

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/004341

発行日 平成21年1月22日(2009.1.22)

(43) 国際公開日 平成19年1月11日(2007.1.11)

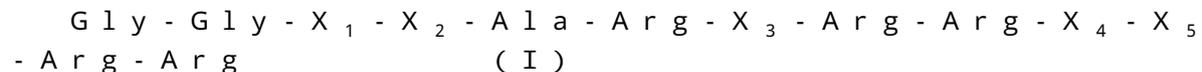
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 30 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2007-523343 (P2007-523343)	(71) 出願人	503256427 株式会社進化創薬 神奈川県横浜市保土ヶ谷区峰岡町二丁目2 13番地2号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/305479	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(22) 国際出願日	平成18年3月14日(2006.3.14)	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号	特願2005-194308 (P2005-194308)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成17年7月1日(2005.7.1)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	石橋 正也 神奈川県横浜市保土ヶ谷区峰岡町二丁目2 13番地2号
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 RNA結合ペプチド

(57) 【要約】

本発明は、GNRAで示される塩基配列を含むRNAのうち当該GNRA配列への結合活性を有するRNA結合ペプチド、例えば、次式I：



(X₁はArg又はLysを表し、X₂は任意のアミノ酸残基を表し、X₃はAla又はArgを表し、X₄はAla又はArgを表し、X₅は任意のアミノ酸残基を表す。)

で示されるアミノ酸配列を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有する R N A 結合ペプチド。

【請求項 2】

G N R A 配列がターミナルループ構造を有するものである請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

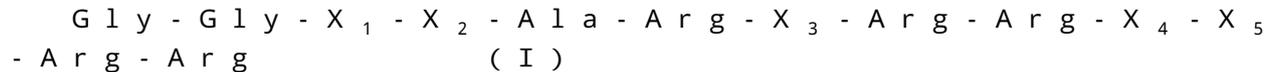
細胞又はウイルスの増殖を抑制することができる請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 4】

以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。

10

(a) 次式 I :



(X₁ は A r g 又は L y s を表し、X₂ は任意のアミノ酸残基を表し、X₃ は A l a 又は A r g を表し、X₄ は A l a 又は A r g を表し、X₅ は任意のアミノ酸残基を表す。)

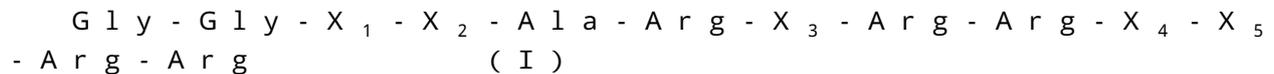
(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

【請求項 5】

20

以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。

(a) 次式 I :



(X₁ は A r g 又は L y s を表し、X₂ は任意のアミノ酸残基を表し、X₃ は A l a 又は A r g を表し、X₄ は A l a 又は A r g を表し、X₅ は任意のアミノ酸残基を表す。)
で示されるアミノ酸配列を含む 1 3 ~ 2 3 残基の長さのアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列を含む 1 3 ~ 2 3 残基の長さのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

30

【請求項 6】

R が少なくとも 9 ~ 1 1 残基含まれることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のペプチド、誘導体又はこれらの塩。

【請求項 7】

以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。

(a) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

40

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はその誘導体を構成するアミノ酸配列の 6 5 % 以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩。

【請求項 9】

アミノ酸配列の一部に化学修飾が施された、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩。

【請求項 1 0】

以下の (a) ~ (e) から選ばれるペプチド又はその誘導体をコードするポリヌクレオチド。

(a) 次式 I :

50

G l y - G l y - X ₁ - X ₂ - A l a - A r g - X ₃ - A r g - A r g - X ₄ - X ₅ -
A r g - A r g (I)

(X ₁ は A r g 又は L y s を表し、 X ₂ は任意のアミノ酸残基を表し、 X ₃ は A l a 又は A r g を表し、 X ₄ は A l a 又は A r g を表し、 X ₅ は任意のアミノ酸残基を表す。)
で示されるアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、 G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

(c) 上記式 I で示されるアミノ酸配列を含む 1 3 ~ 2 3 残基の長さのアミノ酸配列を含むペプチド

(d) 上記式で示されるアミノ酸配列を含む 1 3 ~ 2 3 残基の長さのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、 G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

(e) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド

(f) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、 G N R A モチーフへの結合活性を有するペプチド

【請求項 1 1】

D N A である請求項 1 0 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 又は 1 1 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含有してなる医薬組成物。

【請求項 1 5】

抗生物質、抗菌剤、抗癌剤又は抗ウイルス剤として使用するための請求項 1 4 記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

(V V K) _n (n は 1 1 ~ 3 5 の整数を表す) で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチドを、 G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列に接触させ、シグナルを検出することを特徴とする、 G N R A への結合活性を有するペプチドの検出方法。

【請求項 1 7】

(V V K) _n (n は 1 1 ~ 3 5 の整数を表す) で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチドを、 G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列に接触させ、シグナルを検出することを特徴とする、 G N R A への結合活性を有するペプチドのスクリーニング方法。

【請求項 1 8】

ターミナルループ配列、第一のステム配列、バルジアウト配列及び第二のステム配列を有する核酸。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載の核酸をコードする D N A 。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 記載の D N A を含む組換えベクター。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の組換えベクターを発現させて、ターミナルループ配列、第一のステム配列、バルジアウト配列及び第二のステム配列を有する R N A を得、得られた R N A と被験

10

20

30

40

50

物質とを接触させることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の RNA 結合ペプチドのスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リボソームの GNR Aモチーフへの結合活性を有する RNA 結合ペプチド、その検出方法及びスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

リボソームには G - N - R - A の 4 つの塩基配列が含まれていることが多く、この塩基配列はテトラループを形成することが知られている (Francois B. et al., J. Mol. Biol. 338, 683 - 693, 2004)。この GNR A の塩基配列を「GNR Aモチーフ」と呼ぶ。N は A、G、C 又は U であり、R は A 又は G を表す。リボソームでは、この GNR Aモチーフがループを形成する。このモチーフは、リボソームが機能するために重要な役割を果たすと考えられている (C. R. Woese et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, pp. 8467 - 8471, 1990)。

また、大腸菌リボソームにおいても GNR Aモチーフを有することが知られており (Francois B. et al., J. Mol. Biol. 338, 683 - 693, 2004)、大腸菌では、GCA Aループ - ヘリックスの相互作用が大腸菌の機能発揮に影響を与えると考えられる。

したがって、GNR Aモチーフに結合するペプチドは、競合的に GNR Aループ - ヘリックスの相互作用を阻害することができるといえる。

しかしながら、このようなペプチドは未だ知られていない。

【発明の開示】

【0003】

本発明は、RNA 結合ペプチドとその検出方法又はスクリーニング方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、リボソームの GNR Aモチーフを有する塩基配列に結合することができるペプチドを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) GNR A で示される塩基配列を含む RNA のうち当該 GNR A 配列への結合活性を有する RNA 結合ペプチド。

本発明のペプチドにおいて、結合領域である GNR A 配列はターミナルループ構造を有するものであることが好ましい。また、本発明のペプチドは、細胞又はウイルスの増殖を抑制することができる。さらに、本発明は、以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩である。

(a) 次式 I :

Gly - Gly - X₁ - X₂ - Ala - Arg - X₃ - Arg - Arg - X₄ - X₅ - Arg - Arg (I)

(X₁ は Arg 又は Lys を表し、X₂ は任意のアミノ酸残基を表し、X₃ は Ala 又は Arg を表し、X₄ は Ala 又は Arg を表し、X₅ は任意のアミノ酸残基を表す。

)

(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、GNR A で示される塩基配列を含む RNA のうち当該 GNR A 配列への結合活性を有するペプチド

本発明においては、以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩であることが好ましい。

(a) 次式 I :

10

20

30

40

50

G l y - G l y - X₁ - X₂ - A l a - A r g - X₃ - A r g - A r g - X₄ - X₅
- A r g - A r g (I)

(X₁ は A r g 又は L y s を表し、X₂ は任意のアミノ酸残基を表し、X₃ は A l a 又は A r g を表し、X₄ は A l a 又は A r g を表し、X₅ は任意のアミノ酸残基を表す。)
で示されるアミノ酸配列を含む 13 ~ 23 残基の長さのアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列を含む 13 ~ 23 残基の長さのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

本発明のペプチドは、好ましくは R を少なくとも 9 ~ 11 残基含むものである。

10

さらに、本発明においては、以下の (a) 又は (b) のペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。

(a) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

さらに、本発明は、上記ペプチド又はその誘導体を構成するアミノ酸配列の 65 % 以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。

好ましい態様においては、本発明のペプチドは、アミノ酸配列の一部に化学修飾が施されたものが挙げられる。

20

(2) 以下の (a) ~ (e) から選ばれるペプチド又はその誘導体をコードするポリヌクレオチド。

(a) 次式 I :

G l y - G l y - X₁ - X₂ - A l a - A r g - X₃ - A r g - A r g - X₄ - X₅ -
A r g - A r g (I)

(X₁ は A r g 又は L y s を表し、X₂ は任意のアミノ酸残基を表し、X₃ は A l a 又は A r g を表し、X₄ は A l a 又は A r g を表し、X₅ は任意のアミノ酸残基を表す。)
で示されるアミノ酸配列を含むペプチド

(b) 上記式 I で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

30

(c) 上記式 I で示されるアミノ酸配列を含む 13 ~ 23 残基の長さのアミノ酸配列を含むペプチド

(d) 上記式で示されるアミノ酸配列を含む 13 ~ 23 残基の長さのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列への結合活性を有するペプチド

(e) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド

(f) 配列番号 2 ~ 6 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、G N R A モチーフへの結合活性を有するペプチド

40

上記ポリヌクレオチドは、D N A であることが好ましい。

(3) 上記ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

(4) 上記組換えベクターを含む形質転換体。

(5) 上記ペプチド、その誘導体又はこれらの塩を含有してなる医薬組成物。

本発明の医薬組成物は、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤又は抗ウイルス剤として使用することができる。

(6) (V V K)_n (n は 11 ~ 35 の整数を表す) で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチドを、G N R A で示される塩基配列を含む R N A のうち当該 G N R A 配列に接触させ、シグナルを検出すること

50

を特徴とする、GNRAへの結合活性を有するペプチドの検出方法。

(7) $(VVK)_n$ (n は11~35の整数を表す)で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチドを、GNRAで示される塩基配列を含むRNAのうち当該GNRA配列に接触させ、シグナルを検出することを特徴とする、GNRAへの結合活性を有するペプチドのスクリーニング方法。

(8) ターミナルループ配列、第一のステム配列、バルジアウト配列及び第二のステム配列を有する核酸。

(9) 上記(8)記載の核酸をコードするDNA。

(10) 上記(9)記載のDNAを含む組換えベクター。

(11) 上記(10)記載の組換えベクターを発現させて、ターミナルループ配列、第一のステム配列、バルジアウト配列及び第二のステム配列を有するRNAを得、得られたRNAと被験物質とを接触させることを特徴とする、上記RNA結合ペプチドのスクリーニング方法。

【図面の簡単な説明】

【0004】

図1は、GNRAモチーフを含むループ-ヘリックス構造を有するリボソームの図である。

図2は、RNA結合ペプチドのセレクションの概要を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書において引用した文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

本発明は、GNRAで示される塩基配列を含むRNAのうち、当該GNRA配列への結合活性を有するRNA結合ペプチドに関する。本発明のペプチドは、アルギニンに富む13個のアミノ酸配列を骨格とするペプチドであり、当該ペプチドによって、例えばGNRA配列を含むRNA(例えばリボソーム)の機能を阻害するというものである。

1. GNRAモチーフを含む核酸

本発明において、GNRAで示される塩基配列を「GNRAモチーフ」という。GNRAモチーフにおいて、Nは、DNAにおいてはA、G、C又はTを表し、RNAにおいてはA、G、C又はUを表す。また、RはA又はGを表す。本発明は、上記GNRAモチーフに結合することができるペプチドが抗生物質、抗菌剤、抗癌剤として利用できるものと考え、本発明を完成するに至った。

一般に、ワトソン-クリックの塩基対からなる核酸の二重らせん構造は、塩基間の水素結合と、塩基対間のスタッキング相互作用によって安定化される。さらに、核酸は、この二重鎖以外にも非塩基対部位や多重鎖構造を形成する。非塩基対部位は、塩基対を形成していない部位と、塩基対を形成している部位に分類され、塩基対を形成していない部位として、バルジアウト、インターナルループ、ターミナルミスマッチ、ヘアピンループ、ダングリングエンドなどが例示され、塩基対を形成する部位として、ミスマッチ塩基対などが例示される。

本発明において、GNRAモチーフを含む核酸は、このような非塩基対部位を含むものである。具体的には、GNRAモチーフ、2つのステム配列及びバルジアウト配列により構成される。図1において、丸で囲った「GCM」部分の配列がGNRAモチーフであり、ターミナルループ(ターミナルミスマッチ)を形成する。ターミナルループの配列に連結するステム配列を第一のステム配列とすると、第一のステム配列は、図1において5'方向から3'方向に向かって「CUGGCC」で示される塩基配列とその相補鎖により形成されるステム配列である。第二のステム配列は、図1において、5'方向から3'方向に向かって「CGAGA U」で示される塩基配列とその相補鎖により形成されるステム配列である。ステム配列には、「G-U」のようにミスマッチの塩基対を形成されたものも含まれる(例えば図1の第二のステム配列)。第一ステム配列と第二ステム配列との間に

10

20

30

40

50

は、ステムからはみ出た構造を有する核酸が存在する。このはみ出た核酸配列を「バルジアウト配列」という。図1において、5'から3'方向に向かって「GGA」で示される配列(丸で囲った部分)がバルジアウト配列である。バルジアウト配列は、第一のステムと第二のステムを連結した構造となっており、バルジアウト配列の相補鎖側には、塩基配列は含まれていない(図1)。この点で、バルジアウト配列は、相補鎖側に塩基配列を含む「インターナルループ」と異なる。

図1は、具体的にRNAの塩基配列(配列番号12)を例示してあるが、DNA配列であってもよい。また、図1は本発明を説明するための例示であって、図1に示す塩基配列に限定されるものではない。

第一及び第二のステム配列の長さは、ステムを形成する限り互いにワトソン-クリックの相補塩基対(例えばAに対してU又はT、Gに対してC)を形成する関係にある必要はなく、力学的エネルギーの関係により非ワトソン-クリック塩基対による相補鎖を形成すればよい。ステム配列の長さは、特に限定されるものではないが、例えば4~20塩基、好ましくは4~10塩基、より好ましくは4~8塩基、さらに好ましくは6塩基である。

本発明においては、発現させたときに上記ターミナルループ、第一のステム、バルジアウト及び第二のステムを形成するように塩基配列を設計し、これをベクターに組み込んでペプチドのスクリーニングに供することができる。

本発明は、極めて多数の組合せをもつペプチドライブラリーから、例えばカナマイシン・アンチターミネーション・システム(「KANシステム」という)と呼ばれる手法により、本発明のペプチドをスクリーニングすることができる。

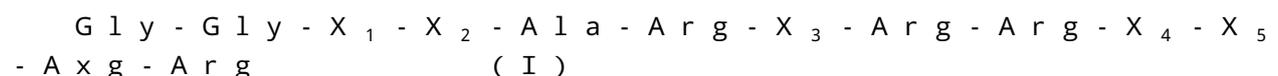
KANシステムとは、細胞内でカナマイシン耐性遺伝子の機能を用いて、RNAとペプチドとの相互作用を検出するアッセイシステムを意味する(Hadas Peled-Zehavi, et al., RNA 9, 252-261, 2003)。

具体的には、GNRAモチーフの塩基配列を有するオリゴDNAと、レポーター遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子とを組み込んだNレポータープラスミド、及びペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを組み込んだN発現プラスミドを細胞に導入する。細胞内でGNRAモチーフとペプチドが相互作用するとカナマイシン耐性遺伝子が転写翻訳され、GNRAモチーフとペプチドとが接触したシグナルとして、細胞はカナマイシン耐性を獲得する。

細胞には、酵母や大腸菌などを用いることができる。大腸菌を用いた場合、カナマイシンを含んだ培地で生存した大腸菌には、GNRAモチーフと相互作用するペプチドが発現していることになる。但し、レポーター遺伝子はカナマイシンに限定されるものではなく、LacZレポーター遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP遺伝子などを連結することができる。LacZ遺伝子を使用すると、培地にXgalを添加することで青又は白色に発色する。陽性クローンは青色に発色するので、これを指標として目的のクローンを選択することができる。ルシフェラーゼ遺伝子又はGFP遺伝子を使用すると、陽性クローンは蛍光を発するので、これを指標として目的のクローンを選択することができる。

2. GNRAモチーフに結合することができるペプチド又はその塩

本発明のペプチドは、少なくとも次式I:



で示されるアミノ酸配列(配列番号1)を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩である。上記ペプチドはRNA結合ペプチドの一つであり、GNRAモチーフに結合することができる。なお、本明細書において、アミノ酸表記は「R」(アルギニン)、「Q」(グルタミン)などの1文字表記をする場合もある。X₁はArg又はLysを表し、X₂は任意のアミノ酸残基を表し、X₃はAla又はArgを表し、X₄はAla又はArgを表し、X₅は任意のアミノ酸残基を表す。任意のアミノ酸残基は、天然に存在する任意のアミノ酸残基であり、例えば20種類のアミノ酸残基から選ばれる。

本発明のペプチドは、上記式のアミノ酸配列を含み、好ましくは13~23個のアミノ酸配列を有する。そして、その中のいくつかのアミノ酸はアルギニンに富むドメイン(「

10

20

30

40

50

アルギニンリッチドメイン」という)を形成する。例えば、23アミノ酸残基を有するペプチドは、その中の5番目から19番目がアルギニンリッチドメインを形成する。本発明のペプチドにおいて、アルギニンの数は、少なくとも9~11個である。いくつかのRNA結合タンパク質のアルギニンリッチドメインは、それらの類似のRNAと高親和性及び特異性をもって結合することが示されている。そして、配列がシンプルであること、及び構造が多様であることから、アルギニンリッチドメインはRNA結合ペプチドを同定するために有効なツールとして利用することができる。

上記KANシステムにより得られた本発明のペプチドのアミノ酸配列を以下の配列番号2~6に例示する。本発明のペプチドがGNRAモチーフへの結合活性を有する限り、当該アミノ酸配列の1個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい(これらを本発明において「変異体」という)。例えば、式Iで示されるアミノ酸配列(配列番号1)又は配列番号2~6で表わされるアミノ酸配列の1個又は数個、好ましくは1~9個、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失してもよく、式Iで示されるアミノ酸配列又は配列番号2~6で表わされるアミノ酸配列に1個又は数個、好ましくは1~9個、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、式Iで示されるアミノ酸配列又は配列番号2~6で表わされるアミノ酸配列の1個又は数個、好ましくは1~9個、さらに好ましくは1~5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。また、式Iで示されるアミノ酸配列又は配列番号2~6に示されるアミノ酸配列を含む13~23残基の長さのアミノ酸配列において、上記欠失、置換、付加等の変異を含むペプチドも、GNRAモチーフへの結合活性を有する限り、本発明のペプチドに含まれる。

1: MA TP KRGGRAARRRRRQRRAATA (配列番号2)

2: MA NI RSGGRGARRRRRRERRAAAA (配列番号3)

3: MA YH RRGGRRARARRRQRRAAAA (配列番号4)

4: MA RN KRGGKPARRRRARRRRAAAA (配列番号5)

5: MA TP KRGGRAARRRRRQRRAAAA (配列番号6)

本発明のペプチドとGNRAモチーフとの結合活性は、KANシステムにおけるレポーター遺伝子の発現量を基に、既知のペプチド(例えばARPL2、配列番号7)との相対的定量化を行い評価することにより測定することができる。このときの解離定数は100pM~10pMである。

ARPL2: MA XX RRRRRRRRRRRRRRRRRRAAAA (配列番号7)

本発明は、上記ペプチドのほかにその誘導体も含まれる。「誘導体」とは、本発明のペプチドを起源とし、3以上のアミノ酸にまでアミノ酸の数を減らしたり、一部のアミノ酸を非天然の物を含んだ他のアミノ酸に置換したものをいう。また、上記誘導体は、天然物の一部を修飾したものであっても、化学合成により合成された修飾残基を含むペプチドであってもよい。

本発明のペプチドは、アミノ酸配列の一部に化学修飾が施されたものも含む。「化学修飾」とは、化学試薬をタンパク質に反応させ、主にアミノ酸残基側鎖の化学構造を変えることをいう。例えば、本発明のペプチドの活性部位又は活性部位近傍に存在すると予想されるアミノ酸を特異的に修飾する試薬(例えばポリエチレングリコール)を反応させる方法などが採用される。アフィニティラベルを行ってもよい。また、化学修飾にはアミノ酸の炭素をメチル化したものも含む。化学修飾法は、当分野において周知である(大野素徳・金岡祐一・崎山文夫・前田浩 著、生物化学実験法12、蛋白質の化学修飾(上)、学会出版センター)。

なお、化学修飾されたアミノ酸配列を含むペプチドの修飾部分は、ペプチド本来の活性には影響せず、他の効果として作用する(Yamaguchi, H. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 67(10), 2269-2272, 2003)。

置換、欠失等の変異が導入されているかどうかは、アミノ酸配列の配列決定、分子進化的工学やX線やNMRなどによる構造解析を用いて確認することができる。

また、本発明のペプチドの誘導体には、そのレトロエナンチオマーも含む。「レトロエ

ナンチオマー」とは、上記ペプチドのアミノ酸配列の向きが左右逆になること（鏡像体を形成すること）を意味する。すなわち、ペプチドのN末端がC末端となり、C末端がN末端となり、かつ各アミノ酸がDアミノ酸によって構成されている配列となることを意味する。このようなレトロエナンチオマーも、GNRAモチーフへの結合活性を有する限り本発明に含まれる。

さらに、本発明は、上記ペプチド（例えば式Iや配列番号1～5に示すアミノ酸配列を含むペプチド）、その変異体、又はその誘導体を構成するアミノ酸配列の65%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上を含むペプチド、その誘導体又はこれらの塩を提供する。上記65%の領域としては、例えば配列番号1～3に示す配列のうち、5番目～19番目（アルギニンリッチドメイン）の領域などが挙げられる。また、配列番号1～3に示すアミノ酸配列のうち、70%以上、80%以上、90%以上の領域としてそれぞれ3番目～19番目、1番目～19番目、3番目～23番目の領域を例示することができ、95%以上の領域として連続する22個のアミノ酸の領域を例示することができる。

上記のとおり本発明のペプチドのアミノ酸配列が決定されると、その後は、当該アミノ酸配列をコードするDNAを構築し、これを発現させることにより、あるいは上記ペプチドを化学合成することにより、得ることができる。

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸付加塩又は塩基性塩が好ましい。酸付加塩としては、例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸などの無機酸との塩、あるいは酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩が挙げられる。塩基性塩としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウムなどの無機塩基との塩、あるいはカフェイン、ピペリジン、トリメチルアミン、ピリジンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

塩は、塩酸などの適切な酸、あるいは水酸化ナトリウムなどの適切な塩基を用いて調製することができる。例えば、水中、又はメタノール、エタノール若しくはジオキサンなどの不活性な水混和性有機溶媒を含む液体中で、標準的なプロトコルを用いて処理することにより調製し得る。

3. コンビナトリアルオリゴヌクレオチドライブラリー

本発明は、 $(VVK)_n$ （ n は11～35の整数を表す）で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドが多数集合したライブラリーを提供する。また、本発明は、上記 $(VVK)_n$ （ n は11～35の整数を表す）で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドによりコードされるペプチドに、GNRAで示されるモチーフを接触させ、シグナルを検出することを特徴とする、GNRAへの結合活性を有するペプチドの検出方法を提供する。

VVKの連続数（ n ）は限定するものではないが、例えば11～35（33～105ヌクレオチド）、好ましくは11～30（33～90ヌクレオチド）、より好ましくは11～20（33～60ヌクレオチド）、さらに好ましくは15～20（45～60ヌクレオチド）である。そして、 $(VVK)_n$ を含むヌクレオチドの長さ（全長）は、特に限定されるものではなく、任意の長さを設計することが可能である。 $(VVK)_n$ に他の配列が付加されていてもよい。ヌクレオチドの合成効率を考慮すると、 $(VVK)_n$ と他の配列で構成されるオリゴヌクレオチドは、全長で300塩基以内、好ましくは200塩基以内、更に好ましくは100塩基以内に収まるようにVVK及び他の配列を調節することが好ましい。

オリゴヌクレオチドは、化学合成によって得ることができる。ヌクレオチドとしてはDNA、RNAなどが挙げられるが、DNAであることが好ましい。オリゴヌクレオチドの化学合成法は、当業者にとって周知であり、市販の合成機を使用することもできる。

ここで、VVKのコドンにおいて、VはA、G又はCを表し、KはG又はTを表わす。従って、VVKにより規定されるコドンは全部で18通り（ $3 \times 3 \times 2$ ）存在する。VVKコドンは、荷電性及び極性アミノ酸であって大きな疎水性側鎖ではなく小さい側鎖を持

10

20

30

40

50

つアミノ酸を主にコードする。アルギニンのコドンはCGN又はAGR（NはA、G、C又はTを表し、RはA又はGを表す）であるから、上記VVKにより規定されるコドンのうち、アルギニンのコドンはCGG、CGT及びAGGである。従って、VVKにより規定される1コドンにおいてアルギニンがコードされる確率（コドン頻度は考慮しない）は、 $3/18 = \text{約} 16.7\%$ である。コドン全体の組合せは64通りであるから、ランダムにコドンを作製した場合は、アルギニンをコードする確率は $6/64 = \text{約} 9.4\%$ となる。従って、 $(VVK)_n$ の領域はアルギニンが選択される確率が高くなり、ライブラリー（通常、 10^7 個以上であるが、この数に限定されない）にはアルギニン含有率の高いペプチドをコードするヌクレオチドが含まれる。但し、アルギニンをコードする確率を高くするために、アルギニンのコドン（プロトタイプ）とVVKコドン（ランダムタイプ）との比が例えば1:1（但し、この比に限定されない）となるように両コドン配列を混合して合成してもよい。

本発明においては、GNRAモチーフを用いたNレポータープラスミドと、 $(VVK)_n$ で示されるヌクレオチド配列を少なくとも一部に含むオリゴヌクレオチドとを組み込んだN発現プラスミドを作製することもできる。作製したNレポータープラスミドと、オリゴヌクレオチドライブラリーとして機能するN発現プラスミドとを用いてKANシステムを行うと、GNRAモチーフへの結合活性を有するペプチドであって、 $(VVK)_n$ に対応するn残基のアミノ酸配列を含むペプチドを得ることができる。

従って、KANシステムによってシグナルを検出することにより、RNA結合活性を有する目的のペプチドを検出し、あるいは目的のペプチドをスクリーニングすることができる。シグナルの検出は前記と同様である。本発明において、「シグナル」とは、前記レポーター遺伝子の発現により、カナマイシンを使用したときはコロニーの生存、LacZ遺伝子を使用したときは青色の発色、蛍光遺伝子を使用したときは蛍光発色を意味する。

また、合成したオリゴヌクレオチドを上記KANシステムに用いるN発現プラスミドに組み込むことで、コンビナトリアルオリゴヌクレオチドライブラリーを得ることができる。ヌクレオチドをプラスミドに組み込む方法は、当業者に周知である（Sambrook J and Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001）。

4. ペプチドの化学合成

本発明のペプチドの化学合成を行う場合は、ペプチドの合成の周知方法によって合成できる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。市販のペプチド合成装置（島津製作所製PSSM-8など）を使用してもよい。

反応後は、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などの通常の精製法を組み合わせることで本発明のペプチドを精製することができる。

5. ペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のペプチドを遺伝子工学的に設計し、得ることができる。例えば、本発明のペプチドのアミノ酸配列をもとに塩基配列を設計し、合成すればよい。ポリヌクレオチドとしてはDNA、RNAなどが挙げられるが、DNAであることが好ましい。

変異体のペプチドを遺伝子工学的に得るには、配列番号1~6のアミノ酸配列をコードするポリペプチドを、当分野において周知の部位特異的突然変異誘発法によって変異体を作製することができる。市販の部位特異的突然変異誘発用キットを用いてもよい（例えばTakara Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製））。

さらに、本発明においては、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列に対し、ストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ、GNRAで示され

10

20

30

40

50

る塩基配列を含むRNAのうち当該GNRA配列への結合活性を有するペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本発明に含まれる。「ストリンジентな条件」とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄時の条件であって塩濃度が300~1000mM、温度が40~75、好ましくは塩濃度が600~900mM、温度が65の条件を意味する。例えば、2×SSCで50等の条件を挙げることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、反応時間等の諸条件を加味し、本発明のポリヌクレオチドを得るための条件を設定することができる。ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等を参照することができる。

10

6. 組換えベクター、形質転換体及びペプチド

タンパク質発現用組換えベクターは、上記ポリヌクレオチドを適当なベクターに連結することにより得ることができ、形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる(Sambrook J and Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001)。

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドDNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしてはファージが挙げられる。さらに、動物ウイルス、昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

20

組換えベクターの作製は、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位等に挿入してベクターに連結すればよい。

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌(大腸菌、枯草菌等)、酵母、動物細胞(COS細胞、CHO細胞等)、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への組換えベクターの導入方法は公知であり、任意の方法(例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等)が挙げられる。

本発明において、本発明のペプチドは、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることもできる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物のいずれをも意味するものである。

30

培養法は、当分野において周知である(前記Sambrookら、Molecular Cloningを参照)。

培養後、目的ペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりタンパク質を抽出する。また、目的タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

40

本発明においては、in vitro翻訳によるペプチド合成を採用することができる。この場合は、RNAを鋳型にする方法とDNAを鋳型にする方法(転写/翻訳)の2通りの方法を用いることができる。鋳型RNAとしては、前記5に記載のポリヌクレオチドが挙げられ、鋳型DNAとしては、翻訳開始点の上流にプロモーターとリボゾーム結合部位を有している上記ポリヌクレオチド、あるいは翻訳開始点の上流に転写に必要なプロモーター等が組み込まれたポリヌクレオチドが挙げられる。in vitro翻訳システムは、市販のシステム、例えばExpresswayTMシステム(Invitrogen社)、PURESYSTEM(登録商標;ポストゲノム研究所)、TNTシステム(登録商標;Promega社)などを用いることができる。in vitro翻訳システムに

50

よるペプチド合成後は、上記の一般的な生化学的方法を単独又は組み合わせることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

7. G N R Aモチーフ結合ペプチド又はその塩を含む医薬組成物

さらに、本発明のペプチドは、細胞又はウイルスの増殖を抑制することができる。従って、本発明のペプチドを抗生物質、抗菌剤、抗癌剤又は抗ウイルス剤などの医薬組成物として使用することができる。

本発明のペプチドを例えばウイルスの増殖抑制剤又は感染予防剤として使用する場合は、患者又はウイルス陽性の健常者に対して治療又は予防を特異目的として用いることができる。また、健常者に対して、感染予防の目的で使用することができる。これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明のペプチドを使用する対象とすることができる。

10

また、本発明の医薬組成物は、経口又は非経口的に全身又は局所投与することができる。本発明の医薬組成物を経口投与する場合は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、内用水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等のいずれのものであってもよく、使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。また、本発明の医薬組成物を非経口投与する場合は、静脈内注射（点滴を含む）、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐剤などの製剤形態を選択することができ、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態を提供される。

これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤などを適宜選択し、常法により製造することができる。

20

上記各種製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物を共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。使用される添加物は、本発明の剤型に応じて上記の中から適宜又は組み合わせで選択される。

本発明の医薬組成物の投与量は、投与対象の年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。本発明のペプチドの有効量と適切な希釈剤及び薬理的に使用し得る担体との組合せとして投与される有効量は、一回につき体重1kgあたり10~1000mg/body、好ましくは50~500mg/bodyの範囲の投与量を選ぶことができ、1日1回から数回に分けて1日以上投与される。

30

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0006】

<材料と方法>

(1) プラスミドの作製

40

レポータープラスミド(図1)は、pACとpACKプラスミド(1)を親プラスミドとして、PstI、BamHIサイトを利用し、T4DNA ligaseを用いて作製した。ライブラリーは以下の通り作製した。すなわち、Pelédら(Peléd-Zehavi, H., Horiya, S., Das, C., Harada, K., Frankel, A.D. (2003) Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay. RNA 9, 252-61.)を基に、コドン単位の変異導入法を用いて化学合成により一本鎖DNAを作製し、この一本鎖DNAの相補鎖合成を行った。得られたDNA断片を、NcoI及びBsmI処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により精製して、インサートDNAを作製した。pBRベクターは、p

50

B R N⁻ を N c o I 処理、 B s m I 処理を行った後、フェノール抽出とエタノール沈殿後、 S A P 処理して作製した。 A R P L 2 インサート DNA と T 4 D N A l i g a s e を用いてライゲーション反応を行い、ライブラリープラスミドを得た。これらのライブラリープラスミド混合物を用いて形質転換した後、ライブラリーの導入されていない親プラスミドにより形質転換される細胞は約 10% であり、残り 90% がライブラリープラスミドにより形質転換された細胞となる。

(2) アンチターミネーション・システムを用いた R N A 結合ペプチドのセレクションとコロニーカラーアッセイ

以下のセレクションは文献 1 を基に行った。

まず、1次セレクションは次のように行った。カナマイシンレポーターを含む N 5 6 7 細胞 (80 μl) を 3 つ用意し、それぞれに A R P L 2 を導入した p B R (100 ng / μl) を 2 μl ずつ加え、2.0 kV のパルスでエレクトロポレーションを行い形質転換させ、S O C (5 ml) を加え、室温で 4 時間培養した。その後、I P T G (I s o p r o p y l - T h i o - - D - G a l a c t o p y r a n o s i d e) を 0.2 mM となるように加え、続けて同様に 2 時間培養した。その後、アンピシリン (100 mg / L)、クロラムフェニコール (20 mg / L)、I P T G (0.05 mM)、カナマイシン (2.5 mg / L) を含むプレートに捲いた。3 日後、形成されたコロニーを掻き採り、プラスミド DNA を単離した。単離した DNA は E c o R V 処理により p A C を切断した後、フェノール抽出とエタノール沈殿を行い、H₂O に溶解した。

カナマイシン耐性レポーターを用いた 2 次セレクション以降は、p B R プラスミド (300 - 500 ng / μl) を 1 μl ずつ用い、カナマイシンレポータープラスミドを含む N 5 6 7 細胞 (80 μl) を上述のようにエレクトロポレーションにより形質転換させ、カナマイシン (2.5 mg / L) を含むプレート上において培養を行った後、プラスミドを単離した。

L a c Z レポータープラスミドを用いたスクリーニングは、レポータープラスミドを含む N 5 6 7 細胞 (300 μl) を p B R (250 ng / μl) を 5 μl 用いてヒートショック法により形質転換し、t r y p t o n e を各 3 mL を加えた。37 °C において 1 時間培養を行った後、アンピシリン (100 mg / L)、クロラムフェニコール (20 mg / L)、I P T G (0.05 mM)、X - g a l (5 - B r o m o - 4 - C h l o r o - 3 - I n d o l y l - - G a l a c t o p y r a n o s i d e、80 mg / L) を含むプレートに捲き、37 °C において 28 時間培養した。その後、24 °C で 119 時間培養し形成されたコロニーの色を調べた。

セレクションされたプラスミドのプール (図 2、p o o l # 3) から、末端にアルギニンを含む配列を選別するための P C R は次のように行った。

フォワードプライマー:

(1 mM, 5' - A A G C T A A C T G A C A G G A G A A T C C C C A T G G C C - 3') (配列番号 8)

リバースプライマー:

(1 mM, 5' - G G A T T T G C T G C A T T C G C A G C A G C T G C A C G - 3') (配列番号 9)

以下の反応組成を含む反応溶液 (720 μl) を、94 °C で 5 分間熱した後、94 °C で 30 秒、68 °C で 30 秒、72 °C で 30 秒のサイクルを 30 サイクル行い、続いて 72 °C で 10 分間反応させた。

反応組成液：

10 mM Tris-HCl (pH 8.3)

50 mM KCl

1.5 mM MgCl₂

0.2 mM dATP

0.2 mM dTTP

0.2 mM dGTP

0.2 mM dCTP

pBR 2 ng/ul

10

t a qポリメラーゼ増幅した二本鎖DNAは、PAGEにより精製し、続いてNco IとBsm I処理後、再びPAGEにより精製し、これをライゲーション反応に用い、pBRに導入した。これらのプラスミド混合物を用いて形質転換した後、ライブラリーの導入されていない親プラスミドにより形質転換される細胞は約8%であり、残り92%がライブラリープラスミドにより形質転換された細胞となる。このようにして、作製したpBR (1 ng / ul) の1 μlを、LacZレポータープラスミドを含むN567細胞 (80 μl) に加え、2.0 kVのパルスでエレクトロポレーションを行い形質転換させ、上述のX-galを含プレートに捲いた。37 °Cにおいて42時間培養した後、24 °Cで33時間培養し形成されたコロニーの色を調べた。

20

単離されたpBRプラスミドのレポーターに対する特異性及びRNA結合活性は、コロニーカラーアッセイにより、評価した。

文献：

1) Peled - Zehavi, H., Horiya, S., Das, C., Harada, K., Frankel, A.D. (2003) Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay. RNA 9, 252 - 61.

< 結果 >

(1) RNA結合ポリペプチドのARPL2からの細胞内選択

野生型 (WT) レポータープラスミドを標的とし、ARPL2からのRNA結合ペプチドのセレクションを行った。検索したクローンの数、カナマイシンを含むプレートにおける生存率、X-galを含むプレート上において青色を呈したコロニーの割合を図2に示す。1.2 x 10⁸ の配列の中から検索を行い、レポータープラスミド由来の擬似陽性を排除するため、ライブラリープラスミドを単離し、新しいカナマイシンレポータープラスミド (Kレポータープラスミド) を持つ細胞に導入した。陽性クローンを2 - 3回のセレクションにより濃縮した後、LacZレポータープラスミド (Lレポータープラスミド) を用い、スクリーニングを行い、青色を呈したコロニーからそれぞれライブラリープラスミドを単離し、標的レポーターに対する特異性を調べた。その結果、WT及びMT2レポーターのみにおいて特異性を示すクローンが単離された (表1)。しかしながら、66クローン中61クローンが、非特異的にβ-ガラクトシダーゼ活性を示すクローンであり、そのうち58配列がドープ領域末端の15番目のコドンがアルギニン以外のアミノ酸であったため、末端にアルギニンを含む配列を選択的に増幅するようなプライマーを用いてPCRを行った。このようにして、選択したライブラリーを再びpBRに導入し、Lレポータープラスミドを用いたスクリーニングを行ったところ、新たに3つの特異的なクローンが同定された (表1)。

30

40

【表 1】

表 1 コロニーカラーアッセイ

	sequence	配列 番号	WT	MT1	MT2	RRE
ARPL2	MA XX RRRRRRRRRRRRRR AAAA	7	-	-	-	-
#1	MA TP KRGGRA ARRRRR QRR AATA	2	+(+)	-	+(+)	-
#2	MA NI RSGRGA ARRRRR E RR AAAA	3	+	-	+	-
#3	MA YH RRGRRR ARARRR QRR AAAA	4	(+)	-	+	-
#4	MA RN KRGKPA ARRRR ARRR AAAA	5	++++	-	++++	-
#5	MA TP KRGGRA ARRRRR QRR AAAA	6	+(+)	-	+(+)	-
Rev			-	-	-	+++(+)
RSG-1. 2			-	-	-	++++

10

20

ドープ領域の中でアルギニン以外に置換されたアミノ酸および、非ランダム領域で変異があったアミノ酸を太字で示す。37 において25時間培養後のコロニーの青さを+の数で評価した。+の半分の青みの強さを(+)と表記する。

【実施例 2】

【0007】

コンビナトリアルライブラリーのデザイン

コンビナトリアルペプチドライブラリーを、Nタンパク質(1-19残基)のRNA結合ドメインを置換している Nタンパク質との融合タンパク質として発現した。オリゴヌクレオチドライブラリーをコドンに基づく突然変異誘発法を用いて以下の配列で合成した (Harada, K. et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 11887-11892)。

30

15残基のアルギニンをコードするプロトタイプ配列:

5' - GA ATC CCC ATG GCC CGT CGC CGT CGC C
GT CGC CGA CGT CGC CGG CGT CGA CGT CGC C
GT GCA GCT GCT GCG AAT GCA GCA AAT CC - 3'

(配列番号10)

ランダム配列:

5' - GA ATC CCC ATG GCC VVK VVK VVK VVK VV
K VVK VVK VVK VVK VVK VVK VVK VVK VVK GC
A GCT GCT GCG AAT GCA GCA AAT CC - 3' (配列番号
11)

40

上記VはA、C、及びGを等モル含む混合物であり、KはG及びTを等モル含む混合物である。ライブラリーは、アルギニンコドン: VVKコドンを1:1の割合で混合して合成した。従って、ライブラリーには、ペプチドあたり平均5個以下の非アルギニン残基を含むことが予想される。ポアソン分布に従うと仮定すると、 10^7 クローンをスクリーニングすることによって、3つの非アルギニンコドンを有する配列のほぼ全て、4つの非アルギニンコドンを持つ配列の10%以下、及び5つの非アルギニンコドンを持つ配列の1%以下をサンプリングすることができる。

【配列表フリーテキスト】

50

【 0 0 0 8 】

配列番号 1 : 合成ペプチド

配列番号 1 : X a a は A r g 又は L y s を表す (存在位置 : 3) 。

配列番号 1 : X a a は任意のアミノ酸残基を表す (存在位置 : 4) 。

配列番号 1 ; X a a は A r g 又は L y s を表す (存在位置 : 7) 。

配列番号 1 : X a a は A r g 又は L y s を表す (存在位置 : 1 0) 。

配列番号 1 : X a a は任意のアミノ酸残基を表す (存在位置 : 1 1) 。

配列番号 2 : 合成ペプチド

配列番号 3 : 合成ペプチド

配列番号 4 : 合成ペプチド

配列番号 5 : 合成ペプチド

配列番号 6 : 合成ペプチド

配列番号 7 : 合成ペプチド

配列番号 7 : X a a は任意のアミノ酸残基を表す (存在位置 : 3 ~ 4) 。

配列番号 8 : 合成 D N A

配列番号 9 : 合成 D N A

配列番号 1 0 : 合成 D N A

配列番号 1 1 : 合成 D N A

配列番号 1 2 : 合成 R N A

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 0 9 】

本発明により、R N A 結合ペプチドが提供される。本発明の R N A 結合ペプチドは、G N R A モチーフに結合して R N A の機能を阻害することができるため、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤に利用することができる。

[配列表]

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> Advanced Science and Technology Enterprise Corporation
 <120> RNA-binding peptide
 <130> PCT06-0025
 <150> JP2005-194308
 <151> 2005-07-01 10
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220> 20
 <223> Synthetic peptide
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa can be Arg or Lys
 <220>
 <221> misc_feature 30
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7).. (7)
 <223> Xaa can be Arg or Lys
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10).. (10) 40
 <223> Xaa can be Arg or Lys
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11).. (11)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

Met Ala Tyr His Arg Arg Gly Gly Arg Arg Ala Arg Ala Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Gln Arg Arg Ala Ala Ala Ala
 20

10

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 5

Met Ala Arg Asn Lys Arg Gly Gly Lys Pro Ala Arg Arg Arg Arg Ala
 1 5 10 15

20

Arg Arg Arg Ala Ala Ala Ala
 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 6

Met Ala Thr Pro Lys Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

40

Gln Arg Arg Ala Ala Ala Ala
 20

<210> 7
 <211> 23

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

10

<400> 7

Met Ala Xaa Xaa Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Ala Ala Ala Ala
 20

20

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 8
aagctaactg acaggagaat ccccatggcc

30

30

<210> 9
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 9
ggatttgctg cattcgcagc agctgcacg

29

40

<210> 10
<211> 85
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

gaatcccat ggcccgtegc cgtcgccgtc gccgacgtcg ccggcgtcga cgtcgccgtg 60

cagctgctgc gaatgcagca aatcc 85

10

<210> 11

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gaatcccat ggccvkvvk vkvkvkvkv kvkvkvkvkv kvkvkvkvkv kvkvkvkvkg 60

cagctgctgc gaatgcagca aatcc 85

20

<210> 12

<211> 78

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic RNA

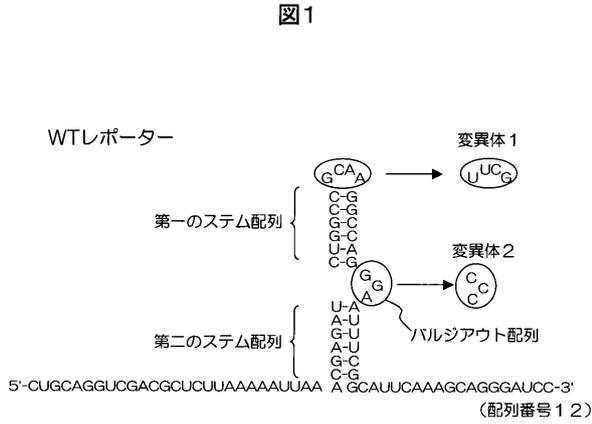
<400> 12

cugcaggucg acgcucuuaa aaauuaaacg agaucuggcc gcaaggccag ggaauuucgg 60

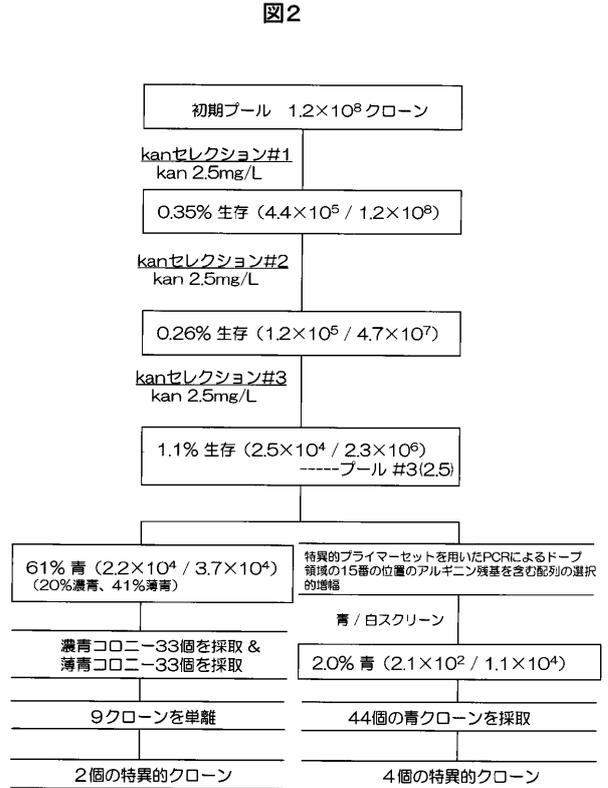
caucaaagc agggaucc 78

30

【 図 1 】



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/305479
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01), A61K38/00(2006.01), A61P31/04(2006.01), A61P31/12(2006.01), A61P35/00(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/00(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09(2006.01), A61K38/00(2006.01), A61P31/04(2006.01), A61P31/12(2006.01), A61P35/00(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/00(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/007686 A1 (Shinka Soyaku Inc.), 27 January, 2005 (27.01.05), Full text (Family: none)	1-17
Y	Peled-Zehavi H. et al., Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay, RNA., 2003, Vol.9, No.2, p.252-61	1-17
Y	Belanger F. et al., Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome, J.Mol.Biol., 2004, Vol.338, No.4, p.683-93	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 June, 2006 (19.06.06)		Date of mailing of the international search report 27 June, 2006 (27.06.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305479

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Woese C. R. et al., Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetraloops", Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1990, Vol.87, No.21, p.8467-71	1-17
P,X	Manabu HORITANI et al., "GNRA-gata Tetraloop Gan'yu Hairpin RNA ni Ketsugo suru Shinki Arginine-rich Peptide", Dai 7 Kai RNA Meeting, 2005 August, page 77	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305479

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N5/10(2006.01), *C12Q1/68*(2006.01), *G01N33/15*(2006.01), *G01N33/50*
(2006.01)

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

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

C12N5/10(2006.01), *C12Q1/68*(2006.01), *G01N33/15*(2006.01), *G01N33/50*
(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/305479

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of claims 1-17 relates to an RNA-binding peptide capable of binding to a GNRA sequence, and the "special technical feature" of claims 18 to 21 relates to a nucleic acid having a terminal loop sequence, a first stem sequence, a bulge-out sequence and a second stem sequence.

Since it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these inventions are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1 - 17

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 5 4 7 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K38/00(2006.01), A61P31/04(2006.01), A61P31/12(2006.01), A61P35/00(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/00(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01), A61K38/00(2006.01), A61P31/04(2006.01), A61P31/12(2006.01), A61P35/00(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/00(2006.01), C12N1/15(2006.01), C12N1/19(2006.01), C12N1/21(2006.01), C12N5/10(2006.01), C12Q1/68(2006.01), G01N33/15(2006.01), G01N33/50(2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), REGISTRY (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	WO 2005/007686 A1 (株式会社進化創薬) 2005.01.27, 全文 (ファミリーなし)	1-17	
Y	Peled-Zehavi H. et al., Selection of RRE RNA binding peptides using a kanamycin antitermination assay, RNA., 2003, Vol.9, No. 2, p. 252-61	1-17	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 19.06.2006		国際調査報告の発送日 27.06.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松田 芳子	4 N 3 1 2 6
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 8 8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/305479
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Belanger F. et al., Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome, J. Mol. Biol., 2004, Vol.338, No.4, p.683-93	1-17
Y	Woese C. R. et al., Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, Vol.87, No.21, p.8467-71	1-17
P X	堀谷学 他, GNRA 型テトラループ含有ヘアピン RNA に結合する新規アルギニン・リッチ・ペプチド, 第7回RNAミーティング, 2005年8月, p.77	1-17

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2006/305479

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-17の「特別な技術的特徴」は、GNRA配列への結合活性を有するRNA結合ペプチドに関し、請求の範囲18-21の「特別な技術的特徴」は、ターミナルループ配列、第一のステム配列、バルジアウト配列及び第二のステム配列を有する核酸に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-17

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2005年4月）

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	7/00	(2006.01)	C 0 7 K	7/00	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 原田 和雄
東京都昭島市東町1丁目5番地1-908

(72)発明者 堀谷 学
青森県弘前市大字御幸町15番地22

(72)発明者 松藤 千弥
東京都西東京市谷戸町3-26-6

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 CA04 DA02 DA05 DA11 DA12 EA02 EA03 EA04
FA02 GA11 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ13 QR33 QR60 QR75 QR76 QR77 QR80 QS05
QS36 QX02
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 BA02 BA18 CA53 CA59 DA27 DA42 NA14 ZB26
ZB33 ZB35
4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA17 EA20 EA28 EA29 EA50 FA20
FA74

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。