

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-537015

(P2005-537015A)

(43) 公表日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2004-533057 (P2004-533057)	(71) 出願人	500320268 ジョンソン アンド ジョンソン リサーチ プロプライエタリー リミテッド オーストラリア連邦、1430 ニューサウス ウェールズ州、エビリー、セントラル アベニュー 1、オーストラリアン テクノロジー パーク、レベル 4 (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成15年9月4日(2003.9.4)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月21日(2005.4.21)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/AU2003/001142	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02004/022777		
(87) 国際公開日	平成16年3月18日(2004.3.18)		
(31) 優先権主張番号	2002951224		
(32) 優先日	平成14年9月4日(2002.9.4)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		
(31) 優先権主張番号	2003901418		
(32) 優先日	平成15年3月26日(2003.3.26)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RNA干渉 (RNAi) を媒介するために dsDNA を使用する方法

(57) 【要約】

本発明は、RNA干渉 (RNAi) を媒介するために使用しうる dsDNA 分子の製造方法を提供する。これらの方法は、ランダム配列を含むヘアピン DNA の産生、ならびにセンス RNA およびアンチセンス RNA を共発現させるための収束的 (convergent) プロモーターの使用を含む。そのようなものとして、本発明は、フォワード・ジェネティック・スクリーニングのためのランダムな短いヘアピン RNA (shRNA) および小さな抑制性 (interfering) RNA (siRNA) 発現ライブラリーの製造を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここで、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1配列および該ランダム配列に相補的であり、

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成することを含んでなる、DNA分子の製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA (hRNA) を形成することを特徴とする製造方法。 10

【請求項2】

該第1配列内にデオキシウラシルヌクレオチドが含まれており、該プライマーを加える前に、該一本鎖DNA鎖を脱プリン化し、脱離させる、請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

該第1 DNA鎖が制限酵素部位を含む、請求項1または請求項2記載の製造方法。

【請求項4】

該ランダム配列が少なくとも19塩基対長、好ましくは、19~約30塩基対長、より好ましくは、19~25塩基対長である、請求項1~3のいずれか1項記載の製造方法。 20

【請求項5】

該ランダム配列が19塩基対長である、請求項4記載の製造方法。

【請求項6】

該二本鎖DNAを、U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項1~5のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項7】

該二本鎖DNAを、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項6記載の製造方法。

【請求項8】

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、 30

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的 (convergent) プロモーターの間にクローニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA (dsRNA) を与える発現ベクターの製造方法。

【請求項9】

該ランダム配列が少なくとも19塩基対長、好ましくは、19~約30塩基対長、より好ましくは、19~25塩基対長である、請求項8記載の製造方法。 40

【請求項10】

該ランダム配列が19塩基対長である、請求項9記載の製造方法。

【請求項11】

該二本鎖DNAを、U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項8~10のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項12】

該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的U6 snRNAプロモーターの間にクローニングする、請求項11記載の製造方法。

【請求項13】

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここ 50

で、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1領域および該ランダム配列に相補的であり、

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、

(v) 該二本鎖DNAを発現ベクター内にクローニングし、ここで、該二本鎖DNAはプロモーターの制御下にあり、

(vi) 該二本鎖DNAの転写を可能にする条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(vii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法。

【請求項14】

該第1配列内にデオキシウラシルヌクレオチドが含まれており、該プライマーを加える前に、該一本鎖DNA鎖を脱プリン化し、脱離させる、請求項13記載の方法。

【請求項15】

該第1 DNA鎖が制限酵素部位を含む、請求項13または請求項14記載の方法。

【請求項16】

該ランダム配列が少なくとも19塩基対長、好ましくは、19~約30塩基対長、より好ましくは、19~25塩基対長である、請求項13~15のいずれか1項記載の方法。

【請求項17】

該ランダム配列が19塩基対長である、請求項16記載の方法。

【請求項18】

該二本鎖DNAを、U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項13~17のいずれか1項記載の方法。

【請求項19】

該二本鎖DNAを、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項18記載の方法。

【請求項20】

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的プロモーターの間にクローニングし、

(iv) 該二本鎖DNAの転写を促進する条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(v) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法。

【請求項21】

該ランダム配列が約19~約30塩基対長、好ましくは、19~25塩基対長である、請求項20記載の方法。

【請求項22】

該ランダム配列が19塩基対長である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

該二本鎖DNAを、U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項20~22のいずれか1項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的U6 snRNAプロモーターの間にクローニングする、請求項23記載の方法。

【請求項 2 5】

収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含んでなる、標的遺伝子の発現の抑制に使用するための発現ベクターであって、該DNA分子が、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的特異的配列を含み、該標的特異的配列が、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含むことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 2 6】

該標的特異的配列が少なくとも19塩基対長、好ましくは、19～約30塩基対長、より好ましくは、19～25塩基対長である、請求項25記載の発現ベクター。

【請求項 2 7】

該標的特異的配列が19塩基対長である、請求項26記載の発現ベクター。

【請求項 2 8】

該標的特異的配列が該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも95%の同一性を有し、より好ましくは、同一である、請求項25～27のいずれか1項記載の発現ベクター。

【請求項 2 9】

該発現ベクターがレトロウイルス発現ベクターである、請求項25～28のいずれか1項記載の発現ベクター。

【請求項 3 0】

該収束的プロモーターがU6 snRNA、H1またはT7プロモーターである、請求項25～29のいずれか1項記載の発現ベクター。

【請求項 3 1】

該収束的プロモーターがU6 snRNAプロモーターである、請求項25～30のいずれか1項記載の発現ベクター。

【請求項 3 2】

(i) 収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含む発現ベクターを調製し、ここで、該DNA分子は、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的特異的配列を含み、該標的特異的配列は、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含み、

(ii) 細胞内に該siRNA発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(iii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の表現型変化を検出することを含んでなる、標的遺伝子の機能を決定するための方法。

【請求項 3 3】

該標的特異的配列が少なくとも19塩基対長、好ましくは、19～約30塩基対長、より好ましくは、19～25塩基対長である、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

該標的特異的配列が19塩基対長である、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

該標的特異的配列が該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも95%の同一性を有し、より好ましくは、同一である、請求項32～34のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 6】

該発現ベクターがレトロウイルス発現ベクターである、請求項32～35のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 7】

該収束的プロモーターがU6 snRNA、H1またはT7プロモーターである、請求項32～36のいずれか1項記載の方法。

【請求項 3 8】

10

20

30

40

50

該収束的プロモーターがU6 snRNAプロモーターである、請求項32～37のいずれか1項記載の方法。

【請求項39】

請求項25～31のいずれか1項記載の発現ベクターを細胞内に導入することを含んでなる、該細胞における標的遺伝子の発現の抑制方法。

【請求項40】

(i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
(ii) 工程(i)からのDNA断片にヘアピンDNAを連結し、
(iii) 工程(ii)からのDNAに二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターはプライマー結合部位を含み、
(iv) 工程(iii)からのDNAを変性させて、一本鎖DNA鎖のライブラリーを得、
(v) 該プライマー結合部位にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法。

10

【請求項41】

二本鎖DNA断片のライブラリーをDNAの消化により調製する、請求項40記載の製造方法。

【請求項42】

該DNAが遺伝子である、請求項41記載の製造方法。

【請求項43】

該DNAがゲノムである、請求項41記載の製造方法。

20

【請求項44】

該DNAがcDNAライブラリーである、請求項41記載の製造方法。

【請求項45】

該消化をDNアーゼIで行う、請求項41～44のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項46】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNA、H1およびT7よりなる群から選ばれるプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項40～45のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項47】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項46記載の製造方法。

30

【請求項48】

(i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
(ii) 工程(i)からのDNA断片の各末端に二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターの配列は、少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチドを3'末端に含み、

(iii) 工程(ii)からの二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的プロモーターの間にクローニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA(dsRNA)分子を与える発現ベクターのライブラリーの製造方法。

40

【請求項49】

二本鎖DNA断片のライブラリーをDNAの消化により調製する、請求項48記載の製造方法。

【請求項50】

該DNAが遺伝子である、請求項49記載の製造方法。

【請求項51】

該DNAがゲノムである、請求項49記載の製造方法。

【請求項52】

該DNAがcDNAライブラリーである、請求項49記載の製造方法。

【請求項53】

該消化をDNアーゼIで行う、請求項49～52のいずれか1項記載の製造方法。

50

【請求項54】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNA、H1およびT7よりなる群から選ばれるプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項48～53のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項55】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項54記載の製造方法。

【請求項56】

(i) mRNAのプールを調製し、
 (ii) 該mRNAのプールに酵素を加え、ここで、該酵素は該mRNAを逆転写してcDNAを形成し該mRNAを分解し、
 (iii) 工程(ii)からのcDNAにヘアピンループを形成させ、
 (iv) 逆転写酵素のプライミング(開始)点として該ヘアピンループを使用して第2鎖を合成し、
 (v) 工程(iv)からのDNAを変性させて一本鎖DNAを形成させ、
 (vi) DNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法。

【請求項57】

工程(ii)における酵素がAMV逆転写酵素である、請求項56記載の製造方法。

【請求項58】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNA、H1およびT7よりなる群から選ばれるプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項56または57記載の製造方法。

【請求項59】

該二本鎖DNA分子を、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内にクローニングする、請求項58記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、転写されることにより二本鎖RNAまたはヘアピンRNAの産生をもたらすDNA分子のライブラリーの製造方法に関する。本発明は更に、短い抑制性(interfering)RNA発現ベクターに関する。

【背景技術】

【0002】

ある範囲の生物への二本鎖RNA(dsRNA)の導入は、強力かつ特異的な遺伝子サイレンシング効果を誘導する。dsRNA分子によるこの形態の遺伝子抑制はシーエレガンス(*Caenorhabditis elegans*)において最初に観察され、RNA干渉またはRNAiと称される(Fireら 1998)。蠕虫における特異的遺伝子発現を制御するための手段としてのアンチセンスRNAの使用を最適化する試みにおいて、Fireら(1998)は、dsRNAがアンチセンスRNAのみより有効であることを見出した。dsRNAはin vitro(Fireら 1998)またはin vivo(Tavernarakisら 2000)で産生され、尚も高い特異性で遺伝子抑制を媒介することが可能であった。その後の研究は、dsRNAが広範な真核生物における遺伝子サイレンシングの有効な誘導物質であること、およびこの形態の遺伝子調節をもたらすメカニズムが、十中八九、進化を通して保存されていることを示している(Baulcombe, D. C. (1996) *Plant Mol Biol* 32(1-2), 79-88; Lohmann, J. U., Endl, I.およびBosch, T. C. (1999) *Dev Biol* 214(1), 211-4; Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K.およびUllu, E. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25), 14687-92; Cogoni, C.およびMacino, G. (1999) *Nature* 399(6732), 166-9; Kennerdell, J. R.およびCarthew, R. W. (1998) *Cell* 95(7), 1017-26; Schoppmeier, M. およびDamen, W. G. (2001) *Dev Genes Evol* 211(2), 76-82; Baker, M. W. およびMacagn

o, E. R. (2000) *Curr Biol* 10(17), 1071-4; Wargelius, A., Ellingsen, S.およびFjose, A. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 263(1), 156-61)。

【0003】

種々の実験系において生化学的および遺伝的アプローチを用いて、RNAiの分子メカニズムが解明され始められている (Hammond, S.M., Caudy, A.A.およびHannon, G.J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* 2, 110-19)。現在のところ、RNAiは開始段階およびエフェクター段階の両方に関与すると仮定されている。開始段階においては、dsRNAはRNアーゼIIIファミリーヌクレアーゼDicerによりプロセシングされて21~23ヌクレオチドの二本鎖siRNA (small interfering RNA) を産生する。dsRNAのこれらの短い伸長は、遺伝子サイレンシングの効果に寄与する、2ヌクレオチドの3'-OH突出を含有する (Elbashir, S.M., Lendeckel, W.およびTuschl, T. (2001) *Genes & Dev* 15:188-200)。エフェクター段階においては、これらのsiRNAは、RISC (RNA-induced silencing complex; RNA誘導性サイレンシング複合体) と称される多タンパク質複体内に取り込まれ、これは、siRNA鎖の1つと内在性mRNAとの塩基対形成により転写産物を標的化する (Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D.およびHannon, G.J. (2000) *Nature* 404: 293-96)。ついで、RISC複合体に伴うヌクレアーゼ活性がmRNA-siRNA二本鎖を切断し、このようにして対応mRNAを標的化し破壊する。

【0004】

哺乳類細胞においては、遺伝子発現を制御するためのdsRNAの使用は、特有の包括的 (global) 応答メカニズムの存在により妨げられている。30塩基対長より長いdsRNAにさらされた哺乳類細胞は、2つの鍵酵素であるdsRNA活性化プロテインキナーゼ (PKR) および2'5'オリゴアデニル酸ポリメラーゼ/RNアーゼLの活性化を含む応答メカニズムを始動させる (Kumar, M.およびCarmichael, G. G. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4), 1415-34)。これらの酵素の活性化はタンパク質合成の停止を招き、最終的にはアポトーシスによる細胞死を招く。したがって、長いdsRNAの導入はこの包括的応答系を活性化すると予想されていた。しかし、移植前のマウス胚 (Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H.およびSchultz, R. M. (2000) *Development* 127(19), 4147-4156; Wianny, F.およびZernicka-Gotz, M. (2000) *Nat Cell Biol* 2(2), 70-5) ならびに未分化胚性幹細胞および胚性癌細胞 (Yang, S., Tutton, S., Pierce, E.およびYoon, K. (2001) *Mol Cell Biol* 21(22), 7807-16; Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U.およびFilipowicz, W. (2001) *Proc. Natl Acad Sci* 98, 14428-14483; Paddison, P., Caudy, A. A.およびHannon, G.J. (2002) *Proc. Natl Acad. Sci.* 99, 1443-1448) においては、*in vitro*で作製した長いdsRNAの使用が特異的遺伝子サイレンシングを媒介することが可能であったことを、研究は示している。これらの観察の主な理由は、これらの細胞系がdsRNAに対する普遍的応答を欠くことであった。これらの結果は励みになるものではあったが、分化哺乳類細胞におけるこのアプローチの有用性に一定の制限を課すものであった。

【0005】

Dicer (ダイサー) 酵素の産物がショウジョウバエ (*Drosophila*) 胚抽出物においてRNAiを媒介するという観察の後、化学合成された21bpのsiRNAが、遺伝子サイレンシングを誘導するために広範なヒトおよびマウス細胞系において使用されることが示された (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K.およびTuschl, T. (2001) *Nature* 411(6836), 494-8; Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. およびMorgan, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9742-9747)。多種多様な標的遺伝子の発現を一過的に制御するためのこのアプローチは既に実証されており、哺乳類細胞における遺伝子機能を決定するための恰好な方法になりつつある (Hsu, J.Y., Reimann, J. D. R., Sorensen, C.S., Lucas, J.およびJackson, P. K. (2002) *Nature Cell Biol.* 4, 358-366; Thompson, B., Tonwsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Muisi, H.およびBienz, M. (2002) *Nature Cell Biol.* 4, 367-373)。これらの合成dsRNA法に伴う制約の1つは、dsRNAにより誘導される抑制効果が一過性であることである。

【0006】

その後、哺乳類細胞は、マイクロRNA (microRNA) と称される小さなRNAの非常に大きな一群を含有することが示され、これはヘアピンRNA前駆体として転写され、これがDicerによりプロセシングされて成熟21塩基形態を与えると仮定されている (Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. および Tuschl, T. (2001) *Science* 294, 853-858; Lau, N. C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. および Bartel, D.P. (2001) *Science* 294, 858-862; Lee, R.C. および Ambros, V. (2001) *Science* 294, 862-864)。短いヘアピンRNA (shRNA) が哺乳類細胞において特異的遺伝子サイレンシングを誘導しうることを示すために、いくつかのグループが、この天然で生じる生物メカニズムを利用している (Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. および Conklin, D.S. (2002) *Genes & Dev* 16, 948-958; Brummelkamp, T.R., Bernards, R. および Agami, R. (2002) *Science* 296, 550-553; Sui, G., Soohoo, C., Affar, E., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C. および Shi, Y. (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99, 5515-20; Yu, J., DeRuiter, S.L. および Turner, D.L. (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99, 6047-52)。さらに、RNAiを介して哺乳類細胞内で一過的および安定に遺伝子発現を調節しうる配列特異的shRNAの発現を駆動するために内在性U6 snRNAまたはH1プロモーターを使用する発現カセットが開発されている (Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. および Conklin, D.S. (2002) *Genes & Dev* 16, 948-958; Brummelkamp, T.R., Bernards, R. および Agami, R. (2002) *Science* 296:550-553)。これらの発現カセットから産生されたshRNAはDicerにより21bpのsiRNAにプロセシングされ、これが遺伝子サイレンシングのエフェクターであると考えられている。これらのカセットは、遺伝子機能をより良く理解するための哺乳類細胞およびトランスジェニックマウスにおけるリバース・ジェネティック・アプローチに有用であり、また、治療剤としても有用であると予想される。

【0007】

哺乳類細胞におけるRNAiに関する最新技術の大きな制約は、細胞過程または種々のヒト疾患に關与する新規遺伝子を同定するためのフォワード・ジェネティック・アプローチにおいてRNAiノックダウンを用いるための方法が存在しないことである。現在のところ、合成siRNAまたはRNAi発現構築物は遺伝子ごとに設計されており、このことは、全ゲノムRNAi発現ライブラリーを作製しスクリーニングするためのこれらの方法の有用性を制限するものである。本発明は、RNAiライブラリーの製造を可能にする方法を提供する。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

第1の態様において、本発明は、

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここで、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1配列および該ランダム配列に相補的であり、

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成することを含んでなる、DNA分子の製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA (hRNA) を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

【0009】

第2の態様において、本発明は、

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補

的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的 (convergent) プロモーターの間にクローニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA (dsRNA) を与える発現ベクターの製造方法を提供する。

【0010】

第3の態様において、本発明は、

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここで、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1領域および該ランダム配列に相補的であり、

10

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、

(v) 該二本鎖DNAを発現ベクター内にクローニングし、ここで、該二本鎖DNAはプロモーターの制御下にあり、

(vi) 該二本鎖DNAの転写を可能にする条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(vii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

20

【0011】

第4の態様において、本発明は、

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的 (convergent) プロモーターの間にクローニングし、

30

(vi) 該二本鎖DNAの転写を促進する条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(v) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

【0012】

第5の態様において、本発明は、収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含んでなる、標的遺伝子の発現の抑制に使用するための発現ベクターであって、該DNA分子が、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的的特異的配列を含み、該標的的特異的配列が、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含むことを特徴とする発現ベクターを提供する。

40

【0013】

第6の態様において、本発明は、

(i) 収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含む発現ベクターを調製し、ここで、該DNA分子は、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的的特異的配列を含み、該標的的特異的配列は、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含み、

(ii) 細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(iii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の表現型変化を検出することを含んでなる、標的遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

50

【0014】

第7の態様において、本発明は、

- (i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
- (ii) 工程(i)からのDNA断片にヘアピンDNAを連結し、
- (iii) 工程(ii)からのDNAに二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターはプライマー結合部位を含み、
- (iv) 工程(iii)からのDNAを変性させて、一本鎖DNA鎖のライブラリーを得、
- (v) 該プライマー結合部位にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

10

【0015】

第8の態様において、本発明は、

- (i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
- (ii) 工程(i)からのDNA断片の各末端に二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターの配列は、少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチドを3'末端に含み、
- (iii) 工程(ii)からの二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的プロモーターの間にクロニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA(dsRNA)分子を与える発現ベクターのライブラリーの製造方法を提供する。

20

【0016】

第9の態様において、本発明は、

- (i) mRNAのプールを調製し、
- (ii) 該mRNAのプールに酵素を加え、ここで、該酵素は該mRNAを逆転写してcDNAを形成し該mRNAを分解し、
- (iii) 工程(ii)からのcDNAにヘアピンループを形成させ、
- (iv) 逆転写酵素のプライミング(開始)点として該ヘアピンループを使用して第2鎖を合成し、
- (v) 工程(iv)からのDNAを変性させて一本鎖DNAを形成させ、
- (vi) DNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

30

【0017】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の第5の態様の発現ベクターを細胞内に導入することを含んでなる、該細胞における標的遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

【0018】

図面の簡潔な説明

図1：p53特異的shRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。ヒトp53に特異的なshRNAをコードする二本鎖DNAインサートの作製に関わる6工程。略語：sa11RE= SalI制限酵素部位；U= デオキシリボウリジン；p53= p53 mRNAのセンス鎖に特異的な19塩基；ステムループ= ステムループ構造を構成する21塩基。

40

図2：ランダムshRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。任意のランダム配列のshRNAをコードする二本鎖DNAインサートの作製に関わる6工程。略語は、以下のもの以外は、図1に示したのと同様である：N19= ランダムな19塩基；As19= ランダムN19配列のアンチセンス；Nc19= N19に対する相補的DNA鎖；Asc19= As19に対する相補的DNA鎖。

図3：EGFP特異的shRNA発現プラスミドを使用するdEGFP媒介細胞蛍光の抑制。A. pTZ(U6+1)ベクターのみ(紫色)またはpTZ(U6+1)GFP(緑色の上塗り)一過的にトランスフェクトされたHEK 293細胞(安定に組込まれたdEGFP標的遺伝子を含むもの)のフローサイ

50

トメトリー分析。B. Aで表されているFAC分析の定量化。各サンプルは三重にトランスフェクトした。

図4：修飾pLXSNレトロウイルスベクターにおけるランダムshRNA発現ライブラリーの構築。唯一のSwaI部位を含有する45bpのスタッファー断片をU6プロモーターの下流のSalI部位とXbaI部位との間に導入した。B. pLXSNU6Swaにおけるクローニング部位。C. pLXSNU6Swaを使用するランダムshRNA発現ベクターの作製。

図5：p53に特異的な相補的センスおよびアンチセンスRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。ヒトp53に特異的な相補的センスおよびアンチセンスRNAをコードするDNAインサートの作製に関わる4工程。

図6：EGFP siRNAをコードするレトロウイルス発現ベクターで一過的にトランスフェクトされた細胞におけるdEGFP媒介細胞蛍光の減少。A. EGFP特異的siRNAをコードするレトロウイルスベクターpLXSNU6/H1GFPの構造。B. pLXSNU6/H1GFPの感染後にHEK 293細胞（安定に組込まれたdEGFPトランスジーンを含有するもの）におけるdEGFP媒介細胞蛍光の抑制。

10

図7：p53 siRNAをコードするレトロウイルス発現ベクターに感染したHCT116結腸癌細胞におけるp53タンパク質レベルの減少。pLXSNU6/H1p53レトロウイルスsiRNA発現ベクターの構造。

図8：全ゲノムsiRNAレトロウイルス発現ライブラリーの構築。ランダムインサートを作製しランダムsiRNA発現ライブラリーを構築するために用いる4工程の概要。B. ランダムsiRNA発現ベクター系の構造の概要図。C. ヒトゲノムにおけるライブラリーインサートの分布。

20

図9：細胞内siRNAの作製方法、およびトランスジーン発現に対する発現siRNAの効果。A. 収束的U6発現カセットは、定方向終結配列において終結するセンスおよびアンチセンスRNAをコードしている。該相補的RNAはアニールし、更なるDicer依存的プロセッシングを受けて、機能的siRNAを産生する。B. EGFP特異的インサートを含有するU6収束的発現ベクター（DualU6GFP）はdEGFP媒介細胞蛍光を減少させる。

図10：安定に組込まれた収束転写ベクターを使用する、dEGFPトランスジーン発現の抑制。HEK 293細胞をpDualU6ベクターまたはpDualU6GFPのいずれかとpREP7プラスミドとで10:1のモル比でコトランスフェクトし、ヒグロマイシン耐性に関して細胞を選択する。選択後、dEGFP媒介細胞蛍光のレベルに関して細胞を検査する。

30

図11：DualU6GFPベクターによる標的遺伝子発現の抑制はセンスRNAおよびアンチセンスRNAの両方の共発現を要する。

図12：DualU6GFP発現ベクターはdEGFP標的遺伝子発現をDicer依存的に減少させる。

図13：pLXSNU6/H1p53を含有するHCT116細胞における5-FU誘導性アポトーシス。A. p53 siRNAを発現する細胞におけるsubG1集団の減少。B. p53 siRNAを発現する細胞はカスパーゼの5-FU誘導性活性化に対する抵抗性を示す。C. p53 siRNAを発現する細胞は5-FUへの曝露後の細胞生存性の増強を示す。

図14：スパイク（spiked）siRNA発現ライブラリーの5-FU遺伝的選択の概要。

図15：全ゲノムRNAiライブラリーのためのレトロウイルス発現ベクター。A. pLXSNU6/H1。B. pLXSNU6/H1LTR。C. pQCXINU6/H1SIN。

40

図16：ゲノム特異的shRNAおよびsiRNAライブラリーの構築方法。

図17：発現RNA集団に特異的なshRNAおよびsiRNAライブラリーの構築方法の概要図。

図18：遺伝的選択を用いるHIV特異的shRNAまたはsiRNAの同定。

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、特定の細胞表現型に寄与する又は特定の刺激により修飾される未知および公知の遺伝子を同定し単離し特徴づけるための、すべての標的mRNA部位を認識しうるshRNAまたはsiRNAをコードするDNA配列のライブラリーの製造を可能にする方法に関する。これらの発現ライブラリーは、標的遺伝子の発現を抑制するように設計され、コード化shRNAまたはsiRNAの配列に基づいて、細胞表現型における変化をもたらす標的遺伝子を同定す

50

る。この方法は、*in vivo*でのそれぞれ分子内または分子間ハイブリダイゼーションにより二本鎖RNAを形成するRNA配列をコードするインサートを含むランダムshRNAおよびsiRNA発現ライブラリーの構築を要する。

【0020】

本発明はまた、RNAi経路により哺乳類細胞において遺伝子サイレンシングを媒介するセンスRNAおよびアンチセンスRNAを産生しうる収束的プロモーター系を提供する。この系は、トランスジーンおよび内在性遺伝子の発現を抑制するために使用することができる。

【0021】

メディエーターとしてのdsRNAの使用は、ハンマーヘッドリボザイムおよびヘアピンリボザイムと比較して顕著な利点を有し、それらには、発現dsRNAに結合し標的mRNAとの相互作用および標的mRNAの切断を媒介する天然細胞タンパク質複合体（RISCと称される）の存在が含まれる。

10

【0022】

第1の態様において、本発明は、

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここで、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1配列および該ランダム配列に相補的であり、

20

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成することを含んでなる、DNA分子の製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA（hRNA）を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

【0023】

好ましい実施形態においては、該第1配列内にデオキシウラシルヌクレオチドが含まれており、該プライマーを加える前に、該一本鎖DNA鎖を、好ましくはウラシルヌクレオチドグリコシラーゼで、脱プリン化し、脱離させる。

【0024】

好ましい実施形態においては、該二本鎖DNAを発現ベクター内にクローニングする。より好ましくは、該二本鎖DNAを発現ベクター内にクローニングし、該二本鎖DNAをプロモーターの制御下に配置する。

30

好ましい実施形態においては、該第1 DNA鎖は制限酵素部位を含む。

【0025】

宿主細胞における本発明の発現ベクターの運搬および転写は、該二本鎖RNA領域に対する相補性を有する標的mRNAに特異的なhRNA、特に、短いヘアピンRNA（shRNA）を与える。本発明のshRNAは遺伝子発現の有効な修飾因子であることが示されている。

【0026】

好ましくは、該ランダム配列は約19～約30塩基対長である。より好ましくは、該ランダム配列は約19～25塩基対長である。最も好ましくは、該ランダム配列は19塩基対長である。

40

【0027】

本明細書中で用いる「相補性」なる語は、塩基対形成の規則により関連づけられる「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」（これらは、ヌクレオチド配列を意味する互換性のある用語である）に関して用いられる。例えば、配列5'-CTGAG-3'は配列5'-CTCAG-3'に相補的である。相補性は部分的または全体的でありうる。部分的相補性は、塩基対形成の規則に従った場合に1以上の核酸塩基がマッチしない場合である。全体的または完全相補性は、塩基対形成の規則に従い各核酸塩基が別の塩基とマッチする場合である。核酸鎖間の相補性の度合は、核酸間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して

50

有意な影響を及ぼす。

【0028】

「ループ」なる語は、「ステム」構造を形成するよう互いに対形成しうる核酸配列に一本鎖核酸配列が隣接している、核酸配列内の不對二次構造を意味する。核酸に関して用いる「不對」なる語は、お互いとは対形成し得ないが他の配列とは対形成しうる核酸配列に核酸が隣接しており該核酸が一本鎖である、核酸配列内の二次構造を意味する。任意の長さ及び任意の配列のループ構造が本発明の範囲内に含まれると意図される。RNA二次構造形成の予測のためのコンピュータプログラムは当技術分野において公知であり、それらには例えば、Hofackerら (1994) Monatshefte F. Chemie 125:167-188; McCaskill (1990) Biopolymers 29:1105-1119に記載の「RNAFOLD」、および「DNASIS」(Hitachi)が含まれる。

10

【0029】

本明細書中で用いる「発現ベクター」なる語は、所望のコード配列と、機能しうる形で連結されたコード配列の宿主生物内発現に必要な適当な核酸配列とを含有する組換えDNA分子を意味する。真核細胞内での発現に必要な核酸配列は、通常、プロモーターならびに終結およびポリアデニル化シグナルを含む。好ましい実施形態においては、該発現ベクターはまた、該RNAの安定性を増強するために、安定化要素を発現RNA内に組込む。本明細書中で用いる「ベクター」なる語は、1つの細胞から別の細胞へDNAセグメントを運ぶ核酸分子に関して用いる。ベクターには、プラスミド、ウイルス、レトロトランスポゾンおよびコスミドが含まれる。

20

【0030】

好ましくは、該二本鎖DNAを、哺乳類細胞内での発現に適した発現ベクター内にクローニングする。該RNA発現ライブラリーをコードする配列を含有する発現ベクターを構築するためには、当業者によく知られた方法を用いることが可能である。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術および*in vivo*組換え又は遺伝子組換えが含まれる。そのような技術はSambrookら (1989) Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.およびAsubel F Mら (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N.Y.に記載されている。

【0031】

本明細書中で用いる「プロモーター」なる語は、互いに及び関心のある少なくとも1つのDNA配列に機能しうる形で連結された複数(すなわち、1以上)のプロモーター配列ならびに単一のプロモーター配列を意味する。プロモーターは、転写に参与する細胞タンパク質と特異的に相互作用する短い並びのDNA配列よりなる(Maniatis T.ら, Science 236:1237 (1987))。プロモーター要素は、種々の真核生物プロモーター要素源、例えば、植物、酵母、昆虫および哺乳類細胞内の遺伝子ならびにウイルスから単離されている。特定のプロモーターの選択は、関心のあるDNA配列を発現させるためにどのような細胞型を使用するかにより左右される。所望により、プロモーターは、転写部位から数千塩基対も離れて位置しうる遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素をも含みうる。プロモーターは構成的プロモーター、例えば、ほとんどの環境条件または発生段階で活性なプロモーターでありうる。あるいは、プロモーターは誘導性であることが可能であり、例えば細胞外刺激に

30

40

【0032】

真核細胞内での組換えDNA配列の効率的発現は、生じる転写産物の効率的な終結およびポリアデニル化を導くシグナルの発現を要する。転写終結シグナルは一般にはポリアデニル化シグナルの下流に存在し、一般には数百ヌクレオチド長である。

【0033】

好ましい実施形態においては、U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの制御下にある発現ベクター内に該二本鎖DNAをクローニングする。より好ましくは、U6 snRNAプロモーターの制御下にある発現ベクター内に該二本鎖DNAをクローニングする。

【0034】

50

該第2 DNA鎖の合成は、DNAの第1鎖からDNAの第2鎖を合成するための当業者によく知られた第2鎖合成技術を用いて、例えば、AmpliTaq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer) のようなDNAポリメラーゼを使用して達成することが可能である。第2鎖の合成のための適当な技術は、Sambrookら (1989) *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.およびAsubel F Mら (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York N.Y.に記載の技術でありうる。

【0035】

第2の態様において、本発明は、

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的 (convergent) プロモーターの間にクローニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA (dsRNA) を与える発現ベクターの製造方法を提供する。

10

【0036】

存在するインサートの2本の鎖の収束的プロモーターからの転写は、3'末端に2~4塩基の突出部を含有するsiRNAを形成するようハイブリダイズしうる2つの小さな相補的RNAの産生をもたらす。

20

【0037】

本発明の方法により製造された発現ベクターは、生物における関心のある配列または遺伝子の機能を同定するのに有用である。

【0038】

好ましくは、該ランダム配列は約19~約30塩基対長である。より好ましくは、該ランダム配列は約19~25塩基対長である。最も好ましくは、該ランダム配列は19塩基対長である。

【0039】

好ましい実施形態においては、発現ベクター内の2つの収束的U6 snRNA、H1またはT7プロモーターの間に該二本鎖DNAをクローニングする。より好ましくは、発現ベクター内の2つの収束的U6 snRNAプロモーターの間に該二本鎖DNAをクローニングする。

30

【0040】

本発明の第1または第2の態様のランダム配列は、合成中のヌクレオチドのランダム挿入による合成的製造、ESTライブラリーの使用、または関心のある生物のゲノムのランダム消化を含む多数の方法により製造することが可能である。ウイルス病原体または他の病原体における遺伝子機能の分析においては、ゲノムのランダム消化によるライブラリーの製造に特に関心がもたれうる。ゲノムのランダム消化は、当業者に公知の技術、例えばDNアーゼI消化により達成することが可能である。合成配列は、例えば、Needham-VanDevanterら (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168に記載の自動合成装置を使用して、BeaucaigeおよびCaruthers (1981) *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862に記載の固相ホスホルアミジットトリエステル法のような公知方法に従い化学的に製造することができる。必要に応じて、典型的には、ゲル電気泳動または陰イオン交換HPLC (PearsonおよびRegnier (1983) *J. Chrom.* 255:137-149に記載されている) により、該分子の精製を行う。該配列は、GrossmanおよびMoldave (編) *Academic Press, New York, Methods in Enzymology* 65:499-560 (1980)におけるMaxamおよびGilbertの化学分解法を用いて確認することができる。

40

【0041】

好ましい実施形態においては、該第1または第2態様の方法に従い製造された発現ベクターは、宿主細胞をトランスフェクトするために使用される。

【0042】

50

第3の態様において、本発明は、

(i) 第1配列、ランダム配列および第2配列をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、ここで、該第2配列がステムループを形成するよう、該第2配列の3'末端のヌクレオチドは該第2配列の5'末端のヌクレオチドに相補的であり、

(ii) DNAポリメラーゼを使用して、該ステムループから伸長する相補的DNA鎖を合成し、ここで、該相補的DNA鎖は、ヘアピンDNAを形成するよう、該第1領域および該ランダム配列に相補的であり、

(iii) 該ヘアピンDNAを変性させて一本鎖DNA鎖を形成させ、

(iv) 該第1配列の相補体にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、

(v) 該二本鎖DNAを発現ベクター内にクローニングし、ここで、該二本鎖DNAはプロモーターの制御下にあり、

(vi) 該二本鎖DNAの転写を可能にする条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(vii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

【0043】

第4の態様において、本発明は、

(i) 少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチド、ランダム配列、少なくとも4個の連続したチミジンヌクレオチドおよびプライマー結合部位をこの順序で含む第1 DNA鎖を合成し、

(ii) プライマーを該プライマー結合部位にアニールさせ、該第1 DNA鎖に実質的に相補的であり二本鎖DNAを形成する第2 DNA鎖を合成し、

(iii) 該二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的 (convergent) プロモーターの間にクローニングし、

(iv) 該二本鎖DNAの転写を促進する条件下、細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

(v) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の変化を検出することを含んでなる、遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

【0044】

第5の態様において、本発明は、収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含んでなる、標的遺伝子の発現の抑制に使用するための発現ベクターであって、該DNA分子が、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的的特異的配列を含み、該標的的特異的配列が、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含むことを特徴とする発現ベクターを提供する。

【0045】

宿主細胞における本発明の発現ベクターの運搬および転写は、該標的的特異的配列に対する相補性を有する標的mRNAに特異的なsiRNAまたはhrRNAを与える。本発明のsiRNAは遺伝子発現の有効な修飾因子であることが示されている。

【0046】

好ましくは、該標的的特異的配列は少なくとも19塩基対長である。より好ましくは、該標的的特異的配列は19~約30塩基対長である。より好ましくは、該標的的特異的配列は19~25塩基対長である。最も好ましくは、該標的的特異的配列は19塩基対長である。

【0047】

該標的遺伝子は、何らかの理由により操作することが望ましいと当業者により考えられる関心のある任意の遺伝子でありうる。

【0048】

好ましい実施形態においては、該標的的特異的配列は該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも95%の同一性を有し、より好ましくは、同一である。

【0049】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態においては、該発現ベクターはレトロウイルス発現ベクターである。

好ましい実施形態においては、該発現ベクターは、該発現ベクターでトランスフェクトされた細胞の選択のための選択マーカー、例えば抗生物質耐性マーカーをコードしている。より好ましくは、該発現ベクターはG418選択マーカーをコードしている。

【0050】

本発明の発現ベクターを構築するためには、当業者によく知られた方法を用いることが可能である。これらの方法には、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術および*in vivo*組換え又は遺伝子組換えが含まれる。そのような技術はSambrookら (1989) *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.およびAsubel F Mら (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York N.Y.に記載されている。

10

【0051】

存在するインサートの2本の鎖の収束的プロモーターからの転写は、3'末端に2~4塩基の突出部を含有するsiRNAを形成するようハイブリダイズしうる2つの小さな相補的RNAの産生をもたらす。

【0052】

好ましい実施形態においては、該収束的プロモーターはU6 snRNA、H1またはT7プロモーターである。より好ましくは、該収束的プロモーターはU6 snRNAプロモーターである。

【0053】

本発明の方法により製造された発現ベクターは、生物における関心のある配列または遺伝子の機能を同定するのに有用である。

20

【0054】

第6の態様において、本発明は、

(i) 収束的プロモーターのペアとそれらの間に位置するDNA分子とを含む発現ベクターを調製し、ここで、該DNA分子は、2つの定方向転写ターミネーターに隣接する標的特異的配列を含み、該標的特異的配列は、該標的遺伝子のセグメントに対して少なくとも90%の同一性を有する少なくとも14ヌクレオチドの配列を含み、

(ii) 細胞内に該発現ベクターの有効量をトランスフェクトして、トランスフェクトされた細胞を得、

30

(iii) 対照細胞と比較した場合の該トランスフェクトされた細胞における1以上の表現型変化を検出することを含んでなる、標的遺伝子の機能を決定するための方法を提供する。

【0055】

本発明は、生物におけるヌクレオチド配列の1以上の機能の同定方法を提供する。本発明の方法は、標的コード配列によりコードされるRNAを選択的に減弱、減少または破壊して、宿主内の標的遺伝子は無傷に維持したまま該RNAを非機能的にする。したがって、これらの方法は、遺伝子機能を決定するために、伝統的な「ロックアウト」法ではなく「ロックダウン」法を用いる。本発明は、例えば、疾患の治療または予防のために標的化される疾患関連遺伝子の迅速な同定に有用である。本発明の方法は、ウイルスまたは病原体による感染に対する細胞の感受性において主要な役割を果たすウイルスまたは病原体由来遺伝子の同定にも有用である。

40

【0056】

好ましい実施形態においては、該発現ベクターはレトロウイルス発現ベクターである。

好ましい実施形態においては、該トランスフェクトされた細胞を回収し、該二本鎖DNAインサートを回収し又は増幅し(例えばポリメラーゼ連鎖反応により)、再クローニングし、更なる富化工程に付す。

【0057】

もう1つの好ましい実施形態においては、富化されたインサートを配列決定し、それを使用して例えば相同性検索により潜在的標的遺伝子を同定したり、あるいは標的mRNAを捕

50

捉する。

【0058】

好ましい実施形態においては、該発現ベクターは、該発現ベクターでトランスフェクトされた細胞の選択のための選択マーカー、例えば抗生物質耐性マーカーをコードしている。より好ましくは、該発現ベクターはG418選択マーカーをコードしている。

【0059】

本明細書中で用いる「トランスフェクション」なる語は、細胞内へのトランスジーン、例えばベクターの導入を意味する。トランスフェクションは、リン酸カルシウム-DNA共沈法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、ポリプレックス媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム融合、リポフェクション、プロトプラスト融合、レトロウイルス感染またはバイオリスティクス (biolistics) (すなわち、粒子射撃 (粒子ボンバードメント)) を含む当技術分野で公知の種々の手段により達成することが可能である。トランスフェクションは一過的または安定なトランスフェクションでありうる。「安定なトランスフェクション」または「安定にトランスフェクトされた」なる語は、トランスフェクトされた細胞のゲノム内へのトランスジーンの導入および組込みを意味する。「一過性トランスフェクション」または「一過的にトランスフェクトされた」なる語は、宿主細胞のゲノム内へのトランスジーンの組込みを伴わない、トランスフェクトされた細胞内への1以上のトランスジーンの導入を意味する。

10

【0060】

「関心のある遺伝子」なる語は、何らかの理由により操作することが望ましいと当業者により考えられうる任意の遺伝子を意味する。

20

【0061】

ゲノムDNA配列の機能を決定するための本発明の方法の好ましい実施形態においては、そのゲノム配列により発現されるRNAの量を減少させるためにshRNAまたはsiRNA配列を細胞内に導入する。

【0062】

実質的にすべての基質RNAが切断されるよう十分な量のshRNAまたはsiRNAを発現させることが望ましい。基質RNA発現のそのような実質的な阻害は、shRNAまたはsiRNAが発現される生物における遺伝子機能の減弱の効果の観察を促進するであろう。基質RNAの完全な排除は、望ましいものの、本発明の方法に必要なわけではない。

30

【0063】

本明細書中で用いる「対照」細胞には、トランスフェクトされていない細胞、模擬トランスフェクトされた細胞、または二本鎖DNAインサートを含有しない発現ベクターのような「空ベクター」でトランスフェクトされた細胞が含まれる。

【0064】

前記発現ベクターを含有する真核細胞のような宿主細胞も本発明により提供される。適当な宿主細胞には、細菌細胞、ラット細胞、マウス細胞およびヒト細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0065】

本発明の方法は、生物における遺伝子もしくはDNA配列の又は別の生物における相同遺伝子もしくはDNA配列の発現の減少の効果の観察を含むフォワード・ジェネティック・アプローチにより生物における関心のある遺伝子またはDNA配列遺伝子の機能を決定するのに有用である。例えば、本明細書に記載のデータは、それぞれHCT116結腸癌細胞またはHEK293胚性腎細胞におけるp53またはEGFP遺伝子の機能が転写産物のsiRNAまたはshRNA媒介切断により決定されうることを示している。

40

【0066】

全ゲノムRNAiライブラリーによるフォワード・ジェネティック・アプローチにおいて使用しうる遺伝的選択のタイプは、例えばp53媒介増殖停止およびアポトーシスを迂回することによる、細胞増殖停止の抑制；例えば5-FU誘導性増殖停止、アポトーシスおよび老化を抑制する化学療法薬物耐性に関与する新規標的の同定；例えばTGF およびWnt経路のよ

50

うな癌に關与するシグナリング経路の新規陽性および陰性調節因子を同定する、活性化シグナリング経路の遮断；HIV感染に対する抵抗性を付与する又はウイルスの生活環の増殖期もしくは潜伏期を妨げる遺伝子に関する遺伝的スクリーニング、あるいはプラスモジウムのような細胞内寄生生物の生活環を妨げる遺伝子に関する遺伝的スクリーニングを含む、ウイルスおよび病原体感染に対する抵抗性の解明；不活性化されると細胞死を招く遺伝子産物（特に、p53またはp16/Rb腫瘍抑制経路が欠損した腫瘍細胞におけるもの）を同定するための合成致死性スクリーニング；例えば *in vivo* アッセイを用いる、転移に關与する遺伝子の同定；特異的標的に対する最適 siRNA の同定；特異的プロモーターを調節する遺伝子の検出；例えば（足場依存性増殖のための）軟寒天アッセイおよび（因子非依存性増殖のための）最少培地（それらは共に、細胞培養内の細胞トランスフォーメーションの、広く用いられている指標である）を用いる、細胞周期調節遺伝子の検出；活発に分裂している細胞に対して毒性であるヌクレオシド類似体であるプロモデオキシウリジンを使用する、腫瘍発生を引き起こす未知遺伝子の同定を含む。

10

【0067】

当業者には理解されるとおり、本発明は、発現されると siRNA または hRNA を与える構築物のライブラリーの製造を可能にする。

【0068】

したがって、第7の態様において、本発明は、

- (i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
- (ii) 工程(i)からのDNA断片にヘアピンDNAを連結し、
- (iii) 工程(ii)からのDNAに二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターはプライマー結合部位を含み、
- (iv) 工程(iii)からのDNAを変性させて、一本鎖DNA鎖のライブラリーを得、
- (v) 該プライマー結合部位にハイブリダイズするプライマーおよびDNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

20

【0069】

第8の態様において、本発明は、

- (i) 二本鎖DNA断片のライブラリーを調製し、
- (ii) 工程(i)からのDNA断片の各末端に二本鎖DNAアダプターを連結し、ここで、該DNAアダプターの配列は、少なくとも4個の連続したアデノシンヌクレオチドを3'末端に含み、
- (iii) 工程(ii)からの二本鎖DNAを発現ベクター内の2つの収束的プロモーターの間にクローニングすることを含んでなる、発現されることにより二本鎖RNA(dsRNA)分子を与える発現ベクターのライブラリーの製造方法を提供する。

30

【0070】

好ましい実施形態においては、DNAの消化により二本鎖DNA断片のライブラリーを調製する。消化されるDNAは、好ましくは、遺伝子、ゲノムまたはcDNAライブラリーである。該消化は、当分野でよく知られた或る範囲の酵素を使用して行いいうるが、該消化はDNアーゼIで行うのが好ましい。

40

【0071】

生じた二本鎖DNAを、好ましくは、U6 snRNA、H1およびT7よりなる群から選ばれるプロモーター、好ましくはU6 snRNAの制御下にある発現ベクター内にクローニングする。

【0072】

第9の態様において、本発明は、

- (i) mRNAのプールを調製し、
- (ii) 該mRNAのプールに酵素を加え、ここで、該酵素は該mRNAを逆転写してcDNAを形成し該mRNAを分解し、
- (iii) 工程(ii)からのcDNAにヘアピンループを形成させ、

50

(iv) 逆転写酵素のプライミング(開始)点として該ヘアピンループを使用して第2鎖を合成し、

(v) 工程(iv)からのDNAを変性させて一本鎖DNAを形成させ、

(vi) DNAポリメラーゼを加えて二本鎖DNAを合成し、それにより二本鎖DNA分子のライブラリーを得ることを含んでなる、DNA分子のライブラリーの製造方法であって、該DNA分子から転写されるmRNAがヘアピンRNA(hrRNA)分子を形成することを特徴とする製造方法を提供する。

好ましい実施形態においては、工程(ii)における酵素はAMV逆転写酵素である。

【0073】

さらに、該二本鎖DNA分子を、U6 snRNA、H1およびT7よりなる群から選ばれるプロモーターの制御下、好ましくはU6 snRNAの制御下にある発現ベクター内にクローニングする。

【0074】

RNAi経路を介して作用するsiRNAが発現されうことは遺伝子の発現の調節を可能にし、これらの遺伝子の発現から生じる病態を軽減するための治療用途を可能にする。

【0075】

したがって、もう1つの態様において、本発明は、本発明の第5の態様の発現ベクターを細胞に付与することを含んでなる、該細胞における標的遺伝子の発現の抑制方法を提供する。

【0076】

該標的遺伝子は、該生物の細胞に由来する遺伝子、トランスジーン、または該生物の細胞内に存在する若しくは該病原体による感染後に該細胞内に残存する病原体の遺伝子でありうる。

【0077】

該細胞は動物または植物細胞であることが可能であり、単離されていたり、あるいは完全生物の一部を形成していることが可能である。

【0078】

第5の態様の発現ベクターは、生物に対して使用される場合には、直接的な導入、例えば直接的な注射により該生物に付与されたり、あるいは経口的導入または局所適用を含む当業者に公知の他の手段により導入されうる。該発現ベクターは、該生物に由来する生殖系列もしくは体細胞、幹細胞または他の多能性細胞に導入され、該生物に再導入されうる。

【0079】

本発明は、標的遺伝子の発現から生じる病態の治療または予防に使用することが可能である。病態には、自己免疫疾患、遺伝病、癌、病原体による感染、または標的遺伝子の過剰発現が含まれるが、これらに限定されるものではない。治療は、該疾患に関連した任意の症状または臨床的徴候の予防または改善を含むであろう。

【0080】

本発明の標的遺伝子には、化学療法薬物耐性、アポトーシスおよび老化に関与する遺伝子；癌に関与する遺伝子、例えば、転移に関与する遺伝子および腫瘍発生の原因となる遺伝子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0081】

本発明はまた、本発明の少なくとも1つの発現ベクターを含んでなる医薬組成物および製剤を含む。本発明の医薬組成物は、局所的治療が望ましいのか全身的治療が望ましいのかに応じて及び治療すべき領域に応じて多数の方法により投与することができる。該投与は局所的、肺内、経口的または非経口的でありうる。

【0082】

局所投与用の医薬組成物および製剤には、経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤および散剤が含まれうる。通常の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが必要であるか望ましい場合もある。

【0083】

10

20

30

40

50

経口投与用の組成物および製剤には、散剤または顆粒剤、坐剤または溶液剤（水または非水性媒体中のもの）、カプセル剤、薬袋（satchel）または錠剤が含まれる。

【0084】

本発明の発現ベクターは更に、化学療法および放射線療法のような抗腫瘍療法に対する腫瘍細胞の感受性を増強するために使用することが可能である。

【0085】

したがって、本発明の或る実施形態においては、（a）本発明の1以上の発現ベクターと（b）非ハイブリダイゼーションメカニズムにより機能する1以上の化学療法剤とを含有するリポソームおよび他の組成物を提供する。そのような化学療法剤の具体例には、抗癌薬、例えばタキソール、ダウノルピシン、ダシチノマイシン（dacitinomycin）、ドキソルピシン、プレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、コルヒチン、ピンクリスチン、ピンラスチン、エトポシド、シスプラチンが含まれるが、これらに限定されるものではない。全般的には、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Ed., Berkowら編, 1987, Rahway, N.J., pp 1206-1228を参照されたい。

【0086】

治療用組成物の製剤化およびそれに続くその投与は当業者の技量の範囲内であると考えられる。投与量は、治療すべき病態の重症度および応答性に左右され、治療期間は数日間～数ヶ月、あるいは治癒が達成されるまで又は病態の軽減が達成されるまでである。最適な投与計画は患者の体内の薬物蓄積の測定から決定することができる。当業者は、最適な投与量、投与方法および反復率を容易に決定することが可能である。一般に、投与量は0.01 μg～100g/kg体重であり、毎日、毎週、毎月または毎年投与することが可能である。

【0087】

本明細書の全体にわたり、「含んでなる」なる語、または「含む」もしくは「含み」のような変形語は、示されている要素、整数もしくは工程、または要素、整数もしくは工程の群の包含を意味すると理解されるが、他のいずれの要素、整数もしくは工程、または要素、整数もしくは工程の群の排除をも意味するものではない。

【0088】

本明細書に挙げられている全ての刊行物を参照により本明細書に組み入れることとする。本明細書中に含まれている文書、法令、材料、装置、物品などのいずれの考察も専ら、本発明の場面状況を示すためのものである。これらの資料のいずれか又は全てが先行技術の一部を形成すること、あるいはこれらの資料のいずれか又は全てが本出願の各請求項の優先日の前にオーストラリア国において、本発明に関連した分野における既存の一般的知識であったと認めるものとみなされるべきではない。

【実施例】

【0089】

つぎに、本発明の本質をより明瞭に理解することが可能となるよう、その好ましい形態を以下の非限定的な実施例により説明する。

【0090】

〔実施例1〕

ランダムshRNAライブラリー

以下は、ランダムshRNAインサートを作製するため及び特異的遺伝子発現の抑制に関して遺伝子発現shRNAを試験するために開発した方法を説明する。shRNAをコードするDNAインサートを作製するための酵素的プロトコールを実証するために、本発明者らは標的としてp53遺伝子を使用した（図1）。これらの反応の出発物質は以下のオリゴヌクレオチドであった：

5' -TGTGGTGATTCGTCGACUGACTCCAGTGGTAATCTACGTCGAGTCTCTTGA^{ACTCGAC}-3'。

【0091】

この鋳型は、SalI制限酵素部位（下線部）を含むプライマー結合部位（TGTGGTGATTCGTC

10

20

30

40

50

GAC)、単一のデオキシリボウリジン塩基(太字)、ヒトp53に特異的な19ヌクレオチド(GACTCCAGTGGTAATCTAC)およびステムループを形成しうる21塩基の配列(GTCGAGTCTCTTGAACTCGAC)から構成されている。最後者の配列により形成される構造は、ループ配列に隣接する6個の相補的塩基から構成される。この方法における最初の工程は内部ステムループ構造の自己アニーリングである(工程1)。これは、75℃で5分間およびそれに続く37℃で20分間および4℃で一晩のオリゴヌクレオチドのインキュベーションを含む。該アニーリング反応後、T4 DNAポリメラーゼを使用して相補的アンチセンス鎖を伸長させた(工程2)。ついで、形成したヘアピン構造をウラシルDNAグリコシラーゼによるデオキシリボウリジン(U)の脱プリン化に付し、ついでそれをピペリジン処理により脱離させて該デオキシリボウリジン塩基の5'側の断片を喪失させた(工程3)。この配列の除去はプライマー結合部位を露出させる。プライマー配列(TGTGGTGATTCGTCGAC)のアニーリングの後、鎖置換を行いうるDNAポリメラーゼ(例えば、Bst DNAポリメラーゼ)を使用して第2鎖の合成を行った(工程4および5)。該二本鎖DNAをSalIで消化し、適当なベクターに連結した(後記を参照されたい)(工程6)。

10

【0092】

全ゲノムRNAi発現ライブラリーの構築に使用するランダムshRNAコード化ライブラリーを作製するために、以下のオリゴヌクレオチドを合成した:

5'-TGTGGTGATTCGTCGACUNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTCGAGTCTCTTGAACCTCGAC-3'。

【0093】

A、T、CおよびGの等モル比を確保する特別な手動混合機(Integrated DNA Technologies, USA)を使用して、合計1μmolのこの配列を合成した。この配列を、図1に示す酵素工程に付して、それぞれ特有のshRNAをコードする二本鎖DNAインサートを得た(図2)。該DNAインサートをSalIで消化し、RNAポリメラーゼIIまたはIIIプロモーターの制御下にある適当な発現ベクター内にクローニングした(後記を参照されたい)。また、これらのベクターは適当な転写終結配列を含有する。

20

【0094】

特異的遺伝子の発現を抑制するための、shRNAをコードする該DNAインサートの適合性を調べるために、dEGFPを標的として選択した。EGFP特異的shRNAをコードするpTZ(U6+1)GFPを構築するために、2つのオリゴヌクレオチド:

5'-TCGACCGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCGCTTCAGGGTCAGCTTGCCGTTTTT-3'および

5'-CTAGAAAAACGGCAAGCTGACCCTGAAGCGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCG-3'

30

をアニールさせ、pTZ(U6+1)内に存在するSalIおよびXbaI部位内にクローニングした。DNA配列解析は該SalIおよびXbaI部位内のEGFP shRNAインサートの存在を証明した。dEGFP遺伝子を安定に発現するHEK293細胞内の一過性トランスフェクションによりpTZ(U6+1)GFP shRNAプラスミドを試験した。Lipofectamine 2000を使用して、合計2μgのプラスミド(ベクターのみ又はpTZ(U6+1)GFP)を三重に運搬した。細胞を、トランスフェクションの24時間後および48時間後に集め、FACS分析によりdEGFP発現に関してアッセイした(図3)。この分析は、EGFP特異的shRNAをコードするpTZ(U6+1)GFPプラスミドがdEGFP媒介細胞蛍光を24時間の時点で40%および48時間の時点で30%減少させることを示した。部分的抑制の観察は十中八九、標的細胞のサブセットのみのトランスフェクションによるものであった。これは、pTZ(U6+1)GFPプラスミドを付与された細胞のヒストグラムにおける2番目に低い蛍光ピークの存在により実証される。

40

【0095】

pTZ(U6+1)内に含有されているU6+1プロモーターを、以下のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを使用してPCR増幅した: 5'-GCGCCTCGAGATAGGGAATTCGAGCTCGGTA-3'および5'-GCGCGGATCCTTGTAACGACGGCCAGTGC-3'。XhoIおよびBamHIでの消化後、このDNA断片をレトロウイルスベクターpLXSNのマルチクローニング部位内に連結してpLXSN(U6+1)を得た。有効なshRNAの発現に関してこのベクター系を試験するために、EGFP特異的shRNAをコードするインサートを、U6+1プロモーターの下流に位置するSalI部位内にクローニングした。さらに、ランダムshRNA発現ライブラリーの構築に使用するこのベクターを調

50

製するために、SwaI部位を含有するスタッファー断片を、U6+1プロモーターの3'側に位置するSalI部位とXbaI部位との間に挿入してpLXSNU6Swaを得た(図4)。これを達成するために、以下のオリゴヌクレオチドをアニールさせ、SalIおよびXbaIで予め消化されたpLXSNU(U6+1)内に連結した: 5'-TCGACTCAAGTTATACCCCTTGCCGATAGACTGCTTACATTTAAAT-3'および5'-CTAGATTTAAATGTAAGCAGTCTATCGGCAAGGGTATAACTTGAG-3'。ランダムshRNAをコードするDNAインサートをSalIで消化し、SalI-SwaI消化pLXSNU6Swa内に連結した。

【0096】

〔実施例2〕

ランダムsiRNAライブラリー

以下は、ランダムsiRNAインサートを作製するために及び特異的遺伝子発現の抑制に関して遺伝子発現siRNAを試験するために開発した方法を説明する。また、収束的プロモーターを使用するランダムsiRNA発現ライブラリーの構築の概要を説明する。短い相補的センスおよびアンチセンスRNAをコードするインサートを作製するための方法を開発するために、p53遺伝子を標的として使用した。プライマー結合部位、SalI制限部位、5個のアデノシン、p53に特異的な19個のヌクレオチド、5個のチミジン、XbaI制限部位および第2のプライマー結合部位を含有する以下の一本鎖オリゴヌクレオチド(63塩基)を合成した: 5'-CGGTGATTCCGTCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTTCTAGAGGTAACAGGCGC-3'(図5)。

【0097】

DNAプライマー(5'-GCGCCTGTTACCTCTAG-3')を前記オリゴヌクレオチドにアニールさせ、クレノウDNAポリメラーゼを使用して第2鎖の合成を行った。二本鎖DNAの作製の後、この断片をSalIおよびXbaIで消化し、収束的RNAポリメラーゼIIIプロモーターを含有する適当なベクター内に連結した。

【0098】

短い相補的RNAの発現を収束的プロモーターが駆動し反復配列が存在しないベクター系を確立するために、収束的U6 snRNAおよびH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーターを含むようpLXSNレトロウイルスベクターを修飾した(図6)。

【0099】

H1プロモーター領域を、プライマー5'-GCCTGCAGGATATTTGCATGTCGCTATGTTCTGG-3'および5'-GCTCTAGAGAGTGGTCTCATACAGAACTTATAAG-3'を使用してpSilencerからPCR増幅し、XbaIおよびSbfIで消化し、pLXSN(U6+1)ベクター内に挿入した。DNA配列解析は、U6およびH1プロモーターがpLXSNU6/H1内に存在し収束的であることを証明した。このベクターを、それが哺乳類細胞内でRNAiを誘導する能力に関して試験するために、EGFP(図6A)およびヒトp53遺伝子(図7A)に特異的なsiRNA発現ベクターを構築した。pLXSNU6/H1GFPベクターを構築するために、オリゴヌクレオチド5'-TCGACAAAAACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTT-3'および5'-CTCAGAAAAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTTTTTG-3'をアニールさせ、pLXSNU6/H1ベクターのSalIおよびXbaI部位内にクローニングした。GFPsiRNAをコードするレトロウイルスプラスミド(pLXSNU6/H1GFPと称される)を、Amphopack 293パッケージング細胞(これはPG13細胞と共にそれぞれ10:1の比で播かれた)内にトランスフェクトした。トランスフェクション効率は約40%であった。ウイルス含有培地(VCM)をこれらの細胞から集め、それを使用して、EGFPを安定に発現するHEK293またはHCT116標的細胞に感染させた。感染の72時間後、細胞を集め、フローサイトメトリーを用いてEGFP媒介細胞蛍光に関して検査した。この分析は、この一過性アッセイを用いた場合の細胞蛍光における若干の減少を示した(図6B)。

【0100】

内在性遺伝子の発現を調節するための収束的レトロウイルス発現系の有効性を試験するために、相補的p53特異的センスおよびアンチセンスRNAをコードするpLXSNU6/H1の誘導体を構築した。この目的のために、以下のオリゴヌクレオチドを合成した:

5'-CGGTGATTCCGTCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTTCTAGAGGTAACAGGCGC-3'。

【0101】

酵素による第2鎖の作製のための前記方法を行い、該DNAインサートをSalIおよびXbaIで

10

20

30

40

50

消化し、pLXSNU6/H1内のU6およびH1収束的プロモーター間にクローニングした(図7A)。pLXSNU6/H1p53と称される得られたプラスミドをAmphopack 293およびPG13パッケージング細胞の10:1混合物にトランスフェクトした。VCMをこれらの細胞から集め、それを使用してHCT116標的細胞に感染させた。感染効率は約63%であった。感染細胞をG418(500ug/ml)の選択に付した。プールした集団を選択の8日後に集め、系列希釈して単一のクローンを単離した。ウエスタン分析を用いて、該プール化集団および単一のクローンの両方をp53タンパク質レベルに関してモニターした。この実験は、該プール化細胞においてはp53タンパク質レベルが少なくとも50%減少したことを示した。この結果を示すゲルは、p53およびアクチンの発現レベルに関してプローブされたベクター対照(U6/H1)または試験ベクター(p53siRNA)のいずれかを含有するHCT116細胞からの3つの異なる濃度の全タンパク質ライセートを示す。選択したクローンの分析は、レトロウイルス発現ベクターpLXSNU6/H1p53がp53タンパク質レベルを減少させることを示した。この結果を示すゲルは、p53およびアクチンタンパク質のレベルに関してプローブされた対照ベクター(U6/H1)または試験ベクター(p53siRNA)のいずれかを含有するHCT116クローンからの全タンパク質ライセートを示す。

10

【0102】

pLXSNU6/H1p53により媒介される遺伝子特異的サイレンシングがRNAiを介して生じていたのかどうかを調べるために、選択されたHCT116クローンの、Dicer特異的siRNA(後記で説明する)での処理の効果を調べた。この目的のために、pLXSNU6/H1(ベクターのみ)またはpLXSNU6/H1p53のいずれかを含有するHCT116クローンを6ウェルプレートの単一のウェル内に 5×10^5 細胞で播いた。該細胞を24時間にわたり回復(recover)させ、ついで、リポフェクタミン(Lipofectamine)2000を使用して、種々の濃度(6nM、12nMおよび60nM)のDicer siRNAまたは60nMのナンセンスsiRNA(Dharmacon)でトランスフェクトした。3時間後、培地を完全McCoy's5A培地と交換した。トランスフェクションの24時間後および48時間後に細胞ペレットを回収し、p53およびアクチンタンパク質レベルのウエスタン分析のためにタンパク質ライセートを調製した。Dicer siRNAの濃度が増加するにつれて、p53の定常状態レベルは野生型レベルに戻った。この結果を示すゲルは、p53およびアクチンタンパク質に関してプローブされた、ベクター対照(U6/H1)または試験ベクター(p53siRNAクローン8)のいずれかを含有し種々の濃度のDicer siRNAでトランスフェクトされたHCT116細胞からの全タンパク質ライセートを示す。p53タンパク質レベルの減少におけるこの逆転は、pLXSNU6/H1p53を含有しより高い濃度の該ナンセンスsiRNAで処理されたHCT116細胞においては観察されなかった。これらの結果は、pLXSNU6/H1p53によるp53タンパク質レベルの観察された抑制が特異的であり、哺乳類細胞におけるRNAiメカニズムの鍵成分であるDicerに依存することを示唆している。

20

30

【0103】

レトロウイルス発現ベクターpLXSNに基づく収束的U6-H1プロモーター系が哺乳類細胞におけるRNAi媒介遺伝子抑制の誘導に有効であったという前記観察を前提として、全ゲノムsiRNA発現ライブラリーの構築に着手した。EFPおよびp53特異的インサートに関して確立された方法を用いて、以下のオリゴヌクレオチドプールを合成した:

5' -CGGTGATTCCTCGAGCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTCTAGAGGTAACAGGCGC-3'。

40

【0104】

A、T、CおよびGの等モル比を確保する特別な手動混合機(Integrated DNA Technologies, USA)を使用して、合計 $1 \mu\text{mol}$ の前記配列(19個のランダムヌクレオチド(N)を含有する)を合成した。DNAプライマー(5' -GCGCCTGTTACCTCTAG-3')をこのプールのオリゴヌクレオチドにアニールさせ、クレノウDNAポリメラーゼを使用して第2鎖の伸長を行った。この伸長工程の後、該DNAをXhoIおよびXbaIで消化し、子ウシ腸アルカリホスファターゼを使用して脱リン酸化して最終発現ライブラリーにおける鎖状インサートの生成を防いだ(図8A)。非変性15% PAGEゲル上での電気泳動、35塩基対の断片の切り出し及び粉砕および浸漬法による抽出の後、該DNAインサートをゲル精製した。精製されたインサートを、SalIおよびXbaIで予め消化された250ngのpLXSNU6/H1ベクターに、種々のインサート:

50

ベクター mol比 (10:1および100:1) で連結した。該ベクターは脱リン酸化されていなかった。16 で一晩のインキュベーションの後、連結物をSalIで処理し、連結産物を高コンピテントDH5細菌細胞内に形質転換した。形質転換細胞を単一のクローンとして又は液体増殖細胞として増殖させた (図8B)。100 μ lの連結容量において、合計 7.5×10^5 クローンを得、該プラスミドの70~90%がインサートを含有していた。インサートのDNA配列分析は、ヒトゲノム配列に対して整列させた場合に配列のランダムな分布を示した (図8C)。

【0105】

〔実施例3〕

構築物およびsiRNA

フォワード・ジェネティック選択のためのRNAiの作製に適した哺乳類細胞においてsiRNAを発現させるためのベクター系を開発するために、図9Aに示す収束的U6プロモーターカセットを設計した。特異的遺伝子サイレンシングを媒介するためのこの発現カセットの細胞内有効性を判定するために、EGFP遺伝子を標的として使用した。

【0106】

収束的U6プロモーターを含有するDualU6を構築するために、プライマー5'-GCG CAA GCT TAT AGG GAA TTC GAG CTC GGT A-3' および5'-GCG CTC TAG AGG TGT TTC GTC CTT TCC ACA A 3' を使用して、pTZ(U6+1) (Paul, C.P., Good, P.D., Winer, IおよびEngelke, D.R. (2002) Nature Biotech 20, 505-508) からU6+1プロモーター領域をPCR増幅し、得られたアンプリコンをXbaI-HindIII断片としてpTZ(U6+1)内にクローニングした。5個のチミンから構成される2つの定方向転写ターミネーターに隣接した19bpの標的的特異的配列 (後記において太字で示されている) を含むよう、センスおよびアンチセンスRNAをコードするインサートを設計した。DualU6GFPを構築するために使用したオリゴヌクレオチドは5'-TCGACAAAAACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTT-3' および5'-CTAGAAAAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTTTTTG-3' であった。一方、DualU6p53を構築するためには以下のものを使用した：

5'-TCGACAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTTT-3' および5'-CTAGAAAAAGTAGATTACCACTGGAGTCTTTTTTG-3'。これらのオリゴヌクレオチドを合成し (Sigma Genosys, Sydney, Australia)、アニールさせ、DualU6のSalIおよびXbaI部位内にクローニングした。

【0107】

該siRNAを形成させるために使用したRNAオリゴヌクレオチドはDharmacon Research Inc (CO, USA) により合成された。該配列は、GFP, 5'-CGGCAAGCUGACCCUGAAGdTdT (センス); p53(siRNA1), 5'-GACUCCAGUGGUAUCUACdTdT (センス); およびp53(siRNA2), 5'-GCAUGAACCGGAGGCCCAuTdT (センス)。これらのRNAオリゴヌクレオチドを、文献記載 (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K.およびTuschl, T. (2001) Nature 411(6836), 494-8) のとおり対応アンチセンス鎖にアニールさせた。

【0108】

〔実施例4〕

トランスジーンの発現に対する発現siRNAの効果

この研究に使用した哺乳類細胞には、ヒト胎児腎細胞系EcR293 (Invitrogen, CA, USA) およびヒト乳癌細胞系MDA MB 231が含まれた。dEGFP遺伝子を発現するEcR293細胞系の構築は既に記載されている (Raponi, M., Dawes, I.W.およびArndt, G.M. (2000) Biotechniques 28, 840-844)。EcR293細胞およびその誘導体を、グルタミン、ストレプトマイシンおよびペニシリンで補足された10% ウシ胎児血清を含有するDMEM内で維持した。MDA MB 231細胞を、グルタミンで補足された10% ウシ胎児血清を含有するRPMI内で増殖させた。

【0109】

トランスフェクションの24時間前に細胞を6ウェルプレートに播いた。すべてのトランスフェクションについて、リポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 (Invitrogen, CA, USA) を該製造業者の指示に従い使用して、合計4 μ gのプラスミドDNAまたは20 μ MのsiRNA

を運搬した。EGFP発現のフローサイトメトリー分析 (Becton Dickinson, USA) のために、24時間および48時間の時点で細胞を集めた。B-2Hフィルターキューブと共に蛍光顕微鏡 (Nikon, Japan) を使用して、蛍光顕微鏡検査を行った。

【0110】

EGFP特異的インサート (DualU6GFP) を含有するU6収束的発現ベクターを構築し、pEGFP-N1プラスミドおよびlacZ発現ベクター-pSV と共に293胎児腎細胞内にコトランスフェクトした。DualU6GFPが供与された細胞は、DualU6対照ベクターでトランスフェクトされた細胞と比較して、細胞蛍光における40%の減少を示した。

【0111】

二重 (dual) U6プロモーターの有用性、およびこのベクターが遺伝子発現を調節したメカニズムを更に調べるために、安定に組込まれた不安定化EGFP (dEGFP) トランスジーンを含有する293細胞にDualU6GFPプラスミドを運搬した。図9Bに示すとおり、DualU6GFPでトランスフェクトされた細胞はdEGFP媒介細胞蛍光の減少を示し、トランスフェクションの48時間後の蛍光減少のレベルは合成EGFP siRNAの場合と等しかった。DualU6GFPからのセンスおよびアンチセンスRNAの発現の要件に符合して、このベクターによる遺伝子サイレンシングは、dEGFP mRNAの同一領域に標的化された合成siRNAに比べて24時間の遅延を示した。DualU6FPプラスミドを含有する細胞により示された細胞蛍光の減少は蛍光顕微鏡検査により確認された。この実例は、DualU6、DualU6GFPまたはGFP特異的siRNAでトランスフェクトされた細胞における細胞蛍光を示している。合成siRNAの場合と同様に、細胞蛍光を示す残留集団は十中八九、該発現プラスミドでトランスフェクトされていない細胞に相当する。

【0112】

哺乳類細胞内の遺伝子発現の長期調節におけるDualU6GFP発現系の有用性を調べるために、dEGFPトランスジーンを発現するHEK293細胞にpDualU6GFPプラスミドまたはpDualU6ベクターをpREP7 (ヒグロマイシン耐性を付与するマーカーを含有する) と共に運搬した。DualU6GFPプラスミドを安定に維持する細胞を選択した後、dEGFP媒介細胞蛍光に関して細胞を検査した。図10に示すとおり、DualU6GFPプラスミドを含有する細胞は、DualU6対照ベクターが供与された細胞と比較して、細胞蛍光における有意な減少を示した。この結果は、記載されている収束的発現カセットが、哺乳類細胞内の遺伝子発現の長期調節を媒介するために使用されうることを示している。

【0113】

shRNAが、または小さなアンチセンスおよびセンスRNAの共発現が、siRNAへのプロセッシングにより特異的遺伝子サイレンシングをもたらすことが報告されている。DualU6GFP発現系の作用メカニズムを確認するために、dEGFPタンパク質レベルに関して、およびdEGFP mRNAレベルに関して、およびEGFP特異的インサートを含有するU6収束的発現ベクターによりコードされる小さなRNAの存在または非存在に関して、トランスフェクトされた細胞を調べた。

【0114】

以下のとおりにウエスタン分析を行った。プロテアーゼインヒビターであるアプロトニン (1 μ g/ml)、ロイペプチン (10 μ g/ml) およびDMSF (100 μ g/ml) で補足されたRIPAバッファーを使用して、細胞ライセートを調製した。全タンパク質を4~12% Bis-Trisアガロースゲル (Invitrogen, CA, USA) 上にローディングし、電気泳動により分離し、ポリビニリデンフルオリド (PVDF) メンブレンにトランスファーした。ウエスタン分析における特異的タンパク質の検出に使用した抗体には、GFP、マウスポリクローナル抗体 (Clontech)、PKRモノクローナル抗体 (Cell Signaling)、PKRホスホウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling)、p53マウスモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products) または アクチンマウスモノクローナル抗体 (Sigma) が含まれた。ヤギ抗マウスホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合体またはヤギ抗ウサギHRP (SantaCruz) を使用し、ついでルミノール/エンハンサー化学発光基質 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) を使用して、二次抗体検出を行った。

【0115】

ウエスタン分析は、U6収束的発現ベクターからsiRNAを発現する細胞においてはdEGFPタンパク質レベルが減少すること、およびこの効果が特異的であることを示した。dEGFPタンパク質の抑制のレベルは、合成siRNAの運搬により媒介されるものと同様であった。この結果を示すゲルは、DualU6、DualU6GFPまたはGFP特異的siRNAでトランスフェクトされたHEK293細胞（組込まれたdEGFP遺伝子を含む）におけるdEGFPおよびアクチンのタンパク質レベルを示す。dEGFP標的mRNAレベルを調べたところ、合成siRNA、およびU6収束的プラスミドから発現されたsiRNAが共に、標的mRNAを減少させることが示された。この結果を示すゲルは、DualU6、DualU6GFPまたはGFP特異的siRNAでトランスフェクトされたHEK293細胞（組込まれたdEGFP遺伝子を含む）におけるdEGFP mRNAおよび18S rRNAのレ

10

【0116】

〔実施例5〕

U6収束的カセットから発現された相補的RNAによる遺伝子抑制はDicer依存的である

DualU6GFPプラスミドがsiRNA産生能を維持することを更に確認するために、このプラスミドから発現された転写産物を、ノーザンブロット分析を用いて同定した。

【0117】

RNA分析用のRNAを、Trizol (Invitrogen, CA, USA) を使用して単離し、標準的なプロンプハイブリダイゼーションを用いる検出のためにナイロンメンブレン (Invitrogen, CA, US) 上に固定化した。DualU6GFPにコードされる小さなアンチセンスおよびセンスRNAの検出のために、以下のオリゴヌクレオチドを末端標識し、これらのメンブレンに37 で1時間ハイブリダイズさせた：5' -TCGACAAAAACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTTT-3' または5' -CTAGAAAAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTTTTTG-3'。ホスホルイメジャー (Molecular Dynamics, USA) およびImageQuantソフトウェアパッケージ (Molecular Dynamics, USA) を使用して、メンブレンを分析した。

20

【0118】

予想される長さのバンドは、DualU6GFPプラスミドを含む細胞においてのみ観察され、ベクター対照を含む細胞においては観察されなかった。また、鎖特異的プローブを使用して、U6収束的EGFPベクターを含む細胞内に、アンチセンスおよびセンスRNAが存在することを示すことが可能であった。転写産物のサイズは、定方向ターミネーターが機能的であること、ならびにU6により指令される転写装置が収束的転写単位内でアンチセンスおよびセンス転写産物を効率的にトランケート化（末端切断）することを証明した。この結果を示すゲルは、DualU6GFPプラスミドにコードされる小さなセンスおよびアンチセンスRNAのレベルを示す。それはまた、偽のトランスフェクトされた細胞 (mock-transfected cells)、およびDualU6対照ベクターでトランスフェクトされた細胞には、これらの小さなRNAが存在しないことを示している。前記の結果は、単一の発現カセットにおけるU6収束的プロモーターの使用が、RNAiに符合した状態で特異的遺伝子抑制を媒介するセンスおよびアンチセンスRNAを産生しうることを示している。

30

【0119】

dEGFP標的遺伝子の抑制を媒介するためにはDualU6GFPベクターにおける収束的U6プロモーターが必要であること、したがってまた、センスRNAおよびアンチセンスRNAの両方の発現が必要であることを示すために、単一のU6プロモーターのみを含むこのプラスミドの誘導体を構築した。これらのベクターをpU6GFPSおよびpU6GFPAsと命名した。これらは、それぞれU6プロモーターの制御下で小さなセンスおよびアンチセンスEGFP RNAをコードすると予想された。これらのプラスミドのそれぞれを使用して、dEGFPトランスジェンを発現する293細胞を一過的にトランスフェクトした。ついでdEGFP媒介細胞蛍光に関して細胞集団を分析した。この分析は、センスまたはアンチセンスEGFP鎖の発現だけでは、dEGFP遺伝子を抑制するには不十分であること、およびこの標的遺伝子の完全抑制には同一細胞における両方の鎖の共発現が必要であることを示した（図11）。

40

50

【 0 1 2 0 】

センスおよびアンチセンスEGFP RNAを共発現する細胞がRNAiの特徴の多くを示したと仮定して、遺伝子サイレンシングがdsRNAの形成を介して生じたかどうかの問題を確認した。この目的のために、観察された抑制がDicer依存的であったかどうかを判定するための手段としてDicer siRNAを使用した (Hutvagnerら (2001) Science 293,834-838)。dEGFPトランスジーンを発現する293細胞を、Dicerに特異的な合成siRNAの存在下および非存在下、DualU6GFPでトランスフェクトした。図12に示すとおり、Dicer siRNAは、EGFP特異的U6収束的プラスミドにより媒介される細胞蛍光の減少を完全に逆転させた。これとは対照的に、合成siRNAのメカニズムはDicer非依存的であるため、合成EGFP特異的siRNAおよびDicer特異的siRNAの両方でトランスフェクトされた細胞は細胞蛍光の減少を尚も示した。これらの結果は、DualU6GFPにコードされる小さなセンスおよびアンチセンスRNAがアニールしてdsRNAを形成し、これがDicerによりプロセシングされて真正なsiRNAを与えることを示唆している。ついで、プロセシングされたこれらのsiRNAにより遺伝子サイレンシングが導かれるのであろう。

10

【 0 1 2 1 】

30塩基対を超えるサイズのdsRNAは、二本鎖RNA特異的プロテインキナーゼPKRの活性化を引き起こす包括的 (global) な応答を誘導することが提示されている (Paddison, P., Caudy, A. A. および Hannon, G. J. (2002) Proc. Natl Acad. Sci. 99, 1443-1448)。この独特の発現系を使用した場合に観察される遺伝子サイレンシングがPKRの活性化により引き起こされる可能性を排除するために、DualU6GFPプラスミドが供与された293細胞において全PKRおよび活性化PKRの両方のレベルを調べた。この分析は、センスおよびアンチセンスEGFP RNAの共発現ならびにdsRNAの形成がPKRを活性化しないことを示した。このことは、観察された遺伝子サイレンシング効果が特異的であり、この包括的応答メカニズムに関連していないことを示唆している。この結果を示すゲルは、DualU6対照ベクター、DualU6GFPまたはGFP特異的siRNAでトランスフェクトされた細胞におけるPKR、活性化PKRおよびアクチンのレベルを示す。

20

【 0 1 2 2 】

〔 実施例 6 〕

収束的U6発現ベクターを使用するp53タンパク質レベルの抑制

哺乳類細胞における内在性遺伝子の発現を制御するためにU6収束的プロモーター系を使用しうるかどうかを確認した。この目的のために、p53腫瘍抑制タンパク質をコードするTP53遺伝子を標的として選択した。この目的のために、p53特異的siRNAをコードするインサートを含むU6収束的発現ベクターを構築した。選択した標的部位は、合成p53特異的siRNAに関して既に報告されているもの (Brummelkamp, T. R., Bernards, R. および Agami, R. (2002) Science 296, 550-553) と同一であった。p53特異的U6収束的発現プラスミドDualU6p53をMDA MB 231乳癌細胞および293細胞内にトランスフェクトし、細胞を集め、トランスフェクションの120時間後までp53タンパク質レベルに関して分析した。DualU6p53プラスミドの運搬はp53タンパク質の有意かつ特異的な減少を引き起こした。この結果を示すゲルは、DualU6、DualU6p53またはp53特異的siRNAでトランスフェクトされた細胞におけるp53およびアクチンタンパク質のレベルを示す。この結果は、哺乳類細胞におけるRNAiを介した内在性遺伝子の発現を有効に抑制するためにU6収束的プロモーター系を使用しうることを示している。

30

40

【 0 1 2 3 】

〔 実施例 7 〕

収束的転写は内在性遺伝子発現の安定な抑制を誘導する

前記のとおり、本発明者らは、一過性アッセイおよび安定選択プール化集団の両方においてEGFP遺伝子発現を調節するためにDualU6GFP発現ベクターを使用しうることを示した。また、本発明者らは、一過的にトランスフェクトされたHEK293細胞において内在性p53遺伝子がDualU6p53により抑制されうることを示した。本実施例においては、dEGFPトランスジーンを含むHEK293細胞にDualU6p53プラスミドをpREP7 (ヒグロマイシン耐性遺伝

50

子を含む)と共に共運搬した。また、この同じ細胞をDualU6GFPおよびpREP7でコトランスフェクトした。これらの集団のそれぞれ及び該ベクターの単独体をpREP7と共に500 µg/ml ヒグロマイシンに2週間さらした。安定な細胞を選択し、ウエスタン分析によりp53タンパク質レベルに関して検査した。該分析は、DualU6p53プラスミドを含む細胞が、対照ベクターが供与された細胞またはDualU6GFPを含む細胞と比較して、p53レベルにおける有意な減少を示すことを示した。この結果を示すゲルは、DualU6、DualU6GFPまたはDualU6p53構築物で安定にトランスフェクトされた細胞におけるp53およびアクチンタンパク質のレベルを示す。これは、観察された抑制が配列特異的であること、および内在性遺伝子発現の長期調節が哺乳類細胞において収束的転写により達成されうること示唆している。

10

【0124】

〔実施例8〕

p53siRNAライブラリー-化学療法薬物耐性スクリーニング

哺乳類細胞におけるフォワード・ジェネティック選択のための全ゲノムRNAiライブラリーの有用性を調べるために、2つの実験を行った。第1の実験においては、pLXSNU6/H1またはpLXSNU6/H1p53を含むHCT116クローンを作製し、後者におけるp53配列の収束的転写がp53タンパク質レベルを抑制することを示した。これらのクローンを、化学療法剤5-フルオロウラシル(5-FU)に対するそれらの細胞応答に関して更に特徴づけした。p53における突然変異は5-FU誘発性アポトーシスに対する細胞耐性を引き起こすことが示されている(Bunz, F.ら(1999) J Clinical Investigation 104: 263-269)。pLXSNU6/H1またはpLXSNU6/H1p53を含むクローンを6ウェルプレートの1ウェル当たり 2.5×10^5 細胞(サブG1およびカスパーゼの活性化を調べるため)または96ウェルプレートの1ウェル当たり 1×10^4 細胞(細胞の増殖および生存度を調べるため)で播いた。細胞を24時間回復させ、ついで種々の濃度の5-FU(100µM、200µMおよび400µM)で24時間処理した。この時点で、ヨウ化プロピジウム(PI)染色を用いて細胞周期分布に関して、カスパーゼ活性化アッセイを用いてアポトーシスの誘導に関して、およびMTT細胞増殖アッセイを用いて細胞生存度に関して、細胞を検査した(図13)。p53特異的siRNAを発現する細胞は、対照細胞と比較してサブG1細胞およびカスパーゼ活性における減少を示した(図13AおよびB)。また、pLXSNU6/H1p53を使用してp53タンパク質レベルが抑制された細胞はMTTアッセイにおける細胞生存性の増強を示した(図13C)。5-FU誘発性アポトーシスに対するpLXSNU6/H1またはpLXSNU6/H1p53を含むクローンの応答性の相違の実証に際しては、後者からの細胞は、pLXSNU6/H1を含む細胞の、より大きなバックグラウンド中に希釈される。これらの混合細胞集団をT150フラスコ当たり 2×10^6 細胞で播く。24時間の回復後、細胞を400 µM 5-FUに18時間さらし、150mmディッシュ当たり 4×10^5 細胞で再び播き、5-FUの非存在下で10~14日間にわたりコロニーを形成させる。該5-FU耐性クローンの分析は、pLXSNU6/H1p53を含むクローンの富化を示している。

20

30

【0125】

第2の実験における本発明者らによる発現ライブラリーの構築においては、pLXSNU6p53レトロウイルスベクターを、ベクターのみの、より大きなバックグラウンド内にスパイクし、ついで、遺伝的選択を用いてHCT116細胞においてスクリーニングして、pLXSNU6/H1p53を富化した(図14)。ベクターpLXSNU6/H1p53をpLXSNU6/H1中で $1:10^3$ および $1:10^4$ で希釈し、このDNA混合物を使用してAmphopack 293およびPG13パッケージング細胞の7:1混合物をトランスフェクトした。この目的のために、該 $1:10^3$ ライブラリーおよび $1:10^4$ ライブラリーのどちらの場合においても、 2×10^6 個のAmphoPack 293細胞および 3×10^5 個のPG13細胞を10本のT75培養フラスコ内に播種した。また、pLXSNU6/H1(ベクター対照)、pLXSNU6/H1p53(陽性対照)およびpLXSNGFP(トランスフェクション効率の指標として)についても、フラスコを確保した。播種の48時間後、DNAの存在下または非存在下で5mM プチラートおよび50 µM クロロキンを含む180 µM リン酸カルシウムで該細胞を処理した。それらのライブラリーの場合には、合計30 µgの再構成DNA(例えば、該 $1:10^3$ ライブラリーでは、30ngのpLXSNU6/H1p53 + 30µgのpLXSNU6/H1)を運搬した。8時間のインキュベーション

40

50

ヨンの後、該トランスフェクション溶液を完全DMEM培地と交換し、細胞を24時間回復させた。この時間の後、該パッケージング細胞上の培地を再び、1mM ピルビン酸ナトリウムで補足された15mlの完全DMEM培地と交換し、16時間後、それより、VCMを集めた。10×T75フラスコからのVCMをプールし、0.45µM フィルターで濾過し、5µg/ml ポリブレンと一緒にした。このVCMをHCT116細胞の10×T150フラスコ上に24時間配置し、ついでVCMをMcCoys 5A培地と交換した。標的HCT116細胞をまず、感染の36時間前にT150フラスコ当たり 2.5×10^6 細胞で播き、合計10本のフラスコを使用した。これらの条件を用いて得られた感染効率は少なくとも40%であった。形質導入の36時間後、HCT116細胞は60%コンフルエンスに達した。この時点で、該培地を、400µM 5-FUを含有するMcCoys5Aと交換した。該細胞を5-FUに16時間さらし、ついでそれを集め、プールし、T150フラスコ当たり 3.5×10^6 細胞で再び播いた。5-FUの非存在下での10日間の増殖の後、細胞を再び400uM 5-FUに16時間さらし、集め、150mmディッシュ当たり 4×10^5 細胞で播いた。これらの細胞を10~14日間にわたりコロニー形成させ、この時点で、独立したコロニーをpLXSNU6/H1またはpLXSNU6/H1p53プロウイルスDNAの存在に関して特徴づけした。この分析は、5-FUの存在下の選択が、pLXSNU6/H1p53ベクターを保持する耐性コロニーの有意な富化をもたらすことを示している。この結果は、本出願に記載の収束的転写発現カセットに基づくランダムRNAi発現ライブラリーが、関連遺伝的インヒビター（および従って標的遺伝子）を同定するために哺乳類細胞におけるフォワード・ジェネティック選択において使用されうることを示唆しているであろう。

10

20

30

40

50

【0126】

〔実施例9〕

追加的なレトロウイルス発現ベクター系

shRNAのような遺伝的インヒビターの発現および特異的遺伝子の過剰発現のために、種々のレトロウイルス発現ベクターを使用することが可能である。本発明に記載の全ゲノムRNAi発現ライブラリーの有用性および適用性を拡張するために、代替的なレトロウイルスベクターを構築した（図15）。ベクターpLXSNU6/H1は既に記載されており、pLXSNのマルチクロニング部位内に収束的U6-H1プロモーターカセットを含有する（図15A）。このベクター系においては、プロウイルスDNAの組込みに際して5'LTRは転写的に活性のままであり、U6-H1カセットは5'LTRと3'LTRとの間に位置する。このベクターは、物質G418を使用した組込みレトロウイルスベクター含有細胞の選択を可能にするNeoR遺伝子をも含有する。図15Bに例示されている1つの代替ベクター系は、3'LTR内に位置するU6-H1発現カセットを含有する。このベクターを構築するために、まず、3'LTRをpLXSNから取り出し、AfIIII-EcoRI断片としてpSP72内にサブクロニングしてpSP72LTRを得た。ついで、以下のPCRプライマーを使用して、U6-H1カセットをPCR増幅した：

5' -GCGCTAGCCGTTAACTCGAGGATCCAAGGTCG-3' および

5' -GCGCTAGCCACAGCCGGATCCTTGTAACGAC-3'。

【0127】

該PCRアンプリコンをNheIで消化し、pSP72LTR中の3'LTR内に位置する唯一のNheI部位内にサブクロニングした。これらの配列の挿入後、U6-H1収束的プロモーターを含有する3'LTRをAfIIII-EcoRI断片として再びpLXSN内にサブクロニングして、野生型3'LTRと置換した。最終的には、3'LTR領域内にU6-H1収束的プロモーターカセットが配置される。感染およびプロウイルス組込みに際して、このカセットは5'LTRの一部として複製されて、2コピーの該カセットを与え、そのうちの一方は5'LTR内の転写開始部位の上流に位置する。

【0128】

もう1つの形態のレトロウイルス発現ベクターを図15Cに示す。この場合、pQCXINと称される自己不活性化レトロウイルス構築物を開始物質として使用する。3'LTR内に位置するXbaI部位をXbaI消化により除去し、末端を埋め、再連結する。以下のPCRプライマーを使用して、U6-H1断片をPCR増幅する：

5' -GCGCTAGCCGTTAACTCGAGGATCCAAGGTCG-3' および

5' -GCGCTCGAGCACAGCCGGATCCTTGTAACGAC-3'。ついで該DNA断片をXhoIで消化し、3'LTR

内に位置する唯一のSalI部位内にサブクロニングする。また、以下のPCRプライマーを使用して、EGFPオープンリーディングフレーム（コザックコンセンサス配列を含む）をpEGFP-N1からPCR増幅した：

5' -GCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGTCGC-3' および

5' -GGAATTCGCGGCCGCTTACTTGTACAGC-3'。BamHIおよびEcoRIでの消化後、この断片を該修飾pQCXINベクター内のマルチクロニング部位内にサブクロニングする。最終ベクターはEGFPおよびNeoRマーカータラビにU6-H1発現カセットを含有する。さらに、このベクター系は、プロウイルスDNAの組込みに際して2コピーのU6-H1カセットを与え、5'LTRから指令される転写を引き起こさない。

【0129】

〔実施例10〕

標的遺伝子およびゲノム（ウイルス、病原体）特異的shRNAおよびsiRNAライブラリーの構築

前記方法は、任意のゲノム含有哺乳類細胞の発現遺伝子のそれぞれに対するdsRNA遺伝的インヒビターを含有するRNAi発現ライブラリーの製造を可能にする。これらの同じライブラリーは、ウイルスおよび病原体による感染に対する細胞の感受性において主要な役割を果たすウイルスまたは病原体由来遺伝子ならびに宿主遺伝子の両方を同定するのにも有用である。記載されている方法は、特定のウイルスもしくは病原体ゲノムに又は一定数の標的遺伝子に限局されたRNAi発現ライブラリーを構築するために修飾されうる。後者の適用は、遺伝子のサブセットのみが研究中の表現型に關与している場合の大規模マイクロアレイまたは差し引きハイブリダイゼーション実験において同定されたアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされた遺伝子の遺伝子機能をプローブするのに特に適している。標的遺伝子およびゲノム特異的shRNAおよびsiRNA発現ライブラリーを構築するための方法を図16に要約する。最初の工程において、標的遺伝子またはウイルスもしくは病原体ゲノムをDNアーゼIで処理して出発DNAを19~29bp断片に断片化する（図16A）。shRNA発現ライブラリーを構築するためには、DNA断片のプールを汎用ヘアピン配列に連結し、単一のヘアピンリンカーを含有するすべてのDNA断片を単離する（図16B）。ついでdsRNAアダプター（プライマー結合部位を含有する）をこれらのDNAの末端（これは該ヘアピンリンカーを含有しない）に連結し、単一のヘアピンリンカーとdsDNAアダプターとを有するすべての断片を単離する（図16C）。ついでこのDNAプールを変性させ、汎用プライマーにアニールさせ、第2鎖合成に付し、ついで消化し、哺乳類発現プラスミドにおいてU6プロモーターの制御下で連結する（図16D~F）。siRNA発現ライブラリーを構築するためには、ランダムに断片化された19~29bpのDNAを、少なくとも4個のアデノシン残基の3'配列を含むdsDNAアダプターに連結し、単一セットのアダプターを含有するすべてのDNAを単離する（図16G）。これらのDNAを、連結アダプターに特異的なプライマーを使用してPCR増幅したり（図16H）、あるいは直接消化し収束的U6プロモーター間に連結することが可能である（図16I）。

【0130】

また、記載されている方法は、特定の細胞型または組織における発現RNA集団に特異的なRNAiライブラリーを構築するために修飾されうる。このアプローチの概要を図17に示す。このライブラリーを構築するために、cDNA合成の自己プライミングの現象を用いる。AMV逆転写酵素を使用するcDNAの第1鎖の合成中、一本鎖cDNAの3'末端は、鋳型RNAの分解に伴いヘアピン構造を形成しうる（工程1および2）。これらのヘアピン構造の一過性形成は、逆転写酵素が第2鎖合成を開始するためのプライミング（開始）点を与える（工程3）。この分子内dsDNA分子（工程4）は、（鋳型を変性させるための）高温および熱安定性DNAポリメラーゼを用いる第2鎖合成により分子間dsDNA断片に変換される（工程5）。最終的には、dsRNAを形成しうる長い逆方向反復RNA配列をコードするDNAインサートが得られる。長いdsRNAの場合には、これらは、5'脱キャッピング認識配列およびシス作用性ハンマーヘッドリボザイムを使用して核内の維持のために標的化されうるであろう。あるいは、得られたDNA断片を、siRNAまたはshRNA発現ライブラリーを作製するために図16に記載の

10

20

30

40

50

方法に付すことが可能であろう。これらのライブラリーのすべては、ある細胞型または組織内に含有される発現遺伝子セットに特異的であろう。

【0131】

〔実施例11〕

HIV由来shRNAライブラリーを使用するHIV治療剤の同定

HIV感染に対する抵抗性を付与する又はウイルスの生活環の生産期もしくは潜伏期を妨げる有効なRNAi構築物に関してHIV特異的RNAi発現ライブラリーをスクリーニングするために、遺伝的選択アッセイを用いることが可能である。遺伝的サプレッサー要素ライブラリーを使用するそのような遺伝的選択アッセイは既に記載されており (Dunn, S.J., Park, S.W., Sharma, V., Raghu, G., Simone, J.M., Tavassoli, R., Young, L.M., Ortega, M.A., Pan, C-H., Alegre, G.J., Roninson, I.B., Lipkina, G., Dayn, A.およびHolzmyer, T.A. (1999) *Gene Therapy* 6, 130-137)、図18に概説されている。1つのアッセイにおいては、潜伏HIVの誘導までは99% CD4陽性である慢性感染前骨髄性HL60細胞を、TNF (4型)の添加に際してCD4を喪失するよう誘導することが可能である (図18A)。有効なHIV特異的shRNAの発現はこの誘導を妨げ、細胞表面上のCD4の保持をもたらすと予想される。ついで、FACソーティングを用いて、有効なshRNA構築物を含有する細胞をCD4陰性集団から分離することが可能である。これらの構築物は、潜伏感染細胞におけるHIV誘導を抑制するのに有効なはずである。もう1つのアッセイにおいては、複製しているHIVに感染したCEM T4細胞はp24の蓄積およびCD4の減少を示す (図17B)。したがって、生産的感染を妨げる有効なshRNA構築物の発現は、FACを用いてCD4陽性p24陰性表現型を示す細胞を富化させることにより同定することが可能である。これらの遺伝的選択系は共に、HIVの生活環の複数の段階に対する遺伝子治療として使用しうる新規HIV特異的shRNA発現ベクターを同定しうる。

【0132】

記載されている系は、哺乳類細胞における遺伝子サイレンシングのためのshRNA発現プラスミドに代わる新規発現様式を提供する。該収束的プロモーター系は、ランダム二本鎖DNAオリゴヌクレオチドが収束的U6プロモーター間に導入されうるランダム化RNAiライブラリーの基礎をも提供する。収束的プロモーター間のランダムオリゴヌクレオチド配列と、RNAポリメラーゼIIおよび/またはIIIプロモーターの組合せ、あるいは逆配向の2つの異なるRNAポリメラーゼIIIプロモーターを含むよう、この構想を拡張すれば、哺乳類細胞内で機能的siRNAを発現し逆方向反復配列を含有しないランダム化RNAiライブラリーが得られるであろう。そのような全ゲノムRNAiライブラリーは、ランダム化リボザイムライブラリー (Kawasaki, H., Onuki, R., Suyama, E.およびTaira, K. (2002) *Nature Biotech* 20:376-380) および汎用ペプチドライブラリー (Xu, X., Leo, C., Jang, Y., Chan, E., Padilla, D., Huang, B.C.B., Lin, T., Gururaja, T., Hitoshi, Y., Lorens, J.B., Anderson, D.C., Sikic, B., Luo, Y., Payan, D.G.およびNolan, G.P. (2001) *Nature Genetics* 21:23-29) を使用する報告されているものに類似したフォワード・ジェネティック・スクリーニングを行うのに有用であろう。核酸に基づく他のライブラリーと比較した場合の哺乳類細胞でのフォワード・ジェネティック・アプローチにおいてランダム化RNAiライブラリーを使用する顕著な利点は、修飾された細胞表現型に関連した細胞内標的RNAに対する完全配列相補性の21塩基の同定であろう。この長さの配列保存は、相同性に基づく検索手段を用いて候補遺伝子をより有効に同定するのに用いられうるであろう。また、これらの配列を化学合成し、同定された標的の更なる証明のための手段として又は潜在的治療剤として使用することが可能であろう。

【0133】

広く記載されている本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的な実施形態において示されている本発明に多数の変更および/または修飾を施しうる、と当業者に理解されるであろう。したがって、本実施形態は、あらゆる点で例示であり限定的ではないとみなされるべきである。

【0134】

参考文献

- Asubel F Mら (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York N.Y.
- Baker, M. W.およびMacagno, E. R. (2000) *Curr Biol* 10(17), 1071-4.
- Baulcombe, D. C. (1996) *Plant Mol Biol* 32(1-2), 79-88.
- BeaucageおよびCaruthers (1981) *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862
- Berkowら編, (1987) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 15th Ed., , Rahway, N.J., pp 1206-1228.
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Muller, U.およびFilipowicz, W. (2001) *Proc. Natl Acad Sci* 98, 14428-14483. 10
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R.およびAgami, R. (2002) *Science* 296, 550-553.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A.およびMorgan, R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9742-9747.
- Cogoni, C.およびMacino, G. (1999) *Nature* 399 (6732), 166-9.
- Dunn, S.J., Park, S.W., Sharma, V., Raghu, G., Simone, J.M., Tavassoli, R., Young, L.M., Ortega, M.A., Pan, C-H., Alegre, G.J., Roninson, I.B., Lipkina, G., Dayn, A.およびHolzmayer, T.A. (1999) *Gene Therapy* 6, 130-137.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W.およびTuschl, T. (2001) *Genes & Dev* 15:188-200.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K.およびTuschl, T. (2001) *Nature* 411(6836), 494-8. 20
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E.およびMello, C. C. (1998) *Nature* 391(6669), 806-11.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D.およびHannon, G.J. (2000) *Nature* 404: 293-96
- Hammond, S.M., Caudy, A.A.およびHannon, G.J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* 2, 110-19.
- Hofackerら (1994) *Monatshefte F. Chemie* 125:167-188
- Hsu, J.Y., Reimann, J. D. R., Sorensen, C.S., Lucas, J.およびJackson, P. K. (2002) *Nature Cell Biol.* 4, 358-366.
- Hutvagnerら, A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. (2001)*Science* 293: 834-838. 30
- Kawasaki, H., Onuki, R., Suyama, E.およびTaira, K. (2002) *Nature Biotech* 20, 376-380
- Kennerdell, J. R.およびCarthew, R. W. (1998) *Cell* 95(7), 1017-26.
- Kumar, M.およびCarmichael, G. G. (1998) *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4), 1415-34.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W.およびTuschl, T. (2001) *Science* 294, 853-858
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G.およびBartel, D.P. (2001) *Science* 294, 858-862
- Lee, R. C.およびAmbros, V. (2001) *Science* 294, 862-864
- Lohmann, J. U., Endl, I.およびBosch, T. C. (1999) *Dev Biol* 214(1), 211-4. 40
- Maniatis T.ら, (1987) *Science* 236:1237
- MaxamおよびGilbert (1980) in GrossmanおよびMoldave (編) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology* 65:499-560.
- McCaskill (1990) *Biopolymers* 29:1105-1119.
- Needham-VanDevanterら (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K.およびUllu, E. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25), 14687-92.
- Paddison, P., Caudy, A. A.およびHannon, G.J. (2002) *Proc. Natl Acad. Sci.* 99, 1443-1448.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J.およびConklin, D.S. (200 50

2) *Genes & Dev* 16, 948-958.

Paul, C.P., Good, P.D., Winer, IおよびEngelke, D.R. (2002) *Nature Biotech* 20, 505-508.

PearsonおよびRegnier (1983) *J. Chrom.* 255:137-149.

Raponi, M., Dawes, I.W.およびArndt, G.M. Characterization of flanking sequences using long inverse PCR. (2000) *Biotechniques* 28, 840-844.

Sambrookら (1989) *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.

Schoppmeier, M.およびDamen, W. G. (2001) *Dev Genes Evol* 211(2), 76-82.

Sui, G., Soohoo, C., Affar, E., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W. C.およびShi, Y. (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99, 5515-20. 10

Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H.およびSchultz, R. M. (2000) *Development* 127(19), 4147-4156.

Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A.およびDriscoll, M. (2000) *Nat Genet* 24(2), 180-3.

Thompson, B., Tonwsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Muisi, H.およびBienz, M. (2002) *Nature Cell Biol.* 4, 367-373.

Wargelius, A., Ellingsen, S.およびFjose, A. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 263(1), 156-61.

Wianny, F.およびZernicka-Goetz, M. (2000) *Nat Cell Biol* 2(2), 70-5. 20

Xu, X., Leo, C., Jang, Y., Chan, E., Padilla, D., Huang, B.C.B., Lin, T., Gururaja, T., Hitoshi, Y., Lorens, J.B., Anderson, D.C., Sikic, B., Luo, Y., Payan, D. G.およびNolan, G.P. (2001) *Nature Genetics* 21:23-29.

Yang, S., Tutton, S., Pierce, E.およびYoon, K. (2001) *Mol Cell Biol* 21(22), 7807-16.

Yu, J., DeRuiter, S.L.およびTurner, D.L. (2002) *Proc Natl Acad Sci* 99, 6047-52.

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】 p53特異的shRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。ヒトp53に特異的なshRNAをコードする二本鎖DNAインサートの作製に関わる6工程。略語：sal1RE= SalI制限酵素部位；U= デオキシリボウリジン；p53= p53 mRNAのセンス鎖に特異的な19塩基；ステムループ= ステムループ構造を構成する21塩基。 30

【図2】 ランダムshRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。任意のランダム配列のshRNAをコードする二本鎖DNAインサートの作製に関わる6工程。略語は、以下のもの以外は、図1に示したのと同様である：N19= ランダムな19塩基；As19= ランダムN19配列のアンチセンス；Nc19= N19に対する相補的DNA鎖；Asc19= As19に対する相補的DNA鎖。

【図3】 EGFP特異的shRNA発現プラスミドを使用するdEGFP媒介細胞蛍光の抑制。A. pTZ(U6+1)ベクターのみ（紫色）またはpTZ(U6+1)GFP（緑色の上塗り）一過的にトランスフェクトされたHEK 293細胞（安定に組込まれたdEGFP標的遺伝子を含むもの）のフローサイトメトリー分析。B. Aで表されているFAC分析の定量化。各サンプルは三重にトランスフェクトした。 40

【図4】 修飾pLXSNレトロウイルスベクターにおけるランダムshRNA発現ライブラリーの構築。唯一のSwaI部位を含む45bpのスタッファー断片をU6プロモーターの下流のSalI部位とXbaI部位との間に導入した。B. pLXSNU6SwaIにおけるクローニング部位。C. pLXSNU6SwaIを使用するランダムshRNA発現ベクターの作製。

【図5】 p53に特異的な相補的センスおよびアンチセンスRNAをコードするDNAインサートの、酵素による作製。ヒトp53に特異的な相補的センスおよびアンチセンスRNAをコードするDNAインサートの作製に関わる4工程。

【図6】 EGFP siRNAをコードするレトロウイルス発現ベクターで一過的にトランスフェクトされた細胞におけるdEGFP媒介細胞蛍光の減少。A. EGFP特異的siRNAをコードするレト 50

ロウイルスベクター-pLXSNU6/H1GFPの構造。B. pLXSNU6/H1GFPの感染後にHEK 293細胞（安定に組込まれたdEGFPトランスジーンを含有するもの）におけるdEGFP媒介細胞蛍光の抑制。

【図7】p53 siRNAをコードするレトロウイルス発現ベクターに感染したHCT116結腸癌細胞におけるp53タンパク質レベルの減少。pLXSNU6/H1p53レトロウイルスsiRNA発現ベクターの構造。

【図8】全ゲノムsiRNAレトロウイルス発現ライブラリーの構築。ランダムインサートを作製しランダムsiRNA発現ライブラリーを構築するために用いる4工程の概要。B. ランダムsiRNA発現ベクター系の構造の概要図。C. ヒトゲノムにおけるライブラリーインサートの分布。

【図9】細胞内siRNAの作製方法、およびトランスジーン発現に対する発現siRNAの効果。A. 収束的U6発現カセットは、定方向終結配列において終結するセンスおよびアンチセンスRNAをコードしている。該相補的RNAはアニールし、更なるDicer依存的プロセッシングを受けて、機能的siRNAを産生する。B. EGFP特異的インサートを含有するU6収束的発現ベクター（DualU6GFP）はdEGFP媒介細胞蛍光を減少させる。

【図10】安定に組込まれた収束転写ベクターを使用する、dEGFPトランスジーン発現の抑制。HEK 293細胞をpDualU6ベクターまたはpDualU6GFPのいずれかとpREP7プラスミドとで10:1のモル比でコトランスフェクトし、ヒグロマイシン耐性に関して細胞を選択する。選択後、dEGFP媒介細胞蛍光のレベルに関して細胞を検査する。

【図11】DualU6GFPベクターによる標的遺伝子発現の抑制はセンスRNAおよびアンチセンスRNAの両方の共発現を要する。

【図12】DualU6GFP発現ベクターはdEGFP標的遺伝子発現をDicer依存的に減少させる。

【図13】pLXSNU6/H1p53を含有するHCT116細胞における5-FU誘導性アポトーシス。A. p53 siRNAを発現する細胞におけるsubG1集団の減少。B. p53 siRNAを発現する細胞はカスパーゼの5-FU誘導性活性化に対する抵抗性を示す。C. p53 siRNAを発現する細胞は5-FUへの曝露後の細胞生存性の増強を示す。

【図14】スパイク（spiked）siRNA発現ライブラリーの5-FU遺伝的選択の概要。

【図15】全ゲノムRNAiライブラリーのためのレトロウイルス発現ベクター。A. pLXSNU6/H1。B. pLXSNU6/H1LTR。C. pQCXINU6/H1SIN。

【図16】ゲノム特異的shRNAおよびsiRNAライブラリーの構築方法。

【図17】発現RNA集団に特異的なshRNAおよびsiRNAライブラリーの構築方法の概要図。

【図18】遺伝的選択を用いるHIV特異的shRNAまたはsiRNAの同定。

10

20

30

【 図 5 】

p53 に特異的な相補的センスおよびアンチセンス RNA をコードする DNA インサートの、
酵素による作製

p53 siRNA 鋳型 (63mer)

5'-CGGTGATTCCGTCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'

プライマー (17mer) 5'-GCGCCTGTTACCTCTAG-3'

1/プライマーを p53siRNA にアニールさせる

5'-CGGTGATTCCGTCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'
3'-GATCTCCATTGTCCGCG-5'

2/第 2 鎖合成

5'-CGGTGATTCCGTCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'
3'-GCCACTAAGGGAGCTCGTTTTCTGAGGTCACCATTAAGATGAAAAAGATCTCCATTGTCCGCG-5'

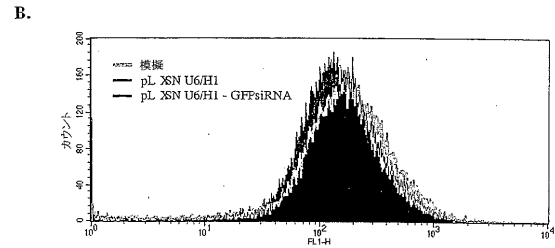
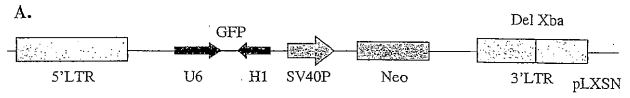
3/Sall および XbaI 消化

TCGACCAAAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTTTT
GGTTTCTGAGGTCACCATTAAGATGAAAAAGATC

4/脱リン酸化および精製

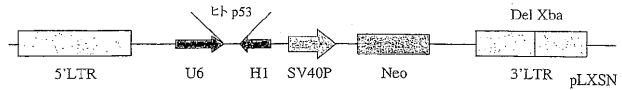
【 図 6 】

EGFP siRNA をコードするレトロウイルス発現ベクターで一過的にトランスフェクトされた
細胞における dEGFP 媒介細胞蛍光の減少



【 図 7 】

p53 siRNA をコードするレトロウイルス発現ベクターに感染した HCT116 結腸癌細胞における
p53 タンパク質レベルの減少



【 図 8 A B 】

全ゲノム siRNA レトロウイルス発現ライブラリーの構築

A.

19N siRNA 鋳型 (63mer)

5'-CGGTGATTCCCTCGAGCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'

19N プライマー (17mer) 5'-GCGCCTGTTACCTCTAG-3'

1/プライマーを 19NsiRNA にアニールさせる

5'-CGGTGATTCCCTCGAGCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'
3'-GATCTCCATTGTCCGCG-5'

2/第 2 鎖合成

5'-CGGTGATTCCCTCGAGCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTCTAGAGGTAACAGGCCG-3'
3'-GCCACTAAGGGAGCTCGTTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAAAGATCTCCATTGTCCGCG-5'

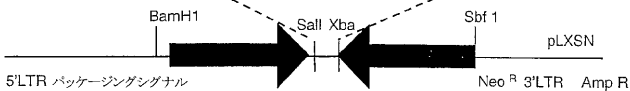
3/XhoI および XbaI 消化

TCGACCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTT
GGTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAAAGATC

4/脱リン酸化および精製

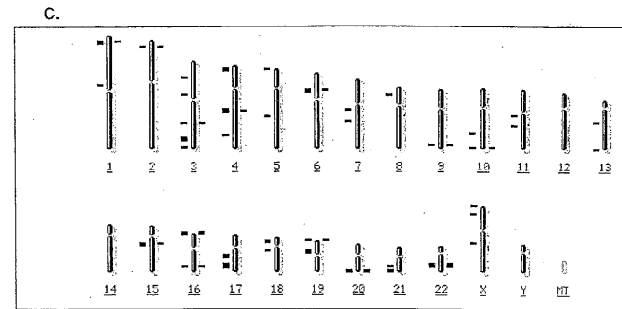
B.

TCGACCAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTT
CGTTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNAAAAAGATC



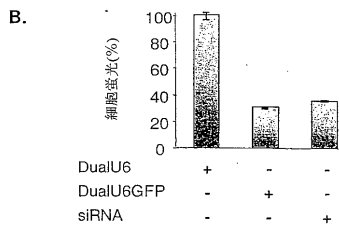
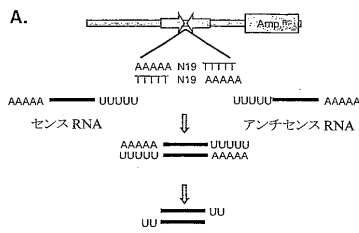
【 図 8 C 】

全ゲノム siRNA レトロウイルス発現ライブラリーの構築



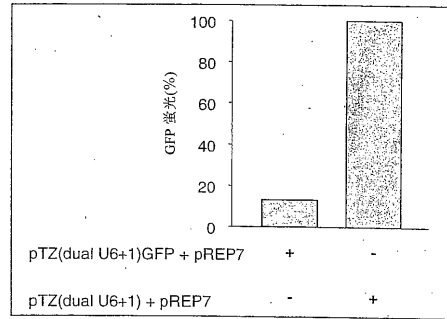
【 図 9 】

細胞内 siRNA の作製方法、およびトランスジーン発現に対する発現 siRNA の効果



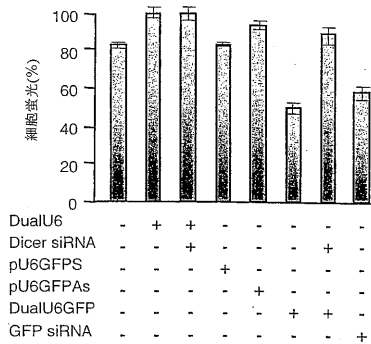
【 図 10 】

安定に組込まれた収束転写ベクターを使用する、dEGFPトランスジーン発現の抑制



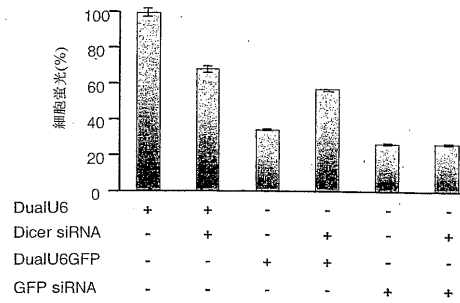
【 図 11 】

DualU6GFP ベクターによる標的遺伝子発現の抑制はセンス RNA およびアンチセンス RNA の両方の共発現を要する



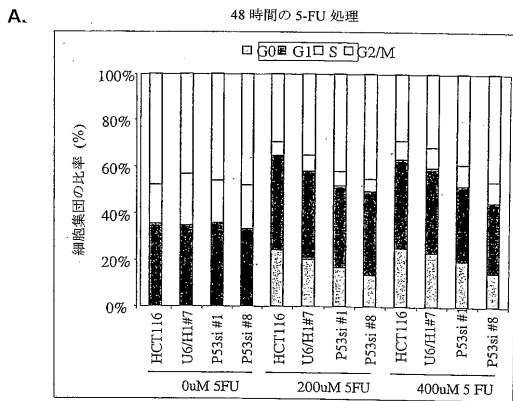
【 図 12 】

DualU6GFP 発現ベクターは dEGFP 標的遺伝子発現を Dicer 依存的に減少させる



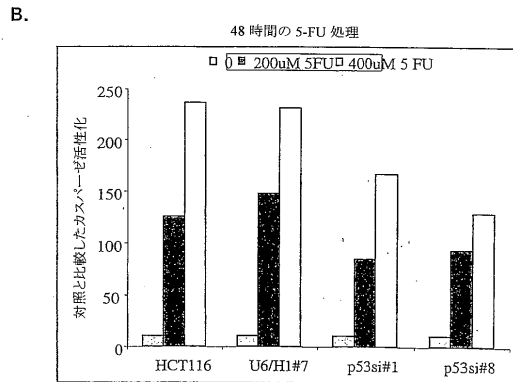
【 図 1 3 A 】

pLXSNU6/H1p53 を含有する HCT116 細胞における 5-FU 誘導性アポトーシス



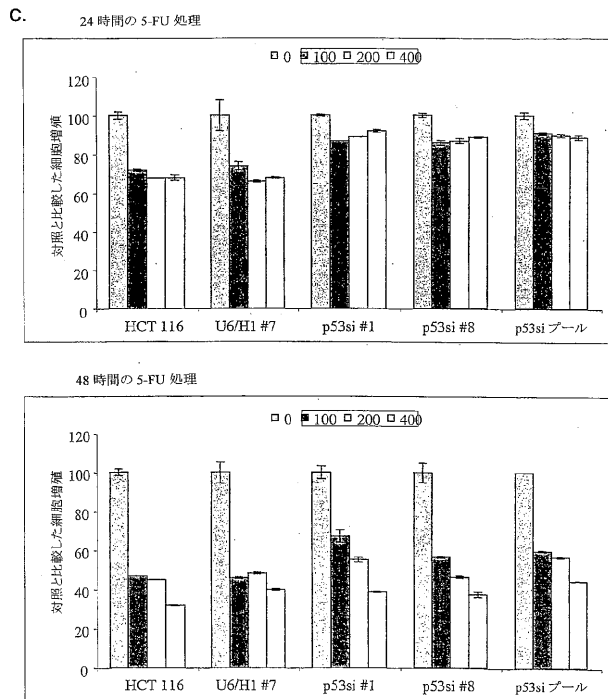
【 図 1 3 B 】

pLXSNU6/H1p53 を含有する HCT116 細胞における 5-FU 誘導性アポトーシス



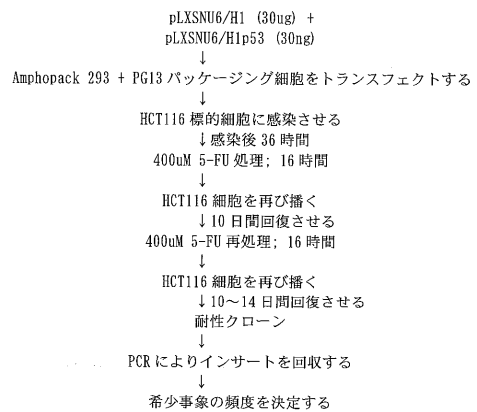
【 図 1 3 C 】

pLXSNU6/H1p53 を含有する HCT116 細胞における 5-FU 誘導性アポトーシス



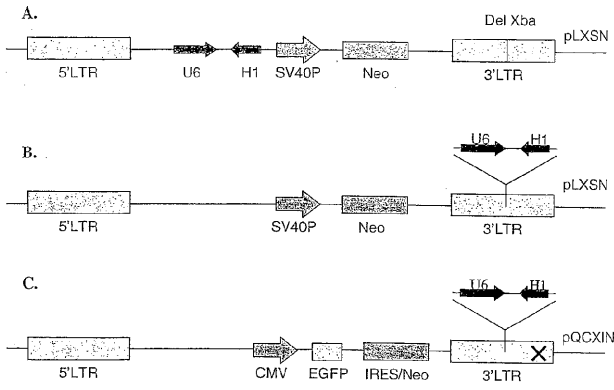
【 図 1 4 】

スパイク (spiked) siRNA 発現ライブラリーの 5-FU 遺伝的選択の概要



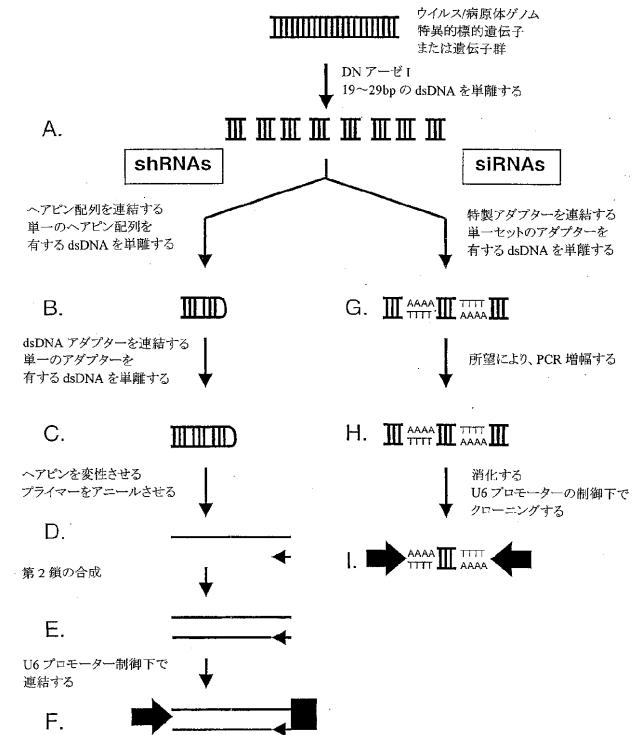
【 図 1 5 】

全ゲノム RNAi ライブラリーのためのレトロウイルス発現ベクター



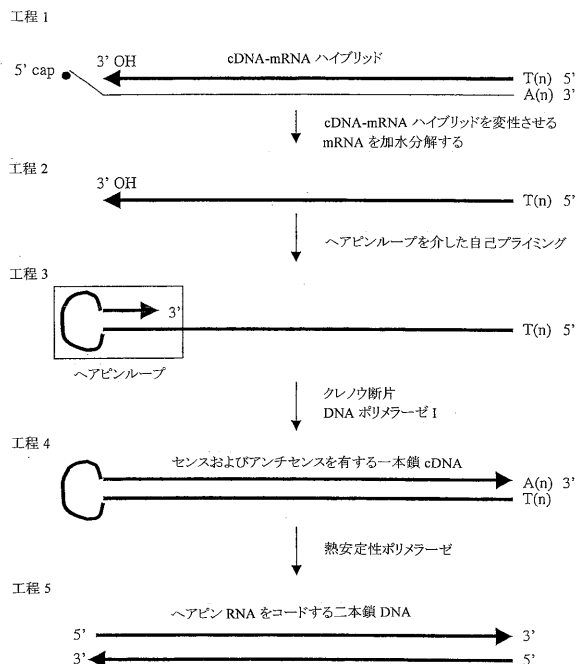
【 図 1 6 】

ゲノム特異的 shRNA および siRNA ライブラリーの構築方法



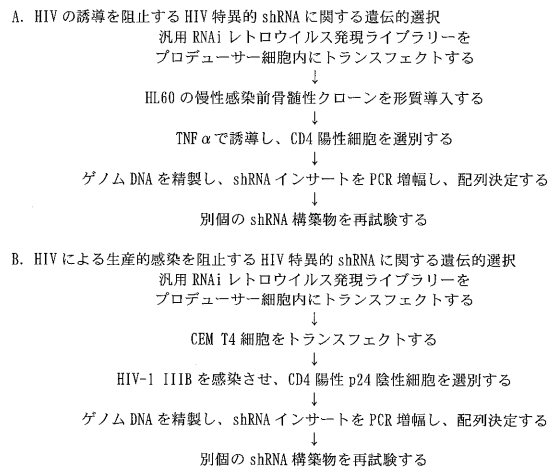
【 図 1 7 】

発現 RNA 集団に特異的な shRNA および siRNA ライブラリーの構築方法の概要図



【 図 1 8 】

遺伝的選択を用いる HIV 特異的 shRNA または siRNA の同定



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU03/01142
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : C12Q 1/68; C12N 15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) [WPIDS] [CA] [MEDLINE]: SYSTEM; VECTOR; CONSTRUCT; LIBRARY; KIT; SHRNA; RNAI; SIRNA; RNA; GENE; INTERFER?; DSRNAI; GENETIC VECTORS; HAIRPIN; STEM; LOOP		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Morris JC, Wang Z, Drew ME and Englund PT (2 September 2002). <i>Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library</i> . The EMBO Journal 21(17):4429-4438.	25, 26, 28-33, 35-39
A	See the entire document.	1-24, 27, 34, 40-59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 7 October 2003		Date of mailing of the international search report 15 OCT 2003
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer PHILIPPA WYRDEMAN Telephone No : (02) 6283 2554

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU03/01142

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Wang Z, Morris JC, Drew ME and Englund PT (2000). Inhibition of <i>Trypanosoma brucei</i> gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> 275(51):40174-40179. See the entire document.	25, 26, 28-33, 35-39 1-24, 27, 34, 40-59
X A	EP 1 229 134 (A2) (NUCLEONICS INC AND MESSAGE PHARMACEUTICALS INC) 07 August 2002. See the entire document and in particular paragraphs [0015] and [0113].	25-39 1-24 and 40-59
A	WO 00/63397 (A2) (AVENTIS CROPSCIENCE N.V.) 26 October 2000. See the entire document.	1-59
A	Brummelkamp TR, Bernards R and Agami R (19 April 2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. <i>Science</i> 269:550-553. See the entire document.	1-59
P X	WO 03/046186 (A1) (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION LTD) 05 June 2003. See the entire document and in particular Figure 1/32.	8-12, 20-24, 48-55
P X	WO 03/046173 (A1) (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION LTD) 05 June 2003. See the entire document and in particular Figure 1/32.	8-12, 20-24, 48-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU03/01142

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
EP 1 229 134	AU 1473502 CA 2369944
WO 03/046186	NONE
WO 03/046173	NONE

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA ,ZM,ZW

(74)代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(72)発明者 アルンドット, グレゴリー, マーティン

オーストラリア国 2036 ニュー サウス ウェールズ州, マラバー, ラグラン ストリート
1

(72)発明者 カイアンズ, ムーレイ

オーストラリア国 2256 ニュー サウス ウェールズ州, ウォイ ウォイ, アルファ ロー
ド 17

(72)発明者 トラン, ナーム

オーストラリア国 2170 ニュー サウス ウェールズ州, カスラ, マッケラー ストリート
26

(72)発明者 ライ, アンジェラ

オーストラリア国 2041 ニュー サウス ウェールズ州, バルメイン, ローズベリー プレ
イス 3, ユニット 7

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 CA12 DA02 DA03
EA02 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 GA18 HA08 HA09 HA14
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ08 QQ42 QR07 QR08 QR14 QR20 QR32
QR33 QR35 QR42 QR55 QR59 QR62 QR66 QR69 QR77 QR82
QS12 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX02