

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7355382号  
(P7355382)

(45)発行日 令和5年10月3日(2023.10.3)

(24)登録日 令和5年9月25日(2023.9.25)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z Z N A	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 N 15/88	Z	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15		
請求項の数 13 (全55頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2019-561875(P2019-561875)	(73)特許権者	508087147
(86)(22)出願日	平成30年5月10日(2018.5.10)		ユニヴァーシティー オブ ユタ リサーチ ファウンデーション
(65)公表番号	特表2020-523983(P2020-523983 A)		アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 8 ソ ルト レイク シティ アラビーン ドラ イヴ 6 1 5 スイート 3 1 0
(43)公表日	令和2年8月13日(2020.8.13)	(74)代理人	100094569
(86)国際出願番号	PCT/US2018/032105		弁理士 田中 伸一郎
(87)国際公開番号	WO2018/209113	(74)代理人	100109070
(87)国際公開日	平成30年11月15日(2018.11.15)		弁理士 須田 洋之
審査請求日	令和3年5月10日(2021.5.10)	(74)代理人	100119013
(31)優先権主張番号	62/504,370		弁理士 山崎 一夫
(32)優先日	平成29年5月10日(2017.5.10)	(74)代理人	100123777
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 市川 さつき
(31)優先権主張番号	62/543,130	(74)代理人	100111796
(32)優先日	平成29年8月9日(2017.8.9)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 A R Cカプシドの組成物及び使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C Aドメインを含むA r cタンパク質で構成されるA r cカプシドであって、異種核酸が中に封入されており、前記A r cタンパク質が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む、前記A r cカプシド。

【請求項 2】

前記異種核酸が、治療用核酸である、請求項1に記載のA r cカプシド。

【請求項 3】

前記異種核酸が、m R N A、s i R N A、s h R N A又はマイクロR N Aである、請求項1又は請求項2に記載のA r cカプシド。

【請求項 4】

前記異種核酸が、治療用タンパク質をコードする、請求項1に記載のA r cカプシド。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか1項に記載のA r cカプシドを含む、細胞外小胞又はエクソソーム。

【請求項 6】

異種核酸を含む組換え核酸と、A r cカプシドを形成することができるA r cタンパク質をコードする組換え核酸とを含む宿主細胞であって、前記A r cタンパク質が、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む、前記宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の Arc カプシドを含む宿主細胞。

【請求項 8】

宿主細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 6 又は 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

宿主細胞がニューロンである、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

宿主細胞が細菌細胞又は真菌細胞である、請求項 6 又は 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の Arc カプシド、または請求項 5 に記載の細胞外小胞またはエクソソームを作製する方法であって、宿主細胞に ( i ) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む Arc タンパク質をコードする組換え核酸； ( i i ) 異種核酸；または ( i i i ) それらの組み合わせを *in vitro* において導入することを含む方法。

10

【請求項 12】

異種核酸を含む Arc カプシドの組立てを促進する条件下で、単離された Arc タンパク質を *in vitro* において異種核酸と接触させることを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の Arc カプシドを作製する方法であって、前記 Arc カプシドの組立てを促進する条件が、100 mM から 500 mM の塩濃度であることを含む、前記方法。

【請求項 13】

核酸を標的細胞に送達する方法であって、標的細胞をインビトロにおいて、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の Arc カプシド、請求項 5 に記載の細胞外小胞またはエクソソーム、または請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞に接触させることを含む、前記方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

2017年8月9日に作成されたサイズ71,200バイトの「21101\_0352 U2\_Sequence\_Listing.txt」と名付けたテキストファイルとして2017年8月9日に提出された配列表を、連邦規則集第37巻第1.52(e)(5)節に準じて、これをもって参照により援用する。

30

【背景技術】

【0002】

ニューロン関連遺伝子 Arc は、哺乳動物の脳において永続的な情報記憶のために必須であり、様々なタイプのシナプス可塑性を媒介し、神経発達障害に関係があるとされてきた。しかしながら、Arc の分子機能及び進化的起源についてはほとんど知られていない。新たな研究は、Arc が、レトロウイルスに共通する Gag ポリプロテインとの相同性を有するレトロトランスポゾンに由来することを示唆している。Arc の生化学は、レトロウイルスに類似した分子特性を呈する。

【発明の概要】

【0003】

Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターを開示する。

40

【0004】

組換え Arc カプシドを開示する。標識部分または標的指向性部分またはその両方と複合した、Arc カプシドを開示する。

【0005】

Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターを含む細胞を開示する。

【0006】

Arc カプシドと薬学的に許容される担体とを含む組成物を開示する。

【0007】

50

mRNAを細胞に送達する方法であって、Arcカプシドを細胞に投与することを含み、Arcカプシドが関心対象のmRNAを含んでいる、当該方法を開示する。

【0008】

mRNAを細胞に送達する方法であって、開示されるベクターのいずれか1つを細胞に投与すること、及び関心対象のmRNAを細胞に投与することを含み、核酸配列が細胞内でArcタンパク質をコードし、Arcカプシドが形成され、Arcカプシドが中に関心対象のmRNAを封入する、当該方法を開示する。

【0009】

mRNAを対象に送達する方法であって、開示される細胞のいずれか1つを、それを必要とする対象に1つ以上投与することを含む、当該方法を開示する。

10

【0010】

Arcカプシドを形成する方法であって、細胞を含む溶液に、Arcタンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターを投与することを含み、核酸配列が細胞内でArcタンパク質をコードし、Arcカプシドが形成される、当該方法を開示する。

【0011】

添付の図面は、本明細書に組み込まれ、その一部をなすものであるが、記述とともに開示される方法及び組成物のいくつかの実施形態を図示しており、開示される方法及び組成物の本質を説明する上で役に立つ。

【図面の簡単な説明】

【0012】

20

【図1】A~D。Arcは、保存されたレトロウイルスGag C Aドメインによってウイルス様カプシドを形成する。(A)四足類Arc、八エドArc1、及び関連Ty3/gypsyレトロトランスポゾン由来のGag配列のアミノ酸アラインメントに基づく最尤系統図。Gag単独のArc遺伝子及びTy3/gypsyエレメントの模式図が系統樹の右側に入っている。Arc遺伝子を除く系統においてArcと最も緊密な関係のある配列は、真性Ty3/gypsyレトロトランスポゾンで予想されるような長鎖末端反復配列(LTR)に挟まれたGag-polポリプロテインである。(B)(上)完全長精製ラットArc(prArc)タンパク質(1mg/mL、42,000x)の代表的な陰性染色EM画像。(i~iv)四角で囲んだ粒子の拡大図。スケールバー=30nm。prArc(2mg/mL、62,000x)の代表的なcryo-EM画像。(v~vi)二重の層になったカプシド殻を示すArcカプシドの拡大画像。スケールバー=30nm。(下)prArcカプシドの動的光散乱分析。重み付けした粒径分布プロファイルが粒子数の度数分布図として表す。(C)予測マトリックス(MA)(橙色)、CA-NTD(緑色)及びCA-CTD(青色)ドメインを有するArcタンパク質の模式図。

30

CTD欠失突然変異体、及びCAドメイン構築物も描写されている。精製されたGST、prArc、ショウジョウバエArc相同体dArc1、prArc-CTD、及びCA-prArcの代表的な陰性染色EM画像(全て1mg/mL、20,000x)。挿入図スケールバー=50nm。(下)カプシド形成の定量。完全に形成されたカプシドは、透明な二重殻を有する20~60nmの球状粒子を含むが、部分的に形成されたカプシドは透明な二重殻を有しない(スケールバー=100nm)。データは3つの異なるprArc調製物を使用した3つの独立した実験の平均±標準誤差である。\*\*\*p<0.001、二元配置ANOVAと事後のt検定。(D)(上)Arcカプシド安定性の特性を決定するために、塩のモル濃度を漸増させた緩衝液の中にprArcを入れ替え、陰性染色EMによって調べた。1.5mg/mLのタンパク質濃度で各緩衝液条件でArcカプシドを手作業で計数し定量した。データは、異なるprArc調製物を使用した3つの独立した実験の平均±標準誤差である。\*\*p<0.01、スチューデントのt検定。(下)0MのNaCl及び0.5MのNaPO4の条件下でのprArcの代表的なEM画像。

40

【図2】A~Eは、Arcタンパク質がmRNAと相互作用することを示す。(A)(左)prArcからのArc mRNA及び細菌mRNA asnAのqRT-PCR、(右)全細菌溶解物からのArc及びasnA mRNAのqRT-PCR。データは、as

50

n A 群の平均に対して正規化した平均 ± 標準誤差として表されている ( スチューデントの t 検定、n = 3 の独立したタンパク質調製物、\* p < 0 . 0 5 ) 。 ( B ) タンパク質調製物に対して RNアーゼ A による処理を 1 5 分間行い、または行わず、そして q R T - P C R を実施した。RNアーゼ処理は Arc 及び as n A m R N A レベルに影響を及ぼさなかった ( 対応 t 検定、n = 5 の独立したタンパク質試料 ) が、外来 / 遊離 G F P m R N A を有意に減成させた ( 対応 t 検定、n = 3 の独立した試料、\* p < 0 . 0 5 ) 。データは、未処理群の平均に対して正規化した ± 標準誤差として表されている。 ( C ) ( 上 ) Arc または I g G 抗体を使用して WT マウス皮質組織から免疫沈降 ( I P ) させた Arc タンパク質の代表的なウェスタンブロット。投入物 ( I ) = 1 0 % 全溶解物。 ( 下、左 ) Arc 抗体を使用した Arc タンパク質の顕著な濃縮を示す、Arc タンパク質 I P の定量。 ( 下、右 ) I P からの溶離画分に対して q R T - P C R を実施した。I P において Arc m R N A は特異的に沈められた ( 反復測定による二元配置 ANOVA 及び S i d a k 多重比較 : Arc + I g G に対する Arc + Arc、p = 0 . 0 1 ; G A P D H + Arc に対する Arc + Arc、p = 0 . 0 1 3 ; G A P D H + I g G に対する Arc + Arc、p = 0 . 0 1 1 ) 。データは、I g G 群の平均に対して正規化した平均 ± 標準誤差として表されている。 ( D ) p r A r c 及び p r A r c ( R N A - ) からの Arc m R N A の q R T - P C R 。 p r A r c ( R N A - ) 調製物中の Arc m R N A は有意に少なかった。p r A r c 群の平均に対して正規化した平均 ± 標準誤差として表されている ( スチューデントの t 検定、n = 3 の独立した試料、\* p = 0 . 0 5 ) 。 ( E ) ( 左 ) p r A r c、p r A r c ( R N A - )、及び 7 . 3 % ( w / w ) の G F P m R N A と共に室温で 2 時間インキュベートした p r A r c ( R N A - ) の代表的な陰性染色 EM 画像 ( 0 . 2 5 m g / m L、1 5 , 0 0 0 x ) 。完全に形成されたカプシドを赤色矢印で示す ( スケールバー = 1 0 0 n m ) 。 ( 右 ) 図 1 C と同様にカプシドを定量した。データを各条件からの 6 つの画像の平均 ± 標準誤差として表す。\*\*\* p < 0 . 0 0 1、独立 t 検定。

【図 3】A ~ F は、Arc が細胞外小胞の中に入った状態で細胞から放出されることを示す。 ( A ) 1 0 c m 皿内の HEK 細胞に完全長ラット WT myc - Arc をトランスフェクトし、培地を 2 4 時間後に回収した。代表的なウェスタンブロット ( n = 3 の独立した実験 ) は Arc トランスフェクト ( + ) 及び未トランスフェクト ( - ) 細胞において全細胞溶解物 ( 細胞 ) 中、及び細胞培地から精製された EV 画分の中の Arc タンパク質を示す。EV 画分マーカーとして ALIX を使用した。ボンソー染色剤を使用して各レーンのタンパク質の総量を可視化した。 ( B ) HEK 2 9 3 細胞に myc - Arc - WT または myc - Arc - C T D をトランスフェクトし、培地を 2 4 時間後に回収した。代表的なウェスタンブロット ( n = 3 の独立した実験 ) は全細胞溶解物 ( 細胞 ) 中、及び細胞培地からの EV 画分の中の Arc タンパク質を示す。各実験において EV 画分の Arc レベルは細胞溶解物の Arc タンパク質レベルに対して正規化し、データは WT レベルに対して正規化して表されている ( n = 3 ) 。\* p < 0 . 0 5、スチューデントの t 検定。 ( C ) HEK EV 画分を処理しない ( 対照 ) で、または RNアーゼ ( n = 6 の独立した培養 ) で処理して、後に RNA 抽出を行った。q R T - P C R を使用して Arc m R N A レベルを測定し、データは、未処理群の平均に対して正規化した平均 ± 標準誤差として表されている。対応 t 検定。 ( D ) WT 及び Arc KO マウスから得た DIV 1 5 培養皮質ニューロンから培地を 2 4 時間のインキュベーションの後に採集し、回収された培地から EV 画分を精製した。プロットは全細胞溶解物 ( 細胞 ) の上清 ( S ) / 可溶性画分及びペレット ( P ) / 不溶性画分からの Arc、ALIX 及びアクチンのレベルを示す。遠心分離精製プロトコールの ( S ) / 最終洗浄液、及び精製 EV 画分 ( EV ) としてのペレット ( P ) / EV 画分。S 及び P の 2 . 5 % を細胞溶解物のために装填した。S 及び P の 5 % を EV 画分のために装填した。 ( E ) WT または KO マウス皮質組織、DIV 1 5 の WT または KO マウス皮質ニューロン ( 細胞 )、及び WT または KO 培養ニューロンから回収した培地から精製された EV に対して、Arc 及び GAPDH プライマーを使用する RT - P C R を実施した。Arc m R N A は 3 つの調製物全ての中に存在していたが、GAPDH m R N A は EV には存在していなかった。 ( F ) ( 上 ) 上記の ( D ) の Arc KO

10

20

30

40

50

またはWT培養ニューロン培地から得たEVの中のArcに対するイムノゴールド標識。赤色矢印は10nmのイムノゴールド粒子を示す(20,000x)。(下)イムノゴールド標識を使用する、Arc陽性±標準誤差であったEV(100nm未満の小胞状構造体)の定量(n=3の独立した実験/EV調製物)。\*\*\*p<0.001、スチューデントのt検定。

【図4】Arc細胞外小胞がHEK293細胞におけるタンパク質及びmRNAの細胞間移動を媒介することを示す。(A)10cm皿内のドナーHEK細胞に6時間掛けてGFP-Arc、myc-Arc、またはnuclear GFP(nucGFP)をトランスフェクトした。次いで、プラスミドDNA及びトランスフェクション試薬を含有する培養培地を除去し、新しい培養培地に替えた。18時間後、この培地を取り出し、12ウェルプレート内のカバースリップ上のナイーブレシピエントHEK細胞の培地を替えるために使用した。24時間後、これらの細胞を固定し、Arc mRNAのFISHとArcタンパク質のICCとの組み合わせを実施した。(左)Arcタンパク質(ICC)及びArc mRNA(FISH)を示す、カバースリップ上で成長させ10cm皿内での場合と同じプロトコールでトランスフェクトされたHEK細胞の代表的画像。(右)nucGFPではなくGFP-Arc及びmyc-Arcをトランスフェクトされた細胞からの培地を与えた細胞にArc mRNA及びタンパク質が存在していたことを示す、レシピエントHEK細胞の代表的画像。スケールバー=20µm。7つの独立した実験及び培養を代表するもの。(B)10cm皿内のドナーHEK細胞に膜GFP(mGFP)、myc-Arcまたは両構築物を(A)の場合と同様にトランスフェクトした。6時間後及び18時間後に培地を替え、12ウェルプレート内のナイーブレシピエントHEK細胞へ移した。24時間後、細胞を固定し、GFP mRNA及びArcタンパク質に対してFISH/ICCの組み合わせを実施した。(左)mGFP蛍光、Arcタンパク質及びGFP mRNAを示す、カバースリップ上で成長したトランスフェクトされたHEK細胞の代表的画像。(右)GFPタンパク質及びmRNAと、Arcタンパク質との共移入を示す、レシピエントHEK細胞の代表的画像。mGFP単独の群ではGFP移入は観察されなかった。スケールバー=20µm。3つの独立した実験及び培養を代表するもの。

【図5】A~Dは、ArcカプシドがArc mRNAをニューロン中に移入させることを示す。(A)4mgのprArcで1時間もしくは4時間処理したDIV15培養海馬Arc KOニューロン、またはWT対照ニューロンからの、Arc ICCの代表的画像。prArc処理ニューロンは、未処理KOニューロンに比べて向上した樹状突起Arcレベルを示す。(B)ニューロンを(A)と同様に処理した。Arc mRNA(FISH)の代表的画像を示す。4時間のprArc処理はKOニューロンの樹状突起Arc mRNAレベルを有意に向上させた。(C)4mgのprArc、prArc-CTD、またはCA-prArcで4時間処理したDIV15培養海馬KOニューロンのArc ICCの代表的画像。prArc-CTD、及びCA-prArcで処理されたKOニューロンはprArc処理ニューロンに比べてより低いArcタンパク質のレベルを示した。(D)ニューロンを(C)と同様に処理した。Arc mRNAの代表的画像を示す。prArc-CTD、及びCA-prArcで処理されたニューロンはprArc処理ニューロンに比べてより低いArc mRNAのレベルを示した。白色四角で囲まれた樹状突起部分を拡大したものを各対応画像の下に示す。全ての群(n=10のニューロン)において2つの樹状突起/ニューロンの30µm部分を総合的密度測定のために分析した。Arc mRNA及びArcタンパク質レベルは未処理KOニューロンに対して正規化して変化倍率±標準誤差として示した。スチューデントのt検定:\*p<0.05、\*\*p<0.01、及び\*\*\*p<0.001。スケールバー、10µm。画像はImageJからのSmart LUTによって擬似色で色付けされている。全てのデータは、独立した3~7つの、異なるタンパク質調製物を使用した実験及び培養を代表するものである。図12も参照されたい。

【図6】A及びBは、ニューロン細胞外小胞の中の内因性ArcがArc mRNAをニューロン中に移入させることを示す。(A)DIV15の高密度皮質WTまたはArc

10

20

30

40

50

KOニューロンの10cm皿から調製したEV画分10mgによって1時間または4時間処理されたDIV15培養海馬Arc KOニューロンからのArc ICCの代表的画像。KO EVによる1時間及び4時間の処理は樹状突起Arcレベルを向上させなかったが、WT EVによる1時間及び4時間の処理は樹状突起Arcタンパク質レベルを有意に向上させた。(B)ニューロンを(A)と同様に処理した。Arc mRNA(FISH)の代表的画像を示す。KO EVによる1時間及び4時間の処理は樹状突起Arc mRNAレベルを向上させなかった。WT EVによる1時間の処理は樹状突起Arcレベルを有意には向上させなかったが、4時間の処理は樹状突起Arc mRNAレベルを向上させた。全ての群(n=10のニューロン)において2つの樹状突起/ニューロンの30mm部分を総合的密度測定のために分析した。Arc mRNA及びArcタンパク質レベルは未処理KOニューロンに対して正規化して変化倍率±標準誤差として示した。スチューデントのt検定:\*p<0.05,\*\*p<0.01,\*\*\*p<0.001。スケールバー、10mm。独立した6つの、異なるEV調製物を使用した実験及び培養を代表するもの。図14も参照されたい。

10

【図7】A及びBは、Arcカプシドによって、EVによって移されたArc mRNAが活性依存的翻訳のために利用可能であることを示す。A)4mgのprArcで4時間処理されたDIV15培養海馬Arc KOニューロンからのArc ICCの代表的画像。Arc mRNA翻訳を誘導するために、固定の30分前に、ニューロンをmGluR1/5作動薬DHPG(100mM)で5分間処理してその後薬物を洗い流した。固定の1時間前にはニューロンのサブセットをシクロヘキシミド(CHX;180mM)で前処理してタンパク質翻訳を阻止した。prArcはKOニューロンにおける樹状突起Arc発現を有意に増加させ、DHPG処理は樹状突起Arcレベルをさらに向上させたが、これはCHXによる前処理によって阻止された。DHPGは未処理KOニューロンに対して何ら影響を及ぼさなかった。(B)DIV15の高密度皮質WTまたはArc KOニューロンの10cm皿から調製したEV画分10mgで4時間処理されたDIV15海馬Arc KOニューロンからのArc ICCの代表的画像。ニューロンのサブセットを(A)と同様にDHPG及びCHXで処理した。WT EVはKOニューロンにおける樹状突起Arc発現を有意に増加させたが、KO EVは何ら影響を及ぼさなかった。DHPG処理は未処理KOニューロンまたはKO EV処理KOニューロンにおける樹状突起Arc発現に対して何ら影響を及ぼさなかった。他方、DHPG処理はWT EV処理KOニューロンにおいて樹状突起Arcレベルを有意に向上させたが、これはCHXによる前処理によって阻止された。全ての群(n=10のニューロン)において2つの樹状突起/ニューロンの30mm部分を総合的密度測定のために分析した。Arc mRNA及びArcタンパク質レベルは未処理KOニューロンに対して正規化して変化倍率±標準誤差として示した。スチューデントのt検定:\*p<0.05,\*\*p<0.01、及び\*\*\*p<0.001。スケールバー、10mm。独立した3つの、異なるEV/タンパク質調製物を使用した実験及び培養を代表するもの。

20

30

【図8】A及びBは、Ty3/Gagエレメントと双翅類Arc遺伝子の起源との一次アミノ酸配列のアラインメントを示す。(A)Arcまたはgypsy Gagタンパク質に対応する翻訳されたゲノムDNA配列のアラインメントを、MUSCLE(www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)を使用して行った。アラインメントされた配列に、boxshadeプロットサーバー(www.ch.embnet.org/software/BOX\_form.html)を使用してデフォルトパラメータ(アミノ酸同一性を共有している50%の配列に陰影付け)を使用して陰影付けした。注記:アラインメントは、開始部位を有する完全長配列を含有しておらず、Arc遺伝子の断片を含有しているにすぎない。種は、Mm-Mus musculus-イエハツカネズミ、Hs-Homo sapiens-ヒト、Ac-Anolis carolinensis-グリーンアノールトカゲ、Lc-Latimeria chalumnae-西インド洋シーラカンス、Dr-Danio rerio-ゼブラフィッシュ、Cc-Cyprinus carpio-コイ、Dm-Drosophila melanog

40

50

aster - キイロショウジョウバエ、Ds - *Drosophila suzukii* - オウトウショウジョウバエ、Sc - *Stomoxys calcitrans* - サシバエ、Lh - *Linepithema humile* - アルゼンチンアリ、Bm - *Bombyx mori* - カイコ、Tc - *tribolium castaneum* - コクヌストモドキを含んでいた。(B)(左)ショウジョウバエ科、イエバエ科及びミバエ科のハエにみられるArc相同体の最尤系統解析。darc1の複数のコピーがミバエ全体、及びイエバエ、*Musca domestica*に認められた。各配列には、省略された種名にちなんだGenbank受託番号が与えられる。ミバエ科：RZ - *Rhagoletis zephyria*、CC - *Ceratitis capitata*、BD - *Bactrocera dorsalis*。イエバエ科：MD - *Musca Domestica*、SC - *Stomoxys calcitrans*。(右)(A)での系統解析から推察される、額囊節のハエのdArcの推定上の重複歴。調べた額囊節のハエは全てdarc1及びdarc2の相同体を保有していることから、これらの種の分岐(青色三角)よりも前に祖先におけるdArcの重複が起こったはずである。この祖先における重複事象の後、いくつかの系統におけるdarc1の複数回の重複(緑色三角)：ミバエ科の共通祖先における2回の重複事象、*Ceratitis capitata*の系統におけるさらに1回の重複、及び*Bactrocera dorsalis*の系統におけるさらに1回の重複が続いた。独立して、darc1は*Musca domestica*の系統において3回の重複を経験した。対照的に、darc2は、調べた種では明らかに単一コピー遺伝子のままであった。

10

20

【図9】A~Dは、組換えタンパク質精製及び図2に関係する実験を示す。A)(左から右へ)完全長ラットArc(prArc)、prArc-CTD、CA-prArc、GST、及びprArcの場合と類似した発現レベルを示しているEndo3Aの親和性精製の代表的なクーマシーゲル。prArc-CTD、及びEndo3AはprArcと同様の方法で調製した。GSTは、15mMのL-グルタチオンを使用した親和性樹脂からすぐさま溶離された。Hisタグ付きCA-prArcは、250mMのイミダゾールを使用したNi<sup>2+</sup>親和性樹脂から溶離された。次いで、Precision ProteaseによるGSTタグ切断、または溶離の後に、全てのタンパク質の緩衝液を150mMのNaCl、50mMのトリス、pH7.4に替えた。各実験のための全てのタンパク質について緩衝液条件をカプシド安定性のための500mMのNaPO<sub>4</sub>、50mMのトリス、pH7.4に調節した。細菌によって発現したタンパク質の可溶性(上清)及び不溶性(ペレット)画分(レーン1、2)への分画、当該タンパク質のGSTまたはNi<sup>2+</sup>親和性マトリックス上での捕捉(レーン3~5はそれぞれ、素通り(FT)、洗浄、及び捕捉タンパク質を示す)を示す分析。このパネルは、タンパク質発現レベルならびに親和性捕捉の有効性及び効率を実証する。(B)S200サイズ排除カラムから溶離されたprArc、prArc-CTD、及びEndo3Aのピーク画分の代表的なクーマシーゲル。ピーク画分をプールし、1mg/mLの最終原液濃度に濃縮した。記載がない限り、prArcは全ての生化学/EM実験に使用するために各精製によって1mg/mLに濃縮した。細胞生物学実験では、prArcを0.4mg/mLに希釈し、1条件あたり4µgの総タンパク質を使用した。(C)ラットprArcに類似した発現レベルを実証している、BL21細菌溶解物からのショウジョウバエdArc1の親和性精製の代表的なクーマシーゲル。(D)12ウェルプレート内のHEK293細胞に完全長ラットWT ArcまたはGFPプラスミドを、等しいDNA濃度でLipofectamineを使用してトランスフェクトし、その場でホルムアルデヒド架橋に供した。細胞溶解物を抗GFPまたは抗Arc抗体でプロットした。高分子種がArc二量体に対応しており、三量体が認められる可能性が架橋Arc試料においてはああるが、GFP試料においては、ということに留意されたい。

30

40

【図10】A~Dは、図2及び図3に関係するRNA結合実験及びArc-EVの特性を示す。(A)prArcのヌクレオチド除去の代表的なクーマシーゲル。(左)細胞を20mMのNaCl、50mMのトリス、2mMのMgCl<sub>2</sub>、5%のグリセロール、1mM

50

の D T T、p H 8 . 0 に溶解させた。示されている画分は、2 1 , 0 0 0 x g で 4 5 分間掛けてペレット化した後の上清及びペレット画分である。このステップから得られた上清を 0 . 1 % の P E I で処理して核酸を析出させた。この処理の結果として A 2 6 0 / 2 8 0 比率が  $1 . 7 1 \pm 0 . 0 1 8$  から  $1 . 2 9 \pm 0 . 0 2 3$  にシフトし、核酸含有量の低下が示唆された。試料を 2 7 , 0 0 0 x g で 2 0 分間掛けてペレット化し、得られた上清を硫酸 ( A m S u l f ) 沈殿によって処理して A r c を濃縮し、1 0 , 0 0 0 x g で 1 0 分間掛けてペレット化した。その後、A r c を含有する A m S u l f ペレットを上記のように親和性精製に供した。(右)切断され親和性精製された、アニオン交換カラムからの P E I 処理 A r c のピーク画分の代表的なクーマシーゲル。このクロマトグラフィーステップは、結合している核酸を A r c からさらに除去した。ピーク画分を 1 m g / m L に濃縮し、これらの画分の最終測定 A 2 6 0 / 2 8 0 比率は  $0 . 6 8 \pm 0 . 0 3$  ( n = 3 ) であり、P E I 処理 p r A r c が核酸をほとんど含んでいないことが示唆された。(B)(左)ウェスタンブロット分析に使用された、2 4 時間で回収した A r c トランスフェクト H E K 2 9 3 細胞培地からの精製 E V の代表的な陰性染色 E M 画像。(右)ウェスタンブロット分析に使用された、2 4 時間で回収した W T 培養ニューロン培地からの精製 E V の代表的な陰性染色 E M 画像。赤色矢印は精製 E V を示す。(C)(左)未処理 E V またはトリプシン ( 0 . 0 5 m g / m L ) で 3 0 分間処理した E V 中の A r c のウェスタンブロット。p r A r c をトリプシン活性の陽性対照として使用した。(右)総タンパク質に対して正規化した A r c ウェスタンブロットの定量。トリプシンは p r A r c を減成させた。ニューロン E V 中に存在する A r c タンパク質に対しては何ら影響を及ぼさなかった。(D) A r c 分泌の活性依存性。未処理 W T ニューロンからの 1 0 c m 皿内の D I V 1 5 皮質ニューロンから回収した培地からの精製 E V 画分を、K C l による処理と比較した。基礎培地、または K C l を補充した培地で新しく培地交換して 5 0 m M の終濃度にした。培地交換に続いて細胞を 1 時間インキュベートし、培地を回収して E V 画分を精製した。(左)培養ニューロン培地からの精製 E V 画分からの A r c 及び総タンパク質のウェスタンブロット。(右)総タンパク質に対して正規化した A r c タンパク質レベルの定量。K C l 処理の結果として A r c がやや多く培地中に放出された ( n = 2、p < 0 . 0 5 )。

10

20

【図 1 1】A ~ C は、図 4 に関係する H E K 細胞実験及び特注 A r c 抗体対照実験を示す。(A) 1 0 c m 皿内の H E K 2 9 3 細胞に G F P - A r c を図 4 のようにトランスフェクトした。1 8 時間後、1 0 c m 皿内の G F P - A r c トランスフェクト H E K 細胞からの培地を 1 2 ウェルプレート内のナイーブ H E K 細胞へと移し、1 つの群には同時に 8 0 m M の D y n a s o r e を添加してエンドサイトーシスを阻止した。6 時間後に D y n a s o r e 処理培地を新しい H E K 培地に替えた。1 8 時間後に細胞を固定し、1 8 m m カバースリップ上全体の G F P - A r c 発現細胞の塊を 2 0 X の対物レンズによって手作業で計数した ( n = 3 のカバースリップ / 群 )。(左) 1 つの 2 0 X 視野の代表的画像。(右) D y n a s o r e はカバースリップ上全体の G F P - A r c 陽性細胞の塊の数を有意に減少させた。スチューデントの t 検定 : \* p < 0 . 0 5。スケールバー = 5 0 m m。類似した結果を有する 3 つの独立した実験及び培養を代表するもの。(B) D I V 1 5 の培養海馬 A r c K O 及び W T ニューロンに対して、A l e x a F l u o r 5 5 5 のみ ( 上段 )、または M A P 2 ( A l e x a 5 5 5 ) と A r c ( A l e x a 4 8 8 ; 下 2 段 ) との両方による樹状突起タンパク質 M A P 2 の免疫染色を行った。A r c の撮像設定は、W T ニューロンの A r c 免疫染色 ( 下段 ) に基づいて決定した。これらの撮像条件下では、K O ニューロンにおいて A r c 遺伝子座にノックインされた G F P からの G F P 蛍光は見えなかった。2 つの独立した実験の例。(C) D I V 1 5 の培養海馬 A r c K O 及び W T ニューロンを固定し、樹状突起タンパク質 M A P 2 は勿論のこと、特注のウサギポリクローナル A r c 抗体 ( P r o t e i n T e c h ) が市販の S y n a p t i c S y s t e m s ウサギポリクローナル A r c 抗体かのどちらかによる免疫染色も行った。全ての群を同じ取得設定で撮像した。全ての群 ( n = 1 0 のニューロン ) において 2 つの樹状突起 / ニューロンの 3 0 m m 部分を分析し、M A P 2 染色を用いて選択した。どちらの抗体も、

30

40

50

Arc KO及びWTニューロンの差異を検出することができたが、信号：雑音は特注抗体を使用した方が良好であった。基本条件下でどちらの抗体を使用しても体細胞／核内のArcはニューロンによって大きく変動する。スチューデントのt検定：\*\*特注抗体でのWTに対するArc KO、 $p < 0.01$ 。#Synaptic Systems(「SySy」)抗体でのWTに対するArc KO、 $p < 0.05$ 。Arc画像は、Arc発現の差をより良好に表示するためにImageJの中のSmart LUTによって擬似色で色付けされている。2つの独立した実験の例。

【図12】A～Dは、図5に関係する実験を示す。(A) Arc mRNAがprArcカプシド内で保護されるか否かを試験するために、試料をRNアーゼAによる15分間の処理に供し、次いでRNアーゼ阻害薬(1U/mL)に供して失活させ、その後、ニューロンと共にインキュベートした。(左)処理済みまたは未処理のprArc試料と共に4時間インキュベートしたDIV15培養海馬Arc KOニューロンのArc mRNAの代表的画像。(右)prArc処理の結果としてArc KOニューロンの樹状突起Arc mRNAレベルが向上した。RNアーゼで処理されたprArcはArc mRNA移入に影響を及ぼさなかった。(B) DIV15の培養海馬Arc KOニューロンを4mgのprArcによって4時間処理した。1つの群では、prArc添加の30分前にニューロンを80mMのDynasoreで前処理してエンドサイトーシスを阻止した。(左)Arcタンパク質及びmRNAレベルの代表的画像。(右)Dynasoreによる前処理はprArcタンパク質及びArc mRNAの取込み／移入を有意に阻止した。スチューデントのt検定：\* $p < 0.05$ 。\*\*\* $p < 0.001$ 。3つの独立した実験(A、B)の例。全てのパネルのスケールバー=10mm。(C) DIV15の培養海馬Arc KOニューロンを4mgのprArcによって4時間処理した。Arc mRNA及びRab5タンパク質に対するFISH/ICCの組み合わせが、Arc及びRab5タンパク質に対するICCかのどちらかを実施した。(左)Arc mRNAとRab5タンパク質、またはArc及びRab5タンパク質を示す、樹状突起の代表的画像。(右)Arcタンパク質及びmRNAは樹状突起におけるRab5との50%程度の共局在化を示した。白色矢尻はArc単独を示し、黄色矢尻はArc/Rab5共局在化を示す。2つの独立した実験の例。スケールバー=10mm。(D) prArc、prArc(RNA-)、prArc-CTD、及びCA-prArcの精製タンパク質試料をSDS-PAGEによって分離し、得られたウェスタンブロットに対して本発明者らの特注Arc抗体を使用してArcの免疫染色を行った。抗体は全ての突然変異構築物を検出することに成功し、移入実験で観察されたArc免疫染色の欠如は抗体が突然変異体を検出できないことに起因していなかったことが示唆された。「総」は、各試料の総タンパク質に対するポンソー染色である。

【図13】核酸を除去された精製Arcがニューロンの外側に結合し、内在化されないことを示す。DIV15の培養海馬Arc KOニューロンを4mgのprArcまたはprArc(RNA-)によって4時間処理し、その後に固定した。各処理からの1つの群には、Arc及びMAP2に対する免疫細胞化学手順の間、透過処理を行わなかった。透過処理されなかったprArc処理ニューロンはMAP2及びArc免疫染色をほとんど全く示さなかった。他方、prArc(RNA-)処理ニューロンは透過処理条件と非透過処理条件とでArc免疫染色に差を示さなかったが、MAP2免疫染色は非透過処理条件では依然として存在しておらず、prArc(RNA-)がニューロンの外側に蓄積することが示唆された。白色四角で囲まれた樹状突起部分を拡大したものを各対応画像の下に示す。スケールバー=10mm。3つの独立した実験の例。Arc画像は、Arc発現の差を強調するためにImageJからのSmart LUTによって擬似色で色付けされている。融合画像はMAP2免疫染色をマゼンタで示し、Arcを緑色で示している。

【図14】A、B、C及びDは、図6に関係するRNアーゼ及び取込みの実験を示す。(A) Arc mRNAがニューロンEV内で保護されるか否かを試験するために、DIV15の培養WT皮質ニューロンの10cm皿から調製したEVをRNアーゼAによる15分間の処理に供し、次いでRNアーゼ阻害薬(1U/mL)に供して失活させ、その後、

10

20

30

40

50

ニューロンと共にインキュベートした。処理済みまたは未処理のWT EV試料10mgと共にDIV15の培養海馬Arc KOニューロンを4時間インキュベートした。(左)ニューロンのArc mRNAレベルの代表的画像。(右)WT EV処理の結果としてArc KOニューロンの樹状突起Arc mRNAレベルが向上した。RNアーゼで処理されたWT EVはArc mRNA移入に影響を及ぼさなかった。(B) DIV15の高密度培養皮質WTまたはArc KOニューロンが入った10cm皿の培地から採集したEV画分10mgによってDIV15の培養海馬Arc KOニューロンを4時間処理した。1つの群では、EV添加の30分前にニューロンを80mMのDynasoreで前処理してエンドサイトーシスを阻止した。(上) Arcタンパク質レベル(左)またはArc mRNAレベル(右)の代表的画像。(下) Dynasoreによる前処理はWT EVからのArcタンパク質及びmRNAの取込みを有意に阻止した。Arcタンパク質及びmRNA発現をArc KOに対して正規化し、変化倍率±標準誤差として示す。白色で囲まれた樹状突起部分を拡大したものを各対応画像の下に示す。全ての群(n=10のニューロン)において2つの樹状突起/ニューロンの30mm部分を分析し、MAP2染色を用いて選択した。スチューデントのt検定: \*\*\* p < 0.001。スケールバー=10mm。3つの独立した実験の例。画像は、Arc発現の差を強調するためにImageJからのSmart LUTによって擬似色で色付されている。(C) DIV15の培養海馬Arc KOニューロンを10mgのWT EVによって4時間処理し、次いで固定した。Arc mRNA及びRab5タンパク質についてのFISH/ICCの組み合わせか、Arc及びRab5タンパク質についてのICCかのどちらかを実施した。(左) Arc mRNAとRab5タンパク質、またはArc及びRab5タンパク質を示す、樹状突起の代表的画像。(右) Arc mRNA及びタンパク質は樹状突起におけるRab5との30~40%の共局在化を示した。白色矢尻はArc単独を示し、黄色矢尻はArc/Rab5共局在化を示す。2つの独立した実験の例。スケールバー=10mm。(D) モデル: HIV GagとArcカプシドとの生活環の比較。(上) HIV Gagタンパク質が(CAドメインによって)サイトゾル中で、及び(MAドメインのミリスチル化によって)形質膜上で自己組織化する一方、カプシドは(NCドメインによって)中にウイルスRNAを封入する。未成熟HIVカプシドは、ウイルスエンベロープタンパク質(Env)を含有する膜と共に(p6ドメインによって)ESCRT依存的に細胞から放出される。成熟ウイルス粒子は表面受容体(例えばCD4)を介して宿主細胞に結合し、膜融合が起こる。あるいは、いくつかの細胞種では、ウイルス粒子はまずエンドサイトーシスを受け、その後に融合し、完全な融合がエンドソーム内で起こった後、粒子が細胞内に放出される。ウイルスRNAが放出され、その後、宿主ゲノム中に組み込まれるウイルスDNAとして逆転写される。(下) Arc mRNAは、選択された種々のmRNAを含有するRNA顆粒の中に入った状態で樹状突起内へと送り込まれる。ニューロン活動に反応して樹状突起内でArc mRNAの局所翻訳が起こる。高濃度のArcタンパク質が自己組織化し、Arc mRNAを含んで空間的に近くにある選択されたmRNAを中に封入したArcカプシドを形成する。Arcカプシドは、任意のRNAを運ぶArcカプシド(Arc Capsids Bearing Any RNA)(ACBAR)の中に入った状態で樹状突起から放出され、隣接する樹状突起でmRNA、及びその他の推定上の積荷の移入が起こる。

【図15】A及びBは、Arcタンパク質と共に移入したRNAがレシピエント細胞で翻訳されることを示す。(A) HEK293T細胞である「ドナー」細胞にWT myc-Arc及びGFPを共トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞から得られた培地を翻訳阻害薬シクロヘキシミド(CHX)と共に、またはそれなしで、ナイーブ「レシピエント」細胞上に置いた。6時間後に細胞を固定し、GFP RNAについて蛍光insituハイブリダイゼーションを実施し、Arcタンパク質について免疫細胞化学を実施した。(B) 積算周波数分布の左へのシフト、ならびに細胞1つあたりの平均GFP及びArcタンパク質レベルの減少によって示されるように、CHX処理は、レシピエント細胞で発現するGFPタンパク質の量を、GFP RNAレベルに影響を及ぼすことなく

10

20

30

40

50

有意に減少させた。これは、Arcタンパク質が、レシピエント細胞で新たに翻訳され得る GFP RNAと共に移入する、ということを示唆している。\*  $p < 0.05$ 。\*\*  $p < 0.01$ 。\*\*\*  $p < 0.001$ 。スケールバー =  $10 \mu\text{m}$ 。

【発明を実施するための形態】

【0013】

開示される方法及び組成物のさらなる利点は一部が以下の説明で示され、一部が当該説明から理解され、または、開示される方法及び組成物の実施によって分かる場合がある。開示される方法及び組成物の利点は、別記の特許請求の範囲の中で詳しく示されている要素及び組み合わせによって実現及び獲得される。上記一般的説明及び以下の詳しい説明が例示及び説明のためのものであるにすぎず、特許請求の範囲に記載の本発明を限定していない、ということとは理解されるべきである。

10

【0014】

開示される方法及び組成物は、以下の特定の実施形態についての詳しい説明及びその中に含まれている実施例、ならびに図及びそれについてのこれより前及び後の説明を参照することによってより容易に理解され得る。

【0015】

特に明記しない限り、開示される方法及び組成物が特定の合成方法、特定の分析技術または特定の試薬に限定されず、それゆえ変化し得る、ということとは理解されるべきである。本明細書中で使用する用語が特定の実施形態を説明する目的のためのものにすぎず、限定することを意図しない、ということも理解されるべきである。

20

【0016】

開示される方法及び組成物のために使用され得る、それと一緒に使用され得る、その調製に使用され得る、またはその産物である、材料、組成物及び成分を開示する。これら及びその他の材料は本明細書中に開示されており、また、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などを開示している場合、これらの化合物の様々な個々の及び集合的な組み合わせ及び並べ替えが各々明示的に開示されていない場合があるとはいえ、各々が本明細書において具体的に企図され記載されていることは理解される。例えば、Arcタンパク質をコードすることができる核酸配列が開示及び記述されており、当該核酸配列を含む複数の分子に対してなされ得る複数の改変について記述されている場合には、核酸配列と改変との可能なありとあらゆる組み合わせ及び並べ替えが具体的に企図され、但しそうでないことが具体的に示されている場合を除く。したがって、分子A、B及びCの部類が開示されていると同時に、分子D、E及びFの部類ならびに組み合わせた分子の例A-Dが開示されている場合、たとえ各々が個々に列挙されておらずとも、各々は個別及び集合的に企図される。したがって、この例において、各々の組み合わせA-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E、及びC-Fは具体的に企図され、A、B及びC；D、E及びF；ならびに組み合わせA-Dの開示から、開示されているとみなされるべきである。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも具体的に企図され開示されている。したがって、例えば、A-E、B-F及びC-Eの小群は、具体的に企図され、A、B及びC；D、E及びF；ならびに組み合わせA-Dの開示から、開示されているとみなされるべきである。この概念は、開示される組成物を作製及び使用する方法的ステップが含まれるがこれに限定されない本願のあらゆる態様に当てはまる。したがって、実施され得る様々な追加ステップがある場合、これらの追加ステップの各々が、開示される方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせと共に実施され得ること、及びそのような組み合わせの各々が具体的に企図され、開示されているとみなされるべきであることは理解される。

30

40

【0017】

A. 定義

開示される方法及び組成物が、記載されている特定の方法論、プロトコール及び試薬に限定されないことは理解される、というのも、これらは変化し得るからである。本明細書中で使用する用語が特定の実施形態を説明する目的のためのものにすぎず、別記の特許請

50

求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図しない、ということも理解されるべきである。

【0018】

文脈による明らかな別段の規定がない限り、本明細書及び別記の特許請求の範囲において使用される場合に単数形「a」、「an」及び「the」が複数形での意味を含むことには留意されねばならない。したがって、例えば「Arcカプシド(an Arc capsid)」への言及は、複数のそのようなArcカプシドを含んでおり、「Arcカプシド(the Arc capsid)」への言及は、1つ以上のArcカプシド及び当業者に知られているその等価体などへの言及である。

【0019】

「任意選択の」または「場合によって」が意味しているのは、続けて記載されている事象、環境または材料が、起こるまたは存在することも、起こらないまたは存在しないこともあり、記載には、事象、環境または材料が起こるまたは存在する事例と、それが起こらないまたは存在しない事例とが含まれる、ということである。

【0020】

範囲は、本明細書中では、「約」ある特定値から、及び/または「約」別の特定値までとして表現され得る。そのような範囲が表されている場合、文脈による別段の具体的指示がない限り、ある特定値から、及び/または他の特定値までの範囲もまた具体的に企図され、開示されているとみなされる。同様に、先行する「約」の使用によって値が近似として表されている場合、文脈による別段の具体的指示がない限り、特定値が、開示されているとみなされるべき具体的に企図される別の実施形態を形成することは理解される。さらに、各範囲の終点は、文脈による別段の具体的指示がない限り、他方の終点との関係においても、他方の終点との無関係においても、重要であることが理解される。最後に、明示的に開示される範囲の中に含まれる個々の値及び値の小範囲も全て、文脈による別段の具体的指示がない限り具体的に企図され、開示されているとみなされるべきであることは理解されねばならない。上記は、特定の場面にこれらの実施形態のいくつかまたは全てが明示的に開示されているか否かに関係なく当てはまる。

【0021】

特に定義されていない限り、本明細書中で使用する全ての科学技術用語は、開示される方法及び組成物が属する分野において技量を有する者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書において開示されているものと類似した、または等価である任意の方法及び材料を本発明の方法及び組成物の実施及び試験で用いることができるが、特に有用な方法、装置及び材料は、記載されているとおりである。本明細書中で引用する刊行物、及びそれらを引用する所以である材料を、これをもって参照により具体的に援用する。本明細書中のいかなるものも、先行発明の効力によって本発明がそのような開示に先行する権利を有さないことの承認として解釈されるべきでない。何らかの参考文献が先行技術に相当するという承認は、何らなされていない。参考文献についての記述はそれらの著者が何を主張しているのかを述べており、出願人は、引用されている文書の正確性及び関連性に異議を唱える権利を保有している。本明細書中で複数の刊行物に言及しているが、そのような言及が、これらの文書のいずれかが当技術分野の通常の一般的知識の一部を形成するという承認には相当しないことは、明確に理解される。

【0022】

本願の説明及び特許請求の範囲の全体を通して、「含む(comprise)」という語及び当該語の変化形、例えば「含んでいる」及び「含む(comprises)」は、「限定されないが含む」を意味しており、例えば他の添加剤、成分、整数またはステップを排除することを意図しない。詳しく述べると、1つ以上のステップまたは操作を含むと明記されている方法においては(そのステップが「からなる」などの限定用語を含んでいない限り)、ステップに列挙されていない例えば他の添加剤、成分、整数またはステップを排除することを各ステップが意図していないという意味で、列挙されているものを各ステップが含むことが具体的に企図される。

10

20

30

40

50

## 【0023】

本明細書中で使用する場合、「突然変異」という用語は、アミノ酸または核酸の付加、欠失または置換を含む。

## 【0024】

## B. Arcカプシド

Arcカプシドを開示する。Arcカプシドは、1つ以上のArcタンパク質からなり得る。1つ以上のArcタンパク質は、全て同じ種からのもの、または1つ以上の種からのものであり得る。いくつかの態様では、Arcカプシドは、2つ以上の種からのArcタンパク質を含む組換えArcカプシドを含み得る。開示されるArcカプシドは、天然に存在しないという点で組換えである。組換えArcカプシドは、2つ以上の種からのArcタンパク質を含んでいるArcカプシドを含み得、または、Arcカプシドに天然にみられない核酸配列を保有しているArcカプシドを含み得る。いくつかの態様では、本明細書に開示されるArcカプシドは、天然及び非天然のArcタンパク質の組み合わせを含み得る。例えば、Arcカプシドは、天然に存在するArcタンパク質と、天然に存在しない組換えArcタンパク質配列とを含み得る。いくつかの態様では、Arcカプシドは1~50、1~100、1~150、1~200、1~250、1~300、1~350、1~400、1~450、1~500、1~550、1~600、1~650、1~700、1~750、1~800、1~850、1~900、1~950、1~1000個のArcタンパク質を含み得る。

10

## 【0025】

標識部分と複合したArcカプシドを開示する。標識部分は、限定されないが、蛍光分子、燐光分子、酵素、抗体、リガンド、タンパク質及び放射性同位体であり得る。標識部分の例としては、限定されないが、GFP、myc、XFP、HALO、His、RFP、ビオチン及びFITCが挙げられる。いくつかの態様では、標識部分はArcカプシドを検出するために使用することができる。いくつかの態様では、標識部分はArcカプシドを精製するために使用することができる。いくつかの態様では、標識部分は特異的なタンパク質相互作用を標的化するために使用することができる。

20

## 【0026】

標的指向性部分と複合したArcカプシドを開示する。標的指向性部分は、選択された標的に特異的に結合する、複合体の一部を指す。標的指向性部分は、例えば、多糖、ペプチド、ペプチドリガンド、オリゴヌクレオチド、アダプター、抗体もしくはその断片、抗体の一本鎖可変断片(scFv)、またはFab断片、またはナノボディであり得る。本明細書中で使用する場合、「標的指向性部分」は、例えばB細胞、T細胞またはニューロンなどの細胞または細胞集団の表面上の認識分子に対して特異的であり得る。したがって、標的指向性部分と複合したArcカプシドであって標的指向性部分が細胞特異的な標的指向性部分である当該Arcカプシドが開示される。

30

## 【0027】

標識部分をさらに含む、標的指向性部分と複合したArcカプシドを開示する。

## 【0028】

いくつかの態様では、Arcカプシドが保有する核酸配列はDNAまたはRNAであり得る。いくつかの態様では、DNAは一本鎖または二本鎖であり得る。いくつかの態様では、RNA配列は、限定されないがmRNA、RNAiまたはマイクロRNAであり得る。

40

## 【0029】

異種核酸配列を含むArcカプシドを開示する。例えば、異種核酸配列は、Arcカプシドと同じ細胞に由来しない任意の核酸配列であり得る。いくつかの態様では、異種核酸配列は非Arc mRNA配列である。

## 【0030】

いくつかの態様では、Arcカプシドは、Arcカプシドから細胞へと移入し得る核酸配列を保有し得る。いくつかの態様では、移入したmRNA配列は細胞内で1回翻訳され得る。

50

## 【0031】

いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは哺乳動物のものであり得る。いくつかの態様では、Arcカプシドはショウジョウバエ由来Arcカプシドであり得る。いくつかの態様では、ArcカプシドはArcカプシド相同体であり得る。いくつかの態様では、Arcカプシド相同体は任意の種からのものであり得る。

## 【0032】

いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは10~200nmであり得る。いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは10~80nmであり得る。いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは30~40nmであり得る。いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは10~100nmであり得る。いくつかの態様では、開示されるArcカプシドは100~200nmであり得る。

10

## 【0033】

## 1. Arcタンパク質

任意の既知のArcタンパク質のアミノ酸配列を含むArcタンパク質を開示する。いくつかの態様では、アミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸配列、ラットArcタンパク質であり得る：

```

m e l d h m t t g g   l h a y p a p r g g   p a a k p n v i l q   i g k c r a e m
l e   h v r r t h r h l l   t e v s k q v e r e   l k g l h r s v g k   l e n n l
d g y v p   t g d s q r w k k s   i k a c l c r c q e   t i a n l e r w v k   r e
m h v w r e v f   y r l e r w a d r l   e s m g g k y p v g   s e p a r h t v s v
g v g g p e p y c q   e a d g y d y t v s   p y a i t p p p a a   g e l p e q e s
v g   a q q y q s w v p g   e d g q p s p g l d   t q i f e d p r e f   l s h l e
e y l r q   v g g s e e y w l s   q i q n h m n g p a   k k w w e f k q g s   v k
n w v e f k k e   f l q y s e g t l s   r e a i q r e l d l   p q k q g e p l d q
f l w r k r d l y q   t l y v d a e e e e   i i q y v v g t l q   p k f k r f l r
h p   l p k t l e q l i q   r g m e v q d g l e   q a a e p s v t p l   p t e d e
t e a l t   p a l t s e s v a s   d r t q p e ( 配列番号 1 ) 。

```

20

## 【0034】

いくつかの態様では、アミノ酸配列は配列番号2のアミノ酸配列、ヒトArcタンパク質であり得る：

```

m e l d h r t s g g   l h a y p g p r g g   q v a k p n v i l q   i g k c r a e m
l e   h v r r t h r h l l   a e v s k q v e r e   l k g l h r s v g k   l e s n l
d g y v p   t s d s q r w k k s   i k a c l c r c q e   t i a n l e r w v k   r e
m h v w r e v f   y r l e r w a d r l   e s t g g k y p v g   s e s a r h t v s v
g v g g p e s y c h   e a d g y d y t v s   p y a i t p p p a a   g e l p g q e p
a e   a q q y q p w v p g   e d g q p s p g v d   t q i f e d p r e f   l s h l e
e y l r q   v g g s e e y w l s   q i q n h m n g p a   k k w w e f k q g s   v k
n w v e f k k e   f l q y s e g t l s   r e a i q r e l d l   p q k q g e p l d q
f l w r k r d l y q   t l y v d a d e e e   i i q y v v g t l q   p k l k r f l r
h p   l p k t l e q l i q   r g m e v q d d l e   q a a e p a g p h l   p v e d e
a e t l t   p a p n s e s v a s   d r t q p e ( 配列番号 2 ) 。

```

30

40

## 【0035】

CAドメイン(アミノ酸207~370)に少なくとも1つの突然変異を含むArcタンパク質を開示する。いくつかの態様では、CAドメインのC末端ドメイン(アミノ酸278~370)に少なくとも1つの突然変異を含むArcタンパク質が開示される。配列番号1または配列番号2のアミノ酸278~370に少なくとも1つの突然変異を含むArcタンパク質を開示する。配列番号1または配列番号2のアミノ酸278~370に対応するアミノ酸に少なくとも1つの突然変異を含むArcタンパク質を開示する。いくつかの態様では、CAドメインのアミノ酸278~370の欠失を含むArcタンパク質が本明細書に開示される(CAドメインは配列番号1または配列番号2のアミノ酸207~

50

370を含む)。

【0036】

既知の、または開示されるArcアミノ酸配列のいずれかとの少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95または99.9%の同一性を含むArcタンパク質を開示する。例えば、配列番号1との少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95または99.9%の同一性を含むArcタンパク質を開示する。また、配列番号2との少なくとも60、65、70、75、80、85、90、95または99.9%の同一性を含むArcタンパク質を開示する。

【0037】

2. Arc 核酸

任意の既知Arcタンパク質をコードすることができる核酸配列を開示する。配列番号1の配列を含むArcタンパク質をコードすることができる核酸配列を開示する。配列番号2の配列を含むArcタンパク質をコードすることができる核酸配列を開示する。例えば、配列番号3の配列を含む核酸配列、ラットArc遺伝子の核酸配列を開示する。

```

a g t g c t c t g g   c g a g t a g t c c   t c c c t c a g c c   g c a g t c t c
t g   g g c c t c t t c a   g c t t g a g c g g   c g g c g a g c c t   g c c a c
a c t c g   c t a a g c t c c t   c c g g c a c c g c   g c a c t t g c c a   c t
g c c a c t g c   c g c t t c g c g c   c c g c t g c a g c   c g c c g g c t c t
g a a t c c t t c t   g g c t t c c g c c   t c a g a g g a g t   t c t t a g c c
t g   t c c c g a a c c g   t a a c c c c g g c   g a g c a g a t g g   a g c t g
g a c c a   t a t g a c g a c c   g g c g g c c t c c   a c g c c t a c c c   t g
c c c c g c g g   g g t g g g c c g g   c c g c c a a a c c   c a a t g t g a t c
c t g c a g a t t g   g t a a g t g c c g   a g c t g a g a t g   c t g g a g c a
c g   t a c g g a g g a c   c c a c c g g c a t   c t g t t g a c c g   a a g t g
t c c a a   g c a g g t g g a g   c g a g a g c t g a   a a g g g t t g c a   c a
g g t c g g t g   g g c a a g c t g g   a g a a c a a c t t   g g a c g g c t a t
g t g c c c a c g g   g c g a c t c a c a   g c g c t g g a a g   a a g t c c a t
c a   a g g c c t g t c t   c t g c c g c t g c   c a g g a g a c c a   t c g c c
a a c c t   g g a g c g c t g g   g t c a a g c g t g   a g a t g c a c g t   g t
g g a g g g a g   g t c t t c t a c c   g t c t g g a g a g   g t g g g c c g a c
c g c c t g g a g t   c c a t g g g c g g   c a a g t a c c c a   g t g g g c a g
c g   a g c c g g c c c g   c c a c a c t g t c   t c t g t a g g t g   t g g g g
g g t c c   a g a g c c c t a c   t g c c a g g a a g   c t g a t g g c t a   c g
a c t a c a c t   g t t a g c c c c t   a t g c c a t c a c   c c c g c c a c c t
g c c g c a g g a g   a g c t g c c t g a   g c a g g a g t c a   g t t g g g g c
t c   a g c a a t a c c a   g t c t t g g g t g   c c a g g t g a g g   a t g g g
c a a c c   a a g c c c a g g t   c t g g a t a c c c   a g a t c t t t g a   g g
a c c c a c g g   g a g t t c c t g a   g c c a c c t g g a   a g a g t a c c t g
c g g c a g g t g g   g t g g c t c t g a   a g a a t a t t g g   c t g t c c c a
g a   t c c a g a a c c a   c a t g a a t g g g
c c a g c c a a g a   a g t g g t g g g a   g t t c a a a c a g   g g c t c g g t
g a   a g a a c t g g g t   g g a g t t c a a g   a a g g a g t t t c   t g c a g
t a c a g   t g a g g g t a c g   c t c t c c c g c g   a a g c c a t t c a   g c
g g g a g c t g   g a c c t g c c a c   a g a a g c a g g g   t g a g c c a c t t
g a c c a g t t c c   t c t g g c g t a a   g c g g g a c c t g   t a c c a g a c
a c   t g t a t g t g g a   c g c t g a g g a g   g a g g a g a t c a   t t c a g
t a t g t   g g t g g g c a c c   c t g c a g c c c a   a g t t c a a g c g   c t
t t c t g c g c   c a c c c a c t t c   c c a a g a c c c t   g g a g c a g c t c
a t c c a g a g g g   g c a t g g a a g t   t c a g g a c g g c   c t g g a g c a
g g   c a g c t g a g c c   t t c t g t c a c c   c c t c t g c c c a   c a g a g

```

10

20

30

40

50

g a t g a g a c t g a g g c a c t c a c g c c t g c t c t t a c c a g c g  
a g t c a g t a g c c a g t g a c a g g a c c c a g c c t g a a t a g a g g  
g g c c a g c c c a g g g t c c c c a g c c t g c c t g c c a c a c c c a g  
t c t g t g g c t t t t g t c a a c t a g g a c t t g a t t g a g c t g g  
g g c t g a c a c c c a a g g g g a t g c c c t g t c c a g c c a g a c a  
c c t t c t c a c c c a c t g g c c t g a c t c a c a a c t g c c a c a c a  
a c c a t g a t t c a t g g a c a t c a a g a a g c c c c t c t c c c a t a  
g g g c t c c c a c c t g c c a c c t a c c c c t c a c c t g t c t g c c  
c t a g t c c t g g c c c t g t c t c c a g t g g c c t c a c c c t c t a  
c a c t c t c a g a c c a t c a c a g a a c a c c t t t g g c t t c c t c a 10  
t t c t g c a t c a g t g t c c a g g g c c c t t t g g g t a g t c a a g a  
a a t c a a g t g t c t g a a a g g c a a t g a a a a g t a g g c a c c a  
a a c c c a a g g g g c a t c c c a g g g c a g a t g c t a a a g c a g a  
a t c a g a g a t g g c c g a a g g a a c c t c t a c t t c c g g g g a t g  
c a g c c c g c t c c t a c a g a c a c a g c a g a t c c a g c t g g t g c  
c c t a c c t g c c t c c c a g a g c a a c t g g c c a g t c t t g g g c  
a g c a t a g c t c c c c t c t c a g g g t g a g c t g a a g c a g c a g  
a c c t g a c g c g c t g g c g c c t c c t g g c c c c a g c a g t g a t  
t c a t a c c a g t g a a g a a a a g c a g a c t t c g g c t c c a t g a c  
t c a g c c a t g c c a g g c g g a g g g t c c c a g a g g g g c t g a g 20  
t c c t c a g c c c c a g c t g a g g c a g c a g c t g g a g t c t t c a  
g a g c c a g g t g a a t g a c a c c a g g t c t c a a g c t g c t g a g a  
a g t c t t t c c g g c c a t g t c t g g a a g g g g t a c c a c c c c a g  
c a c c a g c a c c g t c c c c t c c t c t c t t g a a g c t g c c t g c  
a c a g a g g t t c c a a g a c a c t t t c a a g g c a g a g a a a t a  
g g a t t a c a a a g a g g a g g t g c c t t g g c a g a g g g c a g c a c  
c c a g c t c a g c c t c a g a g c t g a a g g t g a a g a c a a g c c a g  
c g t g a a a c c c c g g g t c t g c c a c g a a t g c c c g c t c c g c  
t g g c c a c t c a c c a g c t g c c t g c c a c a a g c c a c t g c a g  
c t t g a g c a g g g t c t g t g c c c t c t c a g c a c a g a g c c c a g 30  
t t c g c t g c g t g g c c t t t g g c c c c g c c a g a a c c t t g c a  
g g a g c c t t a a g g t t c g g g c c c t a g c c c a g c c t g a c c t  
t a c c t g c t g t g c c c t g c c t g c t g g t c a a g t c c a g t c c  
c a g g a g a c c c c a t g c c t t g g c t c c t a g g c t g t t c c a g g  
c a c t t c c c t g a c c t g c c g g g t g a t t g c c c a g c t g g a a c  
c t c a t c c a c a c c c c a g c a c c a a c c a c c t c g t g t t g g t  
a a c t g c t c g t g t c t g t a g t c t g a g t a g g c c a t g t t g a  
g g t t c c t c c a t c t g c c t g g t c c a t t g g t g t t c t g a g a c  
c a g t t c c a c t g c t g t t c t g a c a g a t c c c c c a c c c t g t g  
c c c c t g c c a g c c c c c a c a g g t t t a t t t t t g c a c a t a a 40  
a c c a t g a c c c a t a c t a a t t t g g c t a g c t c t g g g g a c t  
a g g g a g a c  
c c t g g a g a t c t c a a g a g t g t g g c t a t c c c c t a t t t t c a  
c c a a g c c t t c a a t a t c c a g c c a g g c c a t c t g g c c c a c  
a c c a t c t t a c c t c a a a g a c a g a c a t a t a t a t a t a t  
a c a t a t a t a t g a t t t t g t t a a t a a a a c t a t g a a a t t t a  
a a (配列番号3)

【0038】

また、配列番号4の配列を含む核酸配列、ヒトA r c 遺伝子の核酸配列を開示する。  
c g c g t g g g c c g c a g c a g c c g a g c c g g a c c t g c c t c c c c 50

g g g c g t g c t c c g c c g g c c c c g c c g c c g g c c c g c a g c g g  
 a c a g a c a g g c g c t c c c c g c a g c t c c g c a c g g g a c c c a  
 g g c c g c c g g a c c c c a g c g c c g g a c c a c c g t c c g t c c g c  
 c c c g a g g a g t t t g c c g c c t g c c g g a g c a c c t g c g c a c a  
 g a t g g a g c t g g a c c a c c g g a c c a g c g g c g g g c t c c a c  
 g c c t a c c c c g g g c c g c g g g g c g g g c a g g t g g c c a a g c  
 c c a a c g t g a t c c t g c a g a t c g g g a a g t g c c g g g c c g a g  
 a t g c t g g a g c a c g t g c g g c g g a c g c a c c g g c a c c t g c t  
 g g c c g a g g t g t c c a a g c a g g t g g a g c g c g a g c t g a a g  
 g g g c t g c a c c g g t c g g t c g g g a a g c t g g a g a g c a a c c  
 t g g a c g g c t a c g t g c c c a c g a g c g a c t c g c a g c g c t g g  
 a a g a a g t c c a t c a a g g c c t g c c t g t g c c g c t g c c a g g a  
 g a c c a t c g c c a a c c t g g a g c g c t g g g t c a a g c g c g a g  
 a t g c a c g t g t g g c g c g a g g t g t t c t a c c g c c t g g a g c  
 g c t g g g c c g a c c g c c t g g a g t c c a c g g g c g g c a a g t a c  
 c c g g t g g g c a g c g a g t c a g c c c g c c a c a c c g t t t c c g t  
 g g g c g t g g g g g g t c c c g a g a g c t a c t g c c a c g a g g c a  
 g a t g g c t a c g a c t a c a c c g t c a g c c c c t a c g c c a t c a  
 c c c c g c c c c c a g c c g c t g g c g a g c t g c c c g g g c a g g a g  
 c c c g c c g a g g c c c a g c a g t a c c a g c c g t g g g t c c c c g g  
 c g a g g a c g g g c a g c c c a g c c c c g g c g t g g a c a c g c a g  
 a t c t t c g a g g a c c c t c g a g a g t t c c t g a g c c a c c t a g  
 a g g a g t a c t t g c g g c a g g t g g g c g g c t c t g a g g a g t a c  
 t g g c t g t c c c a g a t c c a g a a t c a c a t g a a c g g g c c g g c  
 c a a g a a g t g g t g g g a g t t c a a g a a g a g t t c c t g c a g t a c a  
 a a c t g g g t g g a g t t c a a g a a g a g t t c c t g c a g t a c a  
 g c g a g g g c a c g c t g t c c c g a g a g g c c a t c c a g c g c g a g  
 c t g g a c c t g c c g c a g a a g c a g g g c g a g c c g c t g g a c c a  
 g t t c c t g t g g c g c a a g c g g g a c c t g t a c c a g a c g c t c  
 t a c g t g g a c g c g g a c g a g g a g g a g a t c a t c c a g t a c g  
 t g g t g g g c a c c c t g c a g c c c a a g c t c a a g c g t t t c c t g  
 c g c c a c c c c c t g c c c a a g a c c c t g g a g c a g c t c a t c c a  
 g a g g g g c a t g g a g g t g c a g g a t g a c c t g g a g c a g g c g  
 g c c g a g c c g g c c g g c c c c a c c t c c c g g t g g a g g a t g  
 a g g c g g a g a c c c t c a c g c c c g c c c c c a a c a g c g a g t c c  
 g t g g c c a g t g a c c g g a c c c a g c c c g a g t a g a g g g c a t c  
 c c g g a g c c c c c a g c c t g c c c a c t a c a t c c a g c c t g t g  
 g c t t t g c c c a c c a g g a c t t t t g a g c t g g g g c t g a c t c  
 c t g c a g g g g a a g c c c t g g t c c a g c t g g g t g c c c c c t c g  
 a g c t c c g g g c g g a c t c g c a c a c a c t c g t g t c a t c c a g a  
 t g t g a g c a c c g c a c c c a g c g g c a a a g a g c c c t c c c c c  
 c t g c a g g g c t c c a c c c a t c a c c c t c c c t c c g t c t g t c  
 t t t c c g g c c t g g a c c c c a c c c t c c a c a c t c t c a g g c c a  
 t c a c a g a a c a c c c c a g c t t c c t c a t t c t g c t a c a a c a c  
 c c a g g c c c t c t g g a c a t c c a g a a a a c c a a g t g t c c g g  
 a t g g c a g g g g c c a g c g g c c a c c a a g c t c a t g g g a c a c  
 c c a g a g c a g a a g c t a g g g c a g a g c c a a t g c t g a g g g a g  
 c c t c g a c t t c c g g c g c c g c c g c c c t c t c c c g g c a t c c g  
 c a g a g c c a g c t g a c g c c c t c c c t g c c t c c c a g g g c a g  
 c t g g c c a g c c t c g g g c a g c g c g g c c c c c t c c t c c c a g

10

20

30

40

50

g g g a g a g t a g a a g t c g c a c a c g c a g c a g a g c a g a c c t g  
a t g t c c c g g t g c t t c c t g g c c c c t c a g c t c c a g t g a t t  
c a c g c c c g c c t g g a g a a g a a t c a g a g c t c a g c t c a t g  
a c t c a c c c a t g g c a g g c g g a g g g t c c c a g a g g g g c t g  
a g t c c t c a a a t c c g g c t g a g g c a g c a g c t g g c a c c a t c  
a g a g c c a g g a g a g t g a c a a c a g g t c t c a a g g t t c c c a c  
a a a g t c t t t g c t g c t g t g c t g g g c a c c c a c c c a c c c t  
c a c c t t g c a g g c t g c c t g c g t g g g a g g c g a a g t c c c a  
g g a c a g c c c a g a g g g g g g c t a c a g a g a g a g a g t c g g c t g  
c a g c a g a g g g c a g g a g c c c c a g c t t a g c c c t g a g c g c c  
a g c g c g a g g a c c a g g g c c t g c c a c t a a g c c c g c c c g  
c t g g c c g c c a g c t g c c c g t c c c c a g a g c c a c t g c a g c  
a g g a g t c g g g c c c t g c c t c c c t c c c a g c a g g g a a a c c c  
c g c c c g c t g c c a g g c c a t c c t c t c t g c c a g a g g c t t t c  
a t g a g c c c c a a g g c t g g g g c c a c a g c t c c t a c c c c t g  
c c c a g c a g c c c t g a g c t c a g c t g c a g g a a g g a c a t c c  
c a g a a g c c a t g g c t c c t g g g g c g c t t c c a g g c a t t c t g  
c c c t g c c c c g a c a c c a g a a c c c t g g t g c t g g t g g g c c a  
c t a g c g t c t g c a g c c t a a g c a g g t g c t g g c t c a g g g t  
t c a t c a t t c t g c c t t g t c c a c t g g g g g a c c a g c c c t g  
c a g a c c a c t c t g a c a a g t c t t c a g c c c a c a c c t t g c c a  
g c c c c a c a g a t t t t a t t t t t g c a c a t a a g c c a t a a c c a  
a t c c t c a a g g c t g g c a c a g g c t t t g g g g a a g c c c t g g  
a g c c t g t g a a g a c c c t g g a a a c c t c a t g a g g c t g t g g  
c c a a c c c c t g c c c c t t g c c c c a c a c a g a c c a g g c c t t a  
a a t g t c g g t c c a g g c c c t g t g c a c c t t a c c c c a g a g a c  
a g a c t c t t t t t g t a a g a t t t t g t t a a t a a a a c a c t g a  
a a c t t c ( 配列番号 4 )

10

20

【 0 0 3 9 】

配列番号 3 との少なくとも 6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5 または 9 9 . 9 % の配列同一性を含む核酸配列を開示する。配列番号 4 との少なくとも 6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5 または 9 9 . 9 % の配列同一性を含む核酸配列を開示する。

30

【 0 0 4 0 】

配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸 2 7 8 ~ 3 7 0 をコードすることができる配列に少なくとも 1 つの突然変異を含む核酸配列を開示する。換言すれば、配列番号 3 または配列番号 4 の核酸 8 3 2 ~ 1 1 1 0 に少なくとも 1 つの突然変異を含む核酸配列を開示する。また、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸 2 0 7 ~ 3 7 0 をコードすることができる配列に少なくとも 1 つの突然変異を含む核酸配列を開示する。換言すれば、配列番号 3 または配列番号 4 の核酸 6 1 9 ~ 1 1 1 0 に少なくとも 1 つの突然変異を含む核酸配列を開示する。

40

【 0 0 4 1 】

また、二次または三次構造が本明細書に記載の A r c タンパク質と共通しているタンパク質をコードすることができる核酸配列を開示する。

【 0 0 4 2 】

C . ベクター

A r c タンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターを開示する。いくつかの態様では、A r c タンパク質は、本明細書に開示される A r c タンパク質のいずれかであり得る。

【 0 0 4 3 】

50

二次または三次構造が本明細書に記載の Arc タンパク質と共通するタンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターを開示する。

【0044】

いくつかの態様では、開示されるベクターはさらに、標識部分をコードすることができる核酸配列を含み得る。いくつかの態様では、標識部分は、核酸にコードされる任意のペプチドまたはタンパク質であり得る。例えば、標識部分は、限定されないが、GST、myc、His または GFP であり得る。

【0045】

いくつかの態様では、標識部分は、Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列に機能可能に繋がられ得る。かくして、標識部分と Arc タンパク質とが一緒に転写され得る。

10

【0046】

いくつかの態様では、開示されるベクターはさらに、標的指向性部分をコードすることができる核酸配列を含み得る。いくつかの態様では、標的指向性部分は、Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列に機能可能に繋がられ得る。かくして、標的指向性部分と Arc タンパク質とが一緒に転写され得る。いくつかの態様では、標的指向性部分は、限定されないが、多糖、ペプチド、ペプチドリガンド、オリゴヌクレオチド、アダプター、抗体もしくはその断片、抗体の一本鎖可変断片 (scFv)、または Fab 断片、または ナノボディ であり得る。

【0047】

Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列に加えて、開示されるベクターは、宿主細胞における Arc タンパク質の発現を制御する調節配列を保有し得る。当業者であれば、調節配列の選択を含めたベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの因子によって決まり得ることを認識する。哺乳動物宿主細胞発現のために好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を促すウイルスエレメント、例えば、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス (CMV) (例えばCMVプロモーター/エンハンサー)、サルウイルス40 (SV40) (例えばSV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス (例えばアデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP))、ポリオーマに由来するプロモーター及び/またはエンハンサー、ならびに強力な哺乳動物プロモーター、例えばナイーブ免疫グロブリン及びアクチンプロモーターが挙げられる。ウイルス調節エレメント及びその配列のさらなる記載については、例えば、米国特許第5,168,062号、第4,510,245号及び第4,968,615号を参照されたい。細菌細胞または真菌細胞、例えば酵母細胞においてポリペプチドを発現させる方法も当技術分野でよく知られている。

20

【0048】

いくつかの態様では、開示されるベクターはさらに、Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列に機能可能に繋がられたプロモーターを含む。いくつかの態様では、プロモーターは誘導性プロモーターであり得る。いくつかの態様では、プロモーターは細胞特異的プロモーターであり得る。Arc タンパク質をコードすることができる核酸配列はプロモーターに機能的に繋がられ得る。「機能的に繋がられる」とは、プロモーターが核酸配列の発現を促進することができること、したがって核酸配列に対するプロモーターの適切な配向を有していることを意味する。

30

40

【0049】

D. 細胞

開示されるベクターのいずれかを含む細胞を開示する。開示される Arc タンパク質のいずれかを含む細胞を開示する。開示される Arc カプシドのいずれかを含む細胞を開示する。

【0050】

いくつかの態様では、開示される細胞は哺乳動物細胞であり得る。

【0051】

50

いくつかの事例では、細胞は、当技術分野でよく知られている培養技術を用いて培養され得る。任意の既知の細胞株を使用することができる。いくつかの事例では、細胞は、任意の宿主に由来し得る。例えば、細胞は、限定されないが、ヒト、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、細菌または真菌宿主に由来し得る。

【0052】

E. 医薬組成物

Arcカプシドと薬学的に許容される担体とを含む組成物を開示する。Arcカプシドは、開示されるArcカプシドのいずれかであり得る。

【0053】

いくつかの態様では、開示されるArcカプシドを、薬学的に許容される担体の中に入れて、またはそれと共に、製剤化及び/または投与することができる。本明細書中で使用する場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、無菌の水性または非水性の溶液、分散体、懸濁液またはエマルジョン、及び使用直前に無菌の注射用の溶液または分散体に入れて再構成するための無菌粉末を指す。好適な水性及び非水性の担体、希釈剤、溶媒またはビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース及びそれらの好適な混合物、植物油（例えばオリーブ油）及び注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられる。レシチンなどのコーティング材料を使用すること、分散体の場合に要求される粒径を維持すること、及び界面活性剤を使用することによって、適度な流動性を維持することができる。これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などの佐剤も含有することができる。様々な抗菌及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含ませることによって微生物の作用の防止を確保することができる。等張化剤、例えば、糖、塩化ナトリウムなどを含むことが望ましい場合もある。吸収を遅延させるモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤を含ませることによって注射用医薬剤形の吸収延長をもたらすことができる。注射用デポ剤形は、薬物をポリラクチド-ポリグリコライド、ポリ（オルトエステル）及びポリ（無水物）などの生分解性ポリマーの中に入れてマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作られる。薬物対ポリマーの比率及び採用する特定ポリマーの性質に応じて薬物放出の速度を制御することができる。デポ注射用製剤は、体組織との適合性を有するリポソームまたはマイクロエマルジョンの中に薬物を捕捉することによっても調製される。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターによる濾過、または使用直前に無菌水もしくはその他の無菌注射用媒体に溶解もしくは分散させることができる無菌固体組成物の形態の滅菌剤の組込みによって滅菌され得る。好適な不活性担体にはラクトースなどの糖が含まれ得る。活性成分の粒子の少なくとも95重量%が0.01~10マイクロメートルの範囲の有効粒径を有することが望ましい。

【0054】

したがって、本明細書に開示される組成物は、脂質、例えばリポソーム、例えばカチオン性リポソーム（例えば、DOTMA、DOPE、DC-コレステロール）またはアニオン性リポソームを含み得る。リポソームはさらに、特定の細胞を指向することを容易にするタンパク質を所望により含み得る。ペプチドとカチオン性リポソームとを含む組成物の投与は、血液に対して施され得るか、標的臓器に対して施され得るか、または呼吸器の細胞を標的とすべく呼吸器内に吸入され得る。例えば、本明細書に記載のペプチドまたは核酸配列と、カチオン性リポソームとを含む組成物を対象の肺細胞に投与することができる。リポソームに関しては例えばBrigham et al. Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1:95-100 (1989)、Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987)、米国特許第4,897,355号を参照されたい。さらに、マクロファージなどの特定の細胞種へ、または特定の速度もしくは投薬量のために化合物の拡散もしくはマイクロカプセルからの化合物の送達企業が企図されている場所へと指向され得るマイクロカプセルの成分として、化合物を投与することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

一態様では、本明細書に記載の開示される A r c カプシドもしくはタンパク質のいずれかまたは薬学的に許容されるその塩もしくは溶媒和物と、薬学的に許容される担体、緩衝液もしくは希釈剤を含む医薬組成物が開示される。様々な態様において、医薬組成物の A r c カプシドまたはタンパク質は送達ビヒクルの中に封入される。さらなる態様では、送達ビヒクルはリポソーム、マイクロカプセルまたはナノ粒子である。さらなる他の態様では、送達ビヒクルは P E G 化される。

## 【 0 0 5 6 】

本明細書に記載の方法において、細胞への組成物の送達は、様々な機序を介したものであり得る。上に定義したとおり、本明細書に記載の A r c カプシドまたはタンパク質のいずれか 1 つ以上を含む組成物が本明細書に開示され、これはさらに担体、例えば薬学的に許容される担体を含み得る。例えば、本明細書に開示される A r c カプシド及びタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が開示される。一態様では、開示される A r c カプシド及びタンパク質を含む医薬組成物が開示される。つまり、医薬組成物は、治療的有効量の少なくとも 1 つの開示される A r c カプシドまたは開示される方法の少なくとも 1 つの産物と、薬学的に許容される担体とを含んだ状態で提供され得る。

## 【 0 0 5 7 】

特定の態様では、開示される医薬組成物は、活性成分としての開示される A r c カプシドまたはタンパク質（薬学的に許容されるその塩（複数可）を含む）、薬学的に許容される担体及び、任意選択の他の治療薬成分または佐剤を含む。目下の組成物には、経口、直腸、局所及び非経口（皮下、筋肉内及び静脈内を含む）投与に適するものが含まれるが、何らかの所与の症例で最も適する経路は特定の宿主、ならびに活性成分を投与する所以である症状の性質及び重症度によって決まる。医薬組成物は、単位剤形で簡便に提供され得、薬学分野でよく知られている方法のいずれかによって調製され得る。

## 【 0 0 5 8 】

實際上、本発明の、本明細書に記載の A r c カプシド及びタンパク質、または薬学的に許容されるその塩は、従来の医薬配合技術に従って、医薬担体との緻密な混合物の中の活性成分として混合され得る。担体は、例えば経口または非経口（静脈内を含む）での投与にとつて望ましい調剤の形態に応じて多種多様な形態をとることができる。かくして、本発明の医薬組成物は、所定量の活性成分を各々含有している経口投与に適した不連続単位、例えば、カプセル、カシェ剤または錠剤として提供され得る。さらに、組成物は、散剤、顆粒剤、溶液、水性液体中の懸濁液、非水性液体、水中油エマルジョン、または油中水液体エマルジョンとして提供され得る。上に挙げた一般的な剤形の他にも、制御された放出手段及び/または送達装置によって本発明の化合物及び/または薬学的に許容されるその塩（複数可）を投与することもできる。組成物は薬学の方法のいずれかによって調製され得る。そのような方法は、大抵、活性成分と 1 つ以上の必要な成分をなす担体とを合わせるステップを含む。組成物は、大抵、活性成分と、液体担体もしくは微粉化固体担体またはその両方とを均質及び緻密に混合することによって調製される。その後、好都合となるように製品が所望の体裁に形作られ得る。

## 【 0 0 5 9 】

当業者によく知られているであろうように、「薬学的に許容される」とは、活性成分のいかなる分解も最小限に抑えるように、かつ対象におけるいかなる有害な副作用も最小限に抑えるように選択されることになるであろう材料または担体を意味する。本明細書に記載の A r c カプシドもしくはタンパク質、または薬学的に許容されるその塩を、1 つ以上の他の治療的活性化化合物と組み合わせて医薬組成物中に含ませることもできる。

## 【 0 0 6 0 】

採用される医薬担体は、例えば、固体、液体または気体であり得る。固体担体の例としては、ラクトース、石膏、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアガム、ステアリン酸マグネシウム及びステアリン酸が挙げられる。液体担体の例は、シュガーシロップ、ピーナッツ油、オリーブ油及び水である。気体担体の例としては、二酸化炭

10

20

30

40

50

素及び窒素が挙げられる。その他の担体の例としては、ジミリストイルホスファチジル (DMPC)、リン酸緩衝生理食塩水または多胞性リポソームが挙げられる。例えば、PG : PC : コレステロール : ペプチドまたはPC : ペプチドを担体として本発明に使用することができる。他の好適な薬学的に許容される担体及びその製剤は、Remington : The Science and Practice of Pharmacy (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995に記載されている。典型的には、適切な量の薬学的に許容される塩を製剤に使用して製剤を等張にする。薬学的に許容される担体のその他の例としては、限定されないが、生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液が挙げられる。溶液のpHは約5～約8、または約7～約7.5であり得る。さらなる担体としては、組成物を含有する固体疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスなどの持続放出性調合剤が挙げられるが、このマトリックスは、成形品、例えば、フィルム、(血管形成手術中に血管内に埋植される)ステント、リポソームまたは微粒子の形態である。例えば投与経路及び投与される組成物の濃度によっては特定の担体により好ましい場合があることは、当業者には明らかである。これらは、水、生理食塩水及び生理的pHの緩衝液を含めてヒトへの薬物投与のための標準的担体であることが最も典型的であろう。

10

#### 【0061】

医薬組成物中の開示されるArcカプシドまたはタンパク質の溶解性及び/または安定性を高めるためには、-、-もしくは-シクロデキストリンまたはそれらの誘導体、特に、ヒドロキシアルキル置換シクロデキストリン、例えば、2-ヒドロキシプロピル-シクロデキストリンもしくはスルホブチル-シクロデキストリンを採用することが有益となり得る。アルコールなどの共溶媒も、医薬組成物中の本発明に係る化合物の溶解性及び/または安定性を高める場合がある。

20

#### 【0062】

医薬組成物は、本発明のポリペプチド、ペプチド、核酸、ベクターの意図された活性が損なわれない限り、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝剤、保存剤なども含むことができる。医薬組成物はまた、(本発明の組成物に加えて)1つ以上の活性成分、例えば、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤などを含んでもよい。医薬組成物は、局所処置が望まれるか全身処置が望まれるかに応じて、及び処置される領域に応じて複数の方法で投与されてもよい。

30

#### 【0063】

投与の簡単さゆえに経口投与を用いることができ、錠剤及びカプセルは、固体医薬担体を当然ながら採用する最も有益な経口用単位剤形に相当する。経口用剤形のための組成物を調製する際、任意の好都合な医薬媒体を採用することができる。例えば、水、グリコール、油、アルコール、着香剤、保存剤、着色剤などを使用して経口用調合液、例えば、懸濁液、エリキシル及び溶液を形成することができる一方、澱粉、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤などの担体を使用して経口用固体調合剤、例えば、散剤、カプセル及び錠剤を形成することができる。投与の簡単さゆえに錠剤及びカプセルは、固体医薬担体を採用するのに好ましい経口用投薬量単位である。場合によって、錠剤を標準的な水性または非水性の技術によってコーティングすることができる。

40

#### 【0064】

経口投与のための組成物は、散剤または顆粒剤、水中または非水性媒体中の懸濁液または溶液、カプセル、サシェまたは錠剤を含む。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合がある。組成物のいくつかは、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸及びリン酸などの無機酸ならびにギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸及びフマル酸などの有機酸との反応、または水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウムなどの無機塩基ならびにモノ-、ジ-、トリアルキル及びアリアルアミン及び置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応によって形成される薬学的に許容される酸性または塩基性付加塩として投与されてもよい可能性がある。

#### 【0065】

50

本発明の組成物を含有する錠剤は、場合によって1つ以上の補助成分または佐剤と共に、圧縮または成型によって調製され得る。圧縮錠剤は、粉末または顆粒などの自由流動形態の活性剤を、場合によって結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、界面活性剤または分散剤と混合して、好適な機械で圧縮することによって調製され得る。成型錠剤は、不活性希釈液で湿らせた粉末化合物の混合物を好適な機械で成型することによって作られ得る。

【0066】

本発明の医薬組成物は、活性成分としてのタンパク質、例えばA r cタンパク質またはカプシド（または薬学的に許容されるその塩）、薬学的に許容される担体及び、任意選択の1つ以上の追加の治療薬成分または佐剤を含む。目下の組成物には、経口、直腸、局所及び非経口（皮下、筋肉内及び静脈内を含む）投与に適する組成物が含まれるが、何らかの所与の症例で最も適する経路は特定の宿主、ならびに活性成分を投与する所以である症状の性質及び重症度によって決まる。医薬組成物は、単位剤形で簡便に提供され得、薬学分野でよく知られている方法のいずれかによって調製され得る。

10

【0067】

非経口投与に適する本発明の医薬組成物は、活性化合物の水溶液または水懸濁液として調製され得る。例えばヒドロキシプロピルセルロースなどの好適な界面活性剤を含ませることができる。油中のグリセロール、液体ポリエチレングリコール及びそれらの混合物で分散体を調製することもできる。さらに、弊害をもたらす微生物の増殖を防止するために保存剤を含ませることができる。

【0068】

注射剤用途に適する本発明の医薬組成物には、無菌の水溶液または分散体が含まれる。さらに、組成物は、そのような無菌注射剤溶液または分散体の即席調合剤のための無菌粉末の形態であり得る。典型的には、最終的な注射剤形態は無菌でなくてはならず、シリンジ操作を簡単にするのに効果的な流動性を有していなくてはならない。医薬組成物は、製造及び保存条件下で安定でなければならず、よって好ましくは細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール）、植物油及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。

20

【0069】

例えば、担体が生理食塩水溶液、グルコース溶液または、生理食塩水及びグルコース溶液の混合物を含んでいる注射剤溶液を調製することができる。注射剤懸濁液も調製され得、この場合は適切な液体担体、懸濁化剤などが採用され得る。さらに、使用の少し前に液体形態の調合剤に作り替えることを意図した固体形態の調合剤も含まれる。

30

【0070】

非経口投与の調合剤には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁液及びエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては、生理食塩水及び緩衝液媒体を含む水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられる。非経口用ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガー液デキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンガー液、または固定油が挙げられる。静脈内用ビヒクルとしては、流体及び栄養補充薬、電解質補充薬（例えば、リンガー液デキストロースに基づくもの）などが挙げられる。保存剤及びその他の添加剤、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤及び不活性ガスなどが存在していてもよい。

40

【0071】

本発明の医薬組成物は、局所使用に適する形態、例えば、エアゾール、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、散布剤、洗口剤、うがい薬などであり得る。さらに、組成物は、経皮用装置に使用するのに適した形態であり得る。これらの製剤は、本発明の化合物または薬学的に許容されるその塩を利用して従来の処理方法によって調製することができる。一例として、クリーム剤または軟膏剤は、親水性材料と水とを約5wt%～約10wt%の化合物と一緒に混合して所望の稠度を有するクリーム剤または軟膏剤を製造することによ

50

って調製される。

【 0 0 7 2 】

経皮投与に適する組成物において、担体は、場合によって浸透強化剤及び/または好適な湿潤剤を、場合によって少量の任意の性質の好適な添加剤と合わせて含むが、この添加剤は、皮膚に有害作用をあまり生じさせないものである。上記添加剤は、皮膚への投与を容易にする場合があり、及び/または所望の組成物を調製するのに役立つ場合がある。これらの組成物は、様々な方法で、例えば、経皮吸収パッチとして、スポットオンとして、軟膏剤として、投与され得る。

【 0 0 7 3 】

本発明の医薬組成物は、担体を固体とする、直腸投与に適した形態であり得る。混合物が単回用量坐剤を形成していることが好ましい。好適な担体としては、カカオバター、及び当技術分野で一般的に使用されるその他の材料が挙げられる。坐剤は、まず組成物を、軟化または融解させた担体（複数可）と混合し、続いて型内で冷却及び成型することによって、簡便に形成され得る。

10

【 0 0 7 4 】

最適な投与のための製剤には、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、ドロップ剤、坐剤、スプレー剤、液剤及び散剤が含まれ得る。従来の医薬担体、水性、粉末または油状の基剤、増粘剤などが望ましい場合がある。

【 0 0 7 5 】

上記担体成分に加えて、上記の医薬製剤は、適宜、1つ以上の追加担体成分、例えば、希釈剤、緩衝剤、着香剤、結合剤、界面活性剤、増粘剤、潤滑剤、保存剤（酸化防止剤を含む）などを含み得る。さらに、他の佐剤を含ませて製剤を、意図したレシピエントの血液と等張にすることができる。開示されるペプチド及び/または薬学的に許容されるその塩を含有する組成物を粉末または液体濃縮物の形態に調製することもできる。

20

【 0 0 7 6 】

正確な投薬量及び投与頻度は、当業者によく知られているように、特定の開示される Arc カプシドまたはタンパク質、開示される製造方法の産物、薬学的に許容されるその塩、溶媒和物もしくは多型、その水和物、その溶媒和物、その多型、またはその立体化学的異性体形態；治療しようとする特定の症状及び治療しようとする症状の重症度；投薬を施す対象の治療歴に固有の様々な因子、例えば年齢；特定の対象の体重、性別、障害の程度及び全身の健康状態、ならびに個体が服用している可能性がある他の薬によって決まる。さらに、上記有効一日量が、治療する対象における奏効に応じて、及び/または組成物を処方する医師の評価に応じて増減される場合があることは明らかである。

30

【 0 0 7 7 】

投与様式に応じて医薬組成物は、どの百分率も組成物の総重量を基準として、0.05 ~ 99 重量%、好ましくは0.1 ~ 70 重量%、より好ましくは0.1 ~ 50 重量%の活性成分と、1 ~ 99.95 重量%、好ましくは30 ~ 99.9 重量%、より好ましくは50 ~ 99.9 重量%の薬学的に許容される担体とを含むことになる。

【 0 0 7 8 】

F . m R N A を送達する方法

40

m R N A を細胞に送達する方法であって、Arc カプシドを細胞に投与することを含み、Arc カプシドが関心対象のm R N A を含むものである、当該方法を開示する。「関心対象のm R N A 配列」または「関心対象のm R N A」という用語は、導入先となる細胞に対して一部または全体が異種すなわち外来のものであるm R N A 核酸配列（例えば治療遺伝子）を意味し得る。「関心対象のm R N A 配列」または「関心対象のm R N A」という用語はまた、導入先となる細胞の内因性遺伝子に対して一部または全体が同種であるがしかし当該細胞に導入されるように設計されている、m R N A 核酸配列も意味し得る。「関心対象のm R N A 配列」または「関心対象のm R N A」という用語はまた、導入先となる細胞の内因性遺伝子に対して一部または全体が相補的であるm R N A 核酸配列も意味し得る。例えば、関心対象のm R N A 配列は、マイクロR N A、s h R N A またはs i R N A

50

であり得る。「関心対象のmRNA配列」または「関心対象のmRNA」は、1つ以上の転写調節配列、及び選択された核酸の最適な発現のために必要となる可能性があるその他の任意の核酸、例えばイントロンも含み得る。

【0079】

開示されるArcカプシドのいずれかが、本明細書に記載のこれらの方法に使用され得る。

【0080】

いくつかの態様では、Arcカプシドは細胞にとって異種であり得る。いくつかの態様では、細胞にとって異種であるArcカプシドは、その送達先である細胞に由来しない任意のArcカプシドである。

10

【0081】

mRNAを細胞に送達する方法であって、開示されるベクターのいずれか1つ以上を細胞に投与すること、及び関心対象のmRNAを細胞に投与することを含み、ベクター中の核酸配列がArcタンパク質をコードし、これが後に細胞内で翻訳され、Arcカプシドが形成され、Arcカプシドが中に関心対象のmRNAを封入する、当該方法を開示する。

【0082】

開示される送達方法のいくつかの態様では、細胞はニューロンであり得る。いくつかの態様では、細胞は哺乳動物細胞、例えば、限定されないが、ヒト細胞であり得る。いくつかの態様では、細胞は、限定されないが、神経細胞、筋肉細胞、骨細胞、腺細胞、血液細胞または生殖細胞であり得る。例えば、細胞は、T細胞、B細胞、マクロファージ、上皮細胞、軟骨細胞または幹細胞であり得る。

20

【0083】

いくつかの態様では、関心対象のmRNAは治療薬である。例えば、治療薬は、限定されないが、mRNA、siRNAにコードされるサイトカインなどの免疫調節剤、またはmRNAにコードされる阻害剤であり得る。このように、いくつかの態様においてArcカプシドは治療薬を細胞に送達するために使用され、治療薬は細胞の任意の症状を治療することができる。例えば、細胞の症状は、対象に対して診断された疾患または障害によって引き起こされたいかなるものでもあり得、当該細胞は上記対象からのものである。いくつかの態様では、関心対象のmRNAはArc mRNAではない。

【0084】

いくつかの態様では、ベクターは関心対象のmRNAを含む。例えば、いくつかの態様では、Arcタンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターが、さらに、関心対象のmRNAを含み得る。いくつかの態様では、Arcタンパク質をコードすることができる核酸配列を含むベクターとは別個の第2のベクターの中に、関心対象のmRNAが投与され得る。

30

【0085】

mRNAを対象に送達する方法であって、開示される細胞のいずれか1つを、それを必要とする対象に1つ以上投与することを含む、当該方法を開示する。いくつかの態様では、細胞は異種のものであり得る。いくつかの態様では、細胞は自家性であり得る。

【0086】

関心対象のmRNAを対象に送達する方法であって、関心対象のmRNA配列を含む開示されるArcカプシドのいずれか1つに対象から得られた細胞を曝露することを含み、Arcカプシドに曝露された細胞がArcカプシドを取り込んで、関心対象のmRNAを含むArcカプシドを含む細胞を形成し；さらに、関心対象のmRNAを含むArcカプシドを含む細胞を、細胞の入手先となった対象に投与することを含む、当該方法を本明細書に開示する。いくつかの態様では、Arcカプシドは異種mRNA配列を含む。異種mRNA配列は、Arcカプシドと同じ細胞に由来しない任意のmRNA配列であり得る。いくつかの態様では、異種mRNA配列は非Arc mRNA配列である。

40

【0087】

関心対象のmRNAを対象に送達する方法であって、関心対象のmRNA配列を含む開

50

示される Arcカプシドのいずれか1つに対象から得られた細胞を曝露することを含み、Arcカプシドに曝露された細胞がArcカプシドを取り込んで、関心対象のmRNAを含むArcカプシドを含む細胞を形成し；さらに、関心対象のmRNAを含むArcカプシドを含む細胞を、細胞の入手先となった対象とは異なる対象に投与することを含み、当該方法を本明細書に開示する。

【0088】

G. Arcカプシドを形成する方法

Arcカプシドを形成する方法であって、細胞を含む溶液に、開示されるベクターのいずれかを投与することを含み、核酸配列が細胞内でArcタンパク質をコードし、Arcカプシドが形成される、当該方法を開示する。

10

【0089】

Arcカプシドを形成する方法であって、細胞を含む溶液に、開示されるベクターのいずれかを投与することを含み、核酸配列が細胞内でArcタンパク質をコードし、Arcカプシドが形成され、さらに、関心対象のmRNAを投与することを含み、Arc形成中にmRNAがArcカプシド内にパッケージングされる、当該方法を開示する。

【0090】

いくつかの態様では、Arcカプシドを形成する開示される方法は、溶液の塩濃度を100~300mMの範囲に増加させることをさらに含む。いくつかの態様では、塩は、限定されないが、NaClまたはNaPO<sub>4</sub>であり得る。

【0091】

いくつかの態様では、形成されるArcカプシドは、細胞外小胞によって細胞から放出される。いくつかの態様では、細胞は、細胞外小胞の形成に関与する細胞膜を含む組換え細胞であり、細胞外小胞はArcカプシドの標的指向化のための細胞特異性を提供する。いくつかの態様では、Arcカプシドは、Arcカプシド組立てを制御することができる外来核酸の存在下で形成され得る。

20

【0092】

いくつかの態様では、Arcカプシドは、細胞内で作られたエクソソームまたは細胞外小胞によって産生または送達され得る。例えば、エクソソームまたは細胞外小胞はArcカプシドの産生及び拡散のための潜在的なベクターとして使用され得る。

【0093】

H. Arc結合を阻止する方法

脂質に対するArcカプシド結合を阻止する方法であって、遮断薬を投与することを含み、遮断薬が脂質に対するArcカプシドの結合を妨害する、当該方法。いくつかの態様では、遮断薬は、Arcカプシドに結合して脂質結合部位を遮断するかまたは脂質に結合してArcカプシド結合部位を遮断する、任意の分子であり得る。いくつかの態様では、遮断薬はArcタンパク質またはその断片であり得る。

30

【0094】

I. キット

上記材料及びその他の材料は、開示される方法を実施するかまたはその実施を助けるのに有用なキットとして任意の好適な組み合わせと一緒に包装され得る。所与のキットにおいて、キット構成要素が、開示される方法と併せた使用のために設計され適合しているならば有用である。例えば、Arcカプシドを生成するキットであって、開示されるArcタンパク質、Arc核酸、ベクターまたは細胞のいずれかを含む、当該キットを開示する。

40

【実施例】

【0095】

脳は、相互連結されたニューロン網同士のシナプス結合によって外界からの情報を処理及び記憶するように進化してきた。脳における情報記憶の基礎的重要性にもかかわらず、関与するプロセス及びその進化的起源についての詳細な分子的及び細胞的理解はいまだに欠如している。過去数十年間にわたる研究から、真核生物ゲノムにはウイルスまたはトランスポゾン起源とするDNAが散在し、これらがほとんどの哺乳動物ゲノムの約半分を

50

構成しているということが示された (Smit, 1999)。これらのエレメントにコードされる配列が新たな機能及び調節エレメントの発生のための原材料を提供し得ることはますます認識されてきている (Chuong et al., 2017、Levin and Moran, 2011)。脊椎動物においてこれらは、以前にトランスポゾン (Feschotte and Pritham, 2007、Naville et al., 2016) またはレトロウイルス (Kaneko-Ishino and Ishino, 2012) にコードされた配列に由来する多数のタンパク質コード遺伝子を含む。興味深いことにこれらのトランスポゾン由来遺伝子の多くは脳に発現するが、それらの分子機能はいまだ解明されていないままである。

#### 【0096】

ニューロン遺伝子 Arc は、Ty3/gypsyレトロトランスポゾンファミリーを起源とする可能性があるウイルス群特異的抗原 (Gag) ポリプロテインにみられる構造エレメントを含有するが (Campillos et al., 2006、Day and Shepherd, 2015、Zhang et al., 2015)、Arc 機能においてこれらの Gag エレメントが果たす役割は探究されていない。Arc は哺乳動物のシナプス可塑性の主たる調節因子であり、長期増強 (LTP) 及び長期抑圧 (LTD) のタンパク質合成依存的形態に必要とされる (Bramham et al., 2010、Shepherd and Bear, 2011)。Arc は、エンドサイトーシス機構による AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA R) の輸送によってシナプス可塑性を調節することができる (Chowdhury et al., 2006)。このエンドサイトーシス経路は、ニューロン活性のシナプススケリングによる長期的変化にตอบสนองして表面 AMPA R のレベルを維持し、かくしてニューロン強度の恒常性に寄与する (Shepherd et al., 2006)。脳における Arc の発現は非常に動的であり、その転写は、生体内でのニューロン回路における情報のコード化と密接なつながりがある (Guzowski et al., 1999)。Arc mRNA は樹状突起へ搬送され、局所シナプス活動部位で豊富になり、そこでタンパク質へと翻訳される (Steward et al., 1998、Wang et al., 2008)。興味深いことに、Arc mRNA 調節の態様はいくつかのウイルス RNA に類似している、というのも、Arc は cap 非依存的翻訳を可能にするリボソーム内部進入部位 (IRES) を含有するからである (Balvay et al., 2007、Pinkstaff et al., 2001)。生体内で Arc は、経験を視覚野可塑性の長期継続的变化に変換するため (McCurry et al., 2010) 及び長期間の記憶のために (Guzowski et al., 2000、Plath et al., 2006) 必要とされる。加えて、Arc は、アルツハイマー病 (Wu et al., 2011)、単一遺伝子型の知的障害、例えばアンジェルマン (Greer et al., 2010、Pastuzyn and Shepherd, 2017) 及び脆弱 X 症候群 (Park et al., 2008) ならびに統合失調症 (Fromer et al., 2014、Manago et al., 2016、Purcell et al., 2014) を含めた様々な神経障害に関係があるとされている。このように、神経系における Arc 発現及び活性の精密な調節は正常な認知のために必須であるらしい。

#### 【0097】

Arc タンパク質の生化学及び分子機能についてはその重要性にもかかわらずほとんど知られていない。Arc の 1 つの役割は、細胞外小胞 (EV) による細胞間伝達を媒介することである。シナプス伝達は、グリア-ニューロン相互作用を含めた多くの他の伝達経路によって補足または調節され、現れつつある証拠は、神経系において EV が細胞間シグナル伝達を媒介することを示唆している (Budnik et al., 2016、Zappulli et al., 2016)。EV は大まかには微小小胞とエクソソームとの 2 つの群に分けて定義することができるが、これらは両方とも EV の径及び細胞内起源によって定義される。微小小胞は形質膜から直接くびれ切れ、直径が通常 100 ~ 300 nm である一方、エクソソームは、多胞体 (MVB) から生じる腔内小胞に由来し、径が通常

10

20

30

40

50

100 nm未満である。EVは、形質膜を容易に横切らない積荷、例えば膜タンパク質及び様々な形態のRNAを輸送することができる。EVが神経系内でこれらの分子の細胞間輸送において機能することができるということの観察結果は、脳内の細胞間伝達についての全く新しい見通しを切り開く。

#### 【0098】

Arcタンパク質は、自己組織化してウイルスカプシドに類似したオリゴマーとなり、レトロウイルスGagタンパク質にみられるいくつかの他の生化学的特性、例えば脂質及びRNAとの結合性を呈する。その上、ArcはEV内に入った状態でニューロンから放出され、それ自体のmRNAをニューロン中に移入させることができる。ショウジョウバエArc相同体dArc1も、別個のレトロトランスポゾン系統を起源としているにもかかわらずカプシドを形成してハエ神経筋接合部でそれ自体のmRNAの細胞間移入を媒介する。これらのデータは、レトロウイルス様Gagエレメントの選入が、細胞間シグナル伝達を媒介する新規な機序のための進化経路を提供し、シナプス可塑性及び動物認知の進化に複雑に関与した可能性があることを示している。

10

#### 【0099】

##### 1. 結果

i. ハエ及び四足類のArc遺伝子は独立してTy3/gypsyレトロトランスポゾンの別個の系統から生じた

Arcの進化的起源に注目するために系統解析を実施した(図1A及び図8A)。マウスArc遺伝子の高度に保存された特有のオーソログが四足類(哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類)の全体にわたって同定されたが、魚類系統が全く存在しないのが目立ち、他の新口動物を調べた(94種)。シーラカンス、ゼブラフィッシュ及びコイのゲノムにおいてArcの最たる近縁種は原型Ty3/gypsyレトロトランスポゾンにコードされており、最近の転移活性が示唆された。同様に、ショウジョウバエArc(dArc1, dArc2)のオーソログ及びパラログはデータベースに表された全ての額囊節(真性)ハエにおいて同定されたが、他の任意の双翅類(例えば蚊)または前口動物では検出されなかった(286種、図8B)。ハエArc遺伝子の最たるレトロトランスポゾン近縁種はカイコ及びアルゼンチンアリのゲノムに見つかった。興味深いことに、調べた全ての四足類ではArcが単一コピー遺伝子であると見受けられるものの、当該遺伝子は双翅類進化の間に複数回の重複を経験している(図8B)。系統発生的には四足類Arc遺伝子が魚類からのTy3/gypsyレトロトランスポゾンと共にクラスタを形成するのに対し、ハエArc相同体は昆虫とは別個のTy3/gypsyレトロトランスポゾンの系統と共に群をなしている(図1A)。これらの結果は、以前(Abrusant et al., 2013)に憶測されたように四足類及びハエのArc遺伝子の起源が独立してTy3/gypsyレトロトランスポゾンの別個の系統を起源としており、それでもなおレトロウイルスGagドメインにおいてかなりの相同性を共有している、ということを示している。

20

30

#### 【0100】

ii. Arcタンパク質は自己組織化してウイルス様カプシドとなる

Ty3レトロトランスポゾンは、レトロウイルスカプシドに類似したオリゴマー粒子を形成することができる(Hansen et al., 1992)、またArcも、オリゴマー化する特性を有する(Myrum et al., 2005)。レトロウイルスカプシド形成は感染性にとって必須であり、主にGagポリプロテインによって媒介されるが、これはHIVでは4つの主要な機能性ドメイン:マトリックス/MA、カプシド/CA、ヌクレオカプシド/NC、及びp6を含有する(Freed, 2015)。Arcは、HIVのCA及び泡沫ウイルスGagポリプロテインとの一次配列類似性(Campillos et al., 2006)だけでなく構造類似性(Taylor et al., 2017、Zhang et al., 2015)も有し、ArcがGagタンパク質との機能的類似性を共有している可能性があることを示唆している。Arcタンパク質の生化学的特性を評価するために、ラットArcを細菌においてグルタチオンS転移酵素(GST)融合タンパク質として発現させた。発現したタンパク質を親和性及びサイズ排除クロマト

40

50

グラフィーによって精製し、GSTタグをタンパク質分解によって除去した(図9のA及びB)。ラットArcの精製調製物(prArc)を、陰性染色電子顕微鏡法(EM)及び低温電子顕微鏡法(cryo-EM)を用いて分析した。これらの実験から、prArcが自発的にウイルス様カプシドに類似したオリゴマー構造体を形成することが明らかとなった(図1B)。prArcカプシドは二重殻構造を呈し、平均直径が $32 \pm 0.2$  nmである。同様に、細菌発現させ精製したショウジョウバエArc相同体であるdArc1(図9C)も自己組織化してカプシド様構造体(図1C)となる。昆虫細胞発現系で発現させた精製Arcタンパク質も、組織化して同様のウイルス様カプシドとなり(データ示さず)、オリゴマー化が細菌発現の人為現象でないことが示された。未成熟レトロウイルスカプシドは未切断Gagポリプロテインによって形成され、主要な安定化相互作用はCA領域のC末端ドメイン(CTD)によってなされる(Mattei et al., 2016)。自己組織化に推定上のArc CA CTDも必要とされるか否かを試験するために、このドメインを欠くラットArc突然変異タンパク質(prArc-CTD、アミノ酸[aa]277~374が欠如、図1C、図9のA及びB)を発現させ精製した(Zhang et al., 2015)。EM分析から、prArc-CTDが二重殻カプシドを形成することができないことが明らかになったが、中間体である不規則な構造体が時として観察された(図1C)。

#### 【0101】

Arc CAドメインがカプシド組立てにとって十分であるか否かを試験するために、aa195~364を含有する突然変異Arcタンパク質(CA-prArc; 図1C及び図9A)を作出した。CA-prArcはカプシド様構造体を形成するのに十分ではなかった。Arcカプシドは、HIVカプシドと類似した他の特性、例えば、塩及びホスフェートレベルに対する感受性を呈し(Purdy et al., 2008); NaCl濃度を0から300 mMに上昇させることで安定なprArcカプシドがもたらされ、高NaPO<sub>4</sub>はカプシド形成をさらに安定化させた(図1D)。Arcがオリゴマーを細胞内で形成するか否かを試験するために、内因性Arcを欠くHEK293細胞においてArcを発現させ、オリゴマー種の存在について試験するために化学架橋を実施した。Arcタンパク質は系中で架橋し、二量体及び三量体サブユニットを予想されるSDS-PAGE移動度を有してより高い分子量種を形成したが(図9D)、これは、類似した架橋アッセイを用いるHIV Gagサブユニットを思い起こさせる(Campbell and Rein, 1999)。対照的に、トランスフェクトされたGFPは同じ条件下でより高い分子量の架橋を形成しなかった。

#### 【0102】

iii. ArcはRNAに結合し、それを中に封入する

レトロウイルス中へのウイルスゲノムRNAの封入は、GagとRNAと脂質膜との間の相互作用ネットワークによって媒介される複雑なプロセスである(Mailler et al., 2016)。HIV Gagは、ウイルスRNA結合及び選択を媒介するNCドメイン内の亜鉛フィンガーナックルモチーフを含有するものの(Carlson et al., 2016)、ウイルスRNAの非存在下ではGagは細胞mRNAにも結合することができ、これは、基礎的なMA及びNCドメインとの非特異的RNA相互作用を反映している可能性がある(Comas-Garcia et al., 2016)。興味深いことに、泡沫ウイルスGagは亜鉛フィンガードメインを含有せず、C末端のグリシン-アルギニンに富む部分によってRNAに結合し(Hamann and Linderman, 2016)、異なるウイルスファミリーからの別個のGagドメインが類似した生化学的プロセスを実施するように進化したことを示唆する。泡沫ウイルスGagと同様に、Arcは亜鉛フィンガードメインを含有しないようであるが、そのN末端におけるイオン相互作用によってRNAに結合する可能性がある。prArcはRNAまたは他の核酸と同時に精製されるようであった、というのも、調製物は純粋な組換えタンパク質について予想されるよりも高いA260/280分光光度測定比率を有していたからである(prArc 1.04 ± 0.024; エンドフィリン3A 0.55 ± 0.006, n = 3, p

10

20

30

40

50

< 0.01、図9B)。ArcはRNAに結合してそれを中に封入することができると考えられた。prArcカプシドがmRNAを収容するか否かを確認するために、Arc mRNA及び非常に豊富に存在している細菌mRNAであるasnA (Zhou et al., 2011)のレベルを、qRT-PCRを用いて測定した。Arc及びasnA mRNA (図2A)はどちらも測定された。しかしながら、Arc mRNAレベルの方がasnAよりも10倍高かった。細菌細胞溶解物はasnAよりも15倍高いArc mRNAレベルを含有し(図2A)、prArcカプシドが特定のmRNAに対する特異性をほとんど示さないが化学量論に従って豊富に存在しているRNAを中に封入するということを示していた。mRNAがカプシドの中に封入される場合、それはリボヌクレアーゼ(RNアーゼ)処理に対して耐性でなければならない。RNアーゼはArc mRNAもasnA mRNAも減成させなかったが外来遊離GFP mRNAを有意に減成させ(図2B)、Arc及びasnA mRNAがRNアーゼによる減成から保護されたことが示された。

10

#### 【0103】

iv. Arcタンパク質がArc mRNAと会合するか否かを生体内で、マウス皮質溶解物からArcタンパク質を免疫沈降させること及びその後のqRT-PCRによって試験した(図2C)。Arc mRNAは選択的にArcタンパク質と共に免疫沈降(IP)することが分かったが、その一方でGAPDHはIPでは強化されなかった。これらの結果は、生体内でArcタンパク質とそのmRNAとがニューロン中で複合体を形成することを示している。Arcカプシド組立てにはRNAが必要である

20

未成熟ウイルスカプシドを形成するためにはHIV GagがRNAと結合しなければならない(Mailler et al., 2016)。Arcカプシド形成がRNAを必要とするか否かを試験するために、完全長Arcタンパク質を上記のとおり精製し、その後、以前(Ganser et al., 1999)にHIV Gagに対して実施されたとおりに結合核酸を除去した(「prArc(RNA)」、図S3A)。この手順はA260/280比率を有意に低下させ(prArc(RNA)  $0.68 \pm 0.03$ 、prArc  $1.04 \pm 0.024$ ;  $n=3$ 、 $p < 0.05$ )、qRT-PCRではArc mRNA会合を検出することができなかった(図2D)。RNAを除去することによって、完全に形成されたカプシドが有意により少なくなり(図2E)、Arcカプシドが正常な組立てのためにRNAを必要とすることが示唆された。RNAが直接Arcカプシド組立てを促進したことを示すために、prArc(RNA)にGFP mRNAを外因的に加えたが(7.3% w/w)、その結果、完全に形成されたArcカプシドは有意により多くなった。

30

#### 【0104】

v. Arcタンパク質及びArc mRNAは細胞外小胞の中に入った状態でニューロンによって放出される

レトロウイルスカプシド及びEVは、類似した細胞機構、例えばMVB経路を用いて細胞から放出される(Nolte't Hoenet al., 2016)。ArcはウイルスGagタンパク質の生化学的特性の多くを呈するので、Arcタンパク質が同様に細胞から放出され得るか否かを試験した。ArcトランスフェクトHEK293細胞から培地を採集し、EV画分を精製した。この画分は100nm未満の小胞状構造体を含有し、エクソソームに類似していた(図S3B)。Arcタンパク質はEV画分中に検出され、これはEVマーカーALIXに対しても陽性であったがアクチンを欠いていた(図3A)。逆に、Arc-CTDトランスフェクトHEK細胞はEV画分において発現をほとんど呈さず(図3B)、EVを介したArc放出には適切なArcカプシド組立てが必要とされ得ることを示していた。qRT-PCRをHEK細胞培地からのEV画分に対して実施し、RNアーゼ処理に対して耐性であるArc mRNAを検出した(図3C)。

40

#### 【0105】

IV15の培養皮質マウスニューロンから採集した培地から調製したEV画分中には天然Arcタンパク質も見つかった(図3D)。Arc mRNAは脳溶解物中でArcタ

50

ンパク質と会合するので、RT-PCRを用いて、ニューロンから精製されたEVの中にもArc mRNAが存在することを示した(図3E)。EV内のArcタンパク質はトリプシン消化に対して耐性であり(図10C)、Arcタンパク質及びRNAがEV内で複合体となって保護されているかまたは結合していることが示唆された。Arcタンパク質がEV内に存在するか否かを直接判定するために、培養ニューロンからのEV画分において内因性Arcのイムノゴールド標識を行い、ArcがEVの垂集団の中に存在することを発見した(図3F)。EV内に入った状態でのArcの放出が活性依存性であるか否かを試験するために、未処理またはKCl処理野生型(WT)培養皮質ニューロンから回収した培地からEV画分を精製した(図10D)。ニューロン活性を増大させるKCl処理の結果として、培地中に放出されるArcが有意により多くなった。

10

## 【0106】

v i . 細胞外小胞においてArcはそれ自体のmRNAの細胞間移動を媒介する

ウイルス粒子がウイルスエンベロープと宿主細胞膜との複雑な相互作用によって細胞に感染することができる一方、EVもRNAなどの積荷を細胞間で移動させることができる(Valadiet al., 2007)。ArcはmRNAを、prArcの中に封入されたmRNAによって直接移動させるか、Arc含有EVの中に入った状態で移動させるかのどちらかであり得る。GFP/myc-Arcまたはnuclear-GFPをHEK(ドナー)細胞にトランスフェクトし、18時間後にこれらの細胞から培地を回収し、次いでこれを未トランスフェクトナイーブHEK(レシピエント/「移入される」)細胞と共に24時間インキュベートした。高いArc発現がナイーブHEK細胞のまばらな集団に認められた(図4A)一方、nuclear-GFPのみがトランスフェクトされた細胞からの培地と共にインキュベートされた細胞はnuclear-GFPを発現させなかった。Arc mRNAの蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)はレシピエント細胞において高レベルのArc mRNAを明らかにした。Arcタンパク質及びmRNAの取込みはエンドサイトーシス依存性であった、というのも、Dynasore(クラスリン依存性エンドサイトーシスの強力な阻害薬[Macia et al., 2006])の適用によってArcタンパク質の移動が有意に阻止されたからである(図11A)。試験管内ではArcカプシドによるRNAの封入が非特異的であるので、非常に豊富に存在しているmRNAと共にArcが移入することができるか否かを試験した。ドナーHEK細胞にmyc-Arc及び/または膜結合GFP(mGFP)をトランスフェクトし、24時間後に培地を回収した。ドナー細胞がArcを含有していた場合、レシピエントHEK細胞はGFPタンパク質及びmRNAの両方の明瞭な移入を示した(図4B)。mGFPのみをトランスフェクトされた細胞からは、移入が認められなかった。これらのデータは、HEK細胞から放出されたArc EVが、非常に豊富に存在しているmRNAを細胞間で移動させることができることを示している。

20

30

## 【0107】

ArcカプシドがArc mRNAをニューロン中に移入させることができるか否かを試験するために、Arcノックアウト(KO)マウスからの培養海馬ニューロンをprArcと共にインキュベートした。Arc KO株はArc遺伝子座の中にノックインされたGFPを含有するため(Wang et al., 2006)、Arcは赤色チャンネルで撮像され、緑色チャンネルでGFP蛍光を検出することはできなかった(図11B)。タンパク質インキュベーションの1時間以内にKOニューロン中へのArcタンパク質の取込みが抗体バックグラウンドレベル(抗体特異性について図11C参照)よりも高く認められたが、これはインキュベーション4時間目あたりをピークとしていた(図5A)。ArcカプシドがArc mRNAをニューロンの中に移入させることができるか否かを直接判定するために、prArcと共にインキュベートしたArc KOニューロンにおいてArc mRNAレベルを測定した。prArcとのインキュベーションの4時間後にArc FISHは堅牢な高レベルの移入Arc mRNAを示した(図5B)。ArcカプシドがArc mRNAを保護して中に封入することができることをさらに示唆して、インキュベーション前のprArcのRNAアーゼ処理はmRNA移入に対して何ら影響

40

50

を与えなかった(図12A)。Dynasoreを使用したエンドサイトーシスの阻止はprArcタンパク質及びArc mRNAの取込みを両方とも妨げた(図12B)。樹状突起において(Rab5を特徴とする)初期エンドソームでも非エンドソーム画分でも、移入したmRNA及びタンパク質は明らかであった(図12C)。精製prArc-CTD及びCA-prArcタンパク質及びmRNAの取込み及び移入はどちらも有意に完全長タンパク質に比べてより少なく、カプシド形成がニューロン中への取込みに必要とされることが示唆された(図5のC及びD)。タンパク質取込みの欠如は、特注Arcポリクローナル抗体による検出不良を原因とするものではなかった(図12D)。印象深いことに、完全なArcカプシドが取込み及び移入に必要とされることをさらに示唆して、prArc(RNA)は取り込まれることができなかったがその代わりにニューロンの外側を覆った(図13)。

10

## 【0108】

内因性ArcがmRNAを移入させることができるか否かを試験するために、Arc KO培養海馬ニューロンを、WTまたはKO皮質ニューロンからの培地から調製した精製EVと共にインキュベートした。WT EVと共にインキュベートされたArc KOニューロンが樹状突起Arcレベルの明らかな上昇を示した一方、KO細胞に由来するEVと共にインキュベートされたKOニューロンは樹状突起Arcレベルの上昇を呈さなかった(図6A)。さらに、FISHはWT EV内のArc mRNAがKOニューロン中に移入したことを示した(図6B)。Arc mRNAの取込みは、取込みがEV画分中の遊離または未結合Arc mRNAに起因していないことを示唆して、RNAアーゼによるEVの前処理によって有意に影響を受けなかった(図14A)。Dynasoreによるエンドサイトーシスの阻止は、EVからのArcタンパク質及びmRNAの取込みを妨げた(図14B)。とりわけ、移入Arc mRNA発現は初期エンドソームにおいても非エンドソーム画分においても細胞全体への局在化を呈し(図14C)、事実上、WTニューロンにおけるArc mRNA分布との区別がつかなかった。これらのデータは、EVによって放出された内因性ArcがArc mRNAをニューロン間で移動させることができることを示している。

20

## 【0109】

vii. 移入したArc mRNAは活性依存的な翻訳を受けることができる

Arcカプシドと会合したArc mRNAはニューロンの細胞質中に移入し、以前に内因性Arcについて示されているように(Waung et al., 2008)、作動薬DHPGによる代謝型グルタミン酸受容体1型(mGluR1/5)の活性化によってArc mRNAの翻訳を誘導することによる樹状突起Arcタンパク質の増加が認められるであろう。予測されるように、Arc KOニューロンの樹状突起においてArcタンパク質レベルは、prArcと共にインキュベートされた細胞にDHPG(5分、100 mM)を適用した後に有意に上昇した(図7A)。この上昇は、DHPG適用前にタンパク質合成阻害薬(シクロヘキシミド、180 mM)を添加した場合には明瞭とならなかった。WT EVと共に4時間インキュベートされその後にDHPGで処理されたKOニューロンは、同様にタンパク質合成に依存した樹状突起Arcレベルの上昇を呈した(図7B)。これらの実験は新たに翻訳されたArcと取り込まれたタンパク質とを明確に区別することはできなかったが、これらのデータは、ArcカプシドまたはEVがArc mRNAをニューロン間で移動させることができること、及びこのmRNAが樹状突起の細胞質において活性依存的な翻訳のために利用可能であることを示唆している。

30

40

## 【0110】

哺乳動物Arcタンパク質は、レトロウイルス及びレトロトランスポゾンによってコードされるGagタンパク質の主な特質を呈する：カプシドへの自己組織化、RNA封入、脂質結合、EVの中に入った状態での放出、及び細胞間でのRNAの転送。これらのデータは、Arc EV(本発明者らはこれを、Arc RNAを運ぶArcカプシド(Arc Capsids Bearing Arc RNA)という意味でACBARと呼ぶ)を介してArcがmRNAの細胞間輸送を媒介することを示唆しており、ニューロン間で遺伝

50

情報を転移させ得る新規な分子的機序を明らかにしている。

【0111】

viii. Arcは転用されたGagタンパク質として機能する

データは、ArcにおけるウイルスGag特性の注目すべき保存を示している。ArcはGag CAドメインとの構造的相同性を示す(Zhang et al., 2015)ことから、自己組織化してオリゴマーカプシドとなる能力はおそらくあまり驚くことではない。しかしながら、Arcは、その配列から直感されないGagの他の重要な生化学的特性を保持しているとみられる。HIV Gagにあるような明瞭な亜鉛フィンガーRNA結合領域が欠如しているにもかかわらずArcは中にRNAを封入し、RNA結合はカプシド形成にとって必須であるとみられる。これは、HIV Gagとは異なるRNA結合モチーフを進化させ(Hamann and Lindemann, 2016)なおかつ構造的にArcと類似している(Taylor et al., 2017)泡沫ウイルスGagを思い起こさせる。HIV Gag-RNA相互作用は複雑であり、MAドメインを含めたGagの複数の構成部分が関与しており、宿主細胞因子によって調節される(Mailler et al., 2016)。Gag MA-RNA相互作用はさらに膜におけるウイルス粒子形成にとって必須である(Kutluay et al., 2014)。しかも、ウイルスRNAが存在していない場合にGagは中に宿主RNAを封入し、20~30ntよりも長い任意の一本鎖核酸はカプシド組立てを支援する可能性があり(Campbell and Rein, 1999)、豊富に存在しているRNAと結合する全般的な傾向が示唆される。実際、厳密にどのようにして細胞内でウイルスRNAが優先的にGagカプシドの中にパッケージングされるのかは、集中的研究分野であり続けている(Comas-Garcia et al., 2016)。

10

20

【0112】

精製Arcタンパク質によるRNAの取込み及び移入は驚くべきことである、というのも、これは「エンベロープ」または脂質二重膜の非存在下で起こるからである。精製Arcカプシド及び内因性EVの両方の取込みはエンドサイトーシスによって起こる。EV及びエクソソームはエンドソーム経路によって簡単に取り込まれるが、RNAが膜融合タンパク質なしでどのようにしてエンドソーム膜を横切ることができるのかは不明なままである(Tkach and Thery, 2016)。データは、無エンベロープウイルスのようにArcタンパク質自体がRNAをエンドソーム膜の向こう側へ移動させる能力を含んでいることを示している。無エンベロープカプシドがどのようにしてRNAを細胞質中へ移入させるのかは不明なままであるが、いくつかの研究は、これが特異的な受容体-カプシド相互作用によって、または膜の孔形成か溶解的減成かのどちらかを可能にするカプシドのpH依存的な配座変化によって起こる可能性があるとして提案している(Tsai, 2007)。Arcタンパク質はエンドソーム膜と相互作用して、カプシドが解体される時に細胞質中へのmRNAの移入を可能にすることができる。これは、これらの実験で見られるタンパク質取込みとmRNA発現との時間差に反映されており、この時間差は、mRNAが本発明者らのFISHプローブに到達できるようになるまでに要する時間の結果であり得る。生体内でACBARの周囲の脂質膜が標的指向化及び取込みを要求し得るのに対し、中に入っているArcカプシドはRNAを保護しその移入を可能にする。興味深いことに、RNAを欠くprArcはカプシドを形成することができず、取り込まれることができず、取込みが、適切に形成されたカプシドを必要とする調節されたプロセスであり得るといことが示唆される。Arcは天然に存在するRNA移動機序を調節するとみられることから、この経路を利用することは、免疫活性化の障壁を回避することができるACBARを使用する遺伝子操作または細胞内へのRNA送達の新たな手段を可能にすることができる。

30

40

【0113】

ix. ArcのGag相同性はニューロンの新たなシグナル伝達経路を明らかにする

エクソソーム及びEVシグナル伝達は、とりわけ免疫系及びがん生物学において、細胞内伝達の必須の機序として浮かび上がった(Becker et al., 2016)。し

50

かしながら、神経系におけるEVによる細胞間シグナル伝達の役割は最近になってようやく調査されたものであり、研究はこれらの経路がシナプス可塑性において重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している (Budnik et al., 2016、Zappulli et al., 2016)。標準的なエクソソームはMV B内に形成されるが、これはエンドソーム経路に由来するものであり、放出されるには大抵ESC RT複合体を必要とし (Raposo and Stoorvogel, 2013)、但し一般的にEVの生合成にはもっと様々なものがある。HIV Gagは、MV Bとは無関係にピリオンを形成することができるが、ESC RT機構はなおも粒子放出のために必要とされ、このことから、Arcは標準的なエクソソーム経路とは無関係にACBARを形成する可能性がある。これらの経路は相互に排他的ではなく、ニューロン中でのACBARの生合成を解明するにはさらなる調査が必要である。

10

#### 【0114】

Arcは樹状突起において局所的に速やかに合成されるので (Park et al., 2008、Waung et al., 2008)、樹状突起に局在化したmRNAの封入が起こり得る樹状突起においてArcタンパク質の高い局所濃度がカプシド組立てを促進するということが考えられる。試験管内でArcカプシドはRNA結合において特異性を示すようではなく、Arc EVは、非常に豊富に存在しているmRNAを移動させることができることから、本発明者らは、ACBAR積荷の特異性がニューロンにおけるArcタンパク質の正確な空間的及び一時的発現によって付与されると推測する (図14D)。脳からのArcタンパク質と会合したArc mRNAの同定と一貫してArc mRNAレベルは、生体内でニューロン活動または経験が起こった後に樹状突起において比類なく非常に豊富に存在する (de Solis et al., 2017)。Gag-RNA相互作用は、ニューロンにおけるArc mRNAを含めた樹状突起mRNA輸送の必須の調節因子でもあるタンパク質であるStaufen (Mouland et al., 2000)などの宿主細胞タンパク質によって調節される (Heraud-Farlow and Kiebler, 2014)。樹状突起mRNA調節とウイルス-RNA相互作用との並行は印象深いものであり、細胞因子がACBAR生合成及びRNA充填において重要な役割を果たすことができることを示している。

20

#### 【0115】

データはさらに、Arcが細胞間シグナル伝達を媒介して非細胞自律的にシナプス機能及び可塑性を制御することができることを示している。ニューロンEVについてのデータが不足しているが、以前の研究は、EVが活性依存的に分泌され得、積荷としてAMPA Rを含み得るということを示した (Faure et al., 2006)。Arcは以前に弱いシナプス (Okuno et al., 2012)でのシナプス及び棘の刈り込み (Chowdhury et al., 2006、Mikuni et al., 2013)の時にAMPA R輸送に関係があるとされたことから、ACBARの潜在的役割はシナプス物質を刈り込むことである可能性がある。Arcはまた、AMPA Rスケールリング (Shepherd et al., 2006)及び種々の脳領域にわたる異種感覚間の可塑性 (Kraft et al., 2017)などの可塑性の恒常性形態も調節するが、これらは回路レベルで非細胞自律的に調節されている可能性がある。細胞の情報固定化に必要とされる、隣接細胞の状態を変化させる細胞間積荷を運ぶArc機能の解放。

30

40

#### 【0116】

以前の研究は、ショウジョウバエ神経筋接合部可塑性が、エクソソームにおいてWnt経路によって媒介されるシナプス間シグナル伝達を必要とすることを示した (Korkut et al., 2009)。興味深いことに、ショウジョウバエArc相同体dArc1は、八工神経系におけるmRNAの細胞間移動の類似した特性を呈し、ショウジョウバエEV内に最も豊富に存在するタンパク質の1つであり (Ashley et al., 2018、Lefebvre et al., 2016)、これらの種の広い進化分岐にもかかわらず注目すべき生物学的収斂が示唆される。近年の研究はさらに、Arcが哺乳動物免疫系に関係があるとしており (Ufer et al., 2016)、この場合、Ar

50

cは樹状細胞依存的T細胞活性化を制御し、神経系を超えてArc依存性細胞間シグナル伝達の潜在的レポーター及び重要性を拡張する。しかも、EVは様々な神経変性障害の病理に関係があるとされている、というのも、いくつかの病原体タンパク質、例えば、プリオン、 $\alpha$ -アミロイドペプチド、及び $\beta$ -シヌクレインはEVと会合した状態で細胞から放出されるからである(Zappulli et al., 2016)。ADでは、ADを有する患者からの脳切片における免疫組織化学的分析は、老人斑の周辺にエクソソームマーカーALIXが豊富に存在することを示した(Rajendran et al., 2006)。これは、EVが細胞外 $\alpha$ ペプチドの重要な供給源を提供している可能性があることを示唆している。Arcは、ACBARがAD病理にも関与している可能性があることを示唆して、プレセニンとの相互作用によってAPPの活性依存的切断及び $\beta$ -アミロイド産生を調節する(Wu et al., 2011)。

10

#### 【0117】

##### x. シナプス可塑性及び認知の進化

Ty3/gypsyレトロトランスポゾン、真核生物ゲノムに広く分布しておりしばしば豊富に存在している古来の移動性エレメントであり、現在のレトロウイルスの祖先であると考えられる(Malik et al., 2000)。Ty3/gypsy及びその他のレトロウイルス様エレメントに由来するコード配列は、進化の間に繰り返し細胞機能に転用された証拠がある(Feschotte and Gilbert, 2012)。例えば、レトロウイルス起源の複数のエンベロップ遺伝子は、哺乳類進化の間に選入されて細胞間融合、及び発達中の胎盤における合胞体栄養細胞層形成を促進した(Cornelis et al., 2015)。ヒトゲノムだけで100種より多くのGag由来遺伝子が存在し(Campillos et al., 2006)、それらのマウスオーソログの遺伝子KOは、Arcのようにいくつかは認知に不可欠であることを明らかにした(Irie et al., 2015)。しかしながら、これらのGag由来タンパク質の分子機能は十分に特性評価されておらず、それらが類似した細胞プロセスを提供すべく選入されたか否かについては疑問であり続けている。この研究及び付随するAshley et al. (2018)による論文はいま、2つの遠縁のGag由来遺伝子が独立して八エ及び四足類祖先に選入されて神経系におけるRNAのEV依存性細胞間輸送の類似したプロセスに関与していることを明らかにする。

20

#### 【0118】

##### 2. 方法

##### i. プラスミド

完全長ラットArc(NP\_062234.1)cDNAのオープンリーディングフレーム(ORF)をpRK5-myc-Arcからサブクローニングした。インサートをPCRによって増幅し、BamH1及びXho1によって消化し、pGEX-6p1(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)発現ベクターのBamH1及びXho1制限部位の間にライゲートした。GST-Arc ORFを同様に増幅し、pFastBac1ベクター(Thermo Fisher Scientific)にBamH1及びXho1制限部位の間でクローニングした。prArc-CTDは、aa277~374をコードする配列を除いてpGEX-6p1-ArcからArc ORFをPCR増幅した後に平滑末端クローニングによって生成された。同様にArc ORFのaa195~364(CA-prArc)をpET11aベクターにクローニングしたが、これはHisタグを含有するものであった。pBluescript-SKII-GFPは、(東京大学のHaruhiko Bitto博士の厚意により提供された)pGL4.11-arc7000-mEGFP-ArcUTRsからのmEGFP(BBA16881.1)の制限消化、及びその後の(ユタ大学のKristen Keefe博士の厚意により提供された)pBluescript-SKII-ArcUTRsプラスミド中のインサートに隣接するKpnI及びSacI制限部位へのライゲーションによって生成された。pGEX-4T-1ショウジョウバエArc1(NP\_610955.1)構築物は、ユタ大学のMark Metzstein博士により提供された。EGFP

30

40

50

- C3 - Arc及びpRK5 - myc - ArcはそれぞれKimberly Huber博士(UT Southwestern)及びPaul Worley博士(ジョンズ・ホプキンス大学)の厚意により提供された。全てのタンパク質発現構築物でDH5 a E. coli細胞を形質転換し、個々のコロニーを、Integrated DNA Technologies(Coralville, IA)によって合成されたプライマーを使用してサンガーシーケンシング(GeneWiz, South Plainfield, NJ)配列決定サービスによってスクリーニングした。ユタ大学から入手することができるA Plasmid Editor(APE)フリーウェアを使用してトレースファイルを解析した。次いで、配列決定され検証された構築物でBL21 - DE3細菌細胞をタンパク質発現のために形質転換した。

10

【0119】

## ii. タンパク質精製

タンパク質発現のための初発細菌培養物を、アンピシリン及びクロラムフェニコールを補充したLBの中で一晩37°Cで成長させた。初発培養物を使用してZY自動誘導培地の大型500mL培養物に接種した。大型培養物を37°Cで150rpmで0.6~0.8のOD600にまで成長させ、その後150rpmで19°Cに遷移させて16~20時間経過させた。次いで、培養物を4°Cで5000xgで15分間ペレット化し、細胞ペレットを30mLの溶解用緩衝液(Arc構築物及びGSTについては500mMのNaCl、50mMのトリス、5%のグリセロール、1mMのDTT、室温(RT)でpH8.0; エンドフィリン3Aについては300mMのKCl、50mMのトリス、1%のTriton X-100、1mMのDTT、RTでpH7.4)の中に懸濁させ、液体窒素中で瞬間冷凍した。冷凍ペレットを37°Cで素早く解凍し、DNアーゼ、リゾチーム、アプロチニン、ロイペプチン、PMSF及びペプスタチンを補充した10mLの溶解用緩衝液に対して1gのペレットとなる終体積にした。次いで溶解物を90%のデューティーサイクルで8~10回の45秒のパルスの超音波処理に掛け、21,000xgで45分間ペレット化した。GSTタグ付き構築物のために、清澄化した上清をその後0.45mmのフィルターに通し、前もって平衡化したGSTセファロース4B親和性樹脂と共に自然落下式カラム内で一晩4°Cでインキュベートした。その後、結合タンパク質を2カラムポリューム(各々20の樹脂床体積)の溶解用緩衝液で2回洗浄し、150mMのNaCl、50mMのトリス、1mMのEDTA、1mMのDTT、RTでpH7.2によって再平衡化し、GSTタグ付き構築物に対してPreScission Protease(GE Healthcare)を使用して、またはdArc1に対してトロンピン(Sigma-Aldrich)を使用して樹脂上で一晩4°Cで切断を行った。その後、切断されたタンパク質の緩衝液を150mMのNaCl、50mMのトリス、RTでpH7.4に替えてプロテアーゼ活性をなくし、S200サイズ排除カラムに流して切断されたタンパク質を分離し、ピーク画分をプールした。セファロース4B樹脂を使用してGSTを上記のとおり親和性精製し、15mMの還元型L-グルタチオン、10mMのトリス、RTでpH7.4を使用して直接溶離させた。Ni<sup>2+</sup>樹脂(Roche, Basel, Switzerland)を使用してHisタグ付きCA-prArcを上記のとおり親和性精製し、250mMのイミダゾール、10mMのトリス、RTでpH7.4を使用して直接溶離させた。その後、GST及びCA-prArcの緩衝液を150mMのNaCl、50mMのトリス、RTでpH7.4に替えた。prArc(RNA-)調製物のために核酸からArcタンパク質を除去すべく20mMのNaCl、50mMのトリス、5%のグリセロール、2mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのDTT、RTでpH8.0の中に細胞ペレットを上記のように溶解させた。細胞上清から、10%のPEI、pH8.0を滴加して0.1%の終濃度にする事及びそれに続く4°Cで20分間のインキュベーション、及び27,000xgで20分間ペレット化することによって核酸を析出させた。その後、得られた上清に飽和硫酸アンモニウムを30%の終濃度になるまで添加することによって沈殿させた。沈殿したタンパク質を10,000xgで10分間ペレット化し、60mLの溶解用緩衝液の中に再懸濁させ、そして親和性精製した。切断された親和性精製生成物をその

20

30

40

50

後 Q - カラム用緩衝液 A ( Q - A ; 20 mM の NaCl、50 mM の トリス、RT で pH 7.4 ) で一晚透析した。透析したタンパク質をその後、Q - A 緩衝液から Q - B 緩衝液 ( 1 M の NaCl、50 mM の トリス、pH 7.4 ) までの勾配でアニオン交換クロマトグラフィー ( HiTrap Q、GE Healthcare ) に供した。精製タンパク質の平均収率は細胞培養物 1 リットルあたり 10.5 mg ( 8 ~ 13 mg ) であった。電子顕微鏡法

#### 【0120】

##### iii . 陰性染色

全ての陰性染色検体のために Formvar 及びカーボンで被覆された銅製 200 メッシュ格子 ( Electron Microscopy Sciences or Ted Pella, Redding, CA ) を真空チャンバ内で 30 mA で 20 ~ 45 秒間グロー放電させた。その後、3.5 mL の試料を格子に塗布して 35 ~ 45 秒間経過させ、そして濾紙を使用して余剰の試料を吸い取らせた。次いで、格子をすぐさま 2 ~ 4 回、30 mL の水滴で 5 秒間洗浄し、その後、パラフィルム上で 1 % の酢酸ウラン ( UA ) で 1 回洗浄した。余剰の水 / UA を吸い取らせ、次いで最終の UA の液滴を塗布して 30 秒間経過させた。余剰の UA を吸い取らせ、格子を 30 ~ 60 秒間掛けて風乾した。Gatan Orius SC200B CCD カメラを装備し 120 kV で作動させた FEI T12、FEI Tecnai Spirit 顕微鏡か、JEOL 1400 電子顕微鏡かのどちらかを使用して撮像を実施した。

#### 【0121】

##### a . 低温 EM

精製 Arc タンパク質を 300 mM の NaCl、50 mM の トリス、pH 7.4 で透析し、Amicon 100 MWCO 遠心分離フィルター ( Millipore, Burlington, MA ) を使用して 2 回濃縮して 2 mg / mL の終タンパク質濃度にした。直径 10 nm の金ビーズを試料に添加した。脱気した 2 / 2 - 3 C C - 平板格子 ( Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA ) を 30 mA で 45 秒間グロー放電させた。試料を格子に 2 回塗布して 30 秒間経過させ、FEI Vitrobot Mark IV を使用して格子を液体エタン中に投入し凍結させた。FEI Falcon II 直接検出器を装備し 200 kV で作動させた FEI Tecnai G2 F20 顕微鏡を使用して顕微鏡写真を取得した。公称焦点ぼけは 1.3 mm であった。

#### 【0122】

##### b . EM 定量

格子を目視で調べて試料塗布が均一になされているかを確認した。各実験において、無作為的に選択した正方形格子から 6 つの画像を撮った。その後、完全及び部分的に形成された 20 ~ 40 nm の粒子を手作業で ImageJ を使用して計数した。計数を画像視野 ( 2.07 mm<sup>2</sup> ) で割ってデータをオリゴマー計数 / mm<sup>2</sup> として表した。

#### 【0123】

##### c . Arc カプシド組立てアッセイ

GFP mRNA を prArc ( RNA - ) ( 低塩緩衝液 : 20 mM の NaCl、50 mM の トリス、RT で pH 7.4 の中に、5 mg / mL ) に 7.3 % ( w / w ) の核酸 : タンパク質比率で添加した ( 10 ヌクレオチドに対して 1 分子の Arc に対応する ) 。次いで反応系を低塩緩衝液またはカプシド組立て用緩衝液 ( 500 mM の NaPO<sub>4</sub>、50 mM の トリス、0.5 mM の EDTA、RT で pH 7.5 ) の滴加によって 1 mg / mL の prArc ( RNA - ) に希釈し、RT で 2 時間インキュベートした。インキュベート後に 0.25 mg / mL の各反応系で陰性染色 EM 格子を作製し、カプシド形成を手作業による 6 つの画像の計数によって定量した。完全に形成されたカプシドは明瞭な二重殻を有する 20 ~ 50 nm の球形粒子を含んでいた。同様の結果が 3 つの独立したタンパク質調製物にみられた。

#### 【0124】

## d . 動的光散乱

精製 Arc タンパク質を Malvern Zetasizer Nano ZSP 装置による動的光散乱測定に供した。散乱は 25° で 173° の固定角度（後方散乱）で行った。散乱強度は、球形粒子からの散乱強度が粒径の 6 乗に比例するという仮定の下で粒子数として表される。系統学的再構築

【0125】

## e . 動物

ヒトまたはキイロショウジョウバエ Arc タンパク質配列を使用して tBLASTn を使用して NCBI ゲノム配列データベースを照会した。CENSOR プログラムを使用して Repbase も照会して、哺乳動物またはハエ亜目 Arc 遺伝子との高い配列類似性を有する既知の反復ファミリーをそれぞれ同定した。以下の配列 ID を解析に使用した：

(GenBank 遺伝子座) Mm ARC - - AHBB01089569; Hs ARC - - LIQK02016549; Ac ARC - - AAWZ02020354; Lc gypsy2 - - AFYH01030203; CC gypsy - - LHQP01046008; Dm ARC1 - - JSAE01000572; Ds ARC1 - - CAKG01020471; Sc ARC1 - - LDNW01019671; Dm ARC2 - - JXOZ01003752; Ds ARC2 - - AWUT01001000; Sc ARC2 - - LDNW01019670; Bm gypsy - - BABH01046987; Tc gypsy - - AAJJ02003810。Repbase: Lc gypsy - - Gypsy2 -

1 - I\_\_Lch; Dr gypsy26 - - Gypsy - 26 - I\_\_DR; Lh gypsy11 - - Gypsy - 11\_\_LH - I; Dm gypsy1 - - Gypsy1 - I\_\_DM; ty3 - - TY3。Arc タンパク質及び他の関連 Ty3 / gypsy エlement との

高い類似性を有することが分かったタンパク質 (Arc 及び Gag) 配列のアラインメントを、MUSCLE プログラムを使用して行った。後のデフォルトパラメータを使用する最尤度系統学的再構築のために、切り取った Arc / Gag アラインメントを MEGA7 にアップロードし、500 のブートストラップ反復を実施して系統樹を生成した。キイロショウジョウバエ dArc1 及び dArc2 タンパク質配列を使用して BLASTp を使用して 額嚢節ハエタンパク質データベースを照会した。調べた種の 1 対 1 のオソログに darc1 が存在する場合、予想以上に多くのヒットが認められた。MUSCLE を使用してタンパク質 FASTA 配列のアラインメントを行い、MEGA を使用して最尤度系統図を生成した。動物

【0126】

Arc ORF (Wang et al., 2006) の中に GFP がノックインされている Arc ノックアウト (KO) マウス (NIH の Kuan Wang 博士からの寄贈)、及び野生型 (WT) C57BL/6 同腹仔を海馬及び皮質溶解物実験に使用した。海馬及び皮質初代ニューロン培養物を WT または KO E18 胚から調製した。

【0127】

## iv . 細胞培養

初代ニューロン培養物を、以前 (Shepherd et al., 2006) に記載されているとおりに E18 マウスの皮質及び海馬から調製した。組織を DNアーゼ (0.01%; Sigma-Aldrich) 及びパイン (0.067%; Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ) で引き離し、その後、火炎研磨したガラスピペットで粉碎して単細胞懸濁液を得た。1000 x g で 4 分間、細胞をペレット化し、上清を除去し、細胞を再懸濁させ、TC-20 細胞計数装置 (Bio-Rad, Hercules, CA) で計数した。12 ウェルプレート (Greiner Bio-One, Monroe, NC) 内に 90,000 細胞/mL、または 10 cm プラスチック皿内に 800,000 細胞/mL のニューロンを、ポリ-L-リジン (0.2 mg/mL; Sigma-Aldrich) で被覆されたカバースリップ (Carolina Biological Supply, Burlington, NC) の上に播種した。ニューロンをまず、5% の CO2 を含有する 37°C のインキュベータ内で、5% のウマ

10

20

30

40

50

血清、2%のGlutaMAX、2%のB-27、及び1%のペニシリン/ストレプトマイシンを含有するNeurobasal培地(Thermo Fisher Scientific)に播種した。DIV4に、1%のウマ血清、GlutaMAX、及びペニシリン/ストレプトマイシン、2%のB-27、及び5 $\mu$ Mのシトシン-D-アラビノフラノシド(AraC)を含有するアストロサイト調整Neurobasal培地(Sigma-Aldrich)を半量培地交換によってニューロンに供給した。その後3日ごとにアストロサイト調整培地をニューロンに供給した。

#### 【0128】

10%のウシ胎仔血清及び1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM培地(Thermo Fisher Scientific)でHEK293細胞を維持し、70%の集密度で3~4日ごとに継代した。トランスフェクション及び移入実験のためにHEK細胞を10cm皿、または12ウェルプレート内のコラーゲン被覆カバースリップに播種した。

10

#### 【0129】

##### v. トランスフェクション

Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)で希釈した1mgのDNAに対して3mgのポリエチレンイミン(PEI)の比率で、PEIを使用してHEK細胞にトランスフェクトした。およそ60~70%の集密度の時に細胞にトランスフェクトした。EV単離及び培地移入実験のために、トランスフェクションから4~6時間後に培養培地を替えてPEI及びDNAを除去し、24時間後に培地を採集した。HEK細胞移入実験

20

#### 【0130】

##### vi. トランスフェクション及び移入

トランスフェクトされたHEK細胞からの培地を、トランスフェクションから24時間後に採集し、500 $\times$ gで4分間遠心分離に掛けて死細胞及び残屑を除去した。トランスフェクトされていないナイーブ細胞からの培地を除去し、清澄化したトランスフェクト済み培地に替え、さらに24時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定し、ArcまたはGFPタンパク質及びRNAについての組み合わせた免疫細胞化学/蛍光insituハイブリダイゼーション(ICC/FISH)を以下に記載するとおりに実施した。

30

#### 【0131】

##### a. エンドサイトーシスの阻止

エンドサイトーシスを阻止するために、12ウェルプレート内でカバースリップ上に播種されGFP-ArcトランスフェクトHEK細胞からの培地を与えているナイーブHEK細胞の群を同時に80mM Dynasore(Abcam, Cambridge, MA)で最初の6時間にわたって処理し、その後、培地を除去して新しいHEK培地に替えた。18時間後、Dynasore処理済み及び未処理のHEK細胞を固定した。18mmカバースリップ全体を20 $\times$ の対物レンズで観察し、GFP-Arc移入細胞の集合体の数を手作業で計数した。Olympus FV1000共焦点顕微鏡(Tokyo, Japan)で20 $\times$ の対物レンズを使用して代表的画像を得た。

40

#### 【0132】

##### vii. ニューロン移入実験

##### a. 撮像

DIV15の培養ニューロンを全てのニューロン実験に使用した。精製Arcタンパク質インキュベーション実験の場合、ニューロンを標準ニューロン栄養培地中で4mgの精製prArc、prArc-CTD、CA-prArc、またはprArc(RNA-)タンパク質で処理し、1時間または4時間インキュベートした。細胞外小胞(EV)インキュベーション実験の場合、800,000細胞/mLとなるようにE18WT皮質ニューロンが播種されたDIV15の培養皮質ニューロン(「細胞培養」方法を参照)の8つの10cm皿から得た精製EV画分からの10mgのタンパク質でニューロンを処理

50

し、1時間または4時間インキュベートした。精製タンパク質及びEV処理実験ではニューロンのサブセットを100mMのmGluR1型作動薬ジヒドロキシフェニルグリシン((S)-3,5-DHPG; Tocris Bioscience, Bristol, UK)で5分間処理し、その後、これを洗い流し、先に調整しておいたニューロン培地に替え、そのままニューロンを25分間置き、その後、固定した。DHPG処理中のタンパク質翻訳を阻止するために、DHPGの前にニューロンのサブセットを180mMのシクロヘキシミド(CHX, Sigma-Aldrich)で30分間前処理した。CHXは培地中に合計1時間入れたままにした。エンドサイトーシスを阻止するためにニューロンを30分間、80mMのDynasore(Abcam, Cambridge, MA)で前処理し、その後、精製タンパク質を添加した。RNアーゼ処理のために、prArcかWT EVかのどちらかの試料をRNアーゼA(1:1000; Omega Bio-tek, Norcross, GA)と共に15分間インキュベートし、その後、ニューロンに添加する直前にSUPERase-In RNアーゼ阻害薬(1U/mL; Thermo Fisher Scientific)と共にインキュベートした。処理した試料をその後ニューロンに添加し、4時間インキュベートした。

#### 【0133】

処理後、ニューロンを2回、37°Cの4%スクロース/1Xリン酸緩衝生理食塩水(PBS; 10X:1.4MのNaCl、26.8mMKCl、62mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、35.3mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.4)で洗浄し、その後、1X PBS中の4%スクロース/4%ホルムアルデヒド(Thermo Fisher Scientific)で15分間固定した。ニューロンを1XのPBSで335分洗浄し、1X PBS中0.2%のTriton X-100(Amresco, Solon, OH)で10分間透過化し、1X PBS中5%の標準口バ血清(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)の中で遮断した。その後、ひとまとめにして希釈した一次抗体の中でニューロンをRTで1時間インキュベートし、1X PBS中で335分洗浄し、ひとまとめにして希釈した二次抗体の中でRTで1時間インキュベートした。カバースリップ上のニューロンをFluoromount(Thermo Fisher Scientific)に含ませてスライドガラス上に固定し、RTで一晩乾燥させた。使用した一次抗体は、ウサギ抗Arc(1:1000; 特注品; ProteinTech, Rosemont, IL); ウサギ抗Arc(1:1000; Synaptic Systems, Goettingen, Germany); ニワトリ抗MAP2(1:5000; ab5392; Abcam); マウス抗Rab5(1:1000; BD Biosciences, San Jose, CA); DAPI核染色剤(Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific)であった。使用した二次抗体は、適切な動物宿主のためのAlexa Fluor 405、488、555または647(1:750; Thermo Fisher Scientific、またはJackson ImmunoResearch)であった。

#### 【0134】

Arc及びGFPの蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)手順は、以前に公開されたプロトコール(Daberkow et al., 2007)に基づくものであった。本発明者らは、公開されたプロトコールにあるとおりに完全長ラットArcリボヌクレオチドプローブ(ラット及びマウスArcはaaレベルで99%同一である)またはEGFP(「プラスミド」の中で上に記したクローニング方策を参照)を使用した。但し、脳切片の代わりに培養ニューロン及びHEK細胞に使用するためにプロトコールを改変した。Arc及びGFPプラスミドをNotIと共に線状化し、標準的なフェノール/クロロホルム抽出によって精製した。線状化したアンチセンスArcまたはGFPを使用し、T7 DIG RNA標識キット(Sigma-Aldrich)を使用してDIG-UTPを組み込まれたリボヌクレオチドプローブを作り、次いでG-50スピンカラム(GE Healthcare)で精製した。細胞を37°Cで4%スクロース/1X PBSで1回洗浄し、その後、1X PBS中の4%スクロース/4%ホルムアルデヒド

10

20

30

40

50

で15分間固定した。細胞を1XのPBSで335分洗浄し、0.2%のTriton X-100の中で10分間透過化し、1XのPBSで235分、その後2Xの生理食塩水-クエン酸ナトリウム(SSC; 20X: 3MのNaCl、300mMのクエン酸三ナトリウム塩二水和物、pH7)で5分洗浄した。細胞を1Xのプレハイブリダイゼーション液(Sigma-Aldrich)中で30分間プレハイブリダイズした。DIG標識ArcまたはGFPリボヌクレオチドプローブをddH<sub>2</sub>Oで1:3に希釈し、90℃で5分間変性させ、濡れた氷の上に2分間置き、その後、RNAハイブリダイゼーション用緩衝液(23.75mMのトリス-HCl、1.19mMのEDTA、357mMのNaCl、11.9%のデキストラン硫酸、1.19Xのデンハルト液(Thermo Fisher Scientific)、2.5%のヌクレアーゼ不含水、60%のホルムアミド(Fisher Scientific, Hampton, NH))と混合した。Arcプローブ(1:500)またはGFPプローブ(1:750)を56℃で16時間、培養細胞とハイブリダイズした。次の日、バックグラウンド信号を減らすために細胞に対して一連の洗浄を行った: 2XのSSCで335分、RNアーゼA(1:1000; Omega Bio-tek)で37℃で15分、2XのSSCでRTで10分、0.2XのSSCでRTで10分、0.2XのSSCで56℃で15分、0.2XのSSCでRTで10分、TNT(0.1Mのトリス-HCl、0.15MのNaCl、0.05%のTween-20、pH7.5)で5分。その後、細胞をTNB(0.1Mのトリス-HCl、0.15MのNaCl、0.5%w/vの遮断薬(Sigma-Aldrich)、pH7.5)中で2.5%のヒツジ血清(Jackson ImmunoResearch)及び2.5%のロバ血清によって30分間遮断した。一次抗体ステップでは、DIG-HRP(1:1000; Sigma-Aldrich)と、MAP2抗体(1:2500; Abcam)かArc抗体(1:500; 特注品)かRab5抗体(1:500; BD Biosciences)かのいずれかとを一緒に、2.5%のヒツジ血清及び2.5%のロバ血清を含有するTNBで希釈し、細胞上で1時間インキュベートした。TNT中で335分洗浄した後、30分にわたってTSA Plus Cyanine3キット(1:50; PerkinElmer, Waltham, MA)を使用してDIG-HRP信号を生じさせた。細胞をTNTで5分間、及び1XのPBSで5分間洗浄し、その後、二次抗体を5%ロバ血清及び1X PBSで1:750に希釈し、細胞上で1時間インキュベートしてMAP2、ArcまたはRab5を検出した。核をDAPI(Thermo Fisher Scientific)で染色し、その後、カバースリップをFluoromountでスライドガラス上に固定し、RTで一晩乾燥させた。

#### 【0135】

##### b. 撮像

Olympus FV1000共焦点顕微鏡(Tokyo, Japan)で60Xの油浸対物レンズを使用してカバースリップを撮像し、ImageJソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を使用して画像を分析した。分析に含めるニューロンは、細胞が健康であるかをMAP2樹状突起形態を調べることによって不偏となるように選択した。各々の独立した実験においてカバースリップは最高輝度の免疫蛍光を見つけるために自動観察され、この値を後にその実験の画像取得環境を設定するために使用した。そうして、その実験において全てのカバースリップからの画像が、全く同じ環境を用いて取得された。

#### 【0136】

##### c. 樹状突起Arcタンパク質及びmRNA発現の分析

分析中、個々の実験において画像は(バックグラウンド蛍光を除去するために、及び画像が直線範囲で分析されることを確保するために)最高輝度の免疫蛍光のところでブラインドで閾値処理され、その実験の中で同じ閾値を他の全ての画像に適用した。2つの30mm樹状突起部分/ニューロンの積分密度(平均画素強度×面積)を各カバースリップから測定した。総じて、本発明者らによる分析では、樹状突起量の潜在的な差を制御するために、密集して近傍にある樹状突起枝を避けた。各実験において、対照群をICCである

10

20

30

40

50

うとFISHであろうと「1」に設定し、他の群の積分密度値をこれに対して正規化し、グラフ中に変化倍率±SEMとして表示する。図中の代表的画像では、群間でのArc発現の差を強調するためにImageJのSmart参照テーブル(LUT)を適用した。Arc/Rab5共局在化の分析では2つの30mm樹状突起部分/ニューロンをArcタンパク質またはmRNAとRab5タンパク質との共局在化の分析のために選択した。Arcチャンネル及びRab5チャンネルを全ての画像にわたって同じ値に閾値処理した。ImageJを使用して、Rab5及びArcの両方について閾値処理された樹状突起の区画でマスクを作った。ArcマスクをRab5マスクに適用し、重複点の数を定量した。Rab5と重複しているArc粒子の数を樹状突起の広がりの中のArc粒子の総数で割ってArc/Rab5共局在化を判定した。

10

## 【0137】

## d. ウェスタンブロットによるイムノブロット及び分析

ウェスタンブロット試料を4XのLaemmli緩衝液(40%のグリセロール、250mMのトリス、4%のSDS、50mMのDTT、pH6.8)と混合し、70°Cで5分間加熱した。SDS-PAGEゲル電気泳動を用いてタンパク質試料を分離した。分離した試料をニトロセルロース膜(GE Healthcare)に転写した。転写後、膜を0.1%のボンソー染色剤でしばらく染色し、その後、総タンパク質の撮像のために1%の酢酸で脱染して総バックグラウンドを除去した。膜をRTで30分間、5%ミルク+1X トリス緩衝生理食塩水(TBS; 10X: 152.3mMのトリス-HCl、46.2mMのトリス塩基、1.5MのNaCl、pH7.6)で遮断し、その後、1X TBS中の一次抗体の中で、RTで1時間か4°Cで一晩かのどちらかのインキュベーションを行った。膜を1XのTBSで3×10分洗浄し、その後、HRP複合二次抗体(Jackson ImmunoResearch)中でひとまとめにしてRTで1時間インキュベーションした。1X TBSによる3×10分の後、化学発光キット(Bio-Rad, Hercules, CA)を使用してタンパク質バンドを検出し、膜をAzure c300 gel dock(Azure Biosystems, Dublin, CA)で撮像した。ImageJのGel Analysis pluginを使用してブロットを分析及び定量した。

20

## 【0138】

## e. 抗体

抗体を以下の濃度で使用した: Arc(1:000; マウスモノクローナル、Santa Cruz)、Arc(1:000; ウサギポリクローナル、特注品、Protein Tech)、ALIX(1:500; ウサギポリクローナル、特注品、Wesley Sundquist博士により提供)、アクチン(1:1000; HRP複合物、Abcam)、GFP(1:1000; ニワトリポリクローナル、Aves)。二次抗体は全て1:10,000の希釈度で使用した(HRP複合ヤギ抗ウサギ、ヤギ抗マウス、ヤギ抗ニワトリ、Jackson ImmunoResearch)。クーマシーゲル

30

## 【0139】

SDS-PAGEによる分析のための試料を4XのLaemmli緩衝液と混合し、70°Cで5分間加熱した。タンパク質試料を10%SDSゲルで分離した。その後、ゲルを0.1%のクーマシーブルー染色剤(0.1%w/vのクーマシーブルー、50%のメタノール、10%の酢酸、40%の水)で30分間染色し、脱染液(50%のメタノール、10%の酢酸、40%の水)で一晩脱染した。Azure c300 gel dockを可視チャンネルで自動露光設定の下で使用してゲルを可視化した。ImageJのGel Analysis pluginを使用してゲル露出を分析及び定量した。

40

## 【0140】

## viii. 免疫沈降

WT及びArc KO皮質を切り出し、添加したてのプロテアーゼ阻害薬(Roche)を使用して150mMのNaCl、50mMのトリス、1%のTriton X-100、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、0.05%のSDS、pH7.4(IP溶

50

解用緩衝液)の中で均質化した。ホモジネートを200×gで5分間、4℃でペレット化して組織残屑を除去した。上清を除去し、2~4mLに希釈し、4℃で10分間振盪し、その後、17,000×gで10分間、4℃でペレット化して不溶物質を除去した。清澄化した上清を取り出し、少量のアリコートを入り物として採取し、残りは免疫沈降のために使用した。上清の免疫沈降を、4℃で2時間緩やかに振盪しながら1mg/500mL溶解物のArc抗体(ウサギポリクローナル、特注品、Protein Tech)または標準ウサギIgG(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を使用して行った。抗体インキュベーションの後、10%体積の洗浄済み50/50プロテインAビーズスラリー(Thermo Fisher Scientific)を抗体/溶解物混合物に添加し、振盪しながら4℃でさらに1時間インキュベートした。その後、ビーズ-抗体複合体を低速で手短かにペレット化し、上清を除去し、ビーズをIP用緩衝液で3回洗浄した。その後、洗浄済みビーズを200mLのIP用緩衝液の中に再懸濁させた。ビーズスラリーの半量を使用してRTで5分掛けて17mLの4XのLaemmli緩衝液でタンパク質をビーズから溶離させ、次いで50mLのIP用緩衝液を添加し、溶液をビーズから除去して新しいチューブに入れ、70℃で5分間加熱した。投入物(10%の溶解物体積)ならびに各々30mLのIgG及び抗体溶離液をSDS-PAGEによって10%アクリルアミドゲル上で分離し、上記のとおりイムノプロットを行った。投入物ならびにIgG及びArc溶離液のバンドを、ImageJのGel Analysis pluginを使用して分析し、データを各個のマウスからの投入物信号に対する各溶離液からの信号の比率としてグラフで表した。ビーズスラリーのもう一方の半量を使用してIP用緩衝液を1%SDSに調節し、0.8mgのプロテイナーゼK(New England Biolabs, Ipswich, MA)を添加した。その後、試料を振盪しながらRTで30分間インキュベートし、総RNAを以下に記載するのとおり抽出した。

#### 【0141】

ix.系中でのArcタンパク質の化学架橋

myc-Arc-WTまたはGFP対照が発現しているトランスフェクトHEK細胞を手短かにトリプシン処理し、DMEM(Thermo Fisher Scientific)で失活させ、ペレット化した。培地を除去し、ペレット化した細胞をその後0.4%のホルムアルデヒドのPBS溶液で10分間、RTで振盪しながら架橋させた。細胞懸濁液をすぐさまトリスで失活させて50mMの濃度にし、再ペレット化した。上清を除去し、その後、細胞ペレットを150mMのNaCl、50mMのトリス、1%のTriton X-100、pH7.4(溶解用緩衝液)で20分間4℃で振盪しながら溶解させた。溶解物を21,000×gで10分間4℃で遠心分離することによって清澄化させ、清澄化した上清をその後、4~8%の勾配を付けたゲルに流し、Arc(マウスモノクローナル、Santa Cruz)及びGFP(ニワトリポリクローナル、Aves)に対する抗体を使用してウェスタンブロットによって分析した。

#### 【0142】

x. RNA抽出

全ての試料について、TRIzol(Thermo Fisher Scientific)を使用して総RNAを抽出した。TRIzolで抽出した試料をクロロホルムと5:1で混合し、RTで3分間インキュベートし、4℃で10分間12,000×gでペレット化した。得られた水相を採取し、イソプロパノールと1:1で混合し、RTでインキュベートし、4℃で10分間12,000×gでペレット化した。得られた上清を除去し、ペレットを75%の冷エタノールで洗浄した。洗浄済みペレットをその後、4℃で5分間7500×gで再ペレット化した。上清を除去し、乾燥ペレットをddH<sub>2</sub>O中に再懸濁させた。

#### 【0143】

xi. RT-PCR

総RNA濃度をNanodrop(Thermo Scientific)でA260

10

20

30

40

50

/280によって測定した。100~200ngのRNAを鋳型としてHigh Capacity cDNA逆転写キット(Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して逆転写反応を行った。得られたcDNAを、60のアニリング温度でラットArc、GAPDHプライマーセットを使用して35サイクル増幅した。得られたPCR産物を、SYBR Safe(Thermo Fisher Scientific)で染色した1.5%アガロースゲルで分析した。ラットArcプライマー：順方向、ACCATATGACCACCGGCGGC；逆方向、TCCAGCATCTCAGCTCGGCAC。GAPDHプライマー：順方向、CATGGCCTTCCGTGTTCTTA；逆方向、GCCTGCTTCAACCACCTTCTT。RT-PCRゲルを、ImageJ gel analyzerツールを使用して定量した。

10

【0144】

xii. qRT-PCR

Arcタンパク質と会合しているRNAの量を決定するために、1:Arc及びIgGタンパク質を使用して免疫沈降させた全マウス皮質、2:HEK細胞から調製したEV画分(以下の「細胞外小胞精製」参照)、ならびに3:ラットArcプラスミド(pGEX-GST-ArcFL)をトランスフェクトされた細菌(BL21, Thermo Fisher Scientific)からの溶解物及び精製タンパク質から調製したmRNAに対して、定量的RT-PCRを実施した。外的に追加した(線状化pBluescript-SKII-GFPからのT7RNAポリメラーゼを使用して生成する)GFPアンチセンスRNAと比較して、Arcタンパク質と会合しているmRNAが分解から保護されるか否かを判定するために、いくつかの試料をRNアーゼ(25mg, RNアーゼA, Thermo Fisher Scientific)で処理した。調製物1:マウスを、暗い筐体に24時間、及び豊かな環境に2時間置いた後に、殺した。全皮質を切り離し、上記のとおりIP溶解用緩衝液中で均質化させた。免疫沈降後、RLT溶解用緩衝液を含有するグアニジンチオシアネートの中でビーズラリーをインキュベートし、QIAGEN RNeasy Microキット(QIAGEN, Hilden, Germany)を使用してRNAのカラム精製を実施した。全溶離液を、50UのMultiscribe逆転写酵素及びrandom oligoプライマー(Thermo Fisher Scientific)と共にHigh Capacity cDNA逆転写キットを使用する逆転写のために使用した。調製物2及び3:TRIzol(Thermo Fisher Scientific)を上記(「RNA抽出」)のとおり使用して全RNAを抽出した。High Capacity cDNA逆転写キットを使用して逆転写反応(25で10分間、37で2時間、85で5分間)を行った。ラットArc、GAPDH及びasnAに対するプライマー(上記「RT-PCR」参照；asnAプライマー：順方向、GCGTGGATGCCGACACGTTG；逆方向、ATACCGCCGCCGATGGTCTG)を使用して96ウェルプレート内でPowerUp SYBRgreen Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を使用するqPCRのために、得られたcDNAを調製した。qPCRをQuantStudio3リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)で以下のプロトコルを用いて実施した：事前のインキュベーション：50で2分間、95で2分間。増幅：95で15秒間、60で15秒間、及び72で1分間を、40サイクル。融解曲線：95で1秒間、60で20秒間、0.15/秒で95までの連続昇温。30より高いCt値を検出不可とみなした。標準DNA試料を段階的に希釈(10倍)し、関心対象の遺伝子を分析し、線形方程式を算出する、という検量線法を用いて発現の差を決定した。結果として得られた線形方程式を使用して試験試料のCt値が検量線のどこに対応するかを決定し、結果を変換(log10)して標準試料の希釈度を反映させた。任意の所与の群の対照値の平均からの変化倍率(試験/平均対照)を測定して差を算出した。

20

30

40

【0145】

xiii. 細胞外小胞の精製

50

以前 (Lachenal et al., 2011) に記載されているとおりに細胞外小胞 (EV) を HEK 細胞及び初代ニューロン培養物から精製した。培地を 2,000 及び 20,000 x g で連続して回転させて死細胞及び残屑を除去し、その後、100,000 x g で回転させて EV をペレット化した。最初の高速度回転の後に得られた粗 EV ペレットを冷 PBS 中に再懸濁させ、SW41 ローターの中で 100,000 x g で 1 時間 4 で再ペレット化した。洗浄した EV ペレットを、4 で 10 ~ 20 % のスクロース - PBS 勾配で 100,000 x g の遠心分離に一晚掛けることによってさらに精製した。得られたペレットを冷 PBS で洗浄して余剰のスクロースを除去し、その後、4 で 1 時間 100,000 x g で再ペレット化した。最終的な洗浄済みペレットを PBS に再懸濁させて下流の EM による分析、ウェスタンブロットング及びニューロン処理のために使用した。トリプシン消化及び RNアーゼアッセイでは pr Arc 及び EV にトリプシンを 0.05 mg/mL となるように添加して RT で 30 分経過させ、続いて 1 mM の PMSF を添加して 10 分経過させてトリプシンを不活化させた。その後、未処理及びトリプシン処理済みの試料をウェスタンブロットで分析した。WT ニューロン溶解物及び EV に RNアーゼ A を 50 mg/mL となるように添加して 37 で 15 分経過させた。RT-PCR のための未処理及び RNアーゼ処理済みの試料をその後 TRIzol で直接抽出した。トリプシン消化及び RNアーゼアッセイ

10

#### 【0146】

pr Arc 及び EV にトリプシンを 0.05 mg/mL となるように添加して RT で 30 分経過させ、続いて 1 mM の PMSF を添加して 10 分経過させてトリプシンを不活化させた。その後、未処理及びトリプシン処理済みの試料をウェスタンブロットで分析した。WT ニューロン溶解物及び EV に RNアーゼ A を 50 µg/mL となるように添加して 37 で 15 分経過させた。RT-PCR のための未処理及び RNアーゼ処理済みの試料をその後 TRIzol で直接抽出した。

20

#### 【0147】

##### xiv. イムノゴールド標識

以前 (Korkut et al., 2013) に記載されているとおりに改変を加えてイムノゴールド標識を実施した。試料を 2 % のホルムアルデヒド中で 4 で緩やかに振盪しながら一晚固定した。その後、試料をグロー放電済みの Formvar 銅メッシュ格子 (Ted Pella) に塗布し、室温で 10 分掛けて付着させた。その後、試料を 0.1 M のトリス、pH 7.4 による 3 回の洗浄によって失活させた。その後、試料を RT で 10 分間透過化し、遮断し、そして Arc の染色を行った (1:500; 特注品)。5 nM 金複合二次抗体を銀強化なしで染色に使用した。抗体標識後、上記のとおり格子に対して陰性染色を行った。

30

#### 【0148】

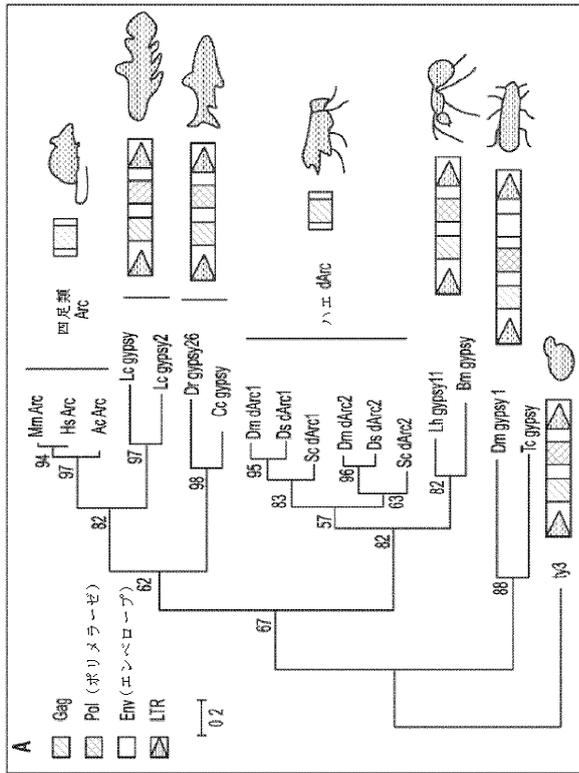
##### xv. 統計

GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) または JMP Pro 統計ソフトウェア (SAS; Cary, NC) を使用して、反復測定を伴うかまたは伴わない (事後 Sidak 検定を伴う) 二元配置 ANOVA、または独立両側 t 検定を実施した。有意性を  $p < 0.05$  に定めた。示されている全てのデータは少なくとも 2 つの実験反復を代表するものである。統計の詳細 (N、実験反復回数、データの表示のされ方についての説明) は図の凡例または結果の節の中に見つけることができる。当業者であれば、本明細書に記載の方法及び組成物の特定の実施形態との多くの均等物を認識することになるか、または慣例的な実験しか用いずにそれを確認することができる。そのような均等物は以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

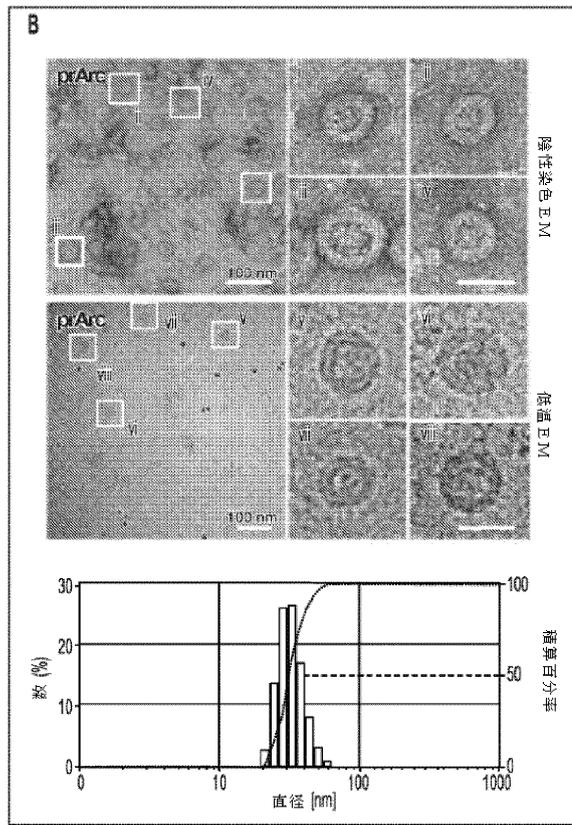
40

【図面】

【図 1 A】



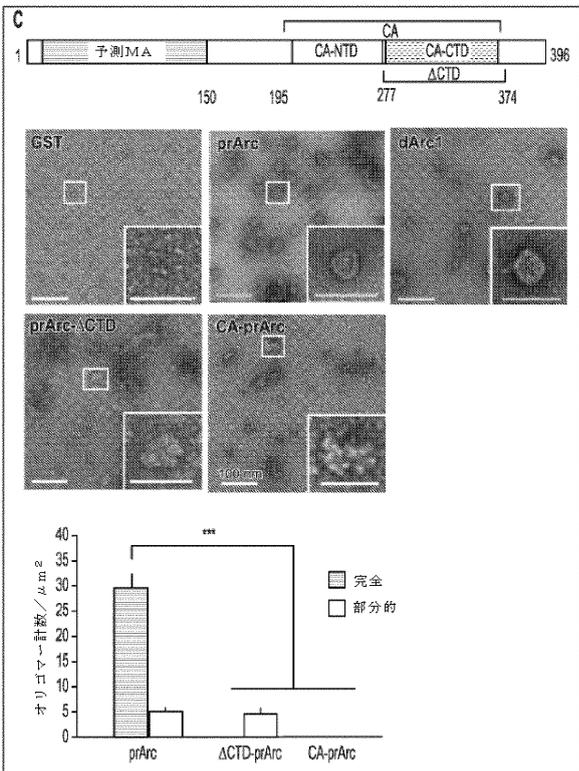
【図 1 B】



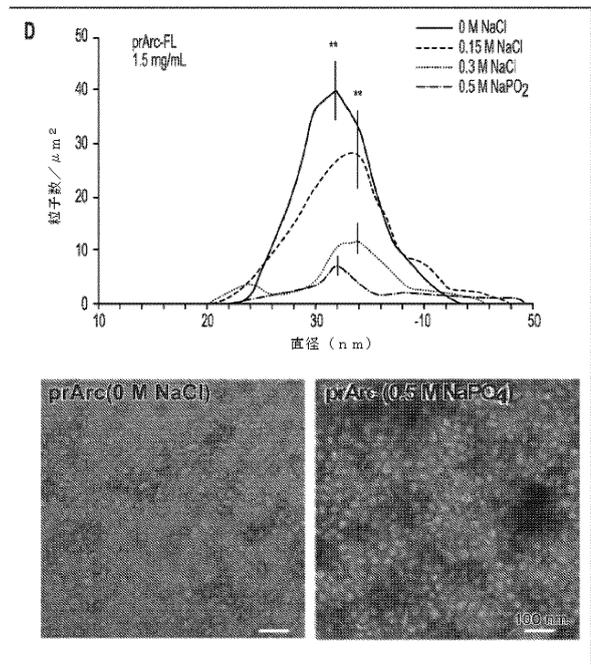
10

20

【図 1 C】



【図 1 D】

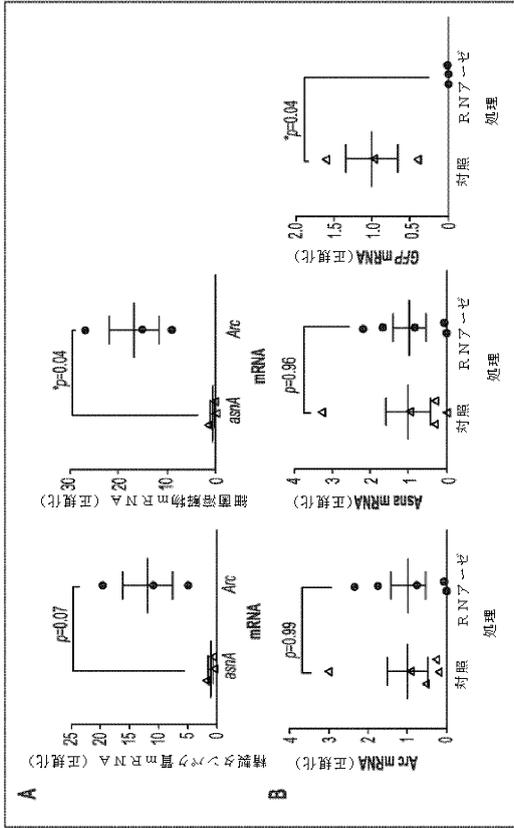


30

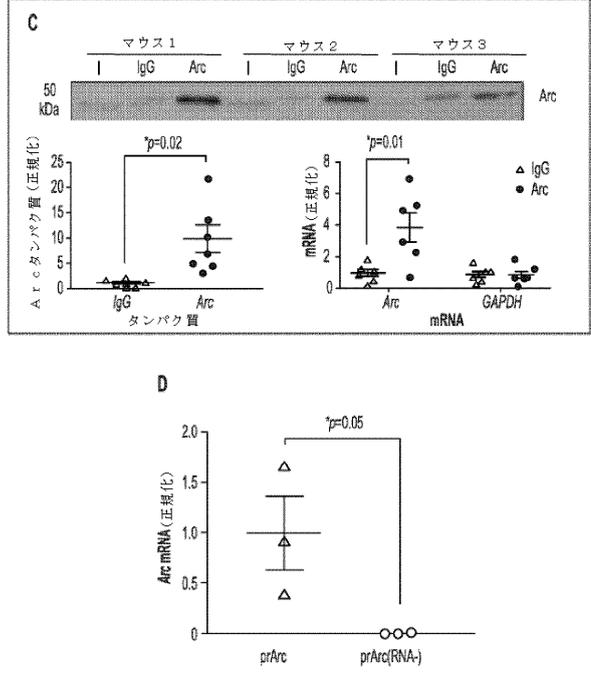
40

50

【図 2 A - B】



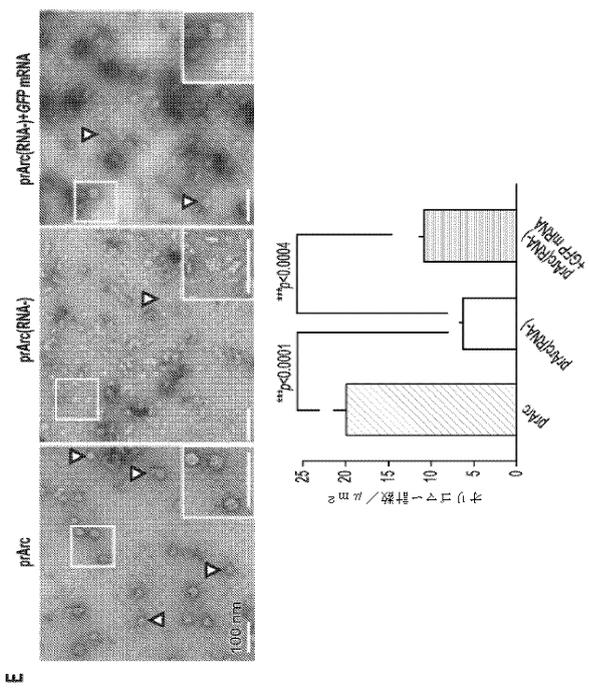
【図 2 C - D】



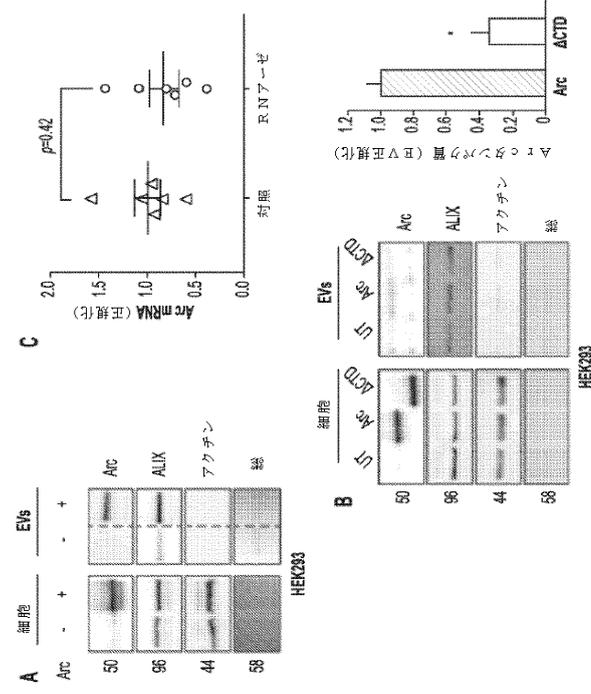
10

20

【図 2 E】



【図 3 A - C】

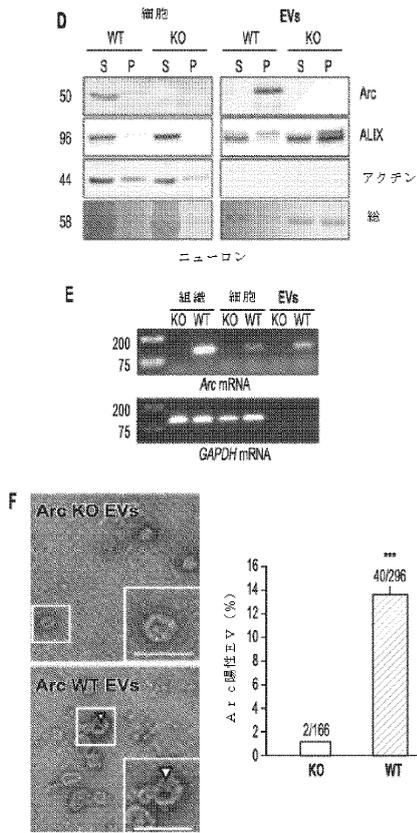


30

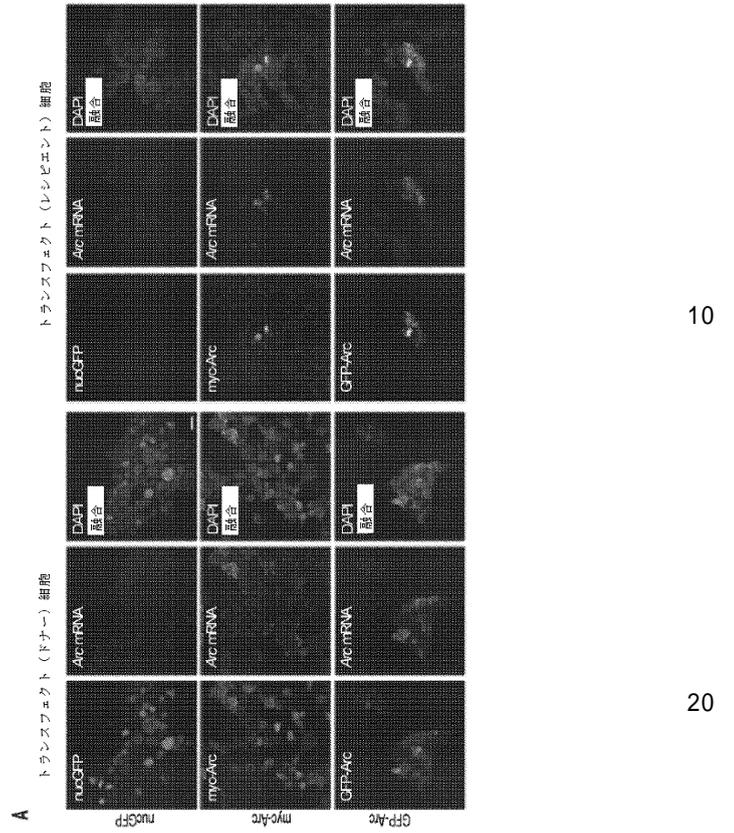
40

50

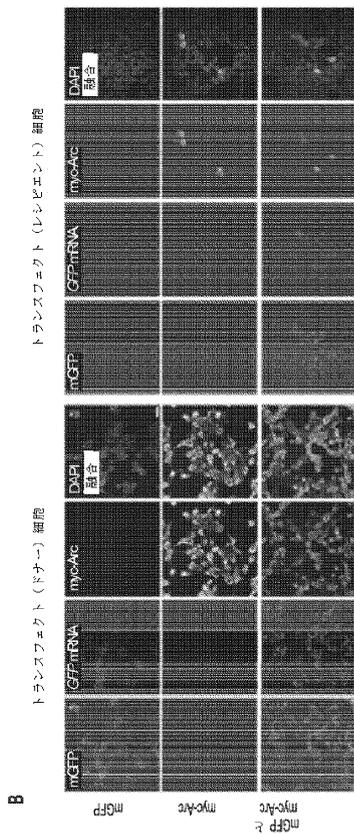
【 3 D - F 】



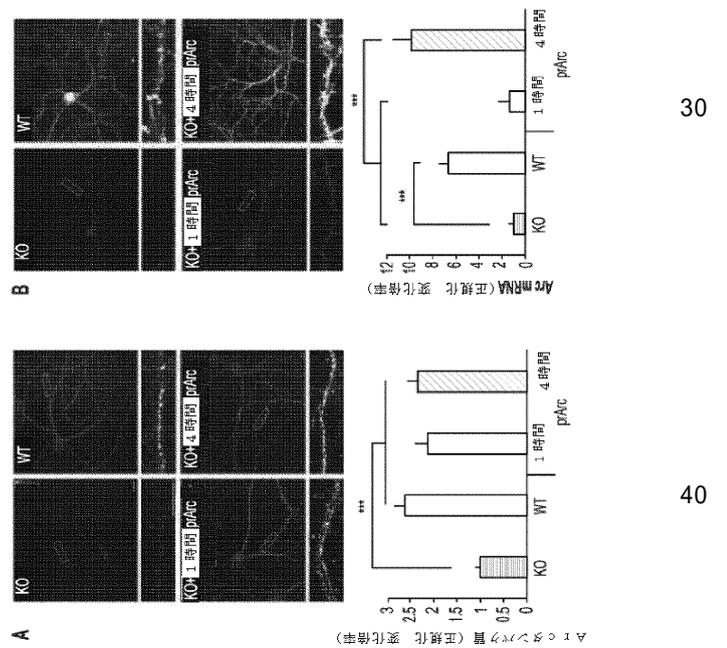
【 4 A 】



【 4 B 】



【 5 A - B 】



10

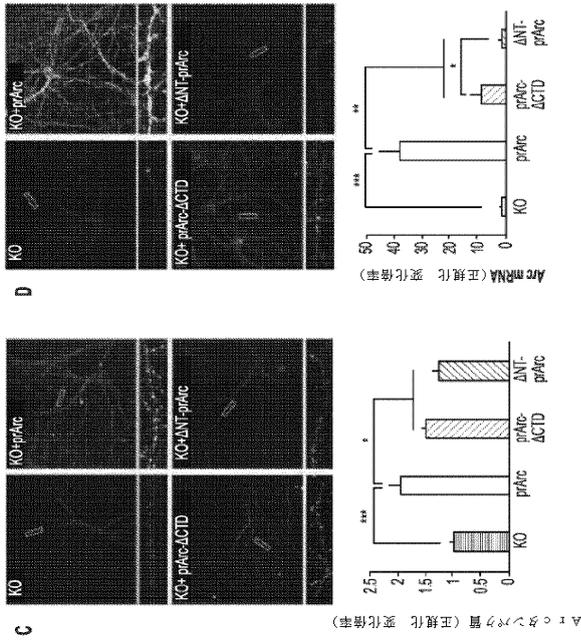
20

30

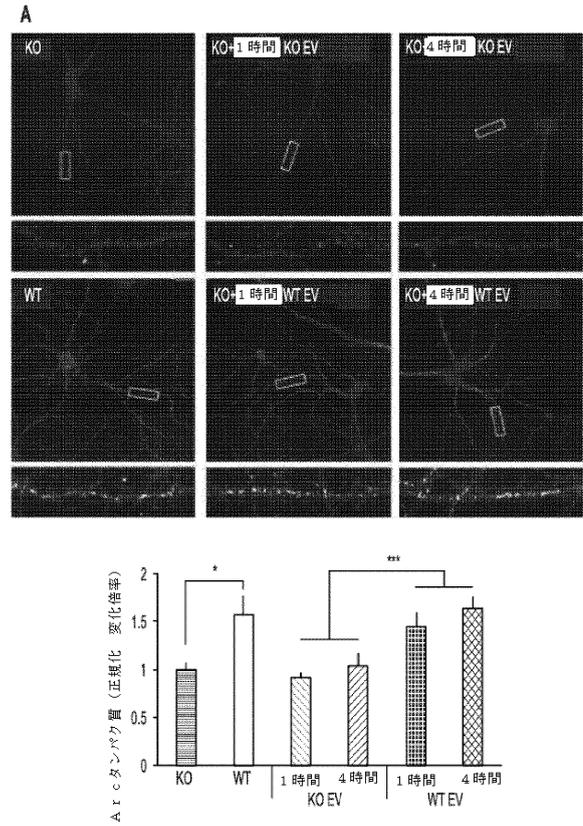
40

50

【図 5 C - D】



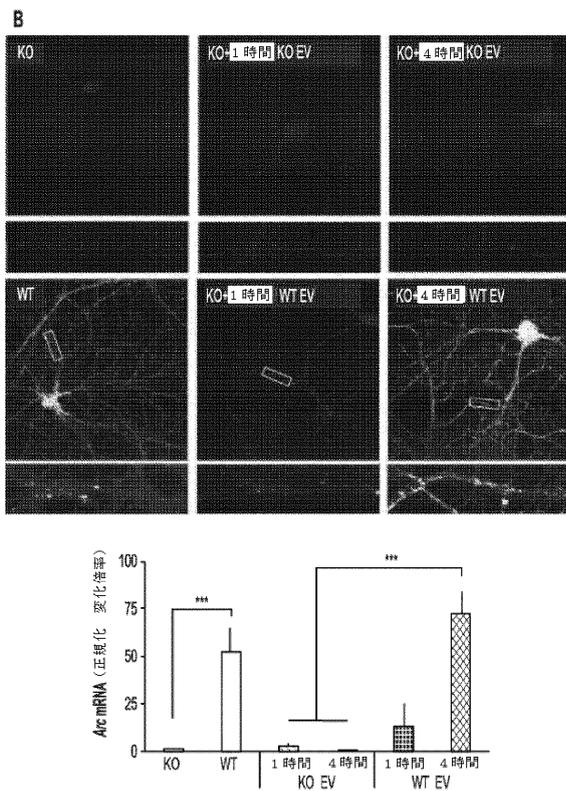
【図 6 A】



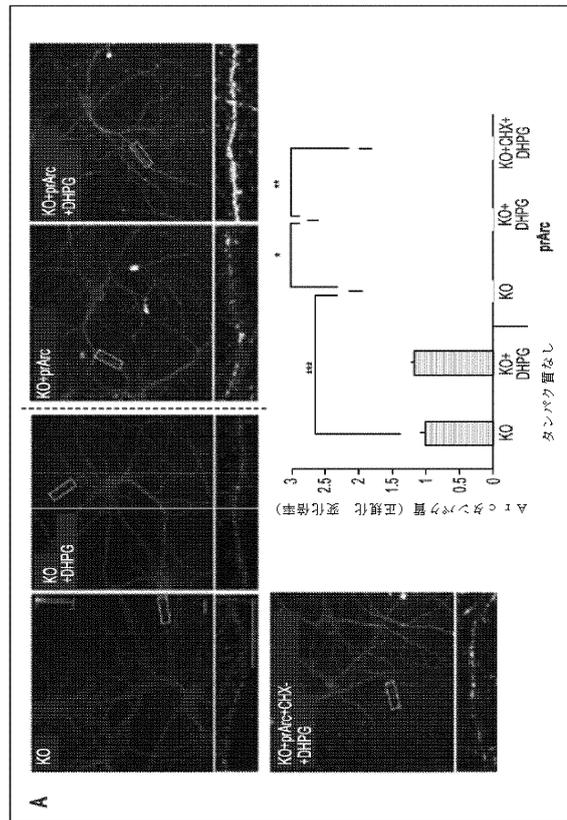
10

20

【図 6 B】



【図 7 A】



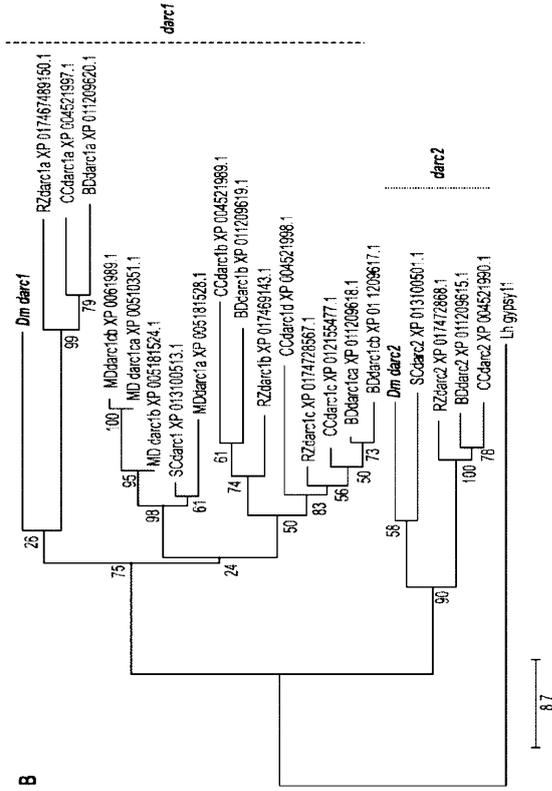
30

40

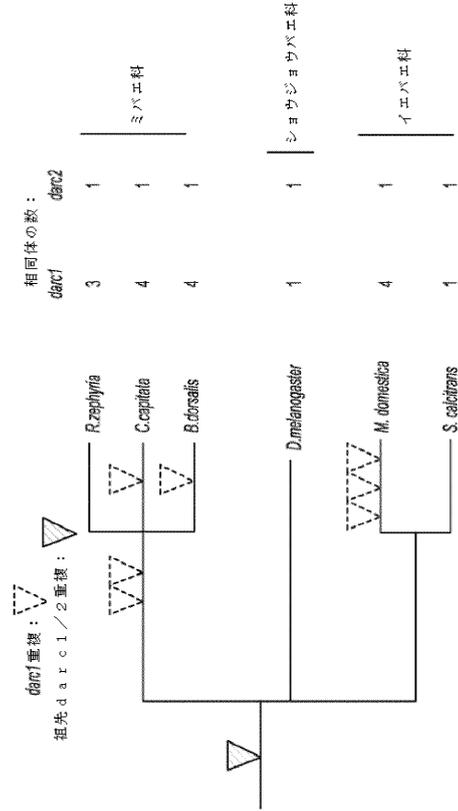
50



【 図 8 B - 1 】



【 図 8 B - 2 】

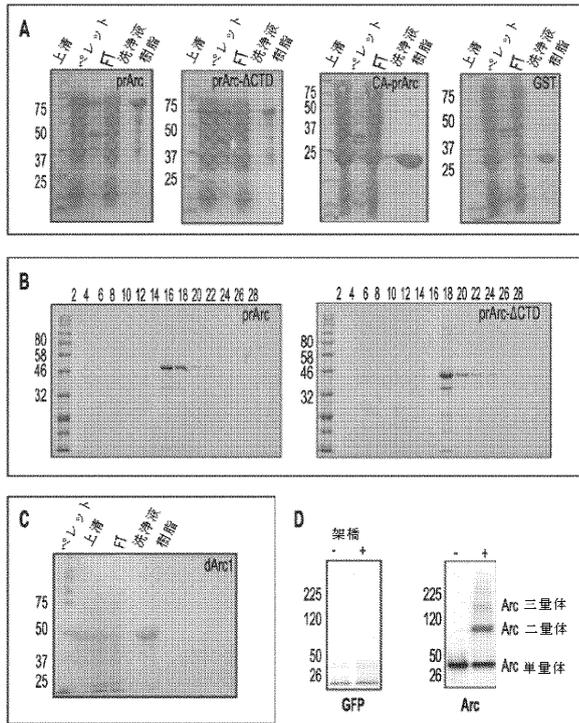


B  
標

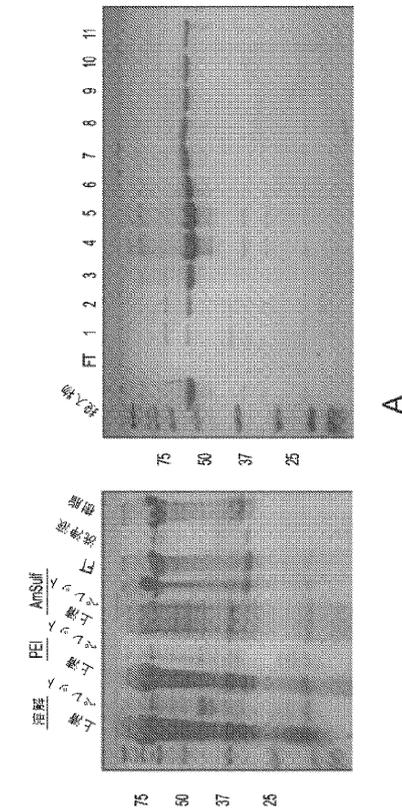
10

20

【 図 9 A - D 】



【 図 10 A 】



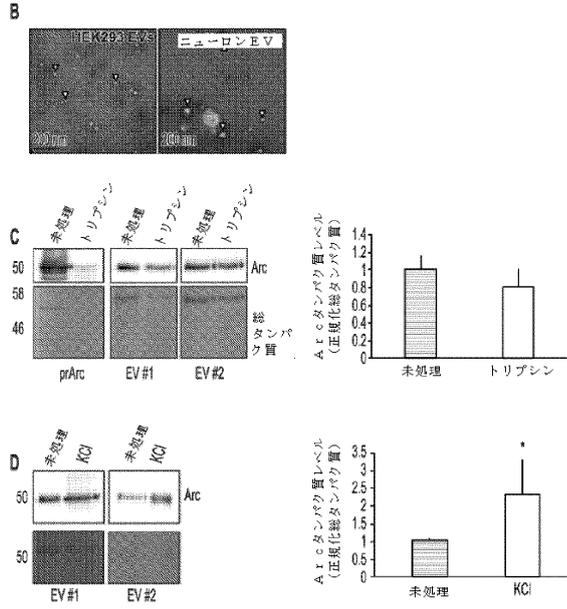
A

30

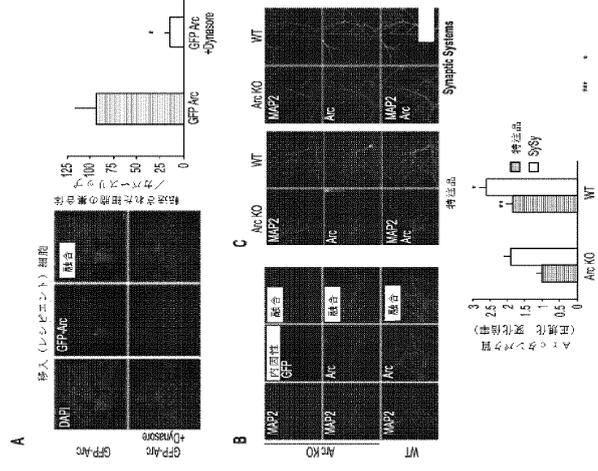
40

50

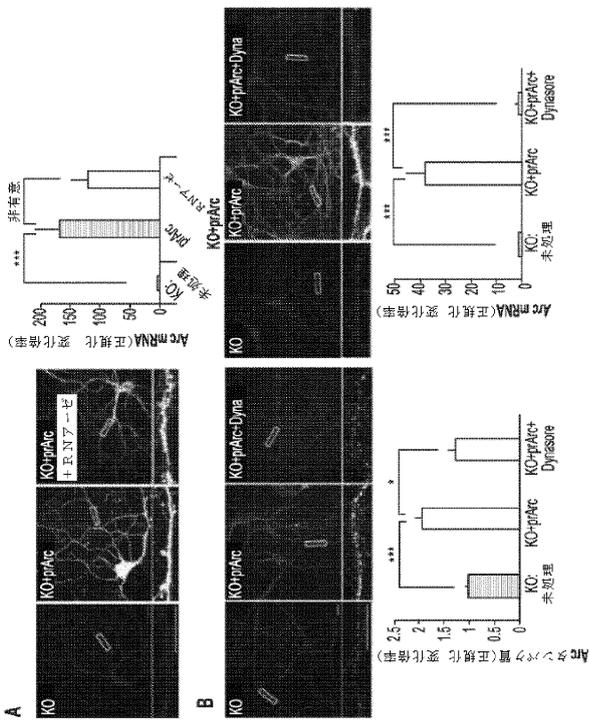
【図 10 B - D】



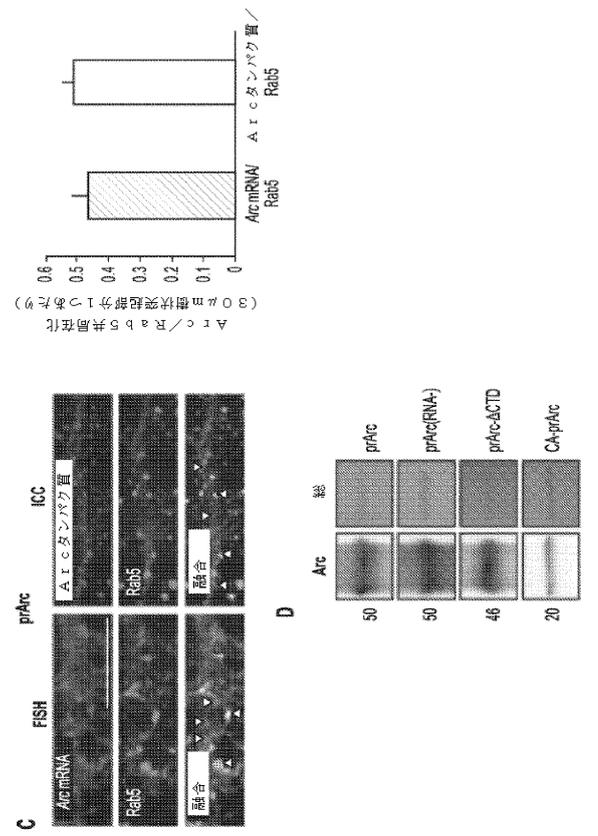
【図 11 A - C】



【図 12 A - B】



【図 12 C - D】



10

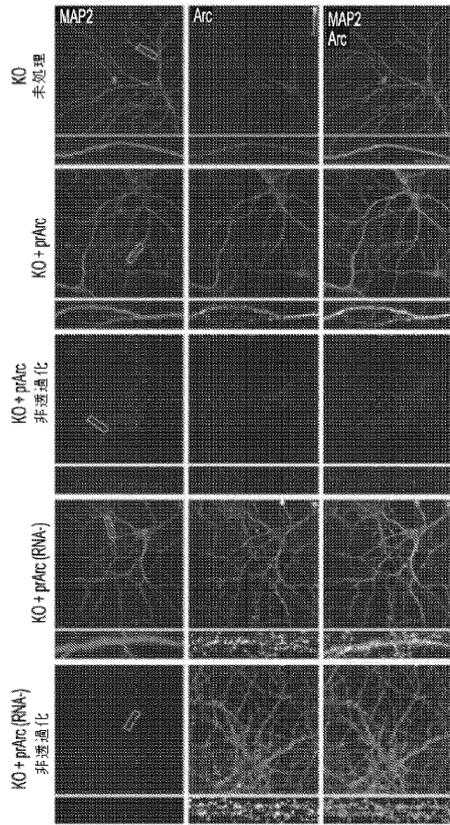
20

30

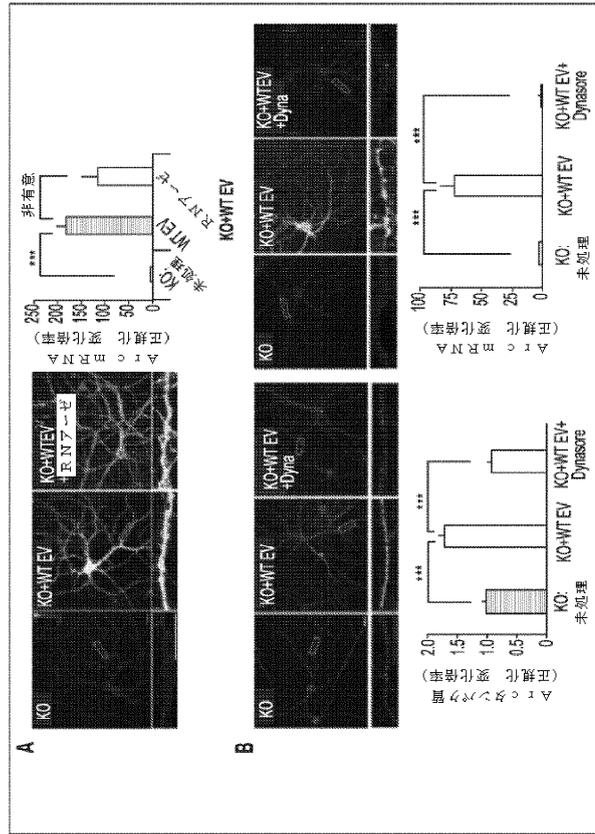
40

50

【 図 1 3 】



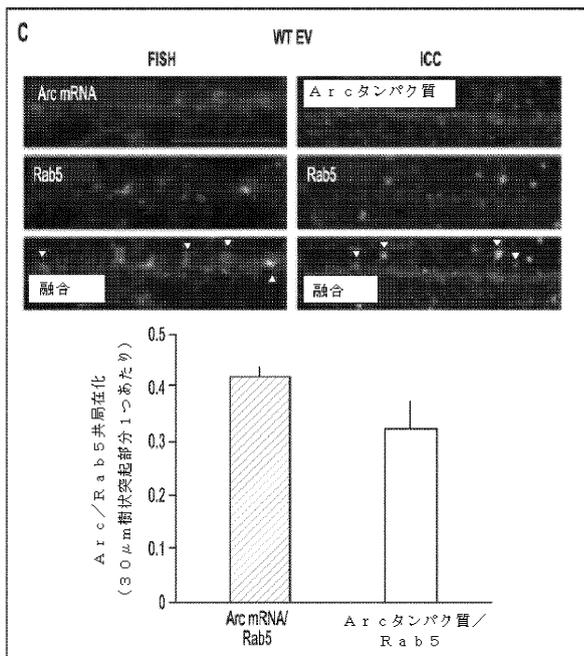
【 図 1 4 A - B 】



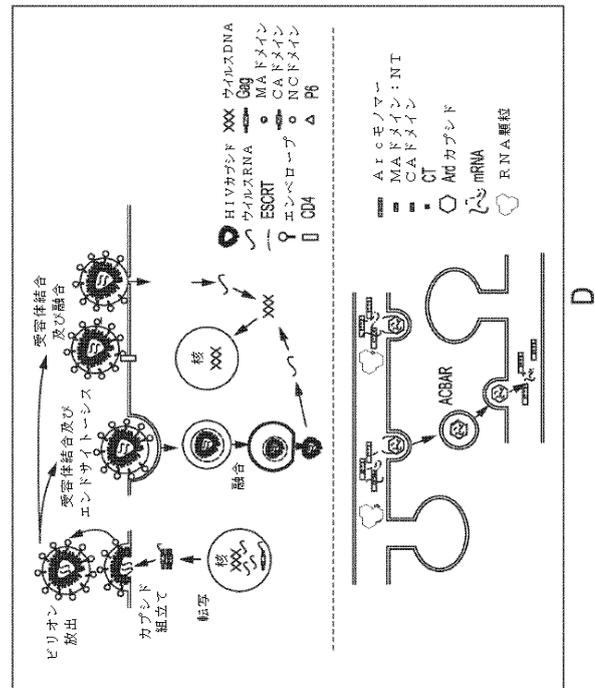
10

20

【 図 1 4 C 】



【 図 1 4 D 】

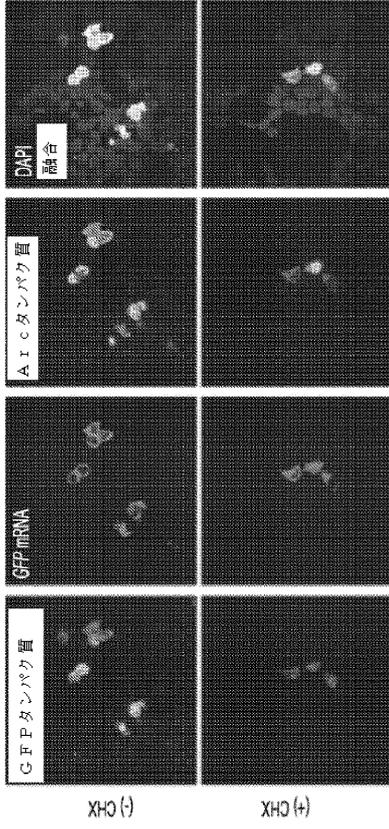


30

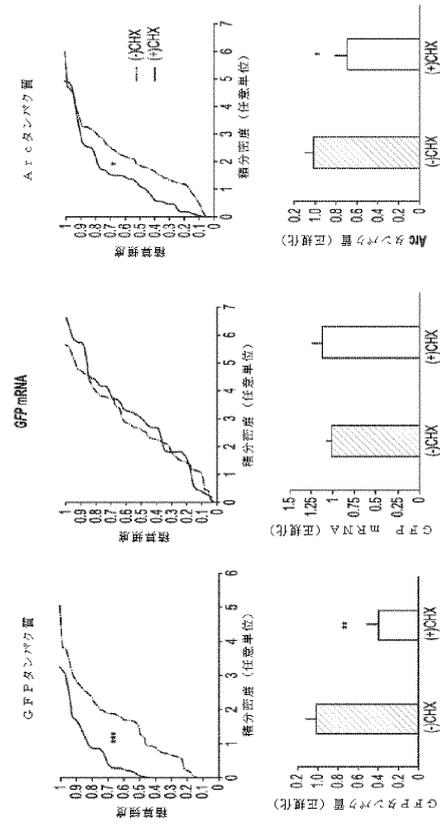
40

50

【図 15 A】



【図 15 B】



【配列表】

0007355382000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 0 7 K 14/47 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)  
 C 1 2 N 5/0793(2010.01)  
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)  
 A 6 1 K 38/17 (2006.01)  
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)

## F I

C 0 7 K 14/47  
 C 1 2 N 15/113 Z  
 C 1 2 N 5/0793  
 A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 K 38/17  
 A 6 1 P 25/00

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

弁理士 服部 博信

## (74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

## (72)発明者 シェパード ジェイソン ディー

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 8 ソルト レイク シティアー アラピーン ドライヴ 6 1 5 スイ  
 ート 3 0 1

## (72)発明者 デイ キャメロン

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 8 ソルト レイク シティアー アラピーン ドライヴ 6 1 5 スイ  
 ート 3 0 1

## (72)発明者 パストゥジン エリッサ

アメリカ合衆国 ユタ州 8 4 1 0 8 ソルト レイク シティアー アラピーン ドライヴ 6 1 5 スイ  
 ート 3 0 1

審査官 鈴木 崇之

## (56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 6 0 4 5 ( J P , A )  
 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 8 7 0 8 7 ( U S , A 1 )  
 国際公開第 2 0 0 9 / 0 4 2 7 2 7 ( W O , A 1 )  
 Neuron , 2015年 , Vol. 86, Issue 2 , pp. 490-500  
 Biochem. J. , 2015年 , Vol. 468 , pp. 145-158  
 Biochem. J. , 2015年 , Vol. 469 , pp. e1-e3  
 Neuron , 2013年 , Vol. 78 , pp. 1024-1035

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q