

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6607481号
(P6607481)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 1 2 N 15/63	(2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z N A Z
C 1 2 N 15/66	(2006.01)	C 1 2 N 15/66	
C 1 2 N 15/87	(2006.01)	C 1 2 N 15/87	Z

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2015-7674 (P2015-7674)	(73) 特許権者	304020177
(22) 出願日	平成27年1月19日(2015.1.19)		国立大学法人山口大学
(65) 公開番号	特開2016-131516 (P2016-131516A)		山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(43) 公開日	平成28年7月25日(2016.7.25)	(74) 代理人	100107984
審査請求日	平成29年10月23日(2017.10.23)		弁理士 廣田 雅紀
(出願人による申告)平成23年度、独立行政法人科学技術振興機構、研究成果展開事業 研究成果最速展開支援プログラム 本格研究開発ステージ 起業挑戦タイプ (若手起業育成)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100102255
			弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100188352
			弁理士 松田 一弘
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902
			弁理士 山内 正子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ターミネータ配列の3'末端側に、哺乳動物細胞でRNAの発現を制御することができるプロモータ配列が動作可能に連結された線状二本鎖DNAであって、ターミネータ配列の3'末端の塩基とプロモータ配列の5'末端との間の塩基数が0~3000であり、プラスミドの複製開始点を含まないことを特徴とする線状二本鎖DNA。

【請求項2】

ターミネータ配列が、SV40ターミネータ又はラビット-グロビンターミネータ由来の配列であることを特徴とする請求項1記載の線状二本鎖DNA。

【請求項3】

プロモータ配列が、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモータ配列であることを特徴とする請求項1又は2記載の線状二本鎖DNA。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか記載の線状二本鎖DNA、及び、RNAを発現しうる線状二本鎖DNAをインビトロで哺乳動物細胞内に導入することを特徴とする前記RNAを発現しうる線状二本鎖DNA由来のRNAを発現させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAや、か

かる線状二本鎖DNAを用いてRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

形質転換細胞を作製して該細胞内で目的遺伝子を発現させるには、プロモータ配列と目的遺伝子とターミネータ配列とを順次備えた二本鎖DNAを作製し、かかるDNAコンストラクトを、ベクターを介して細胞に導入する方法が一般的である。この方法を用いる場合には、プロモータ配列と目的遺伝子とターミネータ配列とを順次備えるようにDNAを連結する必要がある。上記のようにDNAを連結するために最も一般的に用いられている手法は、DNAリガーゼを用いて、平滑末端を有するDNA分子同士又は相補的な突出末端を有するDNA分子同士を結合させるものである。しかしながら、かかる方法は、制限酵素処理とDNAリガーゼによるインサートDNAとベクターの切断並びに連結という複雑な*in vitro*操作を必要としていた。

10

【0003】

近年、本発明者らは、ベクターを介さずに形質転換細胞を作製する方法として、特定のターミネータ配列を含む高発現用リバースプライマーを用いて作製した、プロモータ配列と目的RNA発現用DNA配列と特定ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを動物細胞に導入する方法を提案した(特許文献1参照)。かかる方法では、制限酵素サイトやアニーリング配列を導入することなく、また煩雑な環状化操作を行うこともなく、PCRのみによってターミネータ配列をRNA発現用DNA配列の下流に連結でき、得られた線状二本鎖DNAを動物細胞に導入することでRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させることが可能となる。しかしながら、PCRを行う際は、プロモータ配列と目的RNA発現用DNA配列とを順次備えたテンプレートを予め用意する必要があった。

20

【0004】

また、本発明者らは、ターミネータ配列とプロモータ配列とRNA発現用DNA配列とを順次備えたRNA発現用線状二本鎖DNAやRNA発現用DNA配列とターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えたRNA発現用線状二本鎖DNA(特許文献2参照)を提案した。かかるRNA発現用線状二本鎖DNAを用いれば、線状二本鎖DNAをそのまま細胞内に導入し、細胞内で容易にRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させることができるが、RNA発現用DNA配列にターミネータ配列又はプロモータ配列を予め連結する必要があった。

30

【0005】

さらに、本発明者らは、プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入し、前記RNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる形質転換細胞の製造方法を提案した(特許文献3参照)。かかる方法では、予めRNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを調製する必要があり、様々なRNA発現用DNA配列の発現を解析する場合には煩雑な作業と時間が必要であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0006】

【特許文献1】国際公開第2012/147370号パンフレット

【特許文献2】特願2013-213459号

【特許文献3】特願2013-258265号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、プロモータ配列又はターミネータ配列とRNA発現用DNA配列とを予め連結することなく、細胞内でRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させることが可能な線状二本鎖DNAや、かかる線状二本鎖DNAを用いたRNA発現用DNA配列

50

由来のRNAを発現させる方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく鋭意検討を行った中で、プロモータ配列やターミネータ配列を含む様々な線状二本鎖DNA、及び、タンパク質をコードする遺伝子を作製して、それぞれの配列を予め連結せずにそのまま哺乳動物細胞に導入したところ、意外にも、ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA、及び、タンパク質をコードする遺伝子を細胞内に導入した場合において、細胞内で目的とするタンパク質が発現していることを見だし、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は以下に示すとおりのものである。

(1) ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAであって、ターミネータ配列の3'末端の塩基とプロモータ配列の5'末端との間の塩基数が0~300であることを特徴とする線状二本鎖DNA。

(2) プラスミドの複製開始点を含まないことを特徴とする上記(1)記載の線状二本鎖DNA。

(3) ターミネータ配列が、SV40ターミネータ又はラビット γ -グロビンターミネータ由来の配列であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載の線状二本鎖DNA。

(4) プロモータ配列が、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモータ配列であることを特徴とする上記(1)~(3)のいずれか記載の線状二本鎖DNA。

(5) 上記(1)~(4)のいずれか記載の線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列を細胞内に導入することを特徴とする前記RNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法。

(6) 細胞が哺乳動物細胞であることを特徴とする上記(5)記載の方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によると、細胞内で遺伝子などを発現させる場合に、プロモータ配列とRNA発現用DNA配列をコードする配列とを連結する工程や、RNA発現用DNA配列をコードする配列とターミネータ配列とを連結する工程や、プラスミドを作製する工程が不要となる。特に、様々なRNA発現用DNA配列の発現解析を行う場合に、本発明を利用することで短時間且つ低コストで解析が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを作製する方法の例を示す図である。(a)はプロモータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとする場合、(b)はターミネータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとする場合である。

【図2】作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を示す図である。(1)レーンがSVter-CMVp-EGFP、(2)レーンがSVter-CMVp、(3)レーンがGloPater-CMVp、(4)レーンがGloPater-CMVp-EGFPである。

【図3】プラスミドpCMV-hGluc-SVterのマップを示す図である。

【図4】作製した線状二本鎖DNA hGlucのアガロース電気泳動の結果を示す図である。

【図5】実施例1においてヒト胎児腎細胞(HEK293細胞)を用いた場合におけるルシフェラーゼの発現量を示す図である。横軸は導入した線状二本鎖DNA、縦軸がルシフェラーゼの相対蛍光強度(RLU(counts/ μ l/sec))を示す。

【図6】実施例1においてヒト子宮頸部類上皮腫細胞(HeLa細胞)を用いた場合におけるルシフェラーゼの発現量を示す図である。横軸、縦軸は図5と同様である。

【図7】作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を示す図である。(1)

10

20

30

40

50

レーンがEGFP、(2)レーンがCMVp-EGFP-SVterである。

【図8】実施例2において、HEK293細胞に(a)SVter-CMVp及びEGFPを導入した場合、(b)GloPater-CMVp及びEGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。また、(a)、(b)において左図は蛍光顕微鏡像、右図は微分干渉顕微鏡像である(図9~13においても同様)。

【図9】実施例2において、HEK293細胞に(a)SVter-CMVp-EGFPを導入した場合、(b)GloPater-CMVp-EGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図10】実施例2において、HEK293細胞に(a)CMVp-EGFP-SVterを導入した場合、(b)EGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

10

【図11】実施例2において、HeLa細胞に(a)SVter-CMVp及びEGFPを導入した場合、(b)GloPater-CMVp及びEGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図12】実施例2において、HeLa細胞に(a)SVter-CMVp-EGFPを導入した場合、(b)GloPater-CMVp-EGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

【図13】実施例2において、HeLa細胞に(a)CMVp-EGFP-SVterを導入した場合、(b)EGFPを導入した場合の蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の線状二本鎖DNAとしては、ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAであって、ターミネータ配列の3'末端の塩基とプロモータ配列の5'末端との間の塩基数が0~3000であることを特徴とする線状二本鎖DNAであれば特に制限されず、プラスミドの複製開始点を含まないことが好ましい。

【0013】

また、本発明のRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法としては、上記本発明の線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列を細胞内に導入する方法であれば特に制限されず、かかる方法により、プロモータ配列又はターミネータ配列とRNA発現用DNA配列とを予め連結することなく、細胞内でRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させることが可能となる。

30

【0014】

本発明において、ターミネータ配列としては、遺伝子の転写の終了を制御し、また転写されたRNAを安定化する配列であればよく、RNAの発現を行う目的、RNA発現を行う細胞の種類、プロモータの種類、RNA発現用DNA配列の種類などによって適宜選択することができ、天然に存在するターミネータ配列であっても、データベース上の配列に基づいて人工的に合成したターミネータ配列であってもよい。なお、ターミネータとしての機能を有する限り、天然に存在するターミネータ配列の部分配列や、天然に存在するターミネータ配列に塩基の置換、欠損、又は挿入を含む配列も便宜上、人工的に合成したターミネータ配列に含まれる。

40

【0015】

天然に存在するターミネータ配列を用いる場合、ターミネータ配列としては、ウィルスのターミネータ配列であっても、大腸菌、枯草菌などの原核生物のターミネータ配列であっても、酵母、マウス、ヒトなどの真核生物のターミネータ配列であってもよく、具体的には、シミアンウイルス40(SV40)ターミネータ配列、ラビット-グロビン(Rabbit-globin)ターミネータ配列、ウシ成長ホルモン(BGH)ターミネータ配列、HSV-TKターミネータ配列、CYC1ターミネータ配列、ADHターミネータ配列、SPAターミネータ配列、アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノパリンシンターゼ(NOS)遺伝子ターミネータ配列、カリフラワー・モザイク・ウイルス(

50

C a M V) 3 5 S 遺伝子のターミネータ配列、トウモロコシ由来の Z e i n 遺伝子ターミネータ配列、ルビスコ小サブユニット (S S U) 遺伝子ターミネータ配列、サブローバー・スタント・ウイルス (S C S V) 遺伝子ターミネータ配列、L a c Z アルファターミネータ配列、p o l y T ターミネータ配列などを例示することができ、R N A の発現量を高める観点からは、好ましくは S V 4 0 ターミネータ配列又はラビット - グロピンターミネータ配列を例示することができる。

【 0 0 1 6 】

人工的に合成したターミネータ配列としては、S V 4 0 ターミネータ又はラビット - グロピンターミネータ由来の配列であることが好ましく、例えば、特願 2 0 1 3 - 2 1 3 4 5 9 号に記載された人工的に合成したターミネータ配列、好ましくは S V 4 0 ターミネータ配列の塩基番号 1 3 0 番目 ~ 2 0 8 番目の配列 (配列番号 1) やラビット - グロピンターミネータ配列の塩基番号 1 2 1 番目 ~ 1 9 0 番目の配列 (配列番号 2) などを例示することができる。

10

【 0 0 1 7 】

本発明において、プロモータ配列とは、R N A 発現用 D N A 配列の上流に配置した際に、R N A ポリメラーゼが結合することにより、下流に配置された R N A 発現用 D N A 配列由来の R N A の発現を制御することができる塩基配列であればよく、R N A の発現を行う目的、R N A を発現させる哺乳動物などの細胞の種類、R N A 発現用 D N A 配列の種類、ターミネータ配列の種類などにより適宜選択することができ、天然に存在するプロモータ配列であっても、データベース上の配列に基づいて人工的に合成したプロモータ配列であ

20

【 0 0 1 8 】

天然に存在するプロモータ配列を用いる場合、プロモータ配列としては、ヒトサイトメガロウイルス (C M V) プロモータ配列、シミアンウイルス (S V 4 0) プロモータ配列、ヒト伸長因子 1 (E F 1) プロモータ配列、アデノウイルス後期 (Adenovirus Major Late, A M L) の A M L プロモータ配列、S V 4 0 及び H T L V - 1 L T R の融合プロモータである S R プロモータ配列、ヒトユビキチン C プロモータ配列、 - アクチンプロモータ配列、 - アクチンプロモータ配列、U 6 プロモータ配列、H 1 プロモータ配列、テトラサイクリンによって R N A 発現が抑制される T e t - O f f プロモータ配列、テトラサイクリンによって R N A 発現が誘導される T e t - O n プロモータ配列、亜鉛などの金属や種々の刺激により誘導されるメタロチオネインプロモータ配列、活性酸素により誘導される A R E プロモータ配列を例示することができ、ヒトサイトメガロウイルス (C M V) プロモータ配列を好適に例示することができる。

30

【 0 0 1 9 】

人工的に合成したプロモータ配列としては、ヒトサイトメガロウイルス (C M V) プロモータ又はシミアンウイルス (S V 4 0) プロモータ由来の配列であることが好ましく、例えば、特願 2 0 1 4 - 1 2 3 2 1 4 号や特願 2 0 1 4 - 1 3 6 9 2 9 号に記載されたプロモータ活性を有する配列などを例示することができる。

40

【 0 0 2 0 】

本発明のターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖 D N A としては、ターミネータ配列の下流 (3 ' 末端側) にプロモータ配列が動作可能に連結された線状二本鎖 D N A であって、ターミネータ配列の 3 ' 末端の塩基とプロモータ配列の 5 ' 末端との間の塩基数が 0 ~ 3 0 0 0 、好ましくは 0 ~ 1 0 0 0 、より好ましくは 0 ~ 5 0 0 、さらに好ましくは 0 ~ 1 0 0 、特に好ましくは 0 ~ 5 0 、最も好ましくは 0 を例示することができる。

【 0 0 2 1 】

ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖 D N A を作製する方法としては特に制限されないが、例えば、プロモータ配列を含む二本鎖 D N A をテンプレート

50

として、ターミネータ配列を含むプライマーを用いてPCR法で作製する方法や、ターミネータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとして、プロモータ配列を含むプライマーを用いてPCR法で作製する方法や、ターミネータ配列を含む線状二本鎖DNAとプロモータ配列を含む線状二本鎖DNAとをフュージョンPCR法（特開2009-268360号公報）やDNAリガーゼを用いる方法などの公知の方法で連結して作製する方法を例示することができる。

【0022】

プロモータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとして、ターミネータ配列を含むプライマーを用いてPCR法で作製する方法としては、図1(a)に示すようにプロモータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとして、ターミネータ配列とプロモータ配列の5'末端領域の配列とを順次含む配列からなるフォワードプライマーと、プロモータ配列の3'末端領域の相補配列からなるリバースプライマーを用いてPCRを行う方法を例示することができる。かかるフォワードプライマーにおけるターミネータ配列としては、上述の特願2013-213459号に記載された人工的に合成したターミネータ配列、好ましくはSV40ターミネータ配列の塩基番号130番目～208番目の配列（配列番号1）やラビット-グロピンターミネータ配列の塩基番号121番目～190番目の配列（配列番号2）などを用いることが、RNAの発現量を高めることやプライマーを低コストで作製できる観点で好ましい。

【0023】

ターミネータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとして、プロモータ配列を含むプライマーを用いてPCR法で作製する方法としては、図1(b)に示すようにターミネータ配列を含む二本鎖DNAをテンプレートとして、ターミネータ配列の5'末端領域の配列からなるフォワードプライマーと、ターミネータ配列の3'末端領域の配列とプロモータ配列とを順次含む配列の相補配列からなるリバースプライマーを用いてPCRを行う方法を例示することができる。かかるリバースプライマーにおけるプロモータ配列としては、上述の特願2014-123214号や、特願2014-136929号に記載されたプロモータ活性を有する配列などの人工的に合成したプロモータ活性を有する配列を用いることが、RNAの発現量を高めることやプライマーを低コストで作製できる観点で好ましい。

【0024】

本発明のRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法において、RNA発現用DNA配列としては、RNAを発現しうる線状二本鎖DNA配列であればよく、タンパク質をコードする遺伝子その他、shRNA（small hairpin RNA）発現配列、siRNA（short interfering RNA）発現配列、miRNA（micro-RNA）、核酸アプタマー発現配列、デゴイ発現配列、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現配列、リボザイム発現配列などの機能性核酸を発現するDNA配列を例示することができる。

【0025】

本発明のRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法において、RNA発現用DNA配列を導入した細胞内でタンパク質を発現させる場合は、RNA発現用DNA配列として、タンパク質をコードする遺伝子を選択でき、タンパク質をコードする遺伝子としては、用途に合わせて全長の遺伝子でも、その一部でもよい。また、その由来はいかなる生物から単離された遺伝子でも、遺伝子工学的に作製された人工的な遺伝子でもよい。

【0026】

本発明のRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法において、RNA発現用DNA配列を導入した細胞内のタンパク質の発現をロックダウンする場合、RNA発現用DNA配列としては、タンパク質をコードする遺伝子のmRNAの発現を抑制できるshRNA発現用DNA配列や、siRNA発現用DNA配列や、アンチセンスオリゴヌクレオチド発現用DNA配列を選択することができ、RNA発現用DNA配列を導入した細胞内のタンパク質の活性化作用を阻害又は抑制する場合は、RNA発現用DNA配列とし

10

20

30

40

50

て、タンパク質の活性化作用を阻害又は抑制できる核酸アプタマー発現用DNA配列や、リボザイム発現用DNA配列を選択することができ、上記配列は、それぞれ標的RNAの配列や、その転写因子が結合し得る配列の情報に基づいて常法により設計することができる。

【0027】

本発明のRNA発現用DNA配列由来のRNAを発現させる方法において、ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列を導入する細胞としては、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などを例示することができ、中でも哺乳動物細胞を好適に例示することができる。かかる哺乳動物細胞としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、イヌなどの哺乳動物由来の細胞であればよく、具体的にはHEK293細胞、HeLa細胞、アフリカミドリザル腎臓由来細胞(COS-7)細胞、NIH由来のマウス胎仔由来繊維芽細胞(NIH-3T3細胞)、ヒト骨肉腫細胞(HOS細胞)、培養ヒト骨芽細胞(SAM-1細胞)、ヒト白血球T細胞(jurkat細胞)、ヒト乳癌培養樹立細胞(MCF-7細胞)、ヒト肝臓ガン由来細胞(HepG2細胞)、ヒト結腸癌由来細胞(CaCO-2細胞)、ヒト骨芽細胞(SaOS細胞)、ヒト慢性骨髄性白血病細胞(K562細胞)、サル腎由来細胞(CV-1細胞)、アフリカミドリザル腎臓細胞(COS-1細胞)、マウス由来線維芽細胞(L929細胞)、マウス奇形腫細胞(F9細胞)、マウス骨芽様細胞(MC-3T3-E1細胞)、ラット副腎髄質褐色腫(PC-12細胞)、ラット骨芽細胞様細胞(ROS17/2.8細胞)、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHOK1細胞)、ハムスター腎細胞(BHK-21細胞)などを例示することができ、中でもHEK293細胞又はHeLa細胞が好ましい。また、上記哺乳動物細胞には、EB3細胞などの胚性幹細胞(ES細胞)や、組織から採取した初代培養細胞も含まれる。

【0028】

プロモータ配列からなる線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列とターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAを細胞内に導入する方法としては、DNAを哺乳動物などの細胞内に導入する一般的な方法であればよく、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などを例示することができ、Lipofectin Reagent(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)、Lipofectamine(登録商標)2000 Reagent(インビトロジェン社製)、SuperFect(登録商標)Transfection Reagent(キアゲン社製)、FuGENE(登録商標)HD Transfection Reagent、FuGENE(登録商標) Transfection Reagent(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)などの市販のトランスフェクション試薬並びに当技術分野で広く用いられている手法を用いることができる。

【0029】

また、細胞内に導入するターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列は、同時に細胞に導入してもよく、いずれか一方を先に細胞に導入し、その後、他方を前記細胞に導入してもよいが、同時に細胞内に導入することが好ましい。ターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA、及び、RNA発現用DNA配列の濃度は、形質転換細胞においてRNA発現用DNA配列のRNAを発現しうる限り特に制限されないが、RNA発現用DNA配列の濃度に対してターミネータ配列とプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの濃度が0.2~5倍、好ましくは0.5~2倍であることを例示することができる。

【実施例1】

【0030】

[ルシフェラーゼの発現]

(SV40ターミネータ配列とCMVプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

10

20

30

40

50

pEGFP-C1 (クロンテック社製) をテンプレートとして、配列番号1に示されるフォワードプライマー (SV40pA(130-208)-eCMV-600) と配列番号3に示されるリバースプライマー (CMVpc) を用いて、SV40ターミネータ配列の塩基番号130番目~208番目の配列とCMVプロモータの全長の配列とを順次備えた線状二本鎖DNA (SVter-CMVp) を作製した。PCRは、GXLポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いてその推奨プロトコールに準じて行った。それぞれの最終濃度は、テンプレート10pg (100pg/μlを1μl)、フォワードプライマー0.3μM、リバースプライマー0.3μMに調整し、iCyclerサーマルサイクラー (BIO-RAD社製) を用いて98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図2(2)レーンに示す。

10

【0031】

(ラビット - グロピンターミネータ配列とCMVプロモータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1 (クロンテック製) をテンプレートとして、配列番号2に示されるフォワードプライマー (GlopA(121-190)-eCMV-600) と配列番号3に示されるリバースプライマー (CMVpc) を用いて、 - グロピンターミネータ配列の塩基番号121番目~190番目の配列とCMVプロモータの全長の配列とを順次備えた線状二本鎖DNA (GlopAter-CMVp) を作製した。PCR反応は、いずれも前記と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図2(3)レーンに示す。

20

【0032】

(ルシフェラーゼ (hGluc) 遺伝子をコードする配列を備えた線状二本鎖DNAの作製)

pCMV-Gluc (ニュー・イングランド・バイオラボ社製) を用い、特願2013-213459号に記載の方法に従って、CMVプロモータの全長の配列と、ルシフェラーゼ遺伝子をコードする配列と、SV40ターミネータの塩基番号121番目~220番目の配列とを順次備えたプラスミドDNA (pCMV-hGluc-SVter: 図3) を作製した。かかるpCMV-hGluc-SVterをテンプレートとして、配列番号4に示されるフォワードプライマー (hGluc+1) と配列番号5に示されるリバースプライマー (hGluc+558taaC) を用いて、hGluc遺伝子をコードする配列を備えた線状二本鎖DNA (hGluc) を作製した。PCR反応は、いずれも上述と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図4に示す。

30

【0033】

(細胞への導入)

HEK293細胞及びHeLa細胞を4000細胞/wellになるように96wellプレートに播種して23時間培養後、(I) SVter-CMVp、(II) GlopAter-CMVp、(III) hGluc、(IV) SVter-CMVp及びhGluc (SVter-CMVp+hGluc)、(V) GlopAter-CMVp及びhGluc (GlopAter-CMVp+hGluc) の各線状二本鎖DNA 20ngと、5% (W/V) のPEG3350と、1.25μgのtRNAと、0.2μlのFuGENE (商標登録) HD Transfection Reagent 試薬と、蒸留水とを含む溶液20μlを調製し、かかる溶液を用いてHEK293細胞及びHeLa細胞に(I)~(V)の線状二本鎖DNAを導入した。次に、25時間後に採取した培養上清に含まれる分泌型ルシフェラーゼの発現量を最終濃度10μMのCTZ基質とControl B960 (ベルトールドテクノロジー社製) を用いて測定した。HEK293細胞を用いた場合におけるルシフェラーゼの発現量を図5に、HeLa細胞を用いた場合におけるルシフェラーゼの発現量をそれぞれ図6に示す。

40

【0034】

(結果)

50

図5、6に示すように、SVter-CMVp、GloAter-CMVp、又はhGlucをそれぞれ単独で導入しても細胞内でルシフェラーゼは発現していないが、SVter-CMVp及びhGluc、又は、GloAter-CMVp及びhGlucを導入すると細胞内でルシフェラーゼが発現していることが明らかとなった。

【0035】

[EGFPの発現]

(EGFP遺伝子をコードする配列を備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック社製)をテンプレートとして、配列番号6に示されるフォワードプライマー(pEGFP+1)と配列番号7に示されるリバースプライマー:(pEGFP+720c)を用いて、EGFP遺伝子をコードする配列を備えた線状二本鎖DNA(EGFP)を作製した。PCR反応は、いずれも実施例1記載と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図7(1)レーンに示す。

10

【0036】

(SV40ターミネータ配列とCMVプロモータ配列とEGFP遺伝子をコードする配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック製)をテンプレートとして、配列番号1に示されるフォワードプライマー(SV40pA(130-208)-eCMV-600)と配列番号7に示されるリバースプライマー(pEGFP+720c)を用いて、SV40ターミネータ配列の塩基番号130番目~208番目の配列とCMVプロモータの全長の配列とEGFP遺伝子をコードする配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(SVter-CMVp-EGFP)を作製した。PCR反応は、いずれも実施例1記載と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図2(1)レーンに示す。

20

【0037】

(-グロピンターミネータ配列とCMVプロモータ配列とEGFP遺伝子とをコードする配列を順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック製)をテンプレートとして、配列番号2に示されるフォワードプライマー(GloA(121-190)-eCMV-600)と配列番号7に示されるリバースプライマー(pEGFP+720c)を用いて、-グロピンターミネータ配列の塩基番号121番目~190番目の配列とCMVプロモータの全長の配列とEGFP遺伝子をコードする配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(GloAter-CMVp-EGFP)を作製した。PCR反応は、いずれも実施例1記載と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図2(4)レーンに示す。

30

【0038】

(CMVプロモータ配列とEGFP遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNAの作製)

pEGFP-C1(クロンテック製)をテンプレートとして、配列番号8に示されるフォワードプライマー(pEGFP-600)と配列番号9に示されるリバースプライマー(pEGFP+018c)を用いて、CMVプロモータの全長の配列とEGFP遺伝子をコードする配列とSV40ターミネータ配列とを順次備えた線状二本鎖DNA(CMVp-EGFP-SVter)を作製した。PCR反応は、いずれも実施例1記載と同様の反応溶液組成にて、98 10秒、60 15秒、68 1分のサイクルを40回行った。作製した線状二本鎖DNAのアガロース電気泳動の結果を図7(2)レーンに示す。

40

【0039】

(細胞への導入)

HEK293細胞及びHeLa細胞を4000細胞/wellになるように96wellプレートに播種して23時間培養後、(I)SVter-CMVp及びEGFP(SVter-CMVp+EGFP)、(II)GloAter-CMVp及びEGFP(

50

G l o p A t e r - C M V p + E G F P)、(III) S V t e r - C M V p - E G F P、(IV) G l o p A t e r - C M V p - E G F P、(V) C M V p - E G F P - S V t e r、(VI) E G F Pの各線状二本鎖DNA 20ngを、実施例1と同様にFuGENE(商標登録)HD Transfection Reagent 試薬を含む溶液を用いてHEK293細胞及びHeLa細胞に導入し、26時間後に蛍光顕微鏡で観察した。HEK293細胞を用いた場合における観察結果を図8~10に、HeLa細胞を用いた場合における観察結果を図11~13に示す。

【0040】

(結果)

図8~10に示すように、HEK293細胞を用いた場合において、EGFPを単独で導入しても細胞内でEGFPの発現はみられないが、SVter-CMVp及びEGFP、又は、GlopAter-CMVp及びEGFPを導入すると、細胞内でEGFPが発現していることが明らかとなった。同様に、図11~13に示すように、HeLa細胞を用いた場合において、EGFPを単独で導入しても細胞内でEGFPの発現はみられないが、SVter-CMVp及びEGFP、又は、GlopAter-CMVp及びEGFPを導入すると、細胞内でEGFPが発現していることが明らかとなった。予めEGFPがプロモータ配列及び/又はターミネータ配列と結合したSVter-CMVp-EGFP、GlopAter-CMVp-EGFP、CMVp-EGFP-SVterを導入した場合に比べれば発現量が劣るものの、SVter-CMVp及びEGFP、又は、GlopAter-CMVp及びEGFPを導入すると、蛍光観察による解析が十分

10

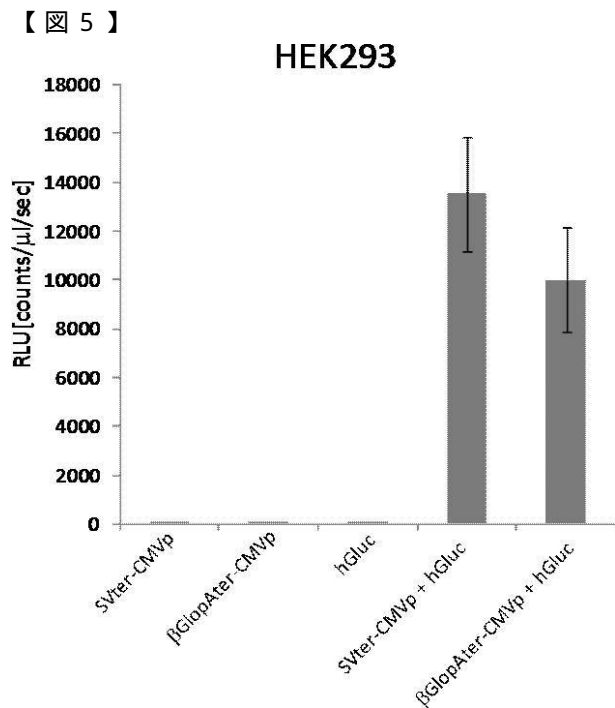
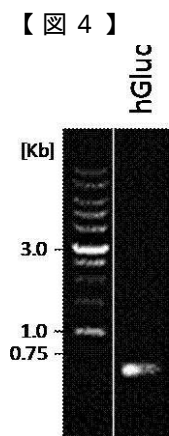
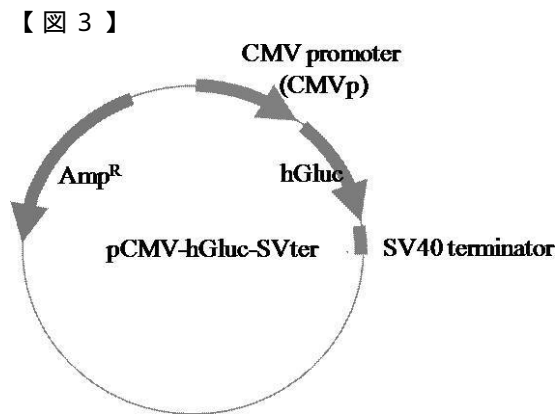
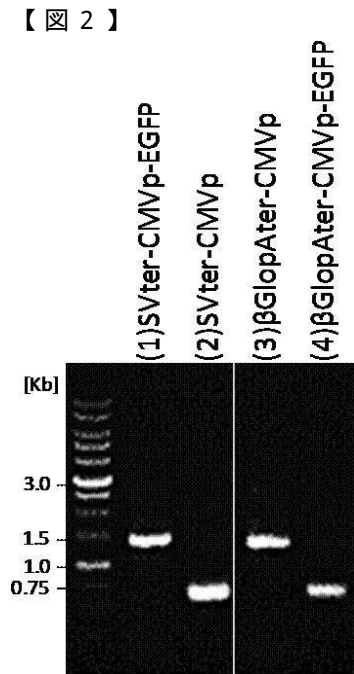
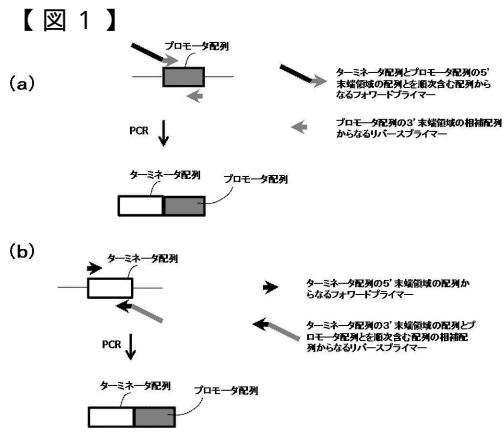
20

、煩雑な作業や時間を要することなく、細胞へ導入した遺伝子の発現解析が可能となることが明らかとなった。

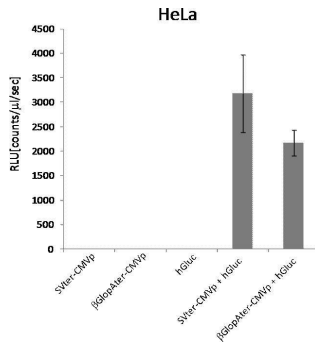
【産業上の利用可能性】

【0041】

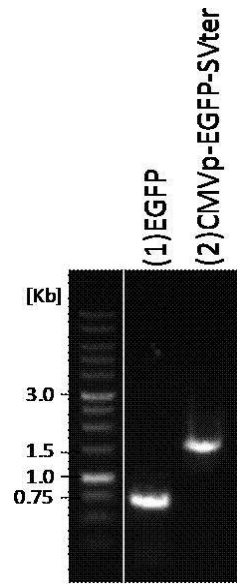
本発明によると、細胞内で遺伝子などを発現させる場合に、プロモータ配列と遺伝子などをコードする配列とを連結する工程や、遺伝子などをコードする配列とターミネータ配列とを連結する工程や、プラスミドを作製する工程が不要となる。そのため、遺伝子、プロモータ、ターミネータなどの解析で利用可能である。



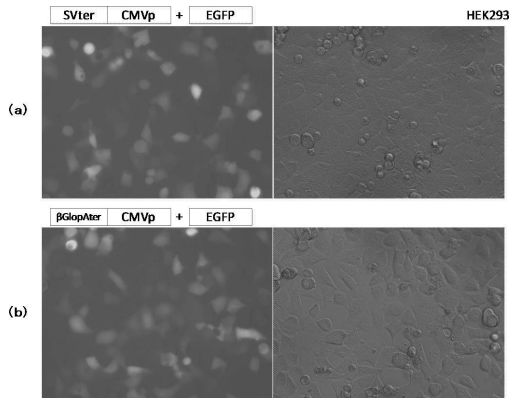
【 6 】



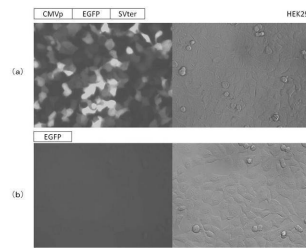
【 7 】



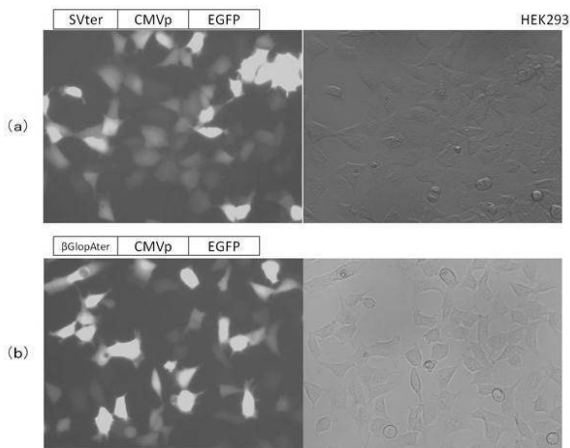
【 8 】



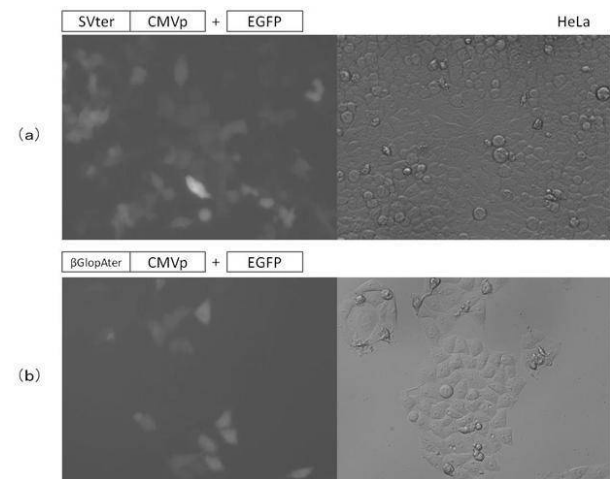
【 10 】



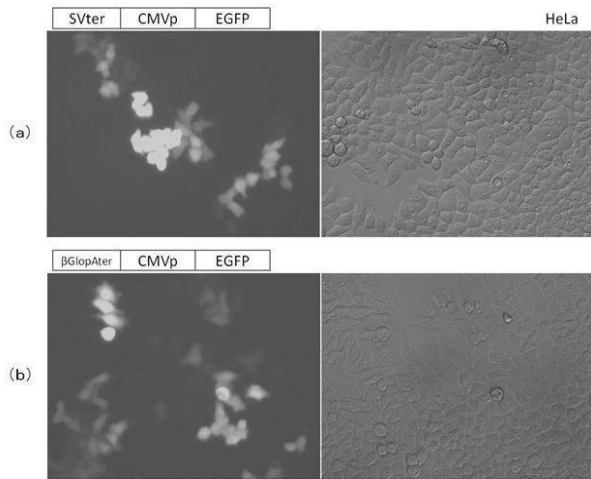
【 9 】



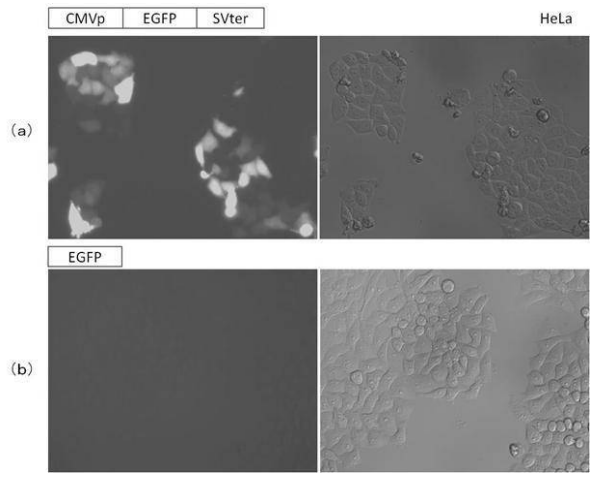
【 11 】



【 1 2】



【 1 3】



【配列表】

0006607481000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100177714
弁理士 藤本 昌平
- (74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
- (74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
- (72)発明者 中村 美紀子
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内
- (72)発明者 星田 尚司
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内
- (72)発明者 赤田 倫治
山口県宇部市常盤台2丁目16-1 国立大学法人山口大学工学部内

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 米国特許第04495280 (US, A)
特開2015-112086 (JP, A)
"Expression Vector pLEAD DNA, pre-digested pLEAD Expression Kit", Woko Bio Window, 2007 Dec., vol. 86, p. 6, [online], retrieved 2018/08/08, <URL ; <https://labchem.wako-chem.co.jp/journal/docs/bio86.pdf>>
"GenScript LIC Kit", フナコシ, 掲載日2008-02-18, [online], retrieved 2018/08/23, <URL: <https://www.funakoshi.co.jp/contents/2632>>
Sykes KF et al, Nat Biotechnol, 1999年 4月, Vol. 17, pp. 355-359

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)