるコンホメーションにするように選択された。従って、リボザイムの活性化を用いて共標的42を開裂し、ラベルされ検出し得るオリゴヌクレオチド42bを放出させ得る; ラベルの放出は、与えられたリガンド46の存在を示す。この調節可能なリボザイム40は、可逆的に共標的42に結合し、従って開裂していない共標識と相互作用を続け得、その結果シグナルを増幅し得る。リボザイム40の不活性なコンホメーションを図2Bに示す。ここではリガンド結合配列44は、リボザイム40の上に折り返され、このリボザイム40は、不活性なコンホメーションをとって、共標的42を開裂し得ない。

40

図1および2で示す方法論の触媒速度を上げるために、および/または、反応の特異性を上げるために、耐熱性微生物から単離された (Brownら、Keystone RNA Processing Meeting, Keystone, p55abs, 1992)、または「インビトロ遺伝学」 (Szostak, TIBS 17:89, 1992) を用いて選択したより熱安定性のリボザイムを、より高い温度で上記の方法を行うために、用い得る。thermus aquaticusおよびthermotoga maritima由来の熱安定性RNase Pもまた用い得る。より高い反応温度では、リボザイムのガイド配列と標的との間のミスマッチは、安定で、活性な複合体の形成にとって熱力学的に好ましくない、すなわちアームはタ

50

ーゲットに対して正確な相補性を伴ったハイブリダイズをしないままになる。従って、温度が上昇しても触媒中心がコンホメーション的に活性であるリボザイムは、標的および全ての起こりうる部分的に相同な非標的配列の間を識別し得る。標準反応温度では、プロトタイプカル (prototypical) なリボザイムは、本質的に同じ反応速度論で、類似してはいるが同一ではない配列、例えば、10個中2個がミスマッチであるような配列、に結合し、厳密な区別をし得ない。これは、1塩基対のミスマッチを、標準ハイブリダイゼーションプロトタイプ技術、またはPCRによって同定するのと類似している。

インビトロの選択については、上記のインビトロ遺伝学についての方法論を適用して、37°Cで最適に機能するリボザイムの配列においてランダムな遺伝的变化を有するリボザイム集団を生成する。従って、温度が上昇しても効果的に機能するそれらのリボザイムについてアッセイし選択する。例としてBeaudry and Joyce, *Science* 257:635 - 641 (1992) を参照されたい。この教示をここでは援用する。例えば、遺伝子産物は、そのリガンドへの結合能または化学反応能によって選択され得る。選択された遺伝子産物に相当する遺伝子、または特定のリボザイムは、反復プライマー方法、例えばポリメラーゼ連鎖反応、によって増幅され得る。2つのポリメラーゼ酵素の組み合わせを用いて、実質的にはいかなるRNAも増幅し得る。RNAは、逆転写酵素 (RT) を用いて相補的なDNA (cDNA) に逆転写され、そして得られたcDNAを、T7 RNAポリメラーゼを用いてRNAに転写する。増幅は、T7ポリメラーゼがcDNAテンプレートの1コピー当たり200~1200コピーのRNA転写物を生じる能力の結果として、転写の間にかかる。増幅は選択的に行われ、そこでは集団内の個々のRNAが、増幅に好適となるために、特定の化学反応を触媒することが要求される。選択は、リボザイムがオリゴヌクレオチドまたはオリゴデオキシヌクレオチド基質が関与する配列特異的の反応を触媒する能力に基づく。反応産物は、リボザイムの3'末端に付着した3'部分の物質を含む分子である。選択は、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーが連結接合点を越えてハイブリダイズし、cDNA合成を始めるために使われる場合に起こる。

変異は、発生の頻度が固定されているランダムな置換を含む変異誘発性オリゴデオキシヌクレオチドのセットを使用して誘導し得る。これらの部分的にランダム化したオリゴヌクレオチドは、自動化したDNA合成機で不正確なモノマーを数%含むヌクレオチド3'-ホスホルアミダイト溶液を用いて生成される。選択的増幅の各ラウンドの後、ランダムな変異を変異誘発性条件下でPCRを行うことにより誘発する。選択的増幅によって得られたRNAを、逆転写し、得られたcDNAをPCRで増幅し、PCR産物を転写して変異RNAの子孫の分布 (progeny distribution) を生じる。

図3Aに示すように、温度安定性リボザイム50は、上昇した温度で標的52および共標的54に対して特異的で、たとえば、60対45、である。温度は、各リボザイムのシステム、例えば、ハンマーヘッド、RNase P、またはHDVリボザイム、によって変化する。図3Bに示すミスマッチは、温度が37°Cより上がる場合、すなわち45~60°Cの場合は、開裂しない。要するに、開示する方法論は、リボザイムの開裂が起こるためには多数の要件があるため、高度に特異的である；シグナルの増幅をさせるリボザイムの固有の触媒的性質のために高感度である；このシステムは、あらゆるRNA分子を標的にするように容易に改変され得る (リボザイムのたった1つのアームだけが配列を変えればよい)、リボザイムの再合成のみが要求される；マイクロタイタープレートリーダーのような、既に存在しているハードウェアを簡単に使用し得る；ロジスティックに単純で迅速であり、連続的ではなく同時に相互作用するいくつかの構成物が必要である；そして最後には、容易に定量し得る。

リボザイム

種々のリボザイムが上記の方法で用いられ得る。リボザイムの選択は開裂特異性を決定し、そして固定化される共標的は適宜に設計されなければならない。リボザイム活性は、標的および/または共標的への結合により影響されるリボザイムのコンホメーションの変化、または共標的と同程度に非核酸リガンドに結合し得るリボザイムの構築により調節され得る。このリボザイムは、リガンドの非存在下では、リボザイムのコンホメーションが立体的に結合を阻害するので、共標的に結合し得ない。あるいはこのリボザイムは、リボザイムが不活性なコンホメーションを保持するので、結合するが開裂し得ない。リガンドが

10

20

30

40

50

存在する場合、リボザイムはそのリガンドに結合し、それによりそのリボザイムが共標的に結合し、活性コンホメーションをとり、そして標的を開裂し得る。

調節され得るリボザイムは、以下に記載の方法により調製され単離され得る。適切なオリゴヌクレオチドがApplied Biosystems Incorporated (ABI, 850 Lincoln Center Dr., Foster City, CA 94404) 392型シンセサイザーで同社の試薬を用いて合成される。一般的な設計基準は図面を参照して上記で説明される。これは、すべてリボザイムの機能を変えないような改変および変形が可能である。

共標的分子の開裂部位は、リボザイム系の選択に依存する。開裂される配列は、リボザイムの選択に依存する。例えば、リボザイムがイモリサテライトRNAに由来する場合、開裂部位はNUXに従う：ここでNはいずれのヌクレオチドでもよく、XはG以外のいずれかのヌクレオチドであり、そしてUはウリジンである。RNase Pについて、公知の配列特異的要求性を図4Aおよび4Bに示す（それぞれ細菌性RNAase Pおよび真核生物RNAase P）。開裂部位に対しては選択基準が必要とされない。なぜなら、これは共標的に備わっており、公知のシス開裂リボザイム配列に由来するからである。本明細書中に記載の方法の戦略は、常に、共標的中に開裂部位配列要求性を完全に配置するようにしてリボザイム系を分離することであり、よってリボザイム/共標的と疾患標的との間の相互作用に対する要求性のみが、いずれの特異的配列要求性をも伴わないで、相補的ヌクレオチドの範囲となる。

ハイブリダイゼーションのための塩基対のセット数は存在しない。リボザイムと標的との間、リボザイムと共標的との間、および共標的と標的との間の塩基対の長さは、各リボザイム系および特定の診断状況により変化し得る。例えば、塩および温度、または他の反応条件は、シグナル/ノイズ比を最大にするために、各場合について経験的に最適化され得る。

標的RNAおよび共標的RNAの選択

いずれのRNA分子も、本発明の方法での使用のために標的にされ得る。好ましいRNA分子は、少なくとも部分配列が知られているRNA分子であって、リボザイム配列が標的分子および共標的分子の両方に結合するように相補的配列を生成させ得る。標的される分子の例には、タンパク質をコードするmRNA、特に特定の症状、障害、あるいは疾患で特徴づけられているかまたは病原因子に由来するタンパク質をコードするmRNA、および、ウイルスタンパク質をコードするRNAあるいはRNAゲノムが包含される。標的されるRNAの例には、内因性RNAまたは外因性RNAが包含される。内因性RNAは、タンパク質をコードするmRNAあるいは非コーディングRNAのいずれかであり、特定の障害、状態、あるいは疾患の病因に関連する。外因性RNAは細胞の内部あるいは外部に存在するが、疾患状態に直接または間接的に関わる病原因子（ウイルス、細菌、真菌など）に由来する。標的される非核酸分子の例には、タンパク質類、例えば、腫瘍特異的タンパク質あるいは癌タンパク質（例えば、ras変異体）；ホルモン類、例えばヒト絨毛性ゴナドトロピン、薬物使用を示す代謝産物；および毒素（環境試験または法医学試験により同定される）が包含される。

リボザイム活性の制御

制御可能なリボザイムの構築方法は、以下に記載する。ここで、リボザイム配列はリガンド結合配列に連結されており、これによりリボザイムの活性がそのリガンドの調節下に置かれ、そしてその存在は活性化または不活化に必要とされる。DNAオリゴヌクレオチドを、T7プロモーターおよび所定のリボザイムをコードする配列が、長さnのランダム配列の前または後に存在するように合成する。得られるDNAは分子の混合物である（複雑度4n）。T7 RNAポリメラーゼによるインビトロ転写は、RNA分子の複合プールを生じ、それぞれは、長さnのランダム配列に連結した所定のリボザイム配列を有する。リボザイム配列は規定されているが、リボザイムに対応する部分を含む全体分子のコンホメーションは、ランダム配列と、それ自身およびリボザイム配列との相互作用により決定される。折り畳みにより所望のリガンド、好ましくは、結合を可能にするのに十分な複雑度の小有機分子、またはタンパク質のような高分子を結合させるコンホメーションになる分子を選択するには、RNA分子の複合プールをアフィニティークロマトグラフィーの繰り返しラウンドにか

10

20

30

40

50

ける。ここで、リガンドがマトリックスに共有結合し、結合するそれらのRNA分子がカラム上に保持され、その後特異的に溶出する。溶出したリガンド結合RNAを、このリガンド結合分子を富化するためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて増幅する。PCR試薬および方法論は、Perkin Elmer, 761 Main Ave., Norwalk, Conn. 06850; または Roche Molecular Systems, 1145 Atlantic Ave., Suite 100, Alameda, CA 94501 から入手可能である。このようなサイクルをいくらか行った後で、事実上すべての分子がリガンドに結合し得るRNA集団が生じる。

一定数の分子は、分子のリボザイム部分のアームが標的RNAに結合する能力を立体的に妨げることによりリボザイムを不活化するように、および/または、リボザイムの触媒中心のコンホメーションを変化させるように折り畳まれ、それにより開裂が阻害されるが、しかし、続く共リガンドへの結合がリボザイムを活性化するように折り畳まれる。リガンドの例には、標的として上記で規定されたようなタンパク質が包含される。あるいは、一定数の分子は、リガンドの存在下でのみ折り畳まれて不活性コンホメーションになり、そしてその非存在下では触媒的に活性なコンホメーションになる。

次に、リガンド結合RNA集団を、共薬剤リガンドによりリボザイムの活性化または不活化に対してスクリーニングする。選択は、少なくとも2つの方法で達成され得る。第一に、リガンド結合RNA分子の純集団を逆転写酵素により二本鎖DNA分子に変換し、次にインビトロ発現ベクターにクローニングする。クローニングされた配列を有する個々の細菌形質転換体を生育させ、組換えプラスミドを精製し、リガンド結合/リボザイムRNAをコードする遺伝子を転写させる。次に、各クローン由来の相同的RNAをリガンドの存在下または非存在下で開裂に対してアッセイする。あるいは、スクリーニングをロジスティックに簡易化するためのストラテジーが用いられ得、これは単離し転写しアッセイするクロンの総数を減少させる。このような方法の1つは、リガンド結合分子の複合プールの限界希釈を行うことである。RNA濃度および既知のサイズの分子から、単位体積当たりの分子数、RNA溶液のモル濃度が容易に決定され得る。RNAの希釈は、統計上好ましいように、例えば、アッセイウェルあたり10RNA分子で行われる。100マイクロタイタープレート(96ウェル)では、約105分子が開裂に対してアッセイされ得た。EllingtonおよびSzostak(1990)は、1015の異なる配列の原集団中では、所定のリガンドに結合するように折り畳まれている1010RNA分子あたり1つが存在し、最終調製物では102~103配列が存在すると評価した。

リガンド結合に対して精製した後は、事実上100%の分子がリガンドに結合する。105の異なるリガンド結合分子から1つの分子のみが、リガンドの存在により活性化または不活化したリボザイムを有するとすれば、このスキームによりその単離が可能になるであろう。リガンド結合RNAは、PCRによりアフィニティークロマトグラフィーのサイクルで1010倍オーダーに富化されているので、かなり低い割合で存在するリガンド制御リボザイムであっても過度の実験を行うことなく単離することが可能である。共リガンドの存在または非存在下で開裂が生じるそれらのウェルは、PCR増幅されてクローニングされ、そして個々のクロンの転写物は、リガンドによる不活化または活性化についてアッセイされる。

共リガンドの性質が、外生的に供給されるように選択され得る(例えば、少なくとも標的分子に容易に入り込むいくつかの非毒性分子)か、あるいは完全な内生系が設計され得る(ここでは、調節リガンドが、病原に直接または間接的に関連する標的細胞内の低分子代謝産物または高分子である)。例えば、標的RNAによりコードされるタンパク質はリガンドとなり得る。制御可能なリボザイムの活性は、病原性タンパク質への結合に依存する。標的RNAレベルはリガンド活性化リボザイムによる開裂のため低下するので、タンパク質リガンド濃度は低下する。濃度が調節可能なRNA分子が全て占められる濃度以下に低下する場合、リボザイム開裂速度が低下し始める。リボザイム-リガンドアフィニティーの差異について選択することにより、標的RNAがリボザイムの仲介で破壊される適切なレベルの制御がいかなる与えられた条件下でも達成され得る。例えば、RNAプールは、目的のタンパク質をカラムに結合したアフィニティークロマトグラフィーにかけられる。タンパク質に結合し得るリボザイム分子は、カラム上に保持され、その後溶出する。PCRおよびクロマトグラフィーを繰り返し行って、このようにタンパク質に結合するリボザイム分子を

10

20

30

40

50

富化する。次に、この集団を上記のようにスクリーニングし、リガンドの存在下でのみ活性リボザイムとなる分子を単離する。

本発明は、以下の限定されない実施例を参照することにより、さらに理解される。

実施例1: B型肝炎ウイルス表面抗原mRNAの一部に対応する短い配列の検出

図5Aおよび5Bに示されるように、ハンマーヘッドリボザイム構造に基づいて、2つの構築物を設計した。1つは「リボザイム」60(配列番号1)と称し、1つは「共標的」62(配列番号2)と称した。疾患標的RNA 64の存在下で、ステムA~D 70(配列番号4)、72(配列番号5)、74、76(配列番号3)からなる3分子複合体が形成される。得られた複合体は、図5Aに示されるように、リボザイムおよび基質の活性コンホメーションを生じ、続いて共標的分子62(配列番号2)が開裂し、標識オリゴヌクレオチド62aが遊離する。疾患標的RNA 64の非存在下では、ステムA 70(配列番号2)およびB 72(配列番号1)のみが完全に形成されている。ステムC 74(配列番号1)は2つの塩基対のみからなるので、従って、3分子複合体に比較して、共標的62(配列番号4)の効果的な開裂を支持するには十分に安定ではない。

図6は、リボザイムおよび共標的のみで構成される2分子複合体に比較した、リボザイム、共標的、および疾患標的で構成される完全複合体の活性を示す。疾患標的は、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)mRNAに対応する、20ヌクレオチドでなるRNAである。レーン1には、3つの全反応物が存在するがMg⁺⁺が存在しない:開裂は観察されない。レーン2では、Mg⁺⁺とともに3つの全反応物が存在し、そして開裂が生じている。重要なことには、疾患標的の存在しないレーン3に見られるように、共標的の開裂量がレーン2よりも明らかに少ない。

実施例2: B型肝炎表面抗原mRNAの一部に対応する800ヌクレオチドフラグメントの検出

図7Aおよび7Bは、リボザイムの模式図であり、これは標的の非存在下での共標的の開裂が標的の存在下よりも多いことを示す。

図7Cの結果は、疾患標的の存在または非存在下におけるリボザイムおよび共標的の効果を実証する。HBV転写物が存在する場合、リボザイム活性は低い。これは本明細書に記載の方法の好例である。ここでは、分子の存在が、標識の遊離が増加することにより検出される。これはおそらく別の塩基対合による。

図7Cに示されるように、レーン1では、3つの全反応物が存在するがMg⁺⁺が存在しない:開裂は観察されない。レーン2では、Mg⁺⁺とともに3つの全反応物が存在し、そして開裂が生じている。重要なことには、疾患標的の存在しないレーン3に見られるように、共標的の開裂量がレーン2よりも明らかに多い。

本発明の方法および組成物の改変および変形は、前述の詳細な説明から当業者に明らかである。このような改変および変形は、以下の請求の範囲内にあることが意図される。

配列表

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: イノーバー ラボラトリーズ、インコーポレイテッド

(ii) 発明の名称: リボザイム増幅診断用薬

(iii) 配列数: 5

(iv) 連絡住所:

(A) 住所人: パトレア エル・パブスト

(B) 番地: スイート2800、1100 ピーチツリー ストリート

(C) 市: アトランタ

(D) 州: ジョージア

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 30309 - 4530

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換用

(C) 操作システム: PC - DOS/MS - DOS

10

20

30

40

50

(D) ソフトウェア：パテントインリリース # 1.0、バージョン # 1.25

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(Vii) 先行出願データ：

(A) 出願番号：US 07/985,308

(B) 出願日：1992年12月4日

(viii) 代理人/事務所情報：

(A) 氏名：パブスト, パトレア エル .

10

(B) 登録番号：31,284

(C) 照会/記録番号：ILI106

(ix) 電話回線情報：

(A) 電話：404 - 815 - 6508

(B) テレファックス：404 - 815 - 6555

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：41塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

20

(D) トポロジー：不明

(ii) 配列の種類：cDNA to mRNA

(iii) ハイボセティカル：No

(iv) アンチセンス：No

(vi) 起源：

(A) 生物名：合成

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc feature

(B) 存在位置：1..41

(D) 他の情報：/機能 = 「活性リボザイム」

30

(xi) 配列：配列番号1:

GCCGCAGACA UUCUGAUGAG UCCGUGAGGA CGAAACUGGA G
41

(2) 配列番号2の情報：

(i) 配列の特色：

(A) 長さ：14塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：不明

(ii) 配列の種類：cDNA to mRNA

40

(iii) ハイボセティカル：No

(iv) アンチセンス：No

(vi) 起源：

(A) 生物名：合成

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc feature

(B) 存在位置：1..14

(D) 他の情報：/機能 = 「結合した共標的」

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：misc feature

50

- (B) 存在位置:8..9
- (D) 他の情報:/産物 = 「開裂部位」

(xi) 配列: 配列番号2:
CUCCAGUCAA CAUC
 14

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:14塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:不明

(ii) 配列の種類:genomic RNA

(iii) ハイポセティカル:No

(iv) アンチセンス:No

(vi) 起源:

(A) 生物名:B型肝炎ウイルス

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc feature

(B) 存在位置:1..14

(D) 他の情報:/機能 = 「標的RNA - 肝炎表面抗原メッセージ」

(xi) 配列: 配列番号3:
GAUGUGUCUG CGGC
 14

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:14塩基対

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:不明

(ii) 配列の種類:cDNA to mRNA

(iii) ハイポセティカル:No

(iv) アンチセンス:No

(vi) 起源:

(A) 生物名:合成

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号:misc feature

(B) 存在位置:1..14

(D) 他の情報:/機能 = 「標識した共標的」

(xi) 配列: 配列番号4:
CUCCAGUCAA CAUC
 14

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ:41アミノ酸

(B) 型:核酸

(C) 鎖の数:一本鎖

(D) トポロジー:不明

(ii) 配列の種類:cDNA to mRNA

(iii) ハイポセティカル:No

(iv) アンチセンス:No

10

20

30

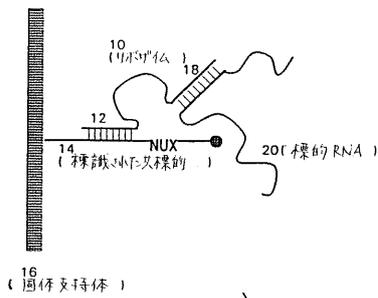
40

50

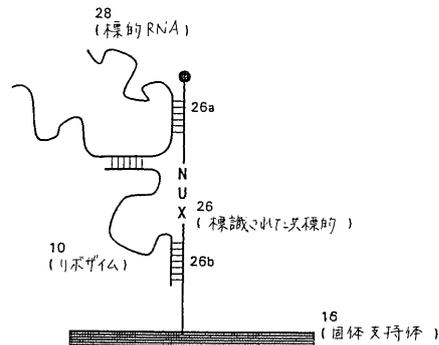
- (vi) 起源：
- (A) 生物名：ウイロイド（植物）
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 特徴を表す記号:misc feature
- (B) 存在位置:1..41
- (D) 他の情報:/機能 = 「不活性リボザイム」
- (xi) 配列：配列番号5:

GCCGCAGACA UUCUGAUGAG UCCGUGAGGA CGAAACUGGA G
41

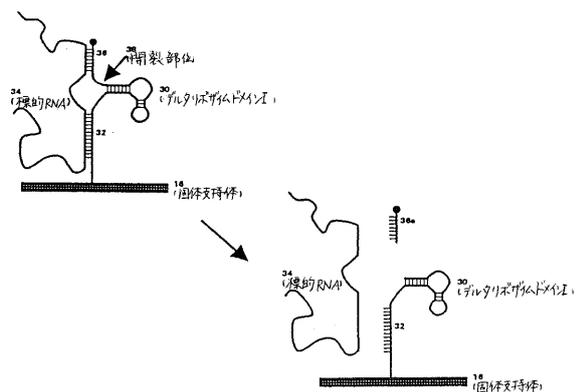
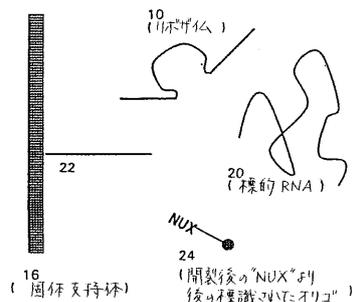
【図 1 A】
FIGURE 1A



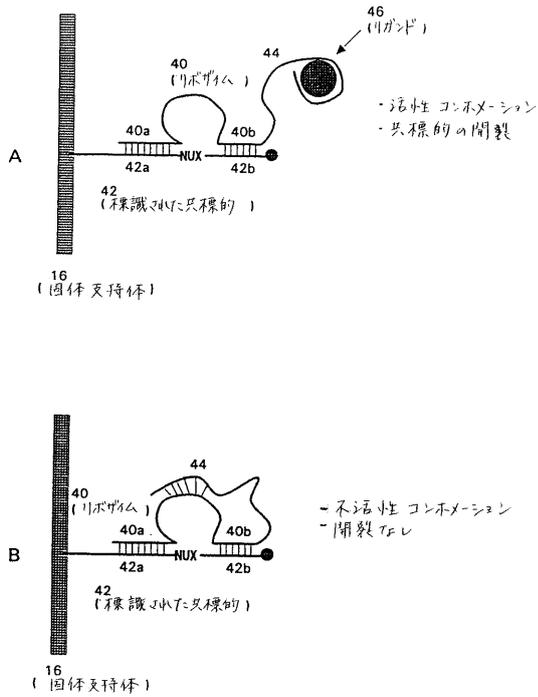
【図 1 B】
FIGURE 1B



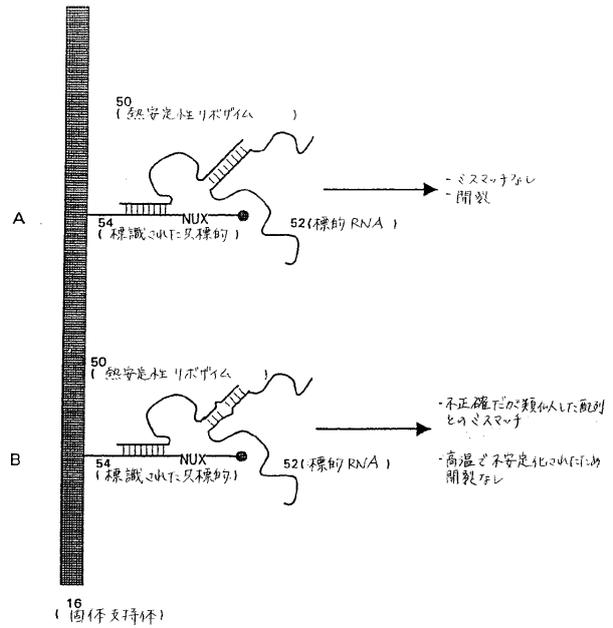
【図 1 C】
FIGURE 1C



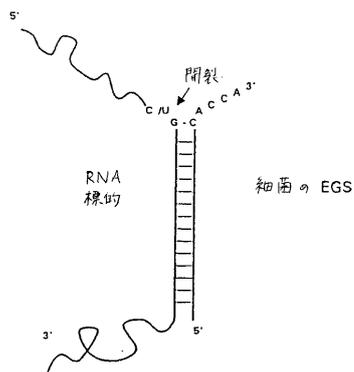
【図2】
FIGURE 2



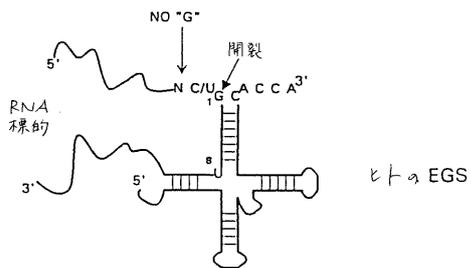
【図3】
FIGURE 3



【図4A】
FIGURE 4A



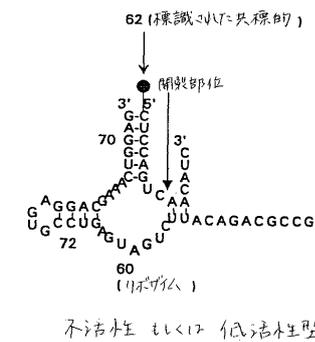
【図4B】
FIGURE 4B



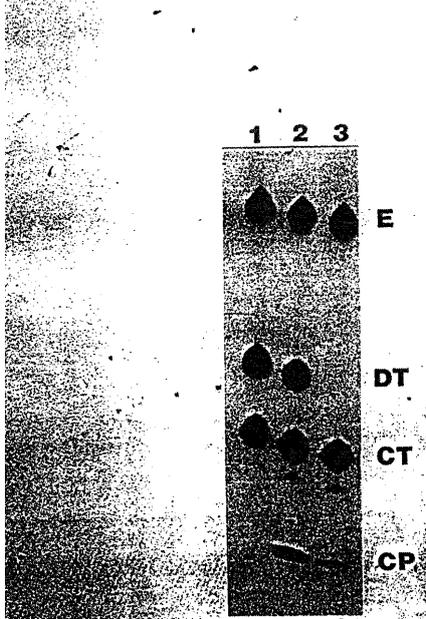
【図5A】
FIGURE 5A



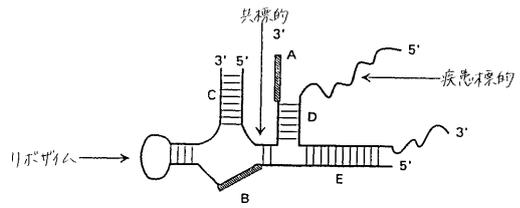
【図5B】
FIGURE 5B



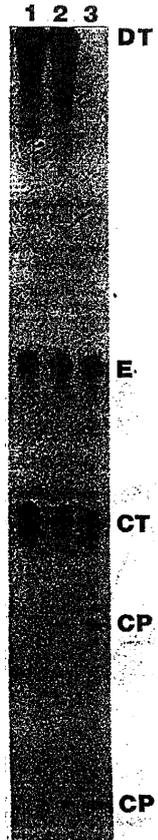
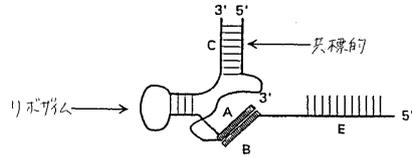
【 図 6 】
Figure 6



【 図 7 A 】
FIGURE 7A



【 図 7 B 】
FIGURE 7B



フロントページの続き

- (72)発明者 シー, アンディ
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イースト 63アールディー スト
リート 504
- (72)発明者 ボックマン, ジェフリー エム.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10003, ニューヨーク, フィフス アベニュー 41, アバ
ートメント 4ビー
- (72)発明者 ジョージ, シャーヅ ティー.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イースト 70ティーエイチ スト
リート 220

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 SCIENCE, 1990年, Vol. 249, p. 783-786
Nature, 1990年, Vol. 344, p. 467-468
US Biochemical Corp.-Editorial Comments, 1990年, Vol. 16, No. 2, p. 1-5

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12N 15/00 - 90
C12Q 1/00 - 70
C07H 21/00 - 04
C07K 14/00 - 16/46
C12P 21/00 - 08
C12N 1/00 - 7/08
G01N 33/50 - 98
A61K 31/00 - 48/00
A61P 1/00 - 43/00
PubMed
MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI (DIALOG)
GenBank/EMBL/CCBJ/GeneSeq