

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7079018号

(P7079018)

(45)発行日 令和4年6月1日(2022.6.1)

(24)登録日 令和4年5月24日(2022.5.24)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11

Z Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

C 4 0 B 40/10 (2006.01)

C 4 0 B 40/10

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 4 0 B 40/06

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

C 4 0 B 40/08

請求項の数 10 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-549140(P2019-549140)

(86)(22)出願日 平成30年8月28日(2018.8.28)

(86)国際出願番号 PCT/JP2018/031814

(87)国際公開番号 WO2019/077887

(87)国際公開日 平成31年4月25日(2019.4.25)

審査請求日 令和2年4月16日(2020.4.16)

(31)優先権主張番号 特願2017-200356(P2017-200356)

(32)優先日 平成29年10月16日(2017.10.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業(CREST)、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの

(73)特許権者 504137912

国立大学法人 東京大学

東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(74)代理人 100152331

弁理士 山田 拓

(72)発明者 菅 裕明

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D - アミノ酸及びβ - アミノ酸の取り込みを増強するtRNAのD及びTアームの改変

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1で示される塩基配列及び配列番号2で示される塩基配列を含有し、非タンパク質性アミノ酸をコードするtRNA。

N₁N₂G C N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁G C N₁₂N₁₃ (配列番号1)A G G G G (N₁₄)_m C C C C U (配列番号2)

(配列番号1において、

N₁ ~ N₁₃は、それぞれ任意の塩基を示し、N₃ ~ N₁₁はDループを形成し、5' - N₂G C - 3'が、3' - N₁₂C G - 5'と塩基対を形成し、

配列番号2において、

N₁₄は、任意の塩基を示し、mは、1以上の整数であり、(N₁₄)_mはTループを形成し

、

5' - A G G G G - 3'が、3' - U C C C C - 5'と塩基対を形成する。)

【請求項2】

非タンパク質性アミノ酸が、D - アミノ酸、β - アミノ酸又はα, α - 二置換アミノ酸である、請求項1に記載のtRNA。

【請求項3】

配列番号1で示される塩基配列を含有し、3'末端にD - アミノ酸、β - アミノ酸又はα, α - 二置換アミノ酸がチャージされている伸長tRNA。

N₁N₂G C N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁G C N₁₂N₁₃ (配列番号1)

(配列番号 1 において、
 $N_1 \sim N_{13}$ は、それぞれ任意の塩基を示し、 $N_3 \sim N_{11}$ は D ループを形成し、
 $5' - N_1 N_2 G C - 3'$ が、 $3' - N_{13} N_{12} C G - 5'$ と塩基対を形成する。)

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の tRNA を含み、2 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを合成するための翻訳系。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の tRNA を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドライブラリの製造方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の tRNA を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドと該ペプチドをコードする mRNA との複合体ライブラリの製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の tRNA を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドの製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の tRNA を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドと該ペプチドをコードする mRNA との複合体の製造方法。

【請求項 9】

前記ペプチドが、2 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

前記ペプチドが、4 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合し、非タンパク質性アミノ酸間で分子内架橋したペプチドを含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非タンパク質性アミノ酸の取り込みを増強する tRNA の D 及び T アームの改変に関する。

【背景技術】

【0002】

天然においては、リボソーム翻訳系は、19 のタンパク質性 L - アミノ酸及びグリシンを利用するが、D - アミノ酸や β - アミノ酸のような非タンパク質性アミノ酸は、リボソーム翻訳系によるペプチド合成やタンパク質合成においては除外されている。D - アミノ酸や β - アミノ酸は、様々な天然ペプチドに見出されているが、通常、非リボソーム翻訳系により合成されている。

そこで、これらの非タンパク質性アミノ酸を導入するための様々な方法が開発されている。例えば、Flexible in vitro translation (FIT) 系のような再構成された in vitro 翻訳系と組み合わされた遺伝子コードの再プログラミングにより、D - アミノ酸、N - メチルアミノ酸、 β - アミノ酸、および α - ヒドロキシ酸といった非タンパク質性アミノ酸が導入されている (非特許文献 1 - 9)。

【0003】

しかしながら、非特許文献 4、5 及び 10 - 12 に開示されるように、ペプチド鎖にある種の D - アミノ酸を導入することに成功しているものの、D - アミノ酸の連続した導入は未だ大きな課題を有していた (非特許文献 4 及び 12)。

非特許文献 5 には、フレキシザイムによって調製された D - アミノ酸でプレチャージした tRNA^{GluE2} を使用することで、FIT システムを用いた D - アミノ酸の連続的な取り込みが開示されている。非特許文献 5 に開示された方法では、EF - Tu のより高濃度であることが、D - アミノアシル tRNA のアコモデーションの増強に貢献していると考え

10

20

30

40

50

られている。しかしながら、2つの連続したD - A l aを有するペプチドの全体的な発現レベルは、0 . 3 μ M未満であり、全L型ペプチドにおける濃度の約1 . 4 μ Mと比べて依然として低かった。

【0004】

また、 β - アミノ酸についても、ペプチド鎖に特定の β - アミノ酸を導入することに成功しているものの、 β - アミノ酸の連続した導入には大きな課題があった（非特許文献8及び13 - 18）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

10

【文献】Murakami, H. et al. Nat. Methods 3, 357-359 (2006).

Goto, Y. et al. Nat. Protoc. 6, 779-790 (2011).

Goto, Y. et al. RNA 14, 1390-1398 (2008).

Fujino, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 135, 1830-1837 (2013).

Katoh, T. et al. Cell Chem. Biol. 24, 46-54 (2017).

Kawakami, T. et al. Chem Biol 15, 32-42 (2008).

Kawakami, T. et al. J Am Chem Soc 135, 12297-12304 (2013).

Fujino, T. et al. J Am Chem Soc 138, 1962-1969 (2016).

Ohta, A. et al. Chem Biol 14, 1315-1322 (2007).

Dedkova, L.M. et al. J. Am. Chem. Soc. 125, 6616-6617 (2003).

20

Dedkova, L.M. et al. Biochemistry 45, 15541-15551 (2006).

Achenbach, J. et al. Nucleic Acids Res 43, 5687-5698 (2015).

Heckler, T. G. et al. J. Biol. Chem. 258, 4492-4495 (1983).

Maini, R. et al. Biochemistry 54, 3694-3706 (2015).

Iqbal, E. S. et al. Org. Biomol. Chem. 16, 1073-1078 (2018).

Dedkova, L. M. et al. Biochemistry 51, 401-415 (2011).

Maini, R. et al. Bioorg. Med. Chem. 21, 1088-1096 (2013).

Czekster, C. M. et al. J. Am. Chem. Soc. 138, 5194-5197 (2016).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

本発明が解決しようとする課題は、無細胞翻訳系で翻訳する際に、非タンパク質性アミノ酸が連続して結合したペプチドを合成することのできる新規翻訳系を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意検討した結果、アミノアシル tRNA のD及びTアームに着目し、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

本発明は以下のとおりである。

(1)

40

配列番号1で示される塩基配列を含有し、非タンパク質性アミノ酸をコードするtRNA。

N₁N₂G C N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁G C N₁₂N₁₃ (配列番号1)

(配列番号1において、

N₁ ~ N₁₃は、それぞれ任意の塩基を示し、N₃ ~ N₁₁はDループを形成し、

N₁N₂G Cが、N₁₃N₁₂C Gと塩基対を形成する。)

(2)

配列番号2で示される塩基配列をさらに含有する、(1)に記載のtRNA。

A G G G G (N₁₄) m C C C C U (配列番号2)

(配列番号2において、

N₁₄は、任意の塩基を示し、mは、1以上の整数であり、(N₁₄) mはTループを形成し

50

、

A G G G G が、U C C C C と塩基対を形成する。)

(3)

3' 末端にチャージされた非タンパク質性アミノ酸が、D - アミノ酸、β - アミノ酸又は α , α - 二置換アミノ酸である、(1) 又は (2) に記載の t R N A。

(4)

(1) ~ (3) のいずれかに記載の t R N A を含み、2 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを合成するための翻訳系。

(5)

(1) ~ (3) のいずれかに記載の t R N A を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドライブラリの製造方法。

10

(6)

(1) ~ (3) のいずれかに記載の t R N A を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドと該ペプチドをコードする m R N A との複合体ライブラリの製造方法。

(7)

(5) に記載の方法によって製造されるペプチドライブラリ又は (6) に記載の方法によって製造されるペプチド - m R N A 複合体ライブラリ。

(8)

2 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを含む、(7) に記載のペプチドライブラリ又はペプチド - m R N A 複合体ライブラリ。

20

(9)

4 以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合し、非タンパク質性アミノ酸間で分子内架橋したペプチドを含む、(8) に記載のペプチドライブラリ又はペプチド - m R N A 複合体ライブラリ。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、無細胞翻訳系で翻訳する際に、非タンパク質性アミノ酸が連続して結合したペプチドを合成することのできる新規翻訳系を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

30

【図 1】図 1 は、E F - P によるプロリン及び D - アミノ酸の取り込みの促進の模式図を示す。図 1 A は、2 つのプロリン (P r o) 間のペプチド結合形成を促進する原核生物翻訳因子である E F - P を示す。E F - P の役割は、連続したプロリンの取り込みを促進することである。E F - P は、E 部位と P 部位間のリボソームに結合し、P 部位のペプチジルプロリル t R N A と相関して、P 部位のペプチジルプロリル t R N A と A 部位のプロリル t R N A とのペプチジルトランスファーを促進する。図 1 B は、t R N A^{Pro1} の D - アームおよび t R N A^{GluE2} の T - ステムのキメラ構造を有する t R N A^{Pro1E2} の構造を示す。

【図 2】図 2 は、E F - P による D - アミノ酸の取り込みの促進を示す。図 2 A は、実施例で用いられた m R 1 及び m R 2 の m R N A 配列及びそれに対応した r P 1 及び r P 2 のペプチド配列を示す。任意に選択されたコドンは、N N N に導入され、プレチャージした D - アミノアシル t R N A を用いて D - アミノ酸 (X) の取り込みに使用される。f l a g のアミノ酸配列は、D Y K D D D D K である。図 2 B は、C C G コドンで D - アミノ酸の取り込みに用いられる t R N A の構造を示す。野生型の t R N A^{Pro1}_{CGG} (W T) は、1 3 及び 2 2 位に C / G 塩基対を有する。t R N A^{Pro1}_{CGG} (C 1 3 G) 変異体は、C - t o - G 変異を 1 3 位に有するが、塩基対形成を崩壊させる。アンチコドンループの配列は、異なるコドンでデコードするために任意に変更可能である。図 2 C は、2 つの D - アラニンが導入された r P 1 ペプチドの発現レベルを示す。D - アラニン取り込みのために用いられたコドンを示す。黒色バーは、E F - P (+) の翻訳系であることを示し、白抜きバーは、E F - P (-) の翻訳系であることを示す。バーの上の数字は、E F - P (-

40

50

）に対するEF - P（+）における割合として計算した翻訳収率を意味する。EF - P（+）の翻訳系におけるEF - Pの濃度は、5 μ Mであった。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d.（n = 3）である。図2D及び図2Eは、2又は3つの連続したD - アミノ酸又はAib（2 - アミノ酪酸）を含むrP1ペプチド（図2D）及びrP2ペプチド（図2E）の発現レベルを示す。野生型のtRNA^{Pro}_{CGG}（WT）（通常のバー）又はC13G変異体であるtRNA^{Pro1}_{CGG}（ドットのバー）がCCGコドンでD - アミノ酸又はAibの取り込みに用いられた。黒色バーは、EF - P（+）の翻訳系であることを示し、白抜きバーは、EF - P（-）の翻訳系であることを示す。バーの上の数字は、EF - P（-）に対するEF - P（+）における割合として計算した翻訳収率を意味する。EF - P（+）の翻訳系におけるEF - Pの濃度は、5 μ Mであった。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d.（n = 3）である。D - ヒスチジン及びAibの取り込みを示す拡大したグラフを図2Dでの右上に示す。図2D及び図2Eは、EF - Pが、P部位ペプチジルD - アミノアシルtRNAをペプチジルL - プロリンtRNAを認識するのと同様に、認識していることを示している。

10

【図3】図3Aは、2つの連続したD - アラニンを有するrP1ペプチドのトリシンSDS - PAGE分析の結果を示す（図2Cを参照）。図3Bは、2又は3つの連続したL - プロリンを含むrP1ペプチド及びrP2ペプチドの発現レベルを示す。CCGコドンで、野生型のtRNA^{Pro}_{CGG}（WT）（通常のバー）又はC13G変異体であるtRNA^{Pro1}_{CGG}（ドットのバー）がL - プロリンの取り込みに用いられた。黒色バーは、EF - P（+）の翻訳系であることを示し、白抜きバーは、EF - P（-）の翻訳系であることを示す。バーの上の数字は、EF - P（-）に対するEF - P（+）における割合として計算した翻訳収率を意味する。EF - P（+）の翻訳系におけるEF - Pの濃度は、5 μ Mであった。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d.（n = 3）である。図3C及び図3Dは、2又は3つの連続したL - プロリン（図3C）又はD - アミノ酸及びAib（図3D）を有するrP1ペプチド及びrP2ペプチドのトリシンSDS - PAGE分析の結果を示す。EF - Pの存在下あるいは非存在下で2.5 μ L 反応液中で、37で15分、翻訳を行った（図2D及び2Eを参照）。図3Eは、rP1ペプチド及びrP2ペプチドのMALDI - TOF - MSスペクトルを示す。野生型のtRNA^{Pro}が、L - プロリン、D - アミノ酸及びAibの取り込みのために用いられた。矢印は、それぞれ目的物に应答するピークを示す。理論値及び実測値は、m/zで示す。

20

30

【図4】図4は、D - Ala含有ペプチドの翻訳におけるEF - Pの滴定及び時間経過分析を示す。図4Aは、CCGコドンで、2つの連続したD - アラニンを有するrP1ペプチドの翻訳におけるEF - P濃度の滴定を示す。翻訳時間は40分（黒丸）又は15分（黒四角）とした。エラーバーは、s.d.（n = 3）である。図4Bは、2つの連続したD - アラニンを有するrP1ペプチドの翻訳の時間経過分析を示す。黒丸及び黒四角はそれぞれEF - P（+）及びEF - P（-）の翻訳系での結果を示す。EF - P（+）の翻訳系におけるEF - Pの濃度は、5 μ Mであった。エラーバーは、s.d.（n = 3）である。

【図5】図5は、D - アミノ酸取り込みのEF - P依存性促進に対するtRNA構造の効果を示す。図5Aは、D - アミノ酸の取り込みに使用されるtRNAの構造を示す。tRNA^{Pro1E1}_{CGG}及びtRNA^{Pro1E2}_{CGG}の薄い文字は、それぞれ野生型tRNA^{Pro1}_{CGG}配列からの変異を示す（これらの変異を導入したtRNAを、大腸菌プロリルtRNA合成酵素は、認識することができない。）。図5Bは、CCGコドンで、2つの連続したD - アラニンを有するrP1ペプチドの発現レベルを示す。D - アラニン取り込みに使用されるtRNAが示されている。バーの上の数字は、EF - P（-）に対するEF - P（+）における割合として計算した翻訳収率を意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d.（n = 3）である。

40

【図6】図6Aは、2つの連続したD - アラニンを取り込むための様々なtRNAを用いて合成したrP1ペプチドのトリシンSDS - PAGE分析の結果を示す。EF - Pの存在下あるいは非存在下で2.5 μ L 反応液中で、37で15分、翻訳を行った（図5Bを参照）。図6Bは、rP3、rP4、rP5、rP6及びrP7ペプチドのトリシン

50

S D S - P A G E 分析の結果を示す。t R N A^{Pro1E2}をD - アミノ酸の取り込みに使用した。E F - P の存在下あるいは非存在下で2 . 5 μ L 反応液中で、37 °C で15分、翻訳を行った(図7Bを参照)。図6Cは、5 μ M E F - P とt R N A^{Pro1E2}を用いて合成した、r P 3、r P 4、r P 5、r P 6及びr P 7ペプチドのM A L D I - T O F - M Sスペクトルを示す。矢印は、それぞれ目的物に应答するピークを示す。理論値及び実測値は、m / zで示す。なお、r P 7ペプチドは、主に、D - システインへの2 - メルカプトエタノール付加物として検出された。

【図7】図7は、E F - Pによって促進される種々のペプチド配列へのD - アミノ酸の取り込みを示す。図7Aは、m R N A配列(m R 3、m R 4、m R 5、m R 6及びm R 7)並びに対応するペプチド配列(r P 3、r P 4、r P 5、r P 6及びr P 7)を示す。図7Bは、t R N A^{Pro1E2}変異体をD - アミノ酸の取り込みに使用した、r P 3、r P 4、r P 5、r P 6及びr P 7の各ペプチドの発現レベルを示す。バーの上の数字は、E F - P (-)に対するE F - P (+)における割合として計算した翻訳収率を意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s . d . (n = 3)である。

10

【図8】図8は、ジスルフィド結合又はチオエーテル結合による環状D - ペプチドの翻訳を示す。図8Aは、m R N A配列(m R 8及びm R 9)並びに対応するペプチド配列(r P 8及びr P 9)を示す。r P 8ペプチドに含まれる2つのD - システインはジスルフィド結合を形成して大環状構造を形成する。r P 9ペプチド中のD - システインのスルフィドリル基は、N末端クロロアセチル(C l A c)基のα - 炭素を攻撃してチオエーテル結合を形成し、大環状構造を形成する。図8B及び図8Cは、t R N A^{Pro1E2}またはt R N A^{GluE2}をD - アミノ酸の取り込みに使用したr P 8ペプチド(図8B)及びr P 9ペプチド(図8C)の発現レベルを示す。バーの上の数字は、E F - P (-)に対するE F - P (+)における割合として計算した翻訳収率を意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s . d . (n = 3)である。

20

【図9】図9A及び図9Bは、r P 8ペプチド(図9A)及びr P 9ペプチド(図9B)のトリシンS D S - P A G E分析の結果を示す。t R N A^{Pro1E2}又はt R N A^{GluE2}をD - アミノ酸の取り込みに使用した。E F - P の存在下あるいは非存在下で2 . 5 μ L 反応液中で、37 °C で15分、翻訳を行った(図8B及び8Cを参照)。図9Cは、5 μ M E F - P とt R N A^{Pro1E2}を用いて合成した、r P 8ペプチド及びr P 9ペプチドのM A L D I - T O F - M Sスペクトルを示す。矢印は、それぞれ目的物に应答するピークを示す。理論値及び実測値は、m / zで示す。

30

【図10】図10は、E F - Pによるβ - アミノ酸の取り込みの促進を示す。図10aは、C C Gコドンでβ - アミノ酸の取り込みに用いられるt R N Aの構造を示す。図10bは、β - アミノ酸の構造を示す。図10cは、図2A同様に、β - アミノ酸の取り込みのために、実施例で用いられたm R 1のm R N A配列及びそれに対応したr P 1のペプチド配列を示す。C C Gコドンは、プレチャージしたβ - アミノアシルt R N Aを用いてβ - アミノ酸(X a a)の取り込みに使用される。f l a gのアミノ酸配列は、D Y K D D D D Kである。図10dは、2つの連続したβ - アミノ酸又はD - アラニンを含むr P 1ペプチドの発現レベルを示す。野生型のt R N A^{Pro1CGG}(W T)(通常のバー)又はC 1 3 G変異体であるt R N A^{Pro1CGG}(ドットのバー)がC C Gコドンでβ - アミノ酸又はD - アラニンの取り込みに用いられた。黒色バーは、E F - P (+)の翻訳系であることを示し、白抜きバーは、E F - P (-)の翻訳系であることを示す。バーの上の数字は、E F - P (-)に対するE F - P (+)における割合として計算した翻訳収率を意味する。E F - P (+)の翻訳系におけるE F - P の濃度は、5 μ Mであった。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s . d . (n = 3)である。図10e及び図10fは、2つの連続したβ - アミノ酸を含むr P 1ペプチドの翻訳におけるE F - P 濃度の滴定を示す。滴定のために、リシル化(L y s y l a t e d)E F - P (黒丸)又は非修飾E F - P (白丸)が用いられた。エラーバーは、s . d . (n = 3)である。

40

【図11】図11は、β - アミノ酸取り込みのE F - P依存性促進に対するt R N A構造の効果を示す。図11aは、β - アミノ酸の取り込みに使用されるt R N Aの構造を示す

50

。ドットの線は、EF - Tu及びEF - P結合のために、最適化されたTステムモチーフ又はDアームモチーフを示す。図11bは、2つの連続したβhMを含むrP1ペプチドの発現レベルを示す。βhM取り込みに使用されるtRNAが示されている。バーの上の数字は、EF - P (-)に対するEF - P (+)における割合として計算した翻訳収率を意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d. (n = 3)である。図11cは、β - アミノ酸取り込みのために最適化されたDアームモチーフとTステムモチーフを有するtRNA^{Pro1E2}の構造を示す。

【図12】図12は、7つまでの連続したβ - アミノ酸の取り込みを示す。図12aは、図2A同様に、β - アミノ酸の取り込みのために、実施例で用いられたmR2のmRNA配列及びそれに対応したrP2のペプチド配列を示す。2～7つの連続したβhMが、tRNA^{Pro1E2}_{CGG}を用いて、CCGコドン (n = 2～7) で取り込まれた。図12bは、連続したβhMを含むrP2ペプチドの発現レベルを示す。バーの上の数字は、EF - P (-)に対するEF - P (+)における割合として計算した翻訳収率あるいは発現レベル (μM) を意味する。N.D. は、検出できなかったことを意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d. (n = 3)である。図12cは、2～7つの連続したβhMが取り込まれたrP2ペプチドのMALDI - TOF - MSスペクトルを示す。5 μM EF - Pが翻訳系に存在した。矢印は、それぞれ目的物に応答するピークを示す。理論値及び実測値は、m/zで示す。

【図13】図13は、2種のβ - アミノ酸の取り込みを示す。図13aは、図2A同様に、β - アミノ酸の取り込みのために、実施例で用いられたmR3 - 3～mR3 - 7のmRNA配列及びそれに対応したrP3 - 3～rP3 - 7のペプチド配列を示す。βhM及びβhFが、tRNA^{Pro1E2}_{GAU}及びtRNA^{Pro1E2}_{GUG}を用いて、AUUコドン及びCAUコドンで、おのの取り込まれた。図13bは、rP3 - 3ペプチド～rP3 - 7ペプチドの発現レベルを示す。バーの上の数字は、EF - P (-)に対するEF - P (+)における割合として計算した翻訳収率あるいは発現レベル (μM) を意味する。N.D. は、検出できなかったことを意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d. (n = 3)である。図13cは、βhM及びβhFが取り込まれたrP3 - 3ペプチド～rP3 - 7ペプチドのMALDI - TOF - MSスペクトルを示す。5 μM EF - Pが翻訳系に存在した。矢印は、それぞれ目的物に応答するピークを示す。理論値及び実測値は、m/zで示す。

【図14】図14は、複数のD - アミノ酸及びβ - アミノ酸の取り込みを示す。図14aは、図2A同様に、D - アミノ酸及びβ - アミノ酸の取り込みのために、実施例で用いられたmR4～mR11のmRNA配列及びそれに対応したrP4～rP11のペプチド配列を示す。βhM及びβhFが、tRNA^{Pro1E2}_{GAU}及びtRNA^{Pro1E2}_{GUG}を用いて、AUUコドン及びCAUコドンで、D - アミノ酸が、tRNA^{Pro1E2}_{GGU}を用いて、ACUコドンで、おのの取り込まれた。図14bは、大環状ペプチドrP11の構造を示す。D - システインのチオール基が、N末端クロロアセチル基と反応してチオエーテル結合を形成して、大環状構造を産生する。図14c及び図14dは、rP4ペプチドrP9ペプチド、rP10ペプチド～rP11ペプチドの発現レベルを、おのの示す。バーの上の数字は、EF - P (-)に対するEF - P (+)における割合として計算した翻訳収率あるいは発現レベル (μM) を意味する。N.D. は、検出できなかったことを意味する。翻訳時間は15分であり、エラーバーは、s.d. (n = 3)である。

【図15】図15aは、β - アミノ酸又はD - アラニンを取り込んだrP1ペプチドのトリシンSDS - PAGE分析の結果を示す。これらのアミノ酸の取り込みに使用されるtRNAが示されている。各バンドの定量化は、図10dを参照。図15bは、rP1ペプチドのMALDI - TOF - MSスペクトルを示す。野生型tRNA^{Pro1}が、これらのアミノ酸の取り込みに用いられた。5 μM EF - Pが翻訳系に存在した。矢印は、それぞれ目的物に応答するピークを示す。理論値及び実測値は、m/zで示す。

【図16】図16a～図16dは、それぞれ、rP1ペプチド (図16a) 、rP2ペプチド (図16b) 、rP3 - 3ペプチド～rP3 - 7ペプチド (図16c) 及びrP4ペ

10

20

30

40

50

プチド～rP11ペプチド(図16d)のトリシンSDS-PAGE分析の結果を示す。各バンドの定量化は、図11b、図12b、図13b並びに図14c及び図14dを、それぞれ参照。図16eは、rP4ペプチド～rP11ペプチドのMALDI-TOF-MSSスペクトルを示す。野生型tRNA^{Pro1}が、これらのアミノ酸の取り込みに用いられた。5 μM EF-Pが翻訳系に存在した。矢印は、それぞれ目的物に応答するピークを示す。理論値及び実測値は、m/zで示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明のtRNAは、配列番号1で示される塩基配列を含有し、非タンパク質性アミノ酸をコードするtRNAである。

10

N₁N₂G C N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁G C N₁₂N₁₃ (配列番号1)

配列番号1において、

N₁～N₁₃は、それぞれ任意の塩基を示し、N₃～N₁₁はDループを形成し、

N₁N₂G Cが、N₁₃N₁₂C Gと塩基対を形成する。

【0012】

翻訳因子であるEF-Pタンパク質は、プロリン-プロリン(Pro-Pro)結合形成の伸長を促進する上で重要な役割を担っていて、Pro-Pro配列においてペプチジル-tRNAの脱落によって引き起こされる翻訳伸長の停止(リボソームストール)を緩和する。

EF-Pタンパク質は、プロリン選択的ペプチジルトランスファーの促進のために、tRNA^{Pro}アイソアクセプターに見出される特定のDアームモチーフである、4塩基対の安定なDステム配列によって閉じた構造を有する9塩基のDループを認識し、Pro-Pro転移反応の速度促進は、tRNA^{Pro}に依存する。

20

本発明においては、配列番号1で示される塩基配列は、DループとDステムからなるDアームであり、配列番号1で示される塩基配列をtRNAに導入することにより、EF-Pペプチドによるペプチジルトランスファーが促進できる。

【0013】

本発明の配列番号1で示される塩基配列を含有するtRNAにおける、他の構造、すなわち、アクセプターステム、アンチコドンステム、アンチコドンループ、バリアブルループ、Tアームの塩基配列は、任意であってよい。中でも、アンチコドンループは、非タンパク質性アミノ酸を割り当てるコドンに対応した塩基配列を適宜有していればよい。

30

tRNAの3'末端は、CCA配列を有し、任意のアミノ酸と結合する。本発明のtRNAは、非タンパク質性アミノ酸と結合している。

本明細書では、tRNAが非タンパク質性アミノ酸をコードするとは、tRNAが、非タンパク質性アミノ酸とtRNAのCCA配列を介して結合していることを意味する。

【0014】

配列番号1において、それぞれ、N₁N₂とN₁₃N₁₂が塩基対を形成する限り、任意の塩基を選択し得るが、N₁はGであり、N₁₃はCであることが好ましい。また、N₂はCであり、N₁₂はGであることが好ましい。

配列番号1で示される塩基配列は、配列番号3で示される塩基配列であることが好ましい。

40

G C G C N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁G C G C (配列番号3)

配列番号3において、

N₃～N₁₁は、前記と同義であり、G C G Cが、C G C Gと塩基対を形成する。

【0015】

配列番号1及び配列番号3におけるN₃～N₁₁の塩基配列は、配列番号4で示される塩基配列であることが好ましい。

A G C C U G G U A (配列番号4)

配列番号4で示される塩基配列は、tRNAにおけるDループを形成する。

配列番号4においては、1又は複数の塩基が置換されていてもよい。

塩基が複数置換されるとは、Dループを形成する9個の塩基において、2個、3個、4個

50

、5個、6個、7個、8個、9個の塩基が置換されていてもよいことを意味し、1～4個の塩基が置換されていてもよく、1～3個の塩基が置換されていてもよく、1～2個の塩基が置換されていてもよく、1個の塩基が置換されていてもよい。

【0016】

配列番号1で示される塩基配列は、配列番号5で示される塩基配列であること好ましく、配列番号6で示される塩基配列であることが好ましい。

$N_1N_2GCGCAGCCUGGUAGCGCN_{12}N_{13}$ (配列番号5)

配列番号5において、

N_1 、 N_2 、 N_{12} 及び N_{13} は、前記と同義であり、 N_1N_2GC が、 $N_{13}N_{12}CG$ と塩基対を形成する。

$GCGCGCAGCCUGGUAGCGCGC$ (配列番号6)

配列番号5及び配列番号6においては、1又は複数の塩基が置換されていてもよい。

配列番号5及び6において塩基が複数置換されるとは、Dループを形成する9個の塩基を示す配列番号4において、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個の塩基が置換されていてもよいことを意味し、1～4個の塩基が置換されていてもよく、1～3個の塩基が置換されていてもよく、1～2個の塩基が置換されていてもよく、1個の塩基が置換されていてもよい。

【0017】

アミノアシルtRNAのTステムは、EF-Tuタンパク質との相互作用を調節し、N-メチルアミノ酸のような非タンパク質性アミノ酸の取り込みを増強する。

本発明においては、配列番号2で示される塩基配列は、TループとTステムからなるTアームであり、配列番号2で示される塩基配列をtRNAに導入することにより、非タンパク質性アミノ酸をペプチドあるいはタンパク質に導入するにあたり、EF-Tuタンパク質によるアコモデーションが促進される。

【0018】

本発明のtRNAは、配列番号2で示される塩基配列をさらに含有するtRNAであることが好ましい。

$AGGGG(N_{14})_mCCCCU$ (配列番号2)

配列番号2において、

N_{14} は、任意の塩基を示し、 m は、1以上の整数であり、 $(N_{14})_m$ はTループを形成し、 $AGGGG$ が、 $CCCCC$ と塩基対を形成する。

【0019】

m は、 $(N_{14})_m$ はTループを形成する限り特に限定されないが、2、3、4、5、6、7、8、9、10の整数であり得、6～8の整数であることが好ましい。

$(N_{14})_m$ は、tRNA^{GluE2}のTループに由来する配列番号7で示される塩基配列であることが好ましい。

$UUCGA AU$ (配列番号7)

配列番号7においては、1又は複数の塩基が置換されていてもよい。

塩基が複数置換されるとは、Tループを形成する7個の塩基において、2個、3個、4個、5個、6個、7個の塩基が置換されていてもよいことを意味し、1～3個の塩基が置換されていてもよく、1～2個の塩基が置換されていてもよく、1個の塩基が置換されていてもよい。

【0020】

配列番号2において、塩基対を形成する $AGGGG$ と $CCCCC$ とは、Tステムを形成する。

Tステムを形成する塩基配列において、塩基対を形成する限り、1又は複数の塩基が置換されていてもよい。

配列番号2のTステムにおいて塩基が複数置換されるとは、Tステムを形成する10個の塩基において、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個の塩基が置換

10

20

30

40

50

されていてもよいことを意味し、2個の塩基が置換されていてもよく、4個の塩基が置換されていてもよく、6個の塩基が置換されていてもよく、塩基対を形成する限り、1個、3個、5個の塩基が置換されていてもよい。

【0021】

本発明の好適なtRNAとしては、EF-Pタンパク質によるペプチジルトランスファーの促進作用及びEF-Tuタンパク質によるアコモデーションの促進作用を発揮させるために、配列番号1で示される塩基配列と配列番号2で示される塩基配列の双方を含有する。本発明のtRNAは、好適には、tRNA^{Pro1}およびtRNA^{GluE2}のキメラであり、かかるtRNAを、本明細書においては、tRNA^{Pro1E2}と呼ぶ。

具体的には、tRNA^{GluE2}のTステムがtRNA^{Pro1}に導入されていることが好ましい。

10

D-アミノ酸やβ-アミノ酸等の非タンパク質性アミノ酸でプレチャージされたtRNA^{Pro1E2}とEF-Pタンパク質との組み合わせにより、線状ペプチドだけでなく、当該非タンパク質性アミノ酸を連続して、例えば、4つあるいは5つの連続した非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドの発現レベルを増強することができる。

【0022】

本発明に用いられるtRNAにおいて、配列番号1及び/又は配列番号2以外の塩基配列については、野生型tRNAに由来する配列であってもよく、大腸菌由来野生型tRNAに由来する配列であってもよく、in vitroの転写で調製した人工tRNAであってもよい。

20

【0023】

本発明において、翻訳系は、本発明のtRNAを含み、当該tRNAを含むことにより、一般的には連続導入が難しいアミノ酸が連続して結合するペプチドを合成することができる翻訳系となるが、より具体的には、2以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを合成することができる翻訳系となる。

翻訳系には、本発明のtRNAを含む限り、特に限定されずに、無細胞翻訳系で用いられる構成要素を含む。

翻訳系は、EF-Pタンパク質を含有することが好適であり、さらに、EF-Tuタンパク質を含有することが好適である。

【0024】

30

本発明における翻訳系では、フレキシザイムを利用したコドンの再割当において、NNNとして適宜選択したコドンに対して、非タンパク質性アミノ酸を割り当てる。

本発明における翻訳系では、天然の翻訳系を使用してもよい。天然の翻訳系においては、各アミノ酸に対応したアンチコドンを含むtRNAが存在し、各tRNAは、アンチコドンループ以外の領域においてもそれぞれ固有の配列を有する。

本発明においては、配列番号1及び/又は配列番号2で示される塩基配列を導入すれば、他の配列については、それら天然の翻訳系におけるtRNAの固有の配列を割り当てられるという意味で、アクセプターステム、アンチコドンステム、アンチコドンループ、バリエブルループの塩基配列は、任意であり得る。

【0025】

40

本発明における翻訳系では、フレキシザイムを利用し、NNNのすべてに任意のアミノ酸を再割当てしてもよく(Nは任意の塩基である。)、その場合、tRNAをすべて人工のものとしてもよい。この場合、翻訳系に加える各NNNに対応する伸長tRNAは、全長の85%以上又は90%以上が同一の塩基配列からなるものであってもよく、アンチコドンを除いた配列のうち、ほとんど配列が同じである伸長tRNA群を用いることもできる。本明細書において、アンチコドンループとは、tRNAにおけるアンチコドンを含む一本鎖のループ部分を示す。アンチコドンループの配列は、コドン-アンチコドンの相互作用を相補するように、当業者が適宜決定することが可能である。

【0026】

本発明のtRNAは、公知の無細胞翻訳系で用いてペプチドを翻訳することで、2以上の

50

非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを合成することができる。

用いられる無細胞翻訳系は、特に限定されない。

ペプチドライブラリの製造方法においては、適当なコドンでコードされる非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドであって、2以上の非タンパク質性アミノ酸が連続したペプチドを製造することができたり、2以上の複数の非タンパク質性アミノ酸を有するペプチドを効率よく製造できるので、より多様性に富むライブラリを提供することができる。

【0027】

本発明においては、ペプチドライブラリの各ペプチドをコードするmRNAを含み、各mRNAが1又は複数の非タンパク質性アミノ酸をコードするNNNを含むmRNAライブラリを調製する工程と；

NNNのいずれかのコドンに対するアンチコドン有し、該コドンに対応する非タンパク質性アミノ酸がチャージされたtRNAを加えた無細胞翻訳系で、mRNAライブラリの各mRNAを翻訳する工程と、を含む。ペプチドライブラリの製造方法とすることができる。

【0028】

本発明において、ペプチド-mRNA複合体ライブラリの製造方法は、上述したペプチドライブラリの製造方法において、mRNAライブラリを調製する際、各mRNAのORF (Open reading frame) の下流領域にピューロマイシンを結合させることによって行われる。ピューロマイシンは、ペプチドや核酸で構成されるリンカーを介してmRNAに結合させてもよい。mRNAのORF下流領域にピューロマイシンを結合させることにより、mRNAのORFを翻訳したりボソームがピューロマイシンを取り込み、mRNAとペプチドの複合体が形成される。このようなペプチド-mRNA複合体は、遺伝子型と表現型を対応付けることができ、in vitroディスプレイに応用できる。

【0029】

本発明においては、まず、非タンパク質性アミノ酸を割り当てるNNNを選択し、NNNのアンチコドンをアンチコドンループ内に有し、非タンパク質性アミノ酸をコードするtRNAをフレキシザイム等を用いて調製する。

次いで、各mRNAが1又は複数の非タンパク質性アミノ酸をコードするNNNを含むmRNAライブラリを調製し、翻訳することで、割り当てられた非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドを発現させることができる。

【0030】

本明細書において、「NNN」は、アミノ酸を指定するコドンを意味し、コドンを形成する3つのNは、それぞれ独立に、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)及びウラシル(U)から選択される。1つのmRNAには、非タンパク質性アミノ酸がコードされたNNNが複数含まれてよい。

【0031】

本発明においては、非タンパク質性アミノ酸をコードしないNNNには、任意のアミノ酸が再割当されていてもよいし、天然の遺伝暗号に基づいたコドンとアミノ酸との関係を用いてもよい。

再割当においては、天然の遺伝暗号表におけるコドンとアミノ酸の関係とは異なるものを割り当てることもできるし、同一のものを割り当てることもできる。

「天然の遺伝暗号表」とは、生体においてmRNAのトリプレット(コドン)に割り当てられたアミノ酸を示した表であり、下記表1に示す。

【0032】

10

20

30

40

50

【表 1】

2文字目の塩基 →

1文字目の塩基 ↓	U		C		A		G		3文字目の塩基 ↓
	コドン	アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン	アミノ酸	
U	UUU	フェニルアラニン	UCU	セリン	UAU	チロシン	UGU	システイン	U
	UUC	フェニルアラニン	UCC	セリン	UAC	チロシン	UGC	システイン	C
	UUA	ロイシン	UCA	セリン	UAA	終止	UGA	終止	A
	UUG	ロイシン	UCG	セリン	UAG	終止	UGG	トリプトファン	G
C	CUU	ロイシン	CCU	プロリン	CAU	ヒスチジン	CGU	アルギニン	U
	CUC	ロイシン	CCC	プロリン	CAC	ヒスチジン	CGC	アルギニン	C
	CUA	ロイシン	CCA	プロリン	CAA	グルタミン	CGA	アルギニン	A
	CUG	ロイシン	CCG	プロリン	CAG	グルタミン	CGG	アルギニン	G
A	AUU	イソロイシン	ACU	トレオニン	AAU	アスパラギン	AGU	セリン	U
	AUC	イソロイシン	ACC	トレオニン	AAC	アスパラギン	AGC	セリン	C
	AUA	イソロイシン	ACA	トレオニン	AAA	リシン	AGA	アルギニン	A
	AUG	メチオニン	ACG	トレオニン	AAG	リシン	AGG	アルギニン	G
G	GUU	バリン	GCU	アラニン	GAU	アスパラギン酸	GGU	グリシン	U
	GUC	バリン	GCC	アラニン	GAC	アスパラギン酸	GGC	グリシン	C
	GUA	バリン	GCA	アラニン	GAA	グルタミン酸	GGA	グリシン	A
	GUG	バリン	GCG	アラニン	GAG	グルタミン酸	GGG	グリシン	G

【 0 0 3 3 】

各コドンに対する、天然の遺伝暗号表とは異なるアミノ酸の割り当ては、例えば、人工アミノアシル化RNA触媒フレキシザイム (Flexizyme) を利用したコドン再割当によって実現される。フレキシザイムによれば、任意のアンチコドンをもつ tRNA に所望のアミノ酸を結合させることができるので、任意のコドンに任意のアミノ酸を割り当てることが可能となる。

【 0 0 3 4 】

本明細書において、アミノ酸としては、タンパク質性アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含み、例えば、タンパク質性 L - アミノ酸、アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。

タンパク質性アミノ酸 (proteinogenic amino acids) は、当業界に周知の3文字表記により表すと、Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Pro、Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、及びValである。

非タンパク質性アミノ酸 (non-proteinogenic amino acids) としては、タンパク質性アミノ酸以外の天然又は非天然のアミノ酸を意味する。

非天然アミノ酸としては、例えば、主鎖の構造が天然型と異なる、 α 、 α - 二置換アミノ酸 (α - メチルアラニンなど)、N - アルキル - α - アミノ酸、D - アミノ酸、 β - アミノ酸、 α - ヒドロキシ酸や、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸 (ノルロイシン、ホモヒスチジンなど)、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸 (「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど)、及び側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されるアミノ酸 (システイン酸など) 等が挙げられる。非天然アミノ酸の具体例としては、国際公開第 2015/030014 号に記載のアミノ酸が挙げられる。

非タンパク質性アミノ酸が、D - アミノ酸、 β - アミノ酸又は α 、 α - 二置換アミノ酸であることが好適であり、D - アミノ酸又は β - アミノ酸であることがより好適である。

【 0 0 3 5 】

本発明においては、ペプチドを 1×10^6 種以上含むペプチドライブラリを製造することができる。

各ペプチドに含まれる NNN でコードされるアミノ酸の数は、非タンパク質性アミノ酸が含まれる限り、特に限定されないが、例えば、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、15 個、20 個、30 個等とすることができる。各 mRNA における非タンパク質

10

20

30

40

50

性アミノ酸をコードするNNNの位置は特に限定されず、本発明のtRNAを用いることで、非タンパク質性アミノ酸をコードするNNNが連続して配置されるmRNAからも、タンパク質性アミノ酸のライブラリ合成と同程度で、非タンパク質性アミノ酸が連続して配置されたペプチドが翻訳される。

【0036】

コドン再割当には、翻訳系の構成因子を目的に合わせて自由に取り除き、必要な成分だけを再構成してできる翻訳系を利用できる。例えば、特定のアミノ酸を除去した翻訳系を再構成すると、当該アミノ酸に対応するコドンが、いずれのアミノ酸もコードしない空きコドンになる。そこで、フレキシザイム等を利用して、その空きコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに任意のアミノ酸を連結し、これを加えて翻訳を行うと、当該任意のアミノ酸がそのコドンでコードされることになり、除去したアミノ酸の代わりに当該任意のアミノ酸が導入されたペプチドが翻訳される。

10

【0037】

本明細書において「無細胞翻訳系」とは、細胞を含まない翻訳系をいい、無細胞翻訳系としては、例えば、大腸菌抽出液、小麦胚芽抽出液、ウサギ赤血球抽出液、昆虫細胞抽出液等を用いることができる。また、それぞれ精製したリボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素(aars)、リボソームRNA、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子(IF)、伸長因子(EF)、終結因子(RF)、およびリボソーム再生因子(RRF)、ならびに翻訳に必要なその他の因子を再構成することで構築した、再構成型の無細胞翻訳系を用いても良い。

20

DNAからの転写を併せて行うためにRNAポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系としてはロシュ・ダイアグノスティックス社のRTS-100(登録商標)、再構成型翻訳系としてはPGI社のPURESYSTEM(登録商標)やNew England Biolabs社のPURExpress R In Vitro Protein Synthesis Kit等、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイゼン社やセルフリーサイエンス社のもの等を使用できる。

また、大腸菌のリボソームを用いる系として、例えば次の文献に記載された技術が公知である：H. F. Kung et al., 1977, The Journal of Biological Chemistry Vol. 252, No. 19, 6889-6894; M. C. Gonza et al., 1985, Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America Vol. 82, 1648-1652; M. Y. Pavlov and M. Ehrenberg, 1996, Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 328, No. 1, 9-16; Y. Shimizu et al., 2001, Nature Biotechnology Vol. 19, No. 8, 751-755; H. Ohashi et al., 2007, Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 352, No. 1, 270-276。

30

無細胞翻訳系によれば、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。なお、本発明の無細胞翻訳系は、転写に必要な因子を加えて、翻訳のみならず転写に用いてもよい。

【0038】

本発明において得られるペプチドは、環状ペプチドであってもよく、例えば、下記表1に示す官能基1を有するアミノ酸と、対応する官能基2を有するアミノ酸が環状化した環状ペプチドとすることができる。

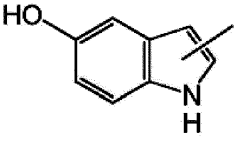
40

官能基1と2はどちらがN末端側にきてもよく、N末端とC末端に配置してもよいし、一方を末端アミノ酸、他方を非末端アミノ酸としてもよいし、両方を非末端アミノ酸としてもよい。

官能基1と官能基2により形成される結合が、環状ペプチドにおける分子環状構造を形成するための化学架橋構造といえる。

【0039】

【表 2】

	官能基 1	官能基 2
(A)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—C—X}_1 \\ \quad \text{H}_2 \end{array} \quad (\text{A}-1)$	HS— (A-2)
(B)	—C≡C—H (B-1)	N ₃ — (B-2)
(C)	—Ar—CH ₂ NH ₂ (C-1)	 (C-2)
(D)	—C≡C—CH ₂ —X ₁ (D-1)	HS— (D-2)
(E)	—Ar—CH ₂ —X ₁ (E-1)	HS— (E-2)

式中、X₁は脱離基であり、脱離基としては、例えば、Cl、Br及びI等のハロゲン原子が挙げられ、Arは置換基を有していてもよい芳香環である。

【0040】

(A-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophan、β-N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、δ-N-chloroacetyl-L-ornithine、ε-N-chloroacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

(A-1)の官能基を有するアミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-tryptophan及びN-chloroacetyl-L-tyrosineが好適に用いられ、D体であることがより好適である。

なお、本明細書において、L体であることを明示して記載する場合があるが、L体であってもよく、D体であってもよいことを意味し、また、L体とD体の任意の割合での混合物であってもよい。L体及びD体であることを明示して記載していない場合についても、L体であってもよく、D体であってもよいことを意味し、また、L体とD体の任意の割合での混合物であってもよい。

【0041】

(A-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

(A-2)の官能基を有するアミノ酸としては、cysteineが好適に用いられる。

【0042】

(A-1)の官能基を有するアミノ酸と(A-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nature Chemical Biology 5, 888-890 (2009); Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009); Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008); Goto, Y. et al., ACS Chemical Biology 3, 120-129 (2008); Kawakami T. et al, Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)、及び国際公開第2008/117833号等に記載された方法が挙げられる。

【0043】

(B-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、及び2-amino-8-nonynoic acid等が挙げられる。

10

20

30

40

50

4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸を用いてもよい。

4-pentynoyl化アミノ酸としては、例えば、N-(4-pentenoyl)-L-alanine、N-(4-pentenoyl)-L-phenylalanine、N-(4-pentenoyl)-L-tyrosine、N-(4-pentenoyl)-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、 β -N-(4-pentenoyl)-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-(4-pentenoyl)-L-diaminobutyric acid、 σ -N-(4-pentenoyl)-L-ornithine、 ϵ -N-(4-pentenoyl)-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

5-hexynoyl化アミノ酸としては、4-pentynoyl化アミノ酸として例示した化合物において、4-pentynoyl基が、5-hexynoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

10

【0044】

(B-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、及び2-amino-8-azidooctanoic acid等が挙げられる。

azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸を用いることもできる。

azidoacetyl化アミノ酸としては、例えば、N-azidoacetyl-L-alanine、N-azidoacetyl-L-phenylalanine、N-azidoacetyl-L-tyrosine、N-azidoacetyl-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、 β -N-azidoacetyl-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-azidoacetyl-L-diaminobutyric acid、 σ -N-azidoacetyl-L-ornithine、 ϵ -N-azidoacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

20

3-azidopentanoyl化アミノ酸としては、azidoacetyl化アミノ酸として例示した化合物において、azidoacetyl基が、3-azidopentanoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

【0045】

(B-1)の官能基を有するアミノ酸と(B-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)、及び国際公開第2008/117833号等に記載された方法が挙げられる。

【0046】

30

(C-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)及び3-aminomethyltyrosine等が挙げられる。

(C-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、5-hydroxytryptophan(WOH)等が挙げられる。

(C-1)の官能基を有するアミノ酸と(C-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)及び国際公開第2008/117833号に記載された方法等が挙げられる。

【0047】

(D-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic acid、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、及び2-amino-8-chloro-octynoic acid等が挙げられる。

40

(D-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

(D-1)の官能基を有するアミノ酸と(D-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、国際公開第2012/074129号に記載された方法等が挙げられる。

【0048】

(E-1)のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophan

50

ane、及びこれらに対応するD - アミノ酸誘導体等が挙げられる。

(E - 2) のアミノ酸としては、例えば、cysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

(E - 1) の官能基を有するアミノ酸と(E - 2) の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、(A - 1) と(A - 2) の環状化方法や(D - 1) と(D - 2) の環状化方法を参考にして行うことができる。

【 0 0 4 9 】

環形成アミノ酸としては、(A - 1) の官能基を有するアミノ酸と(A - 2) の官能基を有するアミノ酸との組み合わせが好ましく、脱離基でHが置換されたN - アセチルトリプトファンとcysteineの組み合わせがより好ましく、N-haloacetyl-D-tyrosine又はN-haloacetyl-D-tryptophan、好適にはN-chloroacetyl-D-tyrosine又はN-chloroacetyl-D-tryptophanとcysteine(Cys)の組み合わせがさらに好ましい。

【 0 0 5 0 】

本発明においては、ペプチドライブラリ又はペプチド - m R N A 複合体ライブラリも提供する。

本発明のt R N Aを用いてペプチドライブラリを製造することで、L - アミノ酸からなるペプチドの発現レベルと同程度で、非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドを合成できるため、従来のペプチドライブラリに比して、非タンパク質性アミノ酸の導入において多様性に富むペプチドライブラリとすることができる。

中でも、2以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを含むライブラリとすることができる。

本発明のt R N Aを用いてペプチド - m R N A 複合体ライブラリを製造することで、L - アミノ酸からなるペプチドの発現レベルと同程度で、非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドを合成できるため、従来のペプチド - m R N A 複合体ライブラリに比して、非タンパク質性アミノ酸の導入において多様性に富むペプチド - m R N A 複合体ライブラリとすることができる。

中でも、2以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合するペプチドを含むライブラリとすることができる。

【 0 0 5 1 】

また、本発明においては、ペプチドライブラリ及びペプチド - m R N A 複合体ライブラリにおけるペプチド構造として、4以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合し、非タンパク質性アミノ酸間で分子内架橋した構造を含むライブラリとすることができる。

4以上の非タンパク質性アミノ酸が連続して結合した構造において、非タンパク質性アミノ酸間で分子内架橋させるには、無細胞翻訳系で翻訳し、環状化する際に用いられる非タンパク質性アミノ酸を利用して分子内架橋を構築することができる。

好適には、D - システインとD - システインによるジスルフィド結合、又はC l A c基を導入した非タンパク質性アミノ酸とD - システインによるチオエーテル結合が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

本発明においては、本発明に係るt R N Aを用いて製造されたペプチドライブラリを用いた、標的物質に結合するペプチドを同定するためのスクリーニング方法も提供する。

スクリーニング方法としては、本発明に係るt R N Aを用いて製造されたペプチドライブラリと標的物質を接触させてインキュベートする工程を含む。

本明細書において、標的物質は特に限定されず、低分子化合物、高分子化合物、核酸、ペプチド、タンパク質、糖、脂質等とすることができる。

スクリーニング方法としては、標的物質と結合したペプチドを選択する工程をさらに含む。標的物質と結合したペプチドの選択は、例えば、ペプチドを公知の方法に従って検出可能に標識し、上記接触工程の後、緩衝液で固相担体表面を洗浄し、標的物質に結合している化合物を検出して行う。

検出可能な標識としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、125

10

20

30

40

50

I、131I、35S、3H等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子が挙げられる。酵素の場合、酵素の基質を加えて発色させ、検出することもできる。また、ペプチドにビオチンを結合させ、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

【0053】

ペプチド-mRNA複合体ライブラリの場合、TRAPディスプレイ法を応用してスクリーニングを行うことができる。

この場合、まず、ペプチド-mRNA複合体ライブラリに対して逆転写反応を行った後、当該ライブラリと標的物質とを接触させる。標的物質に結合する複合体を選択し、このDNAをPCRで増幅する。このDNAをTRAP反応系に加えることで、再度ペプチド-mRNA複合体ライブラリを作製し、同様の操作を繰り返す。

これにより、標的物質に高い親和性を有するペプチド-mRNA複合体が濃縮されるので、濃縮された複合体のDNAの配列を解析して、標的物質に結合するペプチドを効率よく同定することができる。

【0054】

本明細書において引用されるすべての非特許文献及び参考文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

【実施例】

【0055】

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

【0056】

フレキシザイム及びtRNAの調製

D-アミノ酸、β-アミノ酸、2-アミノイソブチル酸及びL-プロリンのプレチャージのために用いたフレキシザイム(dFx又はeFx)及びtRNA(表3)は、T7 RNAポリメラーゼを用いて、*in vitro*で転写した。

フレキシザイム(dFx又はeFx)あるいはtRNA配列の前にT7プロモーターを有する鋳型DNAがフォワード及びリバース伸長プライマー対(表4)の伸長により調製され、次いで、フォワード及びリバース伸長プライマー対(表5)を用いてPCRを行った。

【0057】

10

20

30

40

50

【表 3】

RNA name	RNA sequence
dFx	GGAUCGAAAGAUUCCGCAUCCCCGAAAGGGUACAUGGCGUUAAGGU
eFx	GGAUCGAAAGAUUCCGCGGCCCCGAAAGGGGAUAGCGUUAAGGU
tRNA ₁ , Pro1(CGG)	CGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGACGAAAGGGGUCGGAGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGACCA
tRNA ₁ , Pro1(GGU)	CGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGUACGAAAGGGGUCGGAGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGACCA
tRNA ₁ , Pro1(GUG)	CGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGUACGAAAGGGGUCGGAGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGACCA
tRNA ₁ , Pro1C13G(CGG)	CGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGGACGAAAGGGGUCGGAGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGACCA
tRNA ₁ , Pro1E1(CGG)	CGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGGACGAAAGGGGUCAGGGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGACCA
tRNA ₁ , Pro1E2(CGG)	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUCGGGACGAAAGGGGUCAGGGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGGCCA
tRNA ₁ , Pro1E2(GAU)	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGCUGAUACGAAAGGGGUCAGGGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGGCCA
tRNA ₁ , Pro1E2(GGU)	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUGGUACGAAAGGGGUCAGGGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGGCCA
tRNA ₁ , Pro1E2(GUG)	GGGUGAUUGGCGCAGCCUGGUAGCGCACUUCGUUGUGACGAAAGGGGUCAGGGGUUCGAAUCCUCUAUCACCGGCCA
tRNA ₁ , GluE2(CGG)	GUCCCCUUCGUUAGAGGCCCCAGGACACCGCCUUCGGGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCUCUAAGGGGACGCCA
tRNA ₁ , AsnE2(CGG)	GGUCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCGGGAUCCGUUUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCGGCCA
tRNA ₁ , fMet(CAU)	CGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUCAUAAACCCGAAGAUUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCCCGCAACCA

【 0 0 5 8 】

【表 4】

RNA name	Extension primer (forward)	Extension primer (reverse)
dFx	GTAATACGACTCACTATAGGAATCGAAGATTTCGC	ACCTAACGCCATGTACCTTTCGGGGATCGGAAATCTTCGATCC
eFx	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	ACCTAACGCTAATCCCTTTCGGGGCCGCGAAATCTTTCGATCC
hRNA, Pro1(CGG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTCGGAACGAAGTGC
hRNA, Pro1(GGU)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTACCAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1(GUG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTCAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1(CGG(CGG))	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTCGCGAACGAAGTGC
hRNA, Pro1E1(CGG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTCGCGAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1E2(CGG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTCGCGAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1E2(GAU)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTATCAGCGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1E2(GGU)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTACCAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, Pro1E2(GUG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTACCAACGAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, QhmE2(CGG)	C-ACTATAGTCCCTTCGCTCTAGAGGCCCCAGGACACCCGCTTCGCGAAGGCGGTTCG	TGGCTCTCCCTAGGGGATTCCGAACCCCTTCGTTACCCGC
hRNA, AseI2(CGG)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTCGGTGATAGAGGATTCCGAACCTCCGACCCCTTCGTTACCAAGTGCCTACCAAGG
hRNA, JMeI(CAU)	GTAATACGACTCACTATAGGATCGAAGATTTCGC	TGGTTTCGGGGCCCGGATTTCGAACCGACGATCTTCGGGTTATGAGC

【 0 0 5 9 】

【表 5】

RNA name	PCR primer (forward)	PCR primer (reverse)
dFx	GGCGTAATACGACTCACTATAG	ACCTAACGCCATGTACCT
eFx	GGCGTAATACGACTCACTATAG	ACCTAACGCTAATCCCT
tRNA, Pro1(CG)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTCGGGTGATAGAGGATTC
tRNA, Pro1(GGU)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTCGGGTGATAGAGGATTC
tRNA, Pro1(GUG)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTCGGGTGATAGAGGATTC
tRNA, Pro1C13G(CG)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTCGGGTGATAGAGGATTC
tRNA, Pro1E1(CG)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTCGGGTGATAGAGGATTC
tRNA, Pro1E2(CG)	GGCGTAATACGACTCACTATAG	TGmGCGGGGTGATAGGGGATTC
tRNA, Pro1E2(GAU)	GGCGTAATACGACTCACTATAG	TGmGCGGGGTGATAGGGGATTC
tRNA, Pro1E2(GGU)	GGCGTAATACGACTCACTATAG	TGmGCGGGGTGATAGGGGATTC
tRNA, Pro1E2(GUG)	GGCGTAATACGACTCACTATAG	TGmGCGGGGTGATAGGGGATTC
tRNA, GluE2(CG)	GTAATACGACTCACTATAGTCCCCCTTCGTCTAG	TGmGCGTCCCCCTAGGGGATTC
tRNA, AsnE2(CG)	GTAATACGACTCACTATAG	TGmGCGGCTCTGACTGGAC
tRNA, fMet(CAU)	GGCGTAATACGACTCACTATAC	TGmGTTGCGGGGGCCGGA

【 0 0 6 0 】

表 5 中、Gmは、2'-O-メチルグアノシンを表す。

【 0 0 6 1 】

PCR産物は、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿及び次いで、40 mM Tris-HCl (pH 8.0)、22.5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM スペルミジン、0.01% Triton X-100、120 nM T7 RNAポリメラーゼ、0.04 U/μL RNasin RNase inhibitor (Promega) 及び 3.75 mM NTP mixを含む反応混合物 250 μL 中で、37 °C で 16 時間の転写に用いられた。

tRNA調製においては、5'末端(G又はC)のヌクレオチドに応じて、上記溶液に、5 mM GMP又はCMPが添加された。得られたRNA転写物は、RQ1 DNase (Promega)で、37℃で30分間処理され、次いで、6 M 尿素を含む8% (tRNA)あるいは12% (フレキシザイム)ポリアクリルアミドゲルで精製した。

【0062】

tRNAのアミノアシル化

D-アミノ酸とβ-アミノ酸は、3,5-ジニトロベンジルエステル(DBE)かシアノメチルエステル(CME)としてプレ活性化し、tRNAへ、適切なフレキシザイム(DBE活性化アミノ酸ではdFx、CME活性化アミノ酸ではeFx)を用いてチャージした。

10

D-アラニン、D-セリン及びD-システイン、L-β-ホモグルタミン(βhQ)、L-β-ホモメチオニン(βhM)、L-β-ホモフェニルグリシン(βhF)、L-プロリン及び2-アミノ酪酸(Aib)は、DBE活性化し、クロロアセチル-D-フェニルアラニン(D-ClAcPhe)は、CME活性化した。上記活性化アミノ酸は、非特許文献1及び参考文献18に記載の方法に沿って合成した。

フレキシザイム反応(アミノアシル化)は、0℃で、50 mM HEPES-KOH(D-アミノ酸では、pH 7.5、β-アミノ酸では、pH 8.7)、600 mM MgCl₂、20% DMSO、25 μM dFx又はeFx、25 μM tRNA及び5 mM 活性化アミノ酸を含む反応混合物中で行った。

eFxが、D-ClAcPhe-CMEのために用いられ、dFxが他のアミノ酸のために用いられた。反応時間は、D-Ala、D-ClAcPhe、L-Pro及びAibのためには2時間であり、D-Ser及びD-Cysのためには6時間であり、β-アミノ酸のためには22時間とした。アミノアシルtRNAは、エタノール沈殿により回収され、次いで、ペレットを酢酸ナトリウム(pH 5.2)を含む70%エタノールで2回、70%エタノールで1回洗浄し、1 mM 酢酸ナトリウム(pH 5.2)に溶解した。

20

【0063】

EF-Pの調製

E.coli EF-P遺伝子を、トロンピン部位の代わりにPreScissionプロテアーゼ認識部位を有する修飾されたpET28aベクターにクローニングした。E.coli EpmA及びEpmB遺伝子は、pETDuet-1ベクターにクローニングした。これらのベクターをE.coli Rosetta2(DE3)に共導入した。細胞を0.5 mM IPTGを含むLB培地で、37℃で2時間培養し、超音波処理により溶解した。細胞溶解物をNi-NTAカラムに適用して、ヒスチジン標識EF-Pを精製した。カラムを緩衝液A(20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、200 mM NaCl、2 mM イミダゾール及び1 mM 2-メルカプトエタノール)で洗浄した後、ヒスチジン標識EF-Pを300 mMのイミダゾールを含む緩衝液Aで溶出した。Turbo3Cプロテアーゼを溶出液に添加してヒスチジントグを切断し、緩衝液Aに対して4で一晩透析した。サンプルをNi-NTAカラムに適用して、フロースルー及び洗浄画分をヒスチジントグのないEF-Pとして回収した。次に、Amicon ultra 10k遠心フィルター(Merck Millipore)でタンパク質を濃縮した。EF-Pの改変は、参考文献3に記載された質量分析によって確認した。

30

40

【0064】

モデルペプチドの翻訳及び定量化

モデルペプチドの翻訳は、IF2、EF-G及びEF-Tu/Tsの濃度(それぞれ、3、0.1及び20 μM)がD-アミノ酸及びβ-アミノ酸取り込みのために最適化された改変FIT(Flexible in vitro translation)系で行った(非特許文献5を参照)。

修正されたFITシステムの構成は以下の通りである。

50 mM HEPES-KOH(pH 7.6)、100 mM 酢酸カリウム、12.3 mM 酢酸マグネシウム、2 mM ATP、2 mM GTP、1 mM CTP、1 mM UTP、

50

20 mM クレアチンリン酸、0.1 mM 10 - ホルミル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロ葉酸、2 mM スペルミジン、1 mM DTT、1.5 mg/mL E. coli トータル tRNA、1.2 μM E. coli リボソーム、0.6 μM メチオニル tRNA ホルミルトランスフェラーゼ、2.7 μM IF1、3 μM IF2、1.5 μM IF3、0.1 μM EF - G、20 μM EF - Tu/Ts、0.25 μM RF2、0.17 μM RF3、0.5 μM RRF、4 μg/mL クレアチンキナーゼ、3 μg/mL ミオキナーゼ、0.1 μM 無機ピロホスファターゼ、0.1 μM ヌクレオチドニリン酸キナーゼ、0.1 μM T7 RNAポリメラーゼ、0.13 μM AspRS、0.11 μM LysRS、0.03 μM MetRS、0.02 μM TyrRS、0.05 mM [14C] アスパラギン酸、0.5 mM リジン、0.5 mM メチオニン、0.5 mM チロシン、各 25 μM プレチャージされたアミノアシル tRNA 及び 0.5 μM DNA テンプレート。rP1 および rP2 や β - アミノ酸含有ペプチドの翻訳のために、0.09 μM GlyRS 及び 0.5 mM グリシンも上記溶液に加えた。

翻訳反応は、37 °C で、2.5 μL の溶液で行い、等容量の停止溶液 (0.9 M Tris - HCl (pH 8.45)、8% SDS、30% グリセロール及び 0.001% キシレンシアノール) を加えて停止させ、95 °C で 2 分間又は 3 分間インキュベートした。次に、サンプルを 15% トリシン SDS - PAGE 及び Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare) を用いたオートラジオグラフィーにより分析した。ペプチド収量は、[14C] Asp バンドの強度によって正規化した。

【0065】

MALDI - TOF 質量分析のために、0.5 mM 非放射性アスパラギン酸を [14C] アスパラギン酸の代わりに上記溶液に添加した。翻訳を 37 °C で 20 分間又は 40 分間行った後、等容量の 2 × HBS 緩衝液 (100 mM HEPES - KOH (pH 7.6)、300 mM NaCl) で希釈した。次に、ペプチドを抗 FLAG M2 アフィニティーゲル (Sigma) で精製した。反応混合物を 5 μL のゲルビーズに添加し、25 °C で 30 分間インキュベートした。ゲルビーズ上のペプチドを 25 μL の 1 × HBS 緩衝液 (50 mM HEPES - KOH (pH 7.6)、150 mM NaCl) で洗浄し、ペプチドをビーズから 0.2% トリフルオロ酢酸 15 μL で溶出させた。次いで、ペプチドを SPE C - tip (Nikkyo Technos) で脱塩し、50% 飽和 (R) シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸を含む 0.5% 酢酸溶液である 80% アセトニトリル 1.2 μL で溶出した。反射 / 陽性モードで ultrafleXtreme (Bruker Daltonics) を用いて MALDI - TOF - 質量分析を行った。ペプチド質量標準 II (Bruker Daltonics) を外部質量較正に使用した。

【0066】

連続した D - アミノ酸取り込みの促進のための EF - P によって認識される tRNA^{Pro1} の本質的な D アーム構造

EF - P が、Pro - Pro 伸長におけるペプチジルトランスファー (PT) 速度の増強能を有するため、新生ペプチド鎖において、いくつかの D - アミノ酸のゆっくりとした取り込みを促進し得ることを確認するために、以下の実験を行った。

初めに、おのおの、2 又は 3 の連結した D - アミノ酸をコードする 2 つの mRNA コンストラクト (mR1 及び mR2) を調製した (図 2A)。

D - アミノ酸は、フレキシザイム技術により、対応するアンチコドンを持つ tRNA^{Pro1} 誘導体にプレチャージされ、rP1 ペプチド又は rP2 ペプチドを合成するために、5 μM EF - P タンパク質を含む FIT システムにおいて用いられた。

特定の FIT システムでは、[14C] Asp、コールド Met、Tyr、Lys、Gly 及び対応する ARS が添加され、mRNA (mR1 及び mR2) によってコードされない他のアミノ酸 / ARS 対は省略された。代わりに、D - アミノアシル tRNA を添加して、D - アミノ酸を NNN コドンに割り当てた。IF - 2、EF - Tu 及び EF - G の濃度は、D - アミノ酸の連続取り込みのためにあらかじめ最適化された値である 3 μM、20 μM 及び 0.1 μM にそれぞれ設定した (非特許文献 2 及び 5)。野生型 (WT) tRN

A^{Pro1}_{CGG}はDステムの端に位置する13位及び22位にC/G塩基対を有するが、変異体tRNA^{Pro1}_{CGG}は13位にC-t_o-G点変異を有し、塩基対形成を破壊する(図2B)。EF-Pは、WT tRNA^{Pro1}の4塩基対の安定なDステム構造で閉じられた9塩基のDループを厳密に認識するので、C13G変異はEF-Pによる認識を減少させた。したがって、mR1及びmR2においてD-アミノ酸を指定するNNNコドンを読解するために、tRNA^{Pro1}_{CGG}及び陰性対照としてC13G変異体を用いた。tRNA^{Pro1}のアンチコドンは、標的コドンを読解するために他のものに変更することができた(図2C)。

WT D-Ala-tRNA^{Pro1}を用いて、mR1においては、rP1ペプチド(rP1-D-Ala₂)に2つの連続したD-アラニンを導入するための3つの異なるコドン(NNN=CCG、ACU又はCAC)を試験した(図2C、図3A)。

10

得られたペプチドは、トリシンSDS-PAGEにて分離され、オートラジオグラフィーで定量化した。EF-Pの付加が、rP1ペプチド(rP1-D-Ala₂)の発現レベルに、同様の範囲で(0.4~0.6 μM)、コドンに依らず、重大な改良をもたらした。EF-Pを含まないD-Ala取り込みのバックグラウンドレベルの差異(CCG、ACU及びCACについて、それぞれ2.6倍、4.7倍及び12倍)のために、増強効果の見掛けのレベルはコドンによることとなった。陽性対照として、L-Pro-tRNA^{Pro1}を用いて、rP1-L-Pro₂及びrP2-L-Pro₃ペプチドのX残基の位置に連続するL-Pro取り込みのEF-P増強を行ったところ、それぞれ、1.4倍及び22倍の改善効果が見られた。(図3B及び3C)

20

次に、EF-PがmR1上のCCGコドンを抑制するtRNA^{Pro1}_{CGG}にチャージしたD-Ser、D-Cys及びD-Hisの取り込みを増強できるかどうかを調べた(図2D、図3D)。増強効果は5.4倍、8.4倍及び2.1倍であり、EF-PがこれらのD-アミノ酸の2回の連続した取り込みを2~10倍の範囲で増強することが示された。その一方、tRNA^{Pro1}_{CGG}のC13G変異体を用いると、rP1-D-X₂ペプチドで、D-Ala、D-Ser、D-Cys及びD-Hisの2.1倍、2.4倍、3.5倍及び0.9倍でEF-P増強効果を低下させた。絶対発現レベルは、C13G/EF-PよりもWT/EF-Pの使用により2倍以上に増強されたことから、各場合においてEF-Pの効果が確実に観察された。これらペプチドの正確な発現は、MALDI-TOF質量分析により確認した(図3E)。

30

【0067】

続いて、キラルではないα, α-ジメチル置換アミノ酸(Aib、2-アミノ酪酸)を用いた(図2D、図3D及び3E)。

α, α-二置換はD-アミノ酸のようなリボソームPT中心に同様の状況を設定し、Aibの連続取り込みの効率が非常に低いことが確認できた。rP1-Aib₂ペプチドへのAib取り込みに対するEF-P増強は、WT tRNA^{Pro1}の使用により20倍であり、C13G変異体により5倍であった。発現レベルは、WT/EF-Pの組み合わせにより3倍以上に増強された。

次に、rP2ペプチドの新生鎖にD-Ala及びAibの3つの連続した取り込みを調べた(図2E、図3D及び3E)。rP2-D-Ala₃ペプチドへのD-Alaの取り込みのEF-Pによる増強効果はWT tRNA^{Pro1}_{CGG}を用いて1.9倍であったが、C13G変異体を用いた場合は、EF-Pの存在に関わらず検出限界以下であった。rP2-Aib₃がWT tRNA^{Pro1}_{CGG}を用いて発現させた場合、EF-Pによる増強効果は3倍であったが、C13G変異体を用いた場合には、その効果は観察されなかった。これらの結果から、EF-PがD-アミノ酸の連続的な取り込みの発現レベルを刺激することが示されている。

40

【0068】

我々はまた、WT D-Ala-tRNA^{Pro1}_{CGG}の存在下でrP1-D-Ala₂のペプチドの発現レベルの関数としてEF-P濃度を滴定した(図4A)。EF-P(10及び15 μM)の濃度が高いほどEF-Pの効果は低下したが、40及び15分の時点での

50

滴定実験では、5 - 7 μ MのEF - PがrP1 - D - Ala₂ペプチドの発現の最大レベルを示した。実施例における翻訳系のリボソームの濃度が1 . 2 μ Mであることを考慮すると、EF - Pの最適濃度はリボソーム濃度の約5倍であった。

rP1 - D - Ala₂ペプチドの翻訳の時間経過分析を、EF - Pの存在下(5 μ M)及びEF - Pの非存在下で行った。両条件において、全長ペプチドの収量は50分でプラトー化した(図4B)。50分で、rP1 - D - Ala₂ペプチドの発現レベルは、5 μ M EF - Pの存在下で約1 μ Mに達した。かかる濃度は、L - Ala₂を含む完全L - ペプチドの発現レベルに匹敵した(参考文献3)。

【0069】

連続したD - アラニンの取り込みをさらに増強させるtRNA^{Pro1}へのTステム構造の改変

10

tRNA^{GluE2}のTステムをtRNA^{Pro1}に導入して、本明細書で、tRNA^{Pro1E1}と言及するキメラtRNAを作成した(図5A、tRNA^{Pro1E1CGG})。

さらに、ProRSに認識される識別塩基に付加的な変異を有する(参考文献9)、本明細書で、tRNA^{Pro1E2CGG}と言及する別のキメラtRNAを作成した。かかる変異を導入したことにより、tRNA^{Pro1E2CGG}は、ProRSによりProをチャージされなくなった。すなわち、ProRSに対して直交性を有する。

WT tRNA^{Pro1CGG}、tRNA^{Pro1E1CGG}、tRNA^{Pro1E2CGG}、tRNA^{GluE2CGG}及びtRNA^{AsnE2CGG}を用いて(図5A)、rP1 - D - Ala₂への2つの連続したD - アラニンの取り込み能を比較した(図5B、図6A)。

20

その結果、試験された他のtRNAとの比較により、EF - PとtRNA^{Pro1E1CGG}(4 . 1倍)及びtRNA^{Pro1E2CGG}(5 . 0倍)の組合せによって、4倍以上のペプチド発現レベルの増強が確認された。

このことは、明確にキメラtRNA^{GluE2}のTステムとtRNA^{Pro1}のDアームに由来するキメラtRNA^{Pro1E1}及びtRNA^{Pro1E2}が、EF - PとEF - Tuにアシストされて、トータルのPT速度を増強していることを意味している。

【0070】

EF - Pにより増強された複数のD - アミノ酸の取り込み

D - Ala - tRNA^{Pro1E2}及びEF - Pの組合せは、rPa - D - Ala₂の発現レベルの増強を可能にする。

30

5つの異なる鋳型mRNAを調製して(図7A、mR3 ~ mR7)、1 ~ 3の異なるD - アミノ酸をその配列中に含む対応するペプチドを合成した(図7A、rP3 ~ rP7ペプチド)。

これらのmRNAにおいては、D - Ala - tRNA^{Pro1E2GAU}、D - Cys - tRNA^{Pro1E2GUG}及びD - Ser - tRNA^{Pro1E2GGU}が、それぞれ、AUU、CAU及びACUコドンに各々割り当てられた。5 μ M EF - Pの存在下、rP3及びrP4発現が増強していることを確認した(図6B)。一方、EF - Pの非存在下では、バンドは検出されなかった。すなわち、2種類の2つ連続したD - アミノ酸(D - Ala₂ - YY - D - Ala₂またはD - Ala₂ - YY - D - Cys₂; Y = L - Tyr)を含むrP3及びrP4においては、極めて増強した発現が確認された。

40

2種類の2つ連続したD - アミノ酸(D - Ala₂ - YY - D - Ser₂)を含むrP5ペプチドにおいては、EF - Pの非存在下でも、検出可能なレベルのrP5ペプチドを発現したが、EF - Pの添加は、13倍の発現レベルの増強を示した(図6B、図7B)。

L - アミノ酸とD - アミノ酸を交互に含むrP6及びrP7ペプチドの発現は少ないものの、EF - P存在下でも検出可能であった。一方、EF - Pの添加は、それぞれで、3 . 3倍及び3 . 0倍の発現レベルの増強を示した(図6B、図7B)。

各ペプチドのMALDI - TOF - 質量分析は、EF - Pの存在下での予想される分子量を示した(図6C)。

これらの結果は、EF - PとD - アミノアシル - tRNA^{Pro1E2}の組合せが、複数種のD - アミノ酸を含むペプチドの発現レベルの増強において、顕著なインパクトを与えるこ

50

とを示唆している。

【 0 0 7 1 】

EF - Pにより刺激される環状D - ペプチドのリボソーム合成

FITシステムを用いて tRNA^{GluE2}誘導体を用いて大環状D - ペプチドの発現を実証したところ、大環状D - ペプチドの発現レベルは、大環状L - ペプチドよりも4倍低かった。

そこで、tRNA^{Pro1E2}を用いたところ、大環状D - ペプチドの発現レベルが増強した。具体的には、EF - Pにより2つのモデルD - ペプチドであるrP8及びrP9ペプチドの発現レベルを増強させることに成功した(図8)。

rP8は、D - Cys - D - Ser - D - Ala - D - Ser - D - Cysを含む。

10

EF - Pと共に伸長キャリアとしてtRNA^{Pro1E2}を用いて発現したrP8ペプチドのMALDI - TOF - 質量分析は、これらのD - アミノ酸が正しく導入され、2つのD - Cys残基がジスルフィド結合を形成して大環状構造を与えることを示した(図9C)。rP8ペプチドのトリシンSDS - PAGE分析は、D - アミノアシル - tRNA^{Pro1E2}と対になったEF - Pが、EF - P不活性D - アミノアシル - tRNA^{GluE2}を用いて発現されたものと比較して、発現レベルで、約8倍増強することができた(図8B、図9A)。

同様の方法で、D - ClAcPhe - D - Ser - D - Ser - D - Cys連続ストレッチを含む別のモデルD - ペプチドであるrP9ペプチドを設計した。D - ClAcPheのN末端クロロアセチル基はD - Cysのスルフィドリル基と反応して、チオエーテル大環状構造を形成した(図8A)。rP9ペプチドの発現は、tRNA^{GluE2}を用いた場合と比較して、D - アミノアシル - tRNA^{Pro1E2}と対になったEF - Pにより、約10倍に増強され(図8C)、チオエーテル大環状D - ペプチドが効率的に産生され得ることが示された(図9C)。

20

【 0 0 7 2 】

EF - Pにより増強された連続したβ - アミノ酸の取り込み

D - アミノ酸の取り込みについて上記した方法に準じて、以下行った。

βhQ、βhM及びβhF(図10b)が、野生型(WT)tRNA^{Pro1CGG}又はC13G変異tRNA^{Pro1CGG}(図10a)にフレキシザイム技術によりプレチャージされ、rP1ペプチド合成するために、5 μM EF - Pタンパク質を含むFITシステムにおいて、鋳型mRNAであるmR1(図10c)の翻訳に用いられた。

30

β - アミノ酸の前のTyr - Lys - Lys - Tyr - Lys - Lys - Tys - Lys配列は、発現されたペプチドが、トリシンSDS - PAGEやMALDI - TOF - 質量分析における検出のために導入している配列である。

ペプチドは、[¹⁴C] Aspの存在下に発現され、15%トリシンSDS - PAGEに供され、C末端のフラグータグ領域に導入された[¹⁴C] Aspの強度によってオートラジオグラフィーで定量化した(図10d、図15a)。

コールドAspの存在下で、同じペプチドの発現は、EF - Pの非存在下でも、MALDI - TOF - 質量分析により確認した(図15b)。ただし、EF - Pの存在により、WT tRNA^{Pro1CGG}が用いられた場合には、β - アミノ酸の取り込みは増大した(図10d、βhQにおいて1.7倍、βhMにおいて4.6倍、βhFにおいて1.3倍)。これらの結果は、明確に、EF - Pが、tRNA^{Pro1}のDアーム構造を認識していることを示しており、応答するβ - アミノ酸の取り込みを促進している。

40

続いて、rP1ペプチドへの、βhQ及びβhMの取り込みにおけるEF - Pの最適化濃度の検討を行い(参考文献1及び2)、β - アミノ酸の取り込みにおいては、EF - P濃度が5 ~ 10 μM程度であることが良好であった。同様の傾向が、D - アラニンの取り込みにおいても確認された。

これらの結果は、EF - Pが、リボソームのE部位を占め、そして、P部位からE部位へのデアシルtRNAのトランスロケーションを阻害していると考えられた。

【 0 0 7 3 】

50

連続した β - アラニンの取り込みにおける EF - Tu 結合を増強させる tRNA^{Pro1}の T ステム構造の改変

図 11 a に示す tRNA に、フレキシザイム技術により β hM をチャージして、 β hM をチャージした tRNA 間でさらなる取り込み増強が起こるか対比した。

大腸菌 tRNA^{Asn} に基づく、T ステムも D アームも最適化されていない tRNA^{AsnE2}、EF - Tu 結合に最適化した T ステムを有する tRNA^{Glu} の派生物である tRNA^{GluE2} 及び tRNA^{Pro1} において、 β hM - tRNA^{Pro1E2} は、RF - P の存在下で 7 . 3 倍の取り込みの増強効果を示し、EF - P 存在下での β hM - tRNA^{Pro1} に対して、2 倍近い取り込みの増強効果を示した (図 11 b)。

【0074】

7 つの連続した β - アミノ酸の取り込み

β hM をチャージした tRNA^{GluE2}_{CGG} を用いて、mR2 の 2 ~ 7 つの連続した CGG コドンに対して β hM を導入して、mR2 に対応する rP2 - β hM_n ペプチドを合成した (図 12、図 16 b)。

連続する β hM の数の増加に伴い、rP2 - β hM_n ペプチドの翻訳効率は減少したものの、EF - P の存在下で、 β hM を連続して 7 つ含む完全長の rP2 ペプチドを検出することができた (図 12 b 及び図 12 c)。

また、rP2 - β hM₂ ペプチド及び rP2 - β hM₃ ペプチドでは、EF - P による顕著な取り込みの増強効果が確認された (それぞれ 5 . 9 倍、16 . 2 倍)。

同様に、 β hM 及び β hF を、それぞれ、tRNA^{Pro1E2}_{GAU} 及び tRNA^{Pro1E2}_{GUG} にプレチャージし、AUU コドン及び CAU コドンで、おのの取り込んだ rP3 - 3 ペプチド ~ rP3 - 7 ペプチドを合成した (図 13 a)。

rP3 - 3 ペプチド ~ rP3 - 7 ペプチドの発現が、EF - P の存在下で確認された (図 13 b、図 13 c、図 16 c)。

また、rP3 - 3 ペプチド ~ rP3 - 5 ペプチドでは、EF - P による顕著な取り込みの増強効果が確認された (それぞれ 7 . 4 倍、21 . 7 倍、30 . 3 倍)。加えて、rP3 - 6 ペプチド ~ rP3 - 7 ペプチドでは、EF - P により、発現が、N . D . から検出可能になるという増強効果が確認された。

【0075】

複数の D - アミノ酸及び β - アミノ酸の取り込み

本法の汎用性を示すために、3 種類の β - アミノ酸、4 種類の D - アミノ酸を様々な位置に取り込んだ 8 種類の rP4 ペプチド ~ rP11 ペプチドを合成した (図 14 a 及び図 14 b)。

また、rP4 ペプチド ~ rP5 ペプチドでは、EF - P による取り込みの増強効果が確認された (図 14 c、図 16 d、それぞれ 1 . 9 倍、1 . 6 倍)。rP6 ペプチド ~ rP7 ペプチドでは、連続した β - アミノ酸の 2 つのセットが取り込まれていて、EF - P による取り込みの増強効果が確認された (図 14 c、図 16 d、それぞれ 12 . 3 倍、19 . 3 倍)。rP8 ペプチド ~ rP9 ペプチドでは、 β - アミノ酸と D - アミノ酸の組み合わせが取り込まれていて、EF - P により、検出可能となるまで取り込みの増強効果が確認された (図 14 c、図 16 d、rP8 ペプチドでは、9 . 2 倍、rP8 ペプチドでは、0 . 04 μ M)。

チオエーテル結合による、連続した β - アミノ酸を取り込んだ大環状ペプチド (rP10 ペプチド ~ rP11 ペプチド) を合成した (図 14 a)。開始 AUG コドンが、D - ClAcPhe に割り当てられ、D - ClAcPhe のクロロアセチル基が、下流の D - システインの側鎖チオール基と反応して、チオエーテル結合を形成する。rP10 ペプチド ~ rP11 ペプチドでも、EF - P による取り込みの増強効果が確認された (図 14 d、図 16 d、それぞれ 3 . 2 倍、2 . 3 倍)。

取り込みミスによる副生成物を産生することとなり、これあらのペプチドが合成されていることを、MALDI - TOR - 質量分析により確認した (図 16 e)。

【0076】

10

20

30

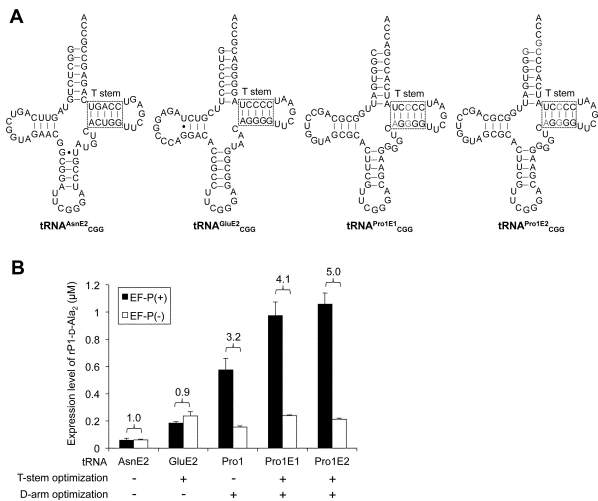
40

50

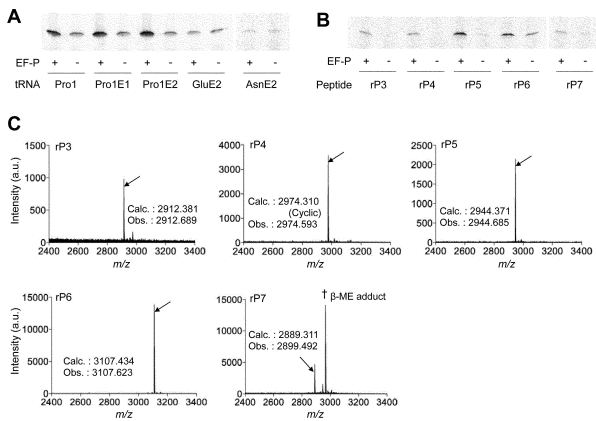
参考文献

- 1 . Ude, S. et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339, 82-5 (2013).
- 2 . Doerfel, L.K. et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339, 85-8 (2013).
- 3 . Katoh, T., Wohlgemuth, I., Nagano, M., Rodnina, M.V. & Suga, H. Essential structural elements in tRNA(Pro) for EF-P-mediated alleviation of translation stalling. *Nat Commun* 7, 11657 (2016).
- 4 . LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D. & Uhlenbeck, O.C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* 294, 165-8 (2001). 10
- 5 . Dale, T., Sanderson, L.E. & Uhlenbeck, O.C. The affinity of elongation factor Tu for an aminoacyl-tRNA is modulated by the esterified amino acid. *Biochemistry* 43, 6159-66 (2004).
- 6 . Becker, H.D. & Kern, D. *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12832-7 (1998).
- 7 . Stanzel, M., Schon, A. & Sprinzl, M. Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast elongation factor Tu. *Eur J Biochem* 219, 435-9 (1994).
- 8 . Schrader, J.M., Chapman, S.J. & Uhlenbeck, O.C. Tuning the affinity of aminoacyl-tRNA to elongation factor Tu for optimal decoding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5215-20 (2011). 20
- 9 . Hasegawa, T. & Yokogawa, T. *Escherichia coli* proline tRNA: structure and recognition sites for prolyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 44, 7-8 (2000).
- 10 . Pavlov, M.Y. et al. Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 50-4 (2009).
- 11 . Doerfel, L.K. et al. Entropic Contribution of Elongation Factor P to Proline Positioning at the Catalytic Center of the Ribosome. *J Am Chem Soc* 137, 12997-3006 (2015). 30
- 12 . Wohlgemuth, I., Brenner, S., Beringer, M. & Rodnina, M.V. Modulation of the rate of peptidyl transfer on the ribosome by the nature of substrates. *J Biol Chem* 283, 32229-35 (2008).
- 13 . Johansson, M. et al. pH-sensitivity of the ribosomal peptidyl transfer reaction dependent on the identity of the A-site aminoacyl-tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 79-84 (2011).
- 14 . Melnikov, S. et al. Molecular insights into protein synthesis with proline residues. *EMBO Rep* 17, 1776-1784 (2016).
- 15 . Driggers, E.M., Hale, S.P., Lee, J. & Terrett, N.K. The exploration of macrocycles for drug discovery--an underexploited structural class. *Nat Rev Drug Discov* 7, 608-24 (2008). 40
- 16 . Hipolito, C.J. & Suga, H. Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems. *Curr Opin Chem Biol* 16, 196-203 (2012).
- 17 . Passioura, T., Katoh, T., Goto, Y. & Suga, H. Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides. *Annu Rev Biochem* 83, 727-52 (2014).
- 18 . Saito, H., Kourouklis, D. & Suga, H. An in vitro evolved precursor tRNA with aminoacylation activity. *EMBO J* 20, 1797-806 (2001).

【 5 】

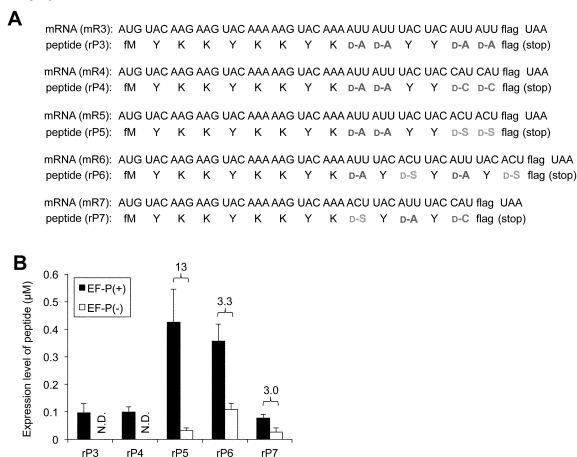


【 6 】

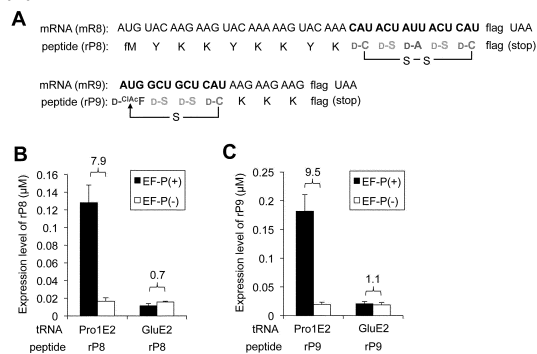


10

【 7 】



【 8 】



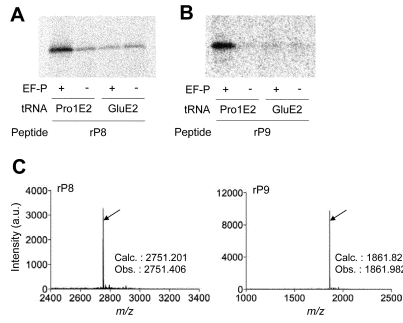
20

30

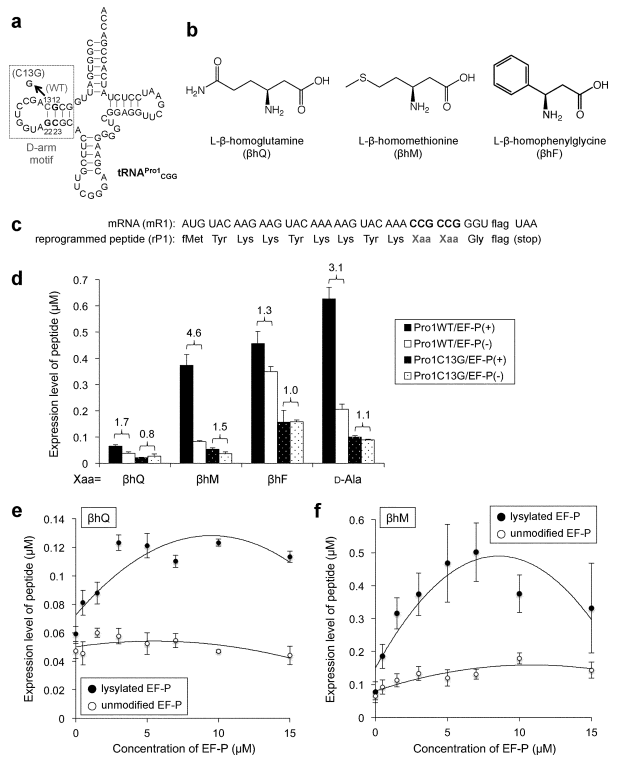
40

50

【 9 】



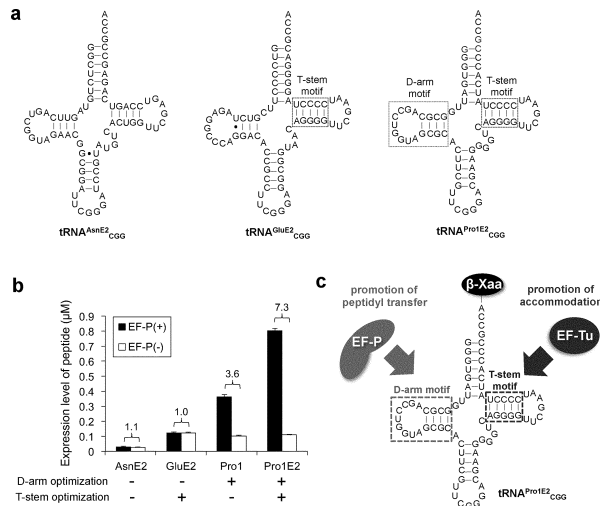
【 10 】



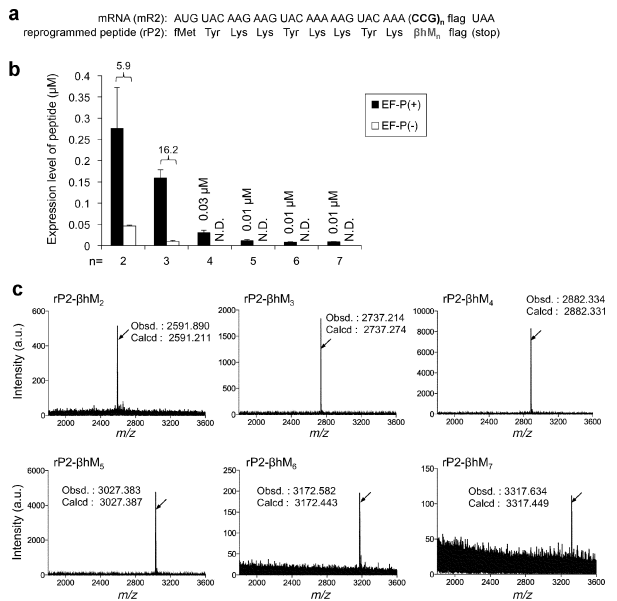
10

20

【 11 】



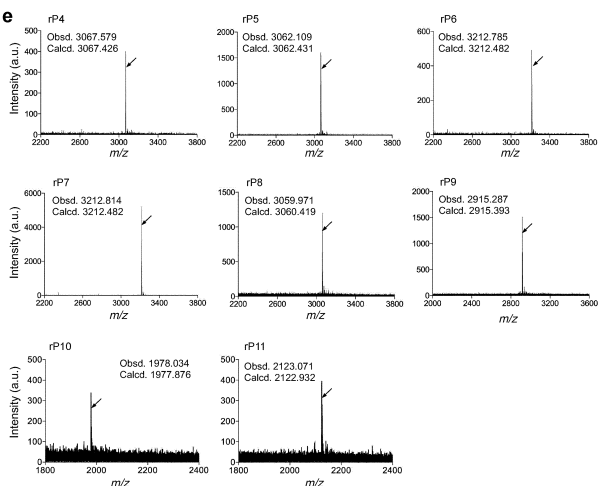
【 12 】



30

40

50



【配列表】

0007079018000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

F I

C 1 2 P 21/00

A

大学法人東京大学内

(72)発明者 加藤 敬行

東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内

審査官 中野 あい

(56)参考文献

特開 2 0 0 8 - 1 2 5 3 9 6 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 1 / 0 4 9 1 5 7 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 2 / 0 7 4 1 3 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 2 / 0 7 4 1 2 9 (W O , A 1)

KATO T. et al. , Essential structural elements in tRNA^{Pro} for EF-P-mediated alleviation of translation stalling , Nature Communications, 2016, 7:11657

小嶋達矢ほか, 遺伝子暗号リプログラミング技術, 生物物理, 2012, vol.52, no.1, p.004-009

KATO T. et al. , Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation , Cell Chemical Biology, Epub 2016 Dec 29, vol.24, no.1, p.46-54

KATO T. et al. , Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation , Nucleic Acids Research, Epub 2017 Nov 16, vol.45, no.22, p.12601-12610

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)