

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年7月15日(2010.7.15)

【公表番号】特表2009-538136(P2009-538136A)

【公表日】平成21年11月5日(2009.11.5)

【年通号数】公開・登録公報2009-044

【出願番号】特願2009-512140(P2009-512140)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 P	13/04	(2006.01)
C 1 2 P	21/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	13/04	Z N A
C 1 2 P	21/00	C
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成22年5月21日(2010.5.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) L-(7-ヒドロキシクマリン-4-イル)エチルグリシン非天然アミノ酸である第1の非天然アミノ酸と；

(b) 第1の直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)と；

(c) 第1の直交tRNA(O-tRNA)を含み；

前記第1のO-RSが前記第1のO-tRNAを前記第1の非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する翻訳系。

【請求項2】

前記第1のO-RSが配列番号4に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体を含むか、又はMethanococcus jannaschiiアミノアシルtRNAシンテターゼから誘導されるか、又は野生型Methanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンテターゼから誘導される請求項1に記載の翻訳系。

【請求項3】

前記第1のO-tRNAがアンバーサプレッサーtRNAであるか、又は配列番号1に記載のポリヌクレオチド配列を含むか若しくは前記配列によりコードされる請求項1に記載の翻訳系。

【請求項4】

該当蛋白質をコードする核酸を更に含み、前記核酸が少なくとも1個のセレクターコドンを含み、前記セレクターコドンが前記第1のO-tRNAにより認識される請求項1に記載の翻訳系。

#### 【請求項5】

第2のO-RSと第2のO-tRNAを更に含み、第2のO-RSが第1の非天然アミノ酸とは異なる第2の非天然アミノ酸で第2のO-tRNAを優先的にアミノアシル化し、第2のO-tRNAが第1のO-tRNAにより認識されるセレクターコドンとは異なるセレクターコドンを認識する請求項4に記載の翻訳系。

#### 【請求項6】

前記系が前記第1の非天然アミノ酸と、前記第1のO-RSと、前記第1のO-tRNAを含む宿主細胞を含み、前記宿主細胞が、

(a) 真正細菌細胞、

(b) 大腸菌細胞、

(c) 前記第1のO-RSをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞、

(d) 配列番号5に記載のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞、及び

(e) 前記第1のO-tRNAをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞、

からなる群から選択される請求項1に記載の翻訳系。

#### 【請求項7】

選択位置に非天然アミノ酸を含む蛋白質を翻訳系で生産する方法であって、

(a) (i) L-(7-ヒドロキシクマリン-4-イル)エチルグリシン非天然アミノ酸である第1の非天然アミノ酸と；

(ii) 第1の直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)と；

(iii) 第1の直交tRNA(O-tRNA)(但し、前記第1のO-RSは前記第1のO-tRNAを前記非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する)と；

(iv) 前記蛋白質をコードし、前記第1のO-tRNAにより認識される少なくとも1個のセレクターコドンを含む核酸を含む翻訳系を提供する段階と；

(b) 前記セレクターコドンに応答して前記蛋白質の翻訳中に前記蛋白質の前記選択位置に前記非天然アミノ酸を組込むことにより、前記選択位置に前記非天然アミノ酸を含む前記蛋白質を生産する段階を含む前記方法。

#### 【請求項8】

翻訳系を提供する前記段階が前記O-RSをコードするポリヌクレオチドを提供する段階を含むか、又はMethanococcus jannaschiiアミノアシルtRNAシンテターゼ若しくは野生型Methanococcus jannaschiiアミノアシルtRNAシンテターゼから誘導されるO-RSを提供する段階を含むか、又は配列番号4に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体を含むO-RSを提供する段階を含む請求項7に記載の方法。

#### 【請求項9】

翻訳系を提供する前記段階が前記O-tRNAをコードするポリヌクレオチドを提供する段階を含むか、又はアンバーサブレッサー-tRNAであるO-tRNAを提供する段階を含むか、又は配列番号1に記載のポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされるO-tRNAを提供する段階を含むか、又はアンバーセレクターコドンを含む核酸を提供する段階を含む請求項7に記載の方法。

#### 【請求項10】

更に前記蛋白質が前記第1の非天然アミノ酸とは異なる第2の非天然アミノ酸を含み、前記翻訳系が更に第2のO-RSと第2のO-tRNAを含み、第2のO-RSが第1の非天然アミノ酸とは異なる第2の非天然アミノ酸で第2のO-tRNAを優先的にアミノアシル化し、第2のO-tRNAが第1のO-tRNAにより認識されるセレクターコドンとは異なる核酸中のセレクターコドンを認識する請求項7に記載の方法。

#### 【請求項11】

翻訳系を提供する前記段階が宿主細胞を提供する段階を含み、前記宿主細胞が前記第1の非天然アミノ酸と、前記第1のO-RSと、前記第1のO-tRNAと、前記核酸を含み、前記組込み段階が前記宿主細胞を培養する段階を含み、前記宿主細胞が、

(a) 真正細菌宿主細胞、

(b) 大腸菌宿主細胞、

(c) 前記第1のO-RSをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞、

(d) 前記第1のO-RSをコードするポリヌクレオチドであって、配列番号5に記載のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む宿主細胞、

からなる群から選択される請求項7に記載の方法。

【請求項12】

配列番号4に記載のアミノ酸配列又はその保存変異体を含むポリペプチドを含有する組成物であって、前記保存変異体ポリペプチドが前記O-tRNAと前記非天然アミノ酸と配列番号4のアミノ酸配列を含むアミノアシルtRNAシンテターゼを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも50%の効率でコグネイト直交tRNA(O-tRNA)を非天然アミノ酸でアミノアシル化する前記組成物。

【請求項13】

(a) 請求項12に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び

(b) 請求項12に記載のポリペプチドをコードすると共に配列番号5のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、

からなる群から選択されるポリヌクレオチド。

【請求項14】

(a) ポリペプチドを含む細胞である請求項12に記載の組成物、及び

(b) 配列番号5に記載のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含有する組成物、

からなる群から選択される組成物。

【請求項15】

請求項14に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを含む細胞。