

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-514799

(P2013-514799A)

(43) 公表日 平成25年5月2日(2013.5.2)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 N 1/15 (2006.01)
C 12 N 1/19 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)
C 12 N 5/10 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 1/15
C 12 N 1/19
C 12 N 1/21
C 12 N 5/00 1 O 1

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願2012-545428 (P2012-545428)
(86) (22) 出願日 平成22年12月20日 (2010.12.20)
(85) 翻訳文提出日 平成24年8月20日 (2012.8.20)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2010/002296
(87) 國際公開番号 WO2011/077075
(87) 國際公開日 平成23年6月30日 (2011.6.30)
(31) 優先権主張番号 0922351.2
(32) 優先日 平成21年12月21日 (2009.12.21)
(33) 優先権主張国 英国(GB)
(31) 優先権主張番号 61/288421
(32) 優先日 平成21年12月21日 (2009.12.21)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 597166578
メディカル リサーチ カウンシル
イギリス国 スウインドン ウィルトシャ
ー エスエヌ2 1エフエル、ノース ス
ター アベニュー、ポラリスハウス、デビ
ッド フィリップス ビルディング、2階
(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀
(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 100123168
弁理士 大▲高▼ とし子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】直交性Q-リボソーム

(57) 【要約】

本発明は、A 1196 に変異を含む 16S rRNA と、C 1195 及び / 又は A 1197 に変異をさらに含む 16S rRNA と、(i) C 1195 A 及び A 1196 G ; 又は (ii) C 1195 T, A 1196 G, 及び A 1197 G ; 又は (iii) A 1196 G 及び A 1197 G を含む 16S rRNA とに関する。本発明は、そのような 16S rRNA を含むリボソーム及びその使用に関する。

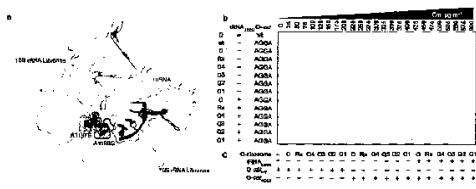


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A 1 1 9 6 に変異を含む 1 6 S r R N A。

【請求項 2】

変異が A 1 1 9 6 G である、請求項 1 に記載の 1 6 S r R N A。

【請求項 3】

C 1 1 9 5 及び / 又は A 1 1 9 7 に変異をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の 1 6 S r R N A。

【請求項 4】

(i) C 1 1 9 5 A 及び A 1 1 9 6 G ; 又は

10

(ii) C 1 1 9 5 T, A 1 1 9 6 G, 及び A 1 1 9 7 G ; 又は

(iii) A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の 1 6 S r R N A。

【請求項 5】

A 5 3 1 G 及び U 5 3 4 A をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の 1 6 S r R N A。

【請求項 6】

クアドラプレットコドンを翻訳することができ、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の 1 6 S r R N A を含むリボソーム。

20

【請求項 7】

少なくとも 1 つのクアドラプレットコドンを含む m R N A の翻訳における、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の 1 6 S r R N A の使用。

【請求項 8】

実質的に本明細書に記載されている、1 6 S r R N A 、リボソーム、細胞又は方法。

【請求項 9】

添付図を参照した、請求項 8 に記載の 1 6 S r R N A 、リボソーム、細胞又は方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、クアドラプレットコドンの翻訳のためのリボソームに関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

6 4 のトリプレットコドンのそれぞれが、天然のアミノ酸又はポリペプチド終止をコードするのに使用されているので、新規の空白コドンが細胞遺伝コード拡張に必要である。原則として、クアドラプレットコドンは 2 5 6 の空白コドンを提供し得るであろう。

【0 0 0 3】

インビトロシステムにおいて(Hohsaka, T. & Sisido, M. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. Curr Opin Chem Biol 6, 809-15 (2002)、Ohtsuki, T., Manabe, T. & Sisido, M. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. FEBS Lett 579, 6769-74 (2005)、Murakami, H., Hohsaka, T., Ashizuka, Y. & Sisido, M. Site-directed incorporation of p-nitrophenylalanine into streptavidin and site-to-site photinduced electron transfer from a pyrenyl group to a nitrophenyl group on the protein framework. Journal of the American Chemical Society 120, 7520-7529 (1998))、及び事前にアミノアシル化された t R N A の移入を介して、限定されたインビトロシステムにおいて(Rodriguez, E. A., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 8650-5 (2006)、Monahan, S. L., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. Site-specific incorporation of unnatural amino acids into receptors expressed in mammalian cells. Chemistry and Biology 10, 573-580 (2003))、化学量論

40

50

的にアミノアシル化された拡張アンチコドン tRNA が、4 塩基コドンに反応して、非常に低効率で非天然アミノ酸を組み込むのに用いられてきた。これが当技術分野における問題である。

【0004】

一事例において、平凡な 2 つのアミノ酸を低効率でコードするのに、一般化できないアプローチで、4 塩基サプレッサー及びアンバーコドンが用いられている(Anderson, J. C. et al. An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7566-71 (2004))。実際、天然のリボソームがクアドラプレットコドンを解読する際の非効率性は、遺伝コード拡張のためのそれらの有用性を厳しく制限するものであり、当技術分野における問題となっている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Hohsaka, T. & Sisido, M. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. Curr Opin Chem Biol 6, 809-15 (2002)

【非特許文献 2】Ohtsuki, T., Manabe, T. & Sisido, M. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. FEBS Lett 579, 6769-74 (2005)

【非特許文献 3】Murakami, H., Hohsaka, T., Ashizuka, Y. & Sisido, M. Site-directed incorporation of p-nitrophenylalanine into streptavidin and site-to-site phot induced electron transfer from a pyrenyl group to a nitrophenyl group on the protein framework. Journal of the American Chemical Society 120, 7520-7529 (1998)

20

【非特許文献 4】Rodriguez, E. A., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 8650-5 (2006)

【非特許文献 5】Monahan, S. L., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. Site-specific incorporation of unnatural amino acids into receptors expressed in mammalian cells. Chemistry and Biology 10, 573-580 (2003)

【非特許文献 6】Anderson, J. C. et al. An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 7566-71 (2004)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、従来技術に伴う問題を克服しようとするものである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、クアドラプレットコドンを翻訳する新規の技術的能力を有するリボソームを産生するために、あるリボソーム構成要素に変異導入した。変異は、16S rRNA に集中させた。本発明によって産生されたリボソームは、時々、クアドラプレットリボソーム又は Q - リボソーム (R i b o Q) と呼ばれる。

40

【0008】

一態様では、本発明は、A 1196 に変異を含む 16S rRNA に関する。

【0009】

一態様では、本発明は、A 1196 に変異と、C 1195T、A 1197G、C 1195A から選択される少なくとも 1 つのさらなる変異とを含む 16S rRNA に関する。

【0010】

別の態様では、本発明は、C 1195 及び / 又は A 1197 に変異をさらに含む、上述の 16S rRNA に関する。

【0011】

別の態様では、本発明は、

50

(i) C 1 1 9 5 A 及び A 1 1 9 6 G ; 又は
 (ii) C 1 1 9 5 T, A 1 1 9 6 G, 及び A 1 1 9 7 G ; 又は
 (iii) A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G
 を含む、上述の 1 6 S r R N A に関する。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本発明は、クアドラプレットコドンを翻訳することができるリボソームであって、上述の 1 6 S r R N A を含むリボソームに関する。

【 0 0 1 3 】

別の態様では、本発明は、少なくとも 1 つのクアドラプレットコドンを含む m R N A の翻訳における、上述の 1 6 S r R N A の使用に関する。

10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

一態様では、本発明は、A 1 1 9 6 に変異を含む 1 6 S r R N A に関する。

【 0 0 1 5 】

適切には、変異が A 1 1 9 6 G である。

【 0 0 1 6 】

別の態様では、本発明は、C 1 1 9 5 及び / 又は A 1 1 9 7 に変異をさらに含む、上述の 1 6 S r R N A に関する。

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、

20

(i) C 1 1 9 5 A 及び A 1 1 9 6 G ; 又は
 (ii) C 1 1 9 5 T, A 1 1 9 6 G, 及び A 1 1 9 7 G ; 又は
 (iii) A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G

を含む、上述の 1 6 S r R N A に関する。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、本発明は、A 5 3 1 G 及び U 5 3 4 A をさらに含む、上述の 1 6 S r R N A に関する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、クアドラプレットコドンを翻訳することができるリボソームであって、上述の 1 6 S r R N A を含むリボソームに関する。

30

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、少なくとも 1 つのクアドラプレットコドンを含む m R N A の翻訳における、上述の 1 6 S r R N A の使用に関する。

【 0 0 2 1 】

適切には、A 1 1 9 6 に変異を含む本発明の 1 6 S r R N A は、A 1 1 9 6 G を含む。この特定の変異は、Q 1、Q 2、Q 3、及び Q 4 など、本明細書で例示される好ましい 1 6 S r R N A のそれぞれに共通であり、Q 1、Q 2、Q 3、及び Q 4 はすべて、A 1 1 9 6 G (すなわち、位置 1 1 9 6 における G) を保持する。

【 0 0 2 2 】

適切には、本発明の 1 6 S r R N A は、A 1 1 9 7 に変異をさらに含む。適切には、A 1 1 9 7 に変異を含む本発明の 1 6 S r R N A は、A 1 1 9 7 G を含む。この特定の変異は、Q 1、Q 2、及び Q 3 など、本明細書で例示される好ましい 1 6 S r R N A の 7 5 % に共通であり、Q 1、Q 2、及び Q 3 はすべて、A 1 1 9 7 G (すなわち、位置 1 1 9 7 における G) を保持する。

40

【 0 0 2 3 】

適切には、本発明の 1 6 S r R N A は、A 1 1 9 6 に変異及び A 1 1 9 7 に変異を含む。最も適切には、本発明の 1 6 S r R N A は、A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G を含む。Q 1、Q 2、及び Q 3 のそれぞれは、変異のこの組合せを含む。

【 0 0 2 4 】

適切には、本発明の 1 6 S r R N A は、C 1 1 9 5 に変異を含み得る。この変異は、

50

C 1 1 9 5 T 又は C 1 1 9 5 A であり得る。適切には、C 1 1 9 5 変異を含む本発明の 1 6 S r RNA は、A 1 1 9 6 G などの A 1 1 9 6 変異も含む。適切には、本発明の 1 6 S r RNA が A 1 1 9 7 G を含む場合、それは C 1 1 9 5 T も含む。適切には、本発明の 1 6 S r RNA が A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G を含む場合、それは C 1 1 9 5 T も含む。適切には、本発明の 1 6 S r RNA が A 1 1 9 6 G を含み、A 1 1 9 7 で野生型である（すなわち、位置 1 1 9 7 が A）場合、それは C 1 1 9 5 A も含む。

【 0 0 2 5 】

さらなる変異は、存在していても、存在していなくてもよい。

【 0 0 2 6 】

R i b o - X 及び R i b o - Q

10

本明細書における R i b o - Q 1 6 S r RNA 配列は、開始 1 6 S r RNA 配列である、R i b o - X から調製された。R i b o - X は、当業者によく知られている公表されている 1 6 S r RNA 配列である。より詳細には、R i b o - X は、野生型と比較して、2つの置換、すなわち A 5 3 1 G 及び U 5 3 4 A を有する 1 6 S r RNA 配列を指す。したがって、適切には、本明細書に記載の各 R i b o - Q 1 6 S r RNA 配列は、本明細書に論じるそれぞれのさらなる変異又は置換に加えて、A 5 3 1 G 及び U 5 3 4 A を保持している。文脈が別段のことを示さない限り、本発明の 1 6 S r RNA はそれぞれ、論じられている任意の他の変異に加えて、A 5 3 1 G 及び U 5 3 4 A を保持していることを想定するべきである。したがって、適切には、本発明の各 1 6 S r RNA は、野生型と比較して、少なくとも 3 つの変異、すなわち A 1 1 9 6 、 A 5 3 1 G 、及び U 5 3 4 A 、最も適切には、A 1 1 9 6 G 、 A 5 3 1 G 、及び U 5 3 4 A を含む。

20

【 0 0 2 7 】

さらなる詳細が必要である場合には、R i b o - X は、国際出願 P C T / G B 2 0 0 7 / 0 0 4 5 6 2 号明細書（国際公開第 2 0 0 8 / 0 6 5 3 9 8 号パンフレットとして公開されている）で徹底的に論じられている。この文献を参照により、明示的に R i b o - X 1 6 S r RNA 配列の詳細について、特に本明細書に組み込む。R i b o - X 1 6 S r RNA 配列は、本発明の R i b o - Q 1 6 S r RNA がそれから派生する及び／又は產生される「背景」配列又は親配列である。

【 0 0 2 8 】

適切には、本発明の 1 6 S r RNA は、A 1 1 9 6 G 及び A 1 1 9 7 G を含む（R i b o - Q 1 、 R i b o - Q 2 、 R i b o - Q 3 ）。

30

【 0 0 2 9 】

適切には、本発明の 1 6 S r RNA は、C 1 1 9 5 T 、 A 1 1 9 6 G 、及び A 1 1 9 7 G を含む（R i b o - Q 3 ）。

【 0 0 3 0 】

適切には、本発明の 1 6 S r RNA は、C 1 1 9 5 T 及び A 1 1 9 6 G を含む（R i b o - Q 4 ）。

【 0 0 3 1 】

一実施形態では、本発明の 1 6 S r RNA は、野生型の 1 6 S r RNA の配列、並びに A 5 3 1 G 、 U 5 3 4 A 、 A 1 1 9 6 G 、及び A 1 1 9 7 G からなる（R i b o - Q 1 ）。

40

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、本発明の 1 6 S r RNA は、野生型の 1 6 S r RNA の配列、並びに A 5 3 1 G 、 U 5 3 4 A 、 A 1 1 9 6 G 、及び A 1 1 9 7 G 、並びに最大 8 までのさらなる変異／置換からなる（R i b o - Q 2 ）。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、本発明の 1 6 S r RNA は、野生型の 1 6 S r RNA の配列、並びに A 5 3 1 G 、 U 5 3 4 A 、 C 1 1 9 5 T 、 A 1 1 9 6 G 、及び A 1 1 9 7 G からなる（R i b o - Q 3 ）。

【 0 0 3 4 】

50

一実施形態では、本発明の 16S rRNA は、野生型の 16S rRNA の配列、並びに A531G、U534A、C1195T、及び A1196G からなる (Ribozyme 4)。

【0035】

本発明は、クアドラプレット解読リボソームの進化を介した、複数の非天然アミノ酸のコード化に関する。

【0036】

定義

「直交性 (orthogonal)」という用語が本明細書で使用される場合、それは、他の核酸と協働する能力が天然の内因性核酸とは異なる核酸、例えば rRNA 又は mRNA を指す。直交性 mRNA、rRNA 及び tRNA は、効率的に協働する適合群 (関連群 (cognate group)) となる。例えば、直交性 rRNA は、リボソームの一部である場合、天然の内因性 mRNA ではなく、適合している関連する直交性 mRNA を効率的に翻訳する。単純にするために、直交性 rRNA を含むリボソームを本明細書では「直交性リボソーム」と呼び、直交性リボソームは、機能が関連する直交性 mRNA を効率的に翻訳する。

10

【0037】

直交性コドン又は直交性 mRNA コドンは、機能が関連する直交性リボソームによってのみ翻訳されるか、又は機能が関連する直交性リボソームによって、天然の内因性リボソームによるよりも効率的に翻訳されるか、又は異なって翻訳される、直交性 mRNA 内のコドンである。直交性は、O と短縮表記される (O - mRNA の O のように)。

20

【0038】

したがって、一例として、直交性リボソーム (O - リボソーム) ・ 直交性 mRNA (O - mRNA) 対は、内因性リボソームによる翻訳を指示しないリボソーム結合部位を含有する mRNA と、直交性 mRNA を効率的且つ特異的に翻訳するが、細胞性 mRNA を認めうるほどに翻訳しない直交性リボソームとで構成される。

30

【0039】

本明細書で例えば「進化した直交性リボソーム」という表現に適用される場合、「進化した」は、多様化及び選択を介した分子の機能の発展を指す。例えば、本明細書に記載の手順に従って、所望の位置で多様化された rRNA 分子のライブラリーを選択にかけることができる。この選択過程によって、進化した rRNA が得られる。

30

【0040】

本明細書で使用される場合、O - mRNA O - リボソーム対に関するコンテキストで使用される場合、「mRNA」という用語は、天然の野生型リボソームによってではなく、機能が関連する O - リボソームによって効率的に翻訳される直交性コドンを含む mRNA を指す。加えて、それは、野生型リボソームではなく、O - リボソームによる翻訳の開始を効率的に媒介する変異体リボソーム結合部位 (とりわけ、AUG 開始コドンから、AUG 開始コドンに対して -13 上流までの配列) を含みうる。mRNA の残りの部分は様々でありえ、それによって、上記リボソーム結合部位の下流に任意のタンパク質のコード配列を配置することによって、内因性リボソームによってではなく、直交性リボソームによって効率的に翻訳される mRNA がもたらされる。

40

【0041】

本明細書で使用される場合、「rRNA」という用語は、O - mRNA O - リボソーム対に関するコンテキストで使用される場合、上記 rRNA が直交性 rRNA であり、それを含有するリボソームが直交性リボソームであるように、すなわち、それが機能が関連する直交性 mRNA のみを効率的に翻訳するように変異導入された rRNA を指す。野生型リボソームの rRNA の 1 次、2 次及び 3 次構造は、極めてよく知られており、様々な保存構造の機能も同様である (ステム - ループ、ヘアピン、ヒンジなど)。O - rRNA は、通常、16S rRNA 内に、翻訳過程中的 tRNA 結合の原因となる変異を含んでいる。それは、スマール rRNA サブユニットの 3' 領域にも、翻訳の開始及び mRNA のリボソーム結合部位との相互作用の原因となる変異を含みうる。

50

【0042】

細胞内における「O-rRNA」の発現は、この用語が本明細書で使用される場合、上記細胞に対して非毒性である。毒性は、細胞死によって、又はその代わりに、「O-mRNA」を発現しない細胞に対する、増殖速度の80%以上の低減によって判定される。O-rRNAの発現は、好ましくは、O-rRNAをもたない同様な細胞の増殖に対して50%未満、好ましくは25%未満、より好ましくは10%未満の増殖の低減を有し、さらにより好ましくは、増殖を全く減速させない。

【0043】

本明細書で使用される場合、「より効率的に翻訳する」とび「より効率的に翻訳を媒介する」という用語は、所与のO-mRNAが機能が関連するO-リボソームによって、少なくとも25%、より効率的に、好ましくは、同じ細胞又は細胞型で野生型のリボソーム又は非同族の(non-cognate)O-リボソームによってO-mRNAが翻訳される効率の少なくとも2倍、3倍、4倍若しくは8倍、又はそれ以上に効率的に翻訳されることを意味する。ひとつの評価基準として、例えば、少なくとも1つの直交性コドンを用いた、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするO-mRNAの、天然のリボソーム又は非同族の直交性リボソームによる翻訳に対して、翻訳効率を評価できる。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、「に対応する」という用語は、ヌクレオチド配列に関して使用される場合、1分子内、例えば16S rRNA内の所与の配列が、別の分子、例えば別の種の16S rRNAにおける同じ位置にあることを意味する。「同じ位置にある」とは、Tatusova及びMaddenによって記載され(1999, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250)、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI, the U.S. National Center for Biotechnology Information)から入手できるBLAST配列アライメントアルゴリズム「BLAST 2 Sequences」を用いてアライメントした際に、「対応する」配列が相互にアライメントされることを意味する。いかなる疑義も回避するため、BLASTバージョン2.2.11(NCBIウェブサイトで利用可能、又は代わりに上記サイトからダウンロード可能)を以下のデフォルトパラメータ、すなわち、プログラム、blastn;一致による得点、1;不一致によるペナルティー、-2;ギャップ開始ペナルティー及びギャップ伸長ペナルティー、それぞれ5及び2;ギャップ×ドロップオフ、50;期待値10.0;ワードサイズ11;フィルター有りを用いて使用した。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、「選択マーカー」という用語は、対応する選択剤の添加によって、集団内における、その遺伝子配列をコード及び発現する細胞の選択を可能にする遺伝子配列を指す。

30

【0046】

本明細書で使用される場合、「リボソーム結合部位でmRNAと相互作用する配列を含む領域」は、翻訳開始中のmRNAと物理的に、例えば塩基対合又は他の相互作用によって相互作用する、16S rRNAの3'末端近傍のヌクレオチドを含む配列領域を指す。上記「領域」は、リボソーム結合部位でmRNA内のヌクレオチドと塩基対合又は他の方法で物理的に相互作用するヌクレオチド、及びそのようなヌクレオチドの5'側又は3'側にある5ヌクレオチド以内のヌクレオチドを含有している。シャイン-ダルガノヘリックスの副溝の近傍で、リボソームとmRNAとの間に形成されるバルジを形成する、大腸菌16S rRNAのヌクレオチド722及び723に対応する塩基も、この「領域」内に含有されている。

40

【0047】

本明細書で使用される場合、「多様化された」という用語は、ライブラリー内の個々のメンバーによって、所与の部位における配列が異なることを意味する。多様性を導入する方法は、当業者によく知られており、所与の部位にランダムな多様性を導入することも、完全にはランダムでない多様性を導入することもできる。「完全にランダム」とは、所与

50

のヌクレオチドが、G、A、T又はCのいずれでも（又は、RNAでは、G、A、U及びCのうちのいずれでも）ありうることを意味する。「完全にはランダムでない」とは、所与の部位を、G、A、T（RNAではU）又はCの全てではないが、複数の異なったヌクレオチドが占めうること、例えば、所与の部位で、多様性によって、U若しくはCではなく、G若しくはAのいずれかが可能となる場合、又はCではなく、G、A若しくはUのいずれかが可能となる場合を意味する。

【0048】

本明細書で使用される場合、「リボソーム結合部位」という用語は、翻訳の開始時にリボソームが結合する、mRNAの領域を指す。本明細書における定義では、原核細胞mRNAの「リボソーム結合部位」は、シャイン-ダルガノコンセンサス配列と、AUG開始コドンに対して-13から+1までのヌクレオチドとを含有している。10

【0049】

本明細書で使用される場合、「非天然アミノ酸」は、タンパク質中に天然で存在する20種のアミノ酸以外のアミノ酸を指す。非限定的な例には、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-ヨード-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-フェニルアラニン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、3-メチル-フェニルアラニン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、トリ-O-アセチル-G1cNAcb-セリン、L-Dopa、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p-ブロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、チロシンアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；トレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ホウ酸、ボロン酸、リン酸、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、又はアミノ置換アミノ酸、又はこれらの組合せ；光励起性架橋物質を有するアミノ酸；スピノ標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；金属結合性アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；フォトケージドアミノ酸及び/又は光異性化可能なアミノ酸；ビオチン又はビオチン類似体含有アミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレンギリコール又はポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学的に切断可能なアミノ酸又は光切断可能なアミノ酸；延長された側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含有するアミノ酸；糖置換アミノ酸；炭素連結された糖を含有するアミノ酸；酸化還元活性なアミノ酸；a-ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸；a,a二置換アミノ酸；b-アミノ酸；プロリン又はヒスチジン以外の環状アミノ酸、及びフェニルアラニン、チロシン又はトリプトファン以外の芳香族アミノ酸が含まれる。2030

【0050】

国際特許出願PCT/GB2006/002637号パンフレットは、O-mRNA内のリボソーム結合部位がO-リボソームに特異的に結合する直交性リボソーム/mRNA対の产生について記載している。40

【0051】

簡潔には、細菌のリボソームは、mRNAのタンパク質への翻訳に関与するrRNA及びタンパク質の2.5MDa複合体である(The Ribosome, Vol. LXVI. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 2001))。mRNAと、リボソームの30Sサブユニットとの相互作用は、翻訳における初期の事象であり(Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. & Sperling-Petersen, H.U., Microbial Mol Biol Rev 69, 101-123 (2005))、最初のコドン(Wikstrom, P.M., Lind, L.K., Berg, D.E. & Bjork, G.R., J Mol Biol 224, 949-966 (1992))、リボソーム結合配列(シャイン-ダルガノ(SD, Shine-Dalgarno)配列を含める(Shine, J. & Delgarno, L., Biochem 50

J 141, 609-615 (1974)、Steitz, J.A. & Jakes, K., Proc Natl Acad Sci USA 72, 4734-4738 (1975)、Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H. & Noller, H.F., Cell 106, 233-241 (2001))、及びこれらの配列間の間隔 (Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E., Nucleic Acids Res 22, 4953-4957 (1994)) を含めた、遺伝子の発現を制御する、mRNAのいくつかの特徴が知られている。特定の場合には、mRNA構造 (Gottesman, S. et al. in The Ribosome, Vol. LXVI (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 2001)、Looman, A.C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A. & van Knippenberg, P.H., Nucleic Acids Res 14, 5481-5497 (1986)、Liebhaber, S.A., Cash, F. & Eshleman, S.S., J Mol Biol 226, 609-621 (1992))、又は代謝産物の結合 (Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R., Nature 419, 952-956 (2002)) が翻訳の開始に影響を与え、まれな場合では、mRNAは、SD配列なしで、翻訳されうるが、これらの配列の翻訳は効率が悪く (Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. & Sperling-Petersen, H.U., Microbiol Mol Biol Rev 69, 101-123 (2005)) 代替の開始経路を介して動作する (Laursen, B.S., Sorensen, H.P., Mortensen, K.K. & Sperling Petersen, H.U. Initiation of protein synthesis in bacteria. Microbial Mol Biol Rev 69, 101-123 (2005))。細菌遺伝子の圧倒的多数では、mRNAのSD領域が翻訳効率の主要決定因子である。古典的なSD配列であるGGAGGは、アンチシャイン - ダルガノ (ASD, Anti Shine Delgarno) として知られているCCUCCという配列を含有する、16S rRNAの3'末端領域とのRNA - RNA塩基対合を介して相互作用する。大腸菌では、約4122の翻訳開始点があり (Shultzaberger, R.K., Buchheimer, R.E., Rudd, K.E. & Schneider, T.D., J Mol Biol 313, 215-228 (2001))、これらは、SD様配列とAUG開始コドンとの間の間隔、SD様配列とリボソームとの間の相補性の度合い、及び16S rRNAの3'末端における、mRNAが相互作用する配列の正確な領域が相違している。したがって、このリボソームは、ただの古典的なシャイン - ダルガノ (SD) 配列よりは複雑なセットの配列からの翻訳を推進させる。明快にするために、16S rRNAの3'末端に結合すると考えられているmRNA配列をSD配列と呼び、GGAGGという特定の配列を古典的なSD配列と呼ぶ。

【0052】

SD配列内の変異は、しばしば急速な細胞溶解及び細胞死をもたらす (Lee, K., Holland-Staley, C.A. & Cunningham, P.R., RNA 2, 1270-1285 (1996)、Wood, T.K. & Peretti, S.W., Biotechnol. Bioeng. 38, 891-906 (1991))。そのような変異体リボソームは、細胞性の翻訳を誤調節するものであって、直交性ではない。ASD領域内の変異に対する、細胞が生存するかどうかの感受性は、ASD内の単一の変化でさえ、プロテオーム合成の破局的且つ全体的な誤調節を介して、細胞死へと導きうるという観察によって強調される (Jacob, W.F., Santer, M. & Dahlberg, A.E., Proc Natl Acad Sci USA 84, 4757-4761 (1987))。rRNAにおける他の変異は、機能的なリボソームのプロセシング又は構築における機能不全をもたらしうる。

【0053】

国際特許出願PCT/GB2006/02637号パンフレットは、野生型のリボソーム及びmRNAに関して、複製された大腸菌リボソームmRNA対の分子特異性を、複数の直交性リボソーム直交性mRNA対を產生するのに適合させる方法を記載している。これらの対では、リボソームが直交性mRNAのみを効率的に翻訳し、直交性mRNAは、細胞性リボソームの効率的な基質ではない。そこに記載されている、内因性mRNAを翻訳しない直交性リボソームは、細胞遺伝子発現を妨げずに、所望の機能が関連するmRNAの特異的な翻訳を可能にする。これらの直交性対の相互作用のネットワークが予測及び決定され、転写後にブール論理で細胞をプログラムするのに直交性リボソームmRNA対を使用できることが示されている。

【0054】

国際特許出願PCT/GB2006/02637号パンフレットは、直交性翻訳機構の進化に関する正及び負の選択を行うための機構を記載している。この選択方法は、複数の

10

20

30

40

50

直交性リボソームmRNA対(O-リボソーム O-mRNA)を進化させるのに適用される。機能が関連する及び非同族の、O-リボソームとO-mRNAとの相互作用のネットワークに関する、成功した予測も記載されている。

【0055】

本発明者らは、ここに、リボソームの分子解読特性を拡張する、新規の、さらに改変された直交性リボソームと、そのようなO-リボソームを产生する方法とを提供する。詳細には、本発明者らは、より効率的にクアドラプレットコドンを解読する直交性リボソームを進化させる。

【0056】

本発明者らは、合成の遺伝コード拡張の効率を強化する進化した直交性リボソームを開示する。本発明者らは、直交性リボソームと直交性mRNAとで構成された細胞モジュールを提供する。これらの対は、大腸菌(*Escherichia coli*)における天然のリボソーム-mRNA対と、独立的ではあるが平行して機能する。直交性リボソームはプロテオームを合成せず、天然のリボソームとは異なったtRNA解読ルールを用いて動作するよう分枝させることができる。ここで、本発明者らは、生細胞内の直交性mRNAのコンテクスト内に配置されたクアドラプレットコドンなど、コドンの効率的で高フィデリティーな解読のための直交性リボソーム(ribo-Q)の進化を実証する。本発明者らは、rib o - Q、直交性mRNA及び直交性アミノアシルtRNAシンテターゼ/tRNA対を組み合わせて、大腸菌における部位特異的な非天然アミノ酸取込みの効率を実質的に増大させる。これは、複数の部位で非天然アミノ酸を取り込むタンパク質の効率的な合成を有利に可能にし、且つ/又は、例えば、タンパク質機能をインピボで探索するために非天然アミノ酸の取込みを用いた実験における、末端欠失タンパク質の機能及び/若しくは表現型への影響を最小にする。

【0057】

直交性コドン

本発明者らは、直交性mRNAコドンを翻訳できる進化したリボソームを記述する。これは、このリボソームが、普遍的な遺伝コードではなく直交性遺伝コードであるコードに従ってmRNA情報を解釈することを意味する。これは、コードの相違によってクロストークが排除されている細胞内に存在する2つの別々の遺伝系を有する可能性、又はどのコードがそれを翻訳するのに用いられているかに従って異なったポリペプチドをコードするmRNA分子の可能性を含めた多くの可能性を導入するものである。

【0058】

直交性遺伝コードをそれから構築できる直交性コドンは、普遍的なトリプレットコード以外のコードである。以下の表1に普遍的遺伝コードを示す。

【0059】

10

20

30

【表1】

表1 2番目のヌクレオチド				
	U	C	A	
U	UUU フェニルアラニン(Phe)	UCU セリン(Ser)	UAU チロシン(Tyr)	UGU システイン(Cys)
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys
	UUA ロイシン(Leu)	UCA Ser	UAA STOP	UGA STOP
	UUG Leu	UCG Ser	UAG STOP	UGG トリプトファン(Trp)
C	CUU ロイシン(Leu)	CCU プロリン(Pro)	CAU ヒスチジン(His)	CGU アルギニン(Arg)
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
	CUA Leu	CCA Pro	CAA グルタミン(Gln)	CGA Arg
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
A	AUU イソロイシン(Ile)	ACU レオニン(Thr)	AAU アスパラギン(Asn)	AGU セリン(Ser)
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
	AUA Ile	ACA Thr	AAA リジン(Lys)	AGA アルギニン(Arg)
	AUG メチオニン(Met) 又は開始	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
G	GUU バリン(Val)	GCU アラニン(Ala)	GAU アスパラギン酸(Asp)	GGU グリシン(Gly)
	GUC (Val)	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
	GUA Val	GCA Ala	GAA グルタミン酸(Glu)	GGA Gly
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

10

20

30

40

【0060】

このコードにおけるある種の変異は天然に存在している。例えば、ミトコンドリアは、U G Aを、鎖終止コドンとして用いるのではなく、トリプトファン(Trp)をコードするのに用いる。加えて、

ほとんどの動物ミトコンドリアは、A U Aをイソロイシンではなくメチオニンに用いており、

全ての脊椎動物のミトコンドリアは、A G A及びA G Gを鎖終止コドンとして用いており、

酵母ミトコンドリアは、C Uで始まる全てのコドンをロイシンではなく、トレオニンに割り当てる(ロイシンは、細胞質ゾルのmRNA内と同じように、依然としてU U A及びU U Gによってコードされている)。

植物ミトコンドリアは普遍的コードを用いており、これは、被子植物がミトコンドリア遺伝子を極めて容易にそれらの核に移行させるのを可能にしてきた。

【0061】

核内遺伝子では、普遍的コードへの違反ははるかにまれである。少数の単細胞真核生物は(それらの3つの終止コドンのうち)1つ又は2つの終止コドンを代わりにアミノ酸に用いていることが見出されている。

【0062】

大多数のタンパク質は、たとえ、これらのうちの一部は後に、例えばリン酸化によって

50

化学的に改変されうるとしても、上記に示した 20 種のアミノ酸から構築されている。

【0063】

しかし、標準的な 20 種の 1 つではないアミノ酸が伸長中のポリペプチドに tRNA によって挿入される 2 つの場合が天然で見出されている。

【0064】

セレノシステイン。このアミノ酸は UGA によってコードされている。UGA は依然として鎖終止コドンとして使用されるが、翻訳機構は、いつ UGA コドンを終止コドンではなくセレノシステインに使用するべきか判別できる。このコドン使用法は、ある種の古細菌、真正細菌、及び動物で見出されている（ヒトは、セレンイウムを含有する 25 種の異なったタンパク質を合成する）。

10

【0065】

ピロリシン。古細菌の一員で見出された 1 遺伝子において、UAG によってこのアミノ酸がコードされている。翻訳機構が UAG に遭遇した場合に、ピロリシンを有する tRNA を挿入するべきか、又は翻訳を停止するべきかを、それがいかにして知るかはまだ知られていない。

【0066】

本発明の目的では、上記の全てを普遍的遺伝コードの一部であると考える。

【0067】

本発明は、自然界で以前に知られていたものではなく、直交性 mRNA / rRNA 対のコンテクストで開発及び使用される新規なコードを可能にする。

20

【0068】

直交性リボソームの選択

直交性リボソーム直交性 mRNA 対又は直交性分子の他の対を同定するための選択アプローチは、O-mRNA 内の直交性コドンの翻訳に関する選択を必要とする。この選択は、O-mRNA を発現する細胞が、それを発現しないもの、又はより低い効率で発現するもののなかから選択されるような、正の選択が有利である。

30

【0069】

多数の様々な正の選択剤が使用できる。最も一般的な選択戦略は、抗生物質存在下での条件的な生存を用いたものである。これらの正の選択のうち、抗生物質であるクロラムフェニコールと組み合わせたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子が最も有用なもの 1 つであると判明している。当技術分野で知られている他のもの、とりわけ、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン又はストレプトマイシン耐性なども使用できる。

30

【0070】

O-mRNA / O-rRNA 対は、機能が関連する直交性リボソームが翻訳できる直交性転写産物、例えば CAT を宿主細胞内で产生するのに使用し、それによって、上記転写産物によってコードされているポリペプチドの発現の極めて高感度な制御を可能にすることができる。したがって、それらの対は、例えば、直交性 mRNA が所望のポリペプチドをコードするそのような対をコードする核酸を細胞に導入することによって、所望のポリペプチドを产生するのに用いることができる。直交性リボソームによる直交性 mRNA の翻訳は、所望のポリペプチドの产生をもたらす。直交性 mRNA 直交性リボソーム対をコードする細胞の中で产生されるポリペプチドは非天然アミノ酸を含有できると企図されている。

40

【0071】

ここに記載する方法は、O-mRNA が O-rRNA によって翻訳される直交性コドンを含む種における、直交性 mRNA 直交性 rRNA 対の選択に適用できる。したがって、これらの方法は、この作用機序が保存されている原核生物種及び真核生物種全体にわたって広範に適用できる。16S rRNA の配列は多くの細菌種が知られており、それ自体、細菌種相互の進化上の関係を定義する進化系統樹を作成するのに使用してきた（例えば、Ludwig & Schleifer, 1994, FEMS Microbiol. Rev. 15: 155-73 で概説されている；B

50

ergey's Manual of Systematic Bacteriology Volumes 1 and 2, Springer, George M. Garrity, ed.も参照)。リボソームデータベースプロジェクトII(Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM, Nucleic Acids Res, (2005) 33(Database Issue):D294-D296. doi: 10.1093/nar/gki038)は、リリース9.28(05年6月17日)で、オンライン分析ツールと共に、155708の、アラインメント及びアノテーションされた16S rRNA配列を提供している。

【0072】

進化系統樹は、例えばClustalW配列アラインメントアルゴリズムで16S rRNA配列及び近隣結合法を用いて構築される。1つの種でそのセットを相互に対して直交性にする所与のセットの変異(16S rRNA及びmRNA内のコドンにおける)が別の種で同様な効果を有する見込みを、進化系統樹を用いて見積もることができる。したがって、例えば、腸内細菌科の一員(例えば大腸菌)でmRNA / 16S rRNA対を相互に対して直交性にする変異は、進化系統樹上の異なった科の一員より、同じ科(例えばサルモネラ属(Salmonella))の別の一員で直交性mRNA / 直交性リボソーム対をもたらす可能性がより高いであろう。

10

【0073】

複数の細菌種が極めて近縁である一部の場合では、1つの種で直交性分子をもたらす16S rRNA変異及びmRNA変異に対応する変異を、近縁の種に導入して、その近縁種で直交性mRNA直交性rRNA対を生成することが可能である。複数の細菌種が極めて近縁である場合(例えば大腸菌とサルモネラ属諸種)でも、1つの種から近縁種に直接的に直交性16S rRNA及び直交性mRNAを導入して、機能的な直交性mRNA直交性リボソーム対をその近縁種で得ることが可能である。

20

【0074】

別法では、直交性mRNA直交性リボソーム対の同定が望まれている種が、1セットの対が既に選択されている種と近縁でない場合(例えば、それらが同じ系統学的な科に属さない場合)、本明細書に記載の選択法を用いて、所望の種で直交性mRNA直交性リボソーム対を生成することができる。簡潔には、変異導入された直交性16S rRNA分子のライプラリーを調製することができる。その後、そのライプラリーを選択された種に導入することができる。本明細書に記載の通り、1又は複数の直交性コドンを用いて、選択されたポリペプチドをコードする配列を含む1又は複数のO-mRNA配列を生成することができる(この細菌種は選択剤の活性に感受性でなければならないが、これは当業者によって容易に判定されることである)。その後、O-mRNAと対をなす直交性リボソームを同定するために、上記O-rRNAライプラリーを含む細胞に上記O-mRNAライプラリーを導入し、それに続いて、正の選択マーカーを発現する細胞を得るための正の選択を行うことができる。

30

【0075】

本明細書に記載の方法は、病原細菌に加えて、工業用及び農業用に重要な細菌を含めた広範な細菌における翻訳又は他の過程を方向付けるのに有用な分子の同定に適用できる。病原細菌は当業者によく知られており、16S rRNA配列のみではなく、多数のmRNAコード配列も含めた配列情報は、GenBankなどの公共データベースで利用可能である。一般的であるが、非限定的な例には、例えば、サルモネラ属諸種、クロストリジウム属(Clostridium)諸種、例えばボツリヌス菌(Clostridium botulinum)及びウェルシュ菌(Clostridium perfringens)、スタフィロコッカス属(Staphylococcus)諸種、例えば黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus);カンピロバクター属(Campylobacter)諸種、例えばカンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、エルシニア属(Yersinia)諸種、例えばペスト菌(Yersinia pestis)、エンテロコリチカ菌(Yersinia enterocolitica)及び仮性結核菌(Yersinia pseudotuberculosis)、リステリア属(Listeria)諸種、例えばリステリア菌(Listeria monocytogenes)、ビブリオ属諸種、例えばコレラ菌(Vibrio cholerae)、腸炎ビブリオ菌(Vibrio parahaemolyticus)及びビブリオ・バルニフィカス(Vibrio vulnificus)、セレウス菌(Bacillus cereus)、エロモナス

40

50

属 (Aeromonas) 諸種、例えばエロモナス腸炎原因菌 (Aeromonas hydrophila) 、赤痢菌属 (Shigella) 諸種、ストレプトコッカス属 (Streptococcus) 諸種、例えば化膿性レンサ球菌 (Streptococcus pyogenes) 、大便レンサ球菌 (Streptococcus faecalis) 、フェシウム菌 (Streptococcus faecium) 、肺炎レンサ球菌 (Streptococcus pneumoniae) 、ストレプトコッカス・デュランス (Streptococcus durans) 及びストレプトコッカス・アヴィウム (Streptococcus avium) 、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) 、クレブシエラ属 (Klebsiella) 諸種、エンテロバクター属 (Enterobacter) 諸種、プロテウス属 (Proteus) 諸種、シトロバクター属 (Citrobacter) 諸種、好気菌属 (Aerobacter) 諸種、プロビデンシア属 (Providencia) 諸種、ナイセリア属 (Neisseria) 諸種、例えば淋菌 (Neisseria gonorrhoea) 及び髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis) 、ヘモフィルス属 (Haemophilus) 諸種、例えばインフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae) 、ヘリコバクター属 (Helicobacter) 諸種、例えばピロリ菌 (Helicobacter pylori) 、ボルデテラ属 (Bordetella) 諸種、例えば百日咳菌 (Bordetella pertussis) 、セラチア属 (Serratia) 諸種、並びに大腸菌の病原種、例えば腸内毒素原性大腸菌 (E T E C , Enterotoxigenic E. coli) 、腸病原性大腸菌 (E P E C , enteropathogenic E. coli) 及び腸管出血性大腸菌 O 1 5 7 : H 7 (E H E C , enterohemorrhagic E. coli) が含まれる。

10

【0076】

終結因子 1 / アンバーコドン

末端欠失タンパク質に比した完全長タンパク質合成の効率を最大にするには、所望の遺伝子の発現への、終結因子 1 (R F - 1) 媒介鎖終止の影響を最小にするのが有利であろう。

20

【0077】

天然のリボソームとは異なり、直交性リボソームはプロテオームを合成する原因とはならず、それゆえ、天然のリボソームでは致死又はドミナントネガティブ効果を引き起こす高度に保存された rRNA の変異に対して寛容性がある。したがって、R F - 1 結合の低減に向けて、直交性リボソームが有利なことに進化している可能性がある。

30

【0078】

本発明者らは、生細胞内の直交性 mRNA のコンテクスト内に配置されたクアドラプレットコドンの、効率的且つ高フィデリティーな解読のための、直交性リボソーム (ribosome-Q) の合成的進化を開示する。ribosome-Q は、大腸菌における部位特異的な非天然アミノ酸の取込み効率を有利に有意に増大させるように、直交性 mRNA 及び直交性アミノアシル - tRNA シンテターゼ / tRNA 対と好ましくは組み合わせることができる。この効率の増大は、複数の部位で非天然アミノ酸を組み込むタンパク質を合成することを可能にし、インビオでの末端欠失タンパク質の機能及び表現型への影響を最小限にする。これは、例えば非天然アミノ酸を取り込むタンパク質の製造で、明らかな産業適用及び有用性を有する。

30

【0079】

細菌の形質転換

本明細書に記載の方法は、細菌への外来性又は外因性核酸の導入に依存している。外因性核酸を用いた細菌の形質転換の方法、及び、とりわけ、外因性核酸を取り込む能力を細胞に与える方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、大腸菌などのグラム陰性菌は、塩化カルシウム又は塩化ルビジウムなどの多価陽イオン薬剤での処理によって、形質転換能が与えられる。グラム陽性菌は、ペプチドグリカン層を除去し、それによってプロトプラストを形成させるために、分解酵素と共にインキュベートすることができる。プロトプラストを DNA 及びポリエチレンギリコールと共にインキュベートすれば、細胞融合と、それに伴う DNA の取込みとを得る。これらの例の両方において、DNA が直鎖上であれば、それはヌクレアーゼに感受性となる傾向があり、それゆえ、形質転換は、共有結合閉環状 DNA を使用した場合に最も効率的である。別法では、形質転換を改善するために、ヌクレアーゼ欠失細胞 (RECBC 株) を用いることができる。

40

【0080】

50

細菌細胞に核酸を導入するには、エレクトロポレーションもよく知られている。例えば大腸菌などのグラム陰性菌のエレクトロポレーションを行う方法はよく知られているが、とりわけエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)などのグラム陽性菌のエレクトロポレーションに関してもよく知られており、例えば、Dunny et al., 1991, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1194-1201に記載されている。

【0081】

インビボにおけるデザイナーアミノ酸の遺伝学的にプログラムされた取込みは、タンパク質の特性を分子的精度で仕立てることを可能にする(Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 775-82 (2006))。メタノコックス・ヤンナシイ (*Methanococcus jannaschii*) チロシル - t RNA シンセターゼ / tRNA_{cua} (MjTyrRS / tRNA_{cua}) (Steer, B. A. & Schimmel, P. Major anticodon-binding region missing from an archaeabacterial tRNA synthetase. *J Biol Chem* 274, 35601-6 (1999)、Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11020-4 (2002)、及びメタノサルシナ・バークリ (*Methanosarcina barkeri*) ピロリジル - tRNA シンセターゼ / tRNA_{cua} (MbPy1RS / tRNA_{cua}) (Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-62 (2002)、Polycarpo, C. et al. An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12450-4 (2004)、Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol* 4, 232-4 (2008))の直交性した対は、大腸菌内のアンバーコドンに反応して、さまざまな非天然アミノ酸を組み込むように進化した(Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 775-82 (2006)、Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(ep-silon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol* 4, 232-4 (2008)、Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. *J Am Chem Soc* 131, 8720-1 (2009))。しかし、普遍的な遺伝コードにおけるあらゆるトリプレットコドンがプロテオームの合成をコードするのに用いられているので、合成の遺伝コード拡張の可能性は、通常、一度に一つのタイプの非天然アミノ酸の低効率の取込みに限定される。複数の異なる非天然アミノ酸をタンパク質内に効率的にコードするためには、i) 空白コドン、及びii) 非天然アミノ酸を認識し、新規のコドンを解読する互いに直交性したアミノアシリル tRNA 合成酵素 / tRNA 対が必要とされる。ここで、本発明者らは、一連のニアドラプレットコドン及びアンバーコドンを効率的に解読する直交性リボソーム(Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol* 1, 159-66 (2005)、Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* 25, 770-7 (2007)) (ribioQ1) を合成進化させ、それが特異的に翻訳する、直交性 mRNA 上のいくつかの空白コドンを提供する(Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol* 1, 159-66 (2005))。互いに直交性したアミノアシリル tRNA 合成酵素 / tRNA 対を作製して、これらを ribioQ1 に組み合わせることによって、本発明者らは、直交性 mRNA 上の 2 つの新規の空白コドンに反応した、異なる非天然アミノ酸の取込みを指示する(図 5)。このコードを用いて、本発明者らは、コードされたアジド及びアルキン含有アミノ酸のバイオ直交性型付加環化(Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 2596-9 (2002))を介した、特異的な酸化還元非感受性のナノスケール

10

20

30

40

50

タンパク質架橋の形成を遺伝学的に指示する。使用されるシンセターゼ / tRNA 対は、多数の非天然アミノ酸を組み込むように進化している(Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 77 5-82 (2006)、Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol* 4, 232-4 (2008)、Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolylsyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. *J Am Chem Soc* 131, 8720-1 (2009))ので、このアプローチを用いて、200を超える非天然アミノ酸の組合せをコードすることが可能であろう。rib o - Q 1 10 は一連のクアドラプレットコドンを独立して解読するので、この研究は、細胞における非天然ポリマーのコードされた合成及び合成進化のための基礎をなす技術を提供する。

【0082】

リボソームは、拡張アンチコドン tRNA を解読するために、拡張アンチコドン tRNA をその解読センターに収容しなければならない(Atkins, J. F. & Bjork, G. R. A gripping tale of ribosomal frameshifting: extragenic suppressors of frameshift mutations spotlight P-site realignment. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 178-210 (2009)、Stahl, G., McCarty, G. P. & Farabaugh, P. J. Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Bioc hem Sci* 27, 178-83 (2002))。天然のリボソームは、クアドラプレット解読の効率が非常に悪く、クアドラプレット解読に向けた進化もできない(図 6)。それは、プロテオームの誤読を増大させるであろう。対照的に、直交性リボソーム(Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol* 1, 159-66 (2005)) 20 は、直交性メッセージに特異的に向けられたものであって、プロテオームを合成する原因とならず、原理的に、直交性メッセージ上のクアドラプレットコドンを効率的に解読するように進化させ得る。クアドラプレット解読を強化する進化した直交性リボソームを発見するために、本発明者らは、最初に、rib o - X (直交性メッセージ上でアンバーコドンを効率的に解読するように以前に進化した直交性リボソーム(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* 25, 770-7 (2007))) の 16 30 S rRNA における 11 の飽和変異誘発ライブラリーを作製した(併せて、これらのライブラリーは、解読センター内で結合した tRNA の 12 以内にある 127 ヌクレオチドをカバーしている(Selmer, M. et al. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935-42 (2006))) (図 7)。本発明者らは、直交性 mRNA 上のアンバーコドンを効率的に解読する能力を維持しながら、クアドラプレットコドンを効率的に解読する能力を獲得し、それによって、その直交性リボソーム上で解読できる追加コドンの数が最大になる、進化した直交性リボソームを発見することを望んでいたので、本発明者らは、ライブラリー作製の出発点としてrib o - X を用いた。

【0083】

拡張アンチコドン tRNA を用いて効率的にクアドラプレットコドンを解読する直交性リボソームを選択するために、本発明者らは、各 O - リボソームライブラリーをレポーターコンストラクト(O - C A T (A A G A 1 4 6) / tRNA^{S e r 2} u c u u)と組み合わせた。このレポーターは、O - リボソーム(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* 25, 770-7 (2007))、インフレームの A A G A クアドラプレットのコドン、及び tRNA^{S e r 2} u c u u (大腸菌セリル - tRNA シンセターゼによってアミノアシル化され、A A G A コドンを解読する、tRNA^{S e r 2} の設計されたバリエント(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* 25, 770-7 (2007)、Magliery, T. J., Anderson, J. C. & Schultz, P. G. Expanding the genetic code: selection of efficient suppressors of fou 40 50

r-base codons and identification of "shifty" four-base codons with a library approach in *Escherichia coli*. J Mol Biol 307, 755-69 (2001))によって特異的に翻訳されるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含有している。tRNA_{Ser²UCUU}が効率的にAAGAコドンを解読して、リーディングフレームを回復する場合にのみ、直交性cat遺伝子がインフレームで読まれ、クロラムフェニコール抵抗性を与える。クローンは、ribos-Xを含有する細胞を殺すクロラムフェニコール濃度で生き残り、catレポーターは4つの異なる配列を有する。クローンribos-Q4は、C1195A及びA1196Gにおける二重変異を有し、ribos-Q3は、C1195T、A1196G、及びA1197Gにおける三重変異を有し、ribos-Q2及びribos-Q1は、A1196G及びA1197Gにおける二重変異を有し、ribos-Q2は、さらに8つのプログラムされていない変異を有する。解読センター全体が変異導入されたが、選択された変異は空間的に局在しており、解読センターにおける拡張アンチコドン：コドン相互作用を収容しているのかもしれない（図1a）。進化していないリボソームに代わってribos-Qリボソームによってcat遺伝子が翻訳される場合、tRNA_{Ser²UCUU}及び2つのAGGAコドンを有するcatを含有する細胞のクロラムフェニコール抵抗性は大いに強化される（図1b、c）。実際、ribos-Qリボソームによって読まれる2つのAGGAコドンを含有する細胞のクロラムフェニコール抵抗性は野生型cat遺伝子の抵抗性に接近するものである。これは、ribos-Q1によるクアドラプレットコドン解読の効率が、トリプレット解読の効率に接近するものであり、進化していないリボソームよりはるかに大きいものであり得ることを示唆する。クアドラプレット解読効率の増強は、様々なクアドラプレットコドン-アンチコドン相互作用について維持されている（図8）。

【0084】

天然リボソームは、高いフィデリティー(fidelity)でトリプレットコドンを解読する（1コドン当たり10⁻²～10⁻⁴エラーの範囲のエラー頻度が報告されている(Khazaei, K., Buchanan, J. H. & Rosenberger, R. F. The accuracy of Q beta RNA translation. 1. Errors during the synthesis of Q beta proteins by intact *Escherichia coli* cells. Eur J Biochem 144, 485-9 (1984)、Laughrea, M., Latulippe, J., Filion, A. M. & Boulet, L. Mistranslation in twelve *Escherichia coli* ribosomal proteins. Cysteine misincorporation at neutral amino acid residues other than tryptophan. Eur J Biochem 169, 59-64 (1987)、Kramer, E. B. & Farabaugh, P. J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. Rna 13, 87-96 (2007)))。進化した直交性リボソーム及び前駆体リボソームについて、トリプレット解読及びクアドラプレット解読のフィデリティーを明確に比較するために、本発明者らは、2つの独立した方法：その遺伝子内にシステインコドンを含有していないタンパク質内への³⁵Sシステインの取込み(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007))、及び二重ルシフェラーゼシステムのバリエント(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007)、Kramer, E. B. & Farabaugh, P. J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. Rna 13, 87-96 (2007))を用いた（図9）。本発明者らは、トリプレット及びクアドラプレット解読の翻訳フィデリティーが、進化したリボソーム(ribos-Q1)及び進化していない野生型リボソームについて同じであること、並びにコドン-アンチコドン相互作用の4番目の塩基がすべてのリボソームによって等しく良く識別されることを見出す（図9）。

【0085】

ribos-Xの強化されたアンバー解読特性がribos-Q1で維持されていることを実証するために、本発明者らは、直交性リボソーム及び以前に進化させたp-ベンゾイル

10

20

30

30

40

50

- L - フェニルアラニル t RNA シンセターゼ / t RNA_{cua} 対 (Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11020-4 (2002)) (BpaRS / t RNA_{cua}) を用いて、直交性 mRNA 上のアンバーコドンに反応して、 p - ベンゾイル - L - フェニルアラニン (Bpa, 1) を組換え GST - MBP 融合体に組み込む効率を比較した (図 2) 。 Ribo - Q1 及び ribo - X は、直交性 mRNA 中のアンバーコドンに反応して、匹敵する高い効率で 1 を組み込む (図 2 a におけるレーン 4 & 6 とレーン 10 & 12 を比較) 。 Ribo - X 及び ribo - Q1 は、アンバー抑制を介して、 1 を組み込むのが、野生型リボソームより実質的に効率的である (図 2 a におけるレーン 4 & 6 とレーン 2 、及びレーン 10 & 12 とレーン 8 を比較) 。

10

【 0086 】

クアドラプレットコドンに反応して、非天然アミノ酸を組み込むための ribo - Q1 の有用性を実証するために、本発明者らは、 ribo - Q1 又は野生型リボソームを用いて、クアドラプレットコドンに反応して、 p - アジド - L - フェニルアラニン (AzPh e, 2) を、組換え GST - MBP 融合体に組み込む効率を比較した。 2 の取込みを指示するために、本発明者らは、 AzPh e RS * / t RNA_{uccu} 対 (以下に記載のように、 2 の取込みのために、 MJTyrRS / t RNA_{cua} 対に由来する pAzPh e RS - 7 / t RNA_{cua} 対のバリエント (Chin, J. W. et al. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. J Am Chem Soc 124, 9026-7 (2002)) を用いた。本発明者らは、 ribo - Q1 が、クアドラプレットコドンに反応した 2 の取込みの効率を実質的に増強すること、及び 2 つのクアドラプレットコドンに反応した 2 の取込みを初めて可能にすることさえ見出す (図 2 b におけるレーン 2 & 6 とレーン 4 & 8 を比較) 。 2 の取込みの部位とフィデリティーを、適切なトリプティックペプチドのタンデム質量分析 (MS / MS) 断片化シリーズの分析によってさらに確認した (図 11) 。

20

【 0087 】

組換えタンパク質における複数の異なる非天然アミノ酸の取込みに ribo - Q1 を利用するために、本発明者らは、互いに直交したアミノアシル t RNA シンセターゼ / t RNA 対を必要とした。本発明者らは、それぞれが様々な非天然アミノ酸を組み込むように以前に進化している (Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 775-82 (2006) 、 Neumann, H., Peak - Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. Nat Chem Biol 4, 232-4 (2008) 、 Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. J Am Chem Soc 131, 8720-1 (2009) 、 Mukai, T. et al. Adding l-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. Biochem Biophys Res Commun 371, 818-22 (2008)) 、 MbPy1RS / t RNA_{cua} 対 (Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. Science 296, 1459-62 (2002) 、 Polycarpo, C. et al. An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12450-4 (2004)) 及び MJTyrRS / t RNA_{cua} 対 (Steer, B. A. & Schimmel, P. Major anticodon-binding region missing from an archaeabacterial tRNA synthetase. J Biol Chem 274, 35601-6 (1999)) が、それらのアミノアシル化の特異性において互いに直交性していることを実証した (図 12) 。本発明者らは、一般に適用可能な一連の指向性の進化ステップによって、 MJTyrRS / t RNA_{cua} 対に由来する、 AzPh e RS * / t RNA_{uccu} 対を作製した (図 13 ~ 15) 。 MbPy1RS / t RNA_{cua} 対及び AzPh e RS * / t RNA_{uccu} 対は、互いに直交している。すなわち、それらは、異なるコドンを解読し、異なるアミノ酸を用い

30

40

50

、それらのアミノアシル化の特異性において直交している(図16)。

【0088】

単一タンパク質内への2つの有用な非天然アミノ酸の同時取込みを実証するために、本発明者らは、大腸菌で、M b P y 1 R S / M b t R N A_{C U A}対、A z P h e R S * t R N A_{U C C U}対、及びr i b o - Q 1を組み合わせた。本発明者らは、2(AzPhe)及びN 6 - [(2-プロピニルオキシ)カルボニル] - L - リジン(CAK、4、M b P y 1 R Sの効率的な基質であることを本発明者らが最近発見した(Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. J Am Chem Soc 131, 8720-1 (2009)))を含有する完全長G S T - カルモジュリンを、直交性遺伝子内のA G G A及びU A Gコドンに反応して產生させるのにこれらの構成要素を用いた(図3)。完全長タンパク質の產生は、両方の非天然アミノ酸の添加を必要とした。本発明者らは、遺伝学的にプログラムされた部位における2及び4の取込みを、両方の非天然アミノ酸を含有する単一のトリプティック断片のM S / M S配列決定によってさらに確認した(図3)。

10

【0089】

非天然アミノ酸の組合せを介して、創発的な特性がタンパク質にプログラムできることの実証を始めるために、本発明者らは、銅触媒のヒュスゲン[2+3]環化付加反応(「クリック反応」)(Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. Angew Chem Int Ed Engl 41, 2596-9 (2002))を介した、トリアゾール化合物架橋の形成を遺伝学的に指示した。本発明者らは、最初に、カルモジュリン内の位置1及び149に2及び4をコードした(図4)。これらの位置にアジド(2)及びアルキン(4)を組み込むカルモジュリンをC u (I)と5分間インキュベートした後、本発明者らは、S D S - P A G Eでより迅速に移動するタンパク質バンドを観察する。M S / M S配列決定は、このより速い移動バンドが、2と4の間のバイオ直交した環化付加反応の産物から生じることを明確に確認する。本発明者らの結果は、ナノメートルスケールのタンパク質構造を特異的に制約するのに用いることができる新規クラスの非対称的な酸化還元非感受性の架橋の遺伝学的にプログラムされた近接加速を実証する。組換えタンパク質の既存のタンパク質環化方法(Camarero, J. A., Pavel, J. & Muir, T. W. Chemical Synthesis of a Circular Protein Domain: Evidence for Folding-Assisted Cyclization. Angewandte Chemie - International Edition 37, 347-349 (1998)、Scott, C. P., Abel-Santos, E., Wall, M., Wahnon, D. C. & Benkovic, S. J. Production of cyclic peptides and proteins in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13638-43 (1999))と異なって、これらの架橋は、末端に配置するのみでなく、タンパク質内の空間的に適合するいかなる部位にもコードすることができる。固相ペプチド合成によってペプチドで利用できる化学的に多様な環化方法(Li, P. & Roller, P. P. Cyclization strategies in peptide derived drug design. Curr Top Med Chem 2, 325-41 (2002))とは対照的に、これらの架橋は、本質的にはいかなるサイズのタンパク質内にもコードすることができる。天然の治療用タンパク質及びホルモンにおけるジスルフィド結合の重要性、ペプチドステープリング戦略の有用性(Walensky, L. D. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. Science 305, 1466-70 (2004))、ペプチド環化の重要性(Trauger, J. W., Kohli, R. M., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. Nature 407, 215-8 (2000))、並びに天然化学連結によって環化されたタンパク質の安定性の改善(Camarero, J. A., Pavel, J. & Muir, T. W. Chemical Synthesis of a Circular Protein Domain: Evidence for Folding-Assisted Cyclization. Angewandte Chemie - International Edition 37, 347-349 (1998))を考慮すると、これらの架橋のコーディングを指向的な進化方法と組み合わせることによって利用できるタンパク質機能の増進を調査するのは興味深い。非天然アミノ酸の取込みのために報告され

20

30

40

50

ている多数のバリエント M j T y r R S / t R N A_{c u A} 及び M b P y l R S / t R N A_{c u A} 対(Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 775-82 (2006)、Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. Nat Chem Biol 4, 232-4 (2008)、Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysy I-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. J Am Chem Soc 131, 8720-1 (2009)) (ここに報告するステップを用いた適切なアンチコドン変換の後に)を r i b o - Q 1 と組み合わせて、組換えタンパク質内の 200 超のアミノ酸の組合せをコードすることが可能である。

10

【0090】

実験(方法の概要)

クローニング、部位特異的変異導入、及びライプラリー構築のための方法は、補足の材料に記載されている。r i b o - X⁹ を発見する戦略の改変を用いて、クアドラプレットサブレッサーを求めて、リボソームライプラリーをスクリーニングした。

20

【0091】

すべてのタンパク質発現実験において、適切な抗生物質及び非天然アミノ酸を補った LB 培地を用いて、大腸菌 g e n e h o g s 又は D H 1 0 B を用いた。タンパク質は、公表されている標準的なプロトコールを用いて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。

20

【0092】

進化した O - リボソームの翻訳フィデリティーは、³⁵S 標識されたシステインの誤取り込みによって測定した(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007))。簡潔には、³⁵S システインの存在下に、O - リボソームによって G S T - M B P を産生させた。タンパク質を精製し、トロンビン (G S T と M B P の間のリンカーを切断する) で切断し、S D S - P A G E 及びホスホイメージングによって分析した。改変二重ルシフェラーゼアッセイを用いて、O - リボソームの翻訳フィデリティーを測定した(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007))。このアッセイにおける不活性化ミスセンス変異を含有するルシフェラーゼ変異体からのルミネッセンスが、リボソームの翻訳不正確性の尺度である。D L R を O - リボソームによって翻訳し、寒冷下で抽出し、二重ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega社製) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

30

【0093】

タンパク質の L C / M S / M S は、NextGen Science社 (Ann Arbor, USA) が行った。タンパク質を、クマシ染色された S D S - P A G E ゲルから切り出し、トリプシンで消化し、L C / M S / M S によって分析した。総タンパク質質量は、E S I - M S によって得た。精製タンパク質を 10 mM 重炭酸アンモニウム pH 7.5 中に透析し、1% ギ酸を含む 50% メタノール中に 1 : 1 に混合し、総質量を陽イオンモードで決定した。

40

【0094】

50 mM リン酸ナトリウム pH 8.3 中の精製タンパク質への環化反応を、1 mM アスコルビン酸、1 mM CuSO₄、及び 2 mM バトフェナントロリンの存在下で、室温で 5 分間行った。すべての方法の詳細は、補足の材料において見出すことができる。

40

【0095】

定義

「含む (comprises)」(含む (comprise)、含むこと (comprising)) という用語は、当技術分野における正常な意味を有し、すなわち、述べられた特徴又は特徴の群が含まれるが、この用語は、いかなる他の述べられた特徴又は特徴の群が存在することも除外し

50

ないと理解するべきである。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】直交性クアドラプレット解読リボソームの選択及び特性分析を示す図である。a. クアドラプレット解読リボソーム内の変異は、拡張アンチコドン tRNA によって潜在的に占有される空間に近い構造的クラスターを形成する。選択されたヌクレオチドを赤で示す。b. Ribo-Q は、クアドラプレットコドンの tRNA 解読を実質的に強化する。O-cat (AGGA103, AGGA146) 遺伝子内の AGGA コドンの解読の tRNA_{ser}²_{UCCU} 依存性増強を、漸増濃度のクロラムフェニコール (Cm) における生存によって測定した。c. b の通り、但し、アセチル化クロラムフェニコール (Ac Cm) の直接的薄層クロマトグラフィーによって CAT 酵素活性を測定する。ribo-X (Rx)、ribo-Q1-Q4 (Q1-Q4)、及び O-リボソーム (O)

【図2】ribo-Q1 存在化における、アンバーコドン及びクアドラプレットコドンに反応した、非天然アミノ酸の取込みの強化を示す図である。a. Ribo-Q1 は、ribo-X と同じように効率的に Bpa (p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン) を組み込む。ゲル全体は図10に示されている。b. Ribo-Q1 は、AzPheRS* / tRNA_{UCCU} を用いて、AGGA クアドラプレットコドンに反応する効率 AzPhe (p-アジド-L-フェニルアラニン) を強化する。GST-MBP 対 GST の比率を示すゲル並びに単一及び二重の AzPhe 取込みの MS / MS スペクトルを図11に示す。(UAG)_n 又は (AGGA)_n は、gst と malE との間のアンバーコドン又は AGGA コドンの数 (n) を示す。

【図3】直交性翻訳を介した、単一タンパク質中におけるアジド及びアルキンのコーディングを示す図である。a. 2つの非天然アミノ酸を含有する GST-CaM-His₆ (グルタチオン-S-トランスフェラーゼカルモジュリン his₆ 融合体) の発現。カルモジュリン (CaM) の位置 1 に AGGA コドンを含有し、位置 40 にアンバーコドンを含有する GST-CaM-His₆ 融合体を產生する直交性遺伝子が、AzPheRS* / tRNA_{UCCU} 及び MbPylRS / tRNA_{CUA} の存在下において、ribo-Q1 によって翻訳された。ゲル全体は図17に示されている。b. GST-MBP のリンカーフィールドへの、2つの異なる非天然アミノ酸の取込みの LC / MS / MS 分析 (2 は Y* と表示されており、4 は K* と表示されている)。

【図4】Cu(I)触媒のヒュスゲン [3+2] - 環化付加を介した、カルモジュリンの遺伝学的に指示された環化を示す図である。a. 2 及び 4 の取込みの部位を示すカルモジュリンの構造並びにそれらのトリアゾール化合物産物。画像は、Pymol (www.pymol.org) 及び pdb ファイル 4CLN を用いて作成した。b. GST-CaM-His₆-1A zPhe-149CAK は Cu(I) 触媒で特異的に環化する。AzPhe は 2、Tyr はチロシン、BocK は 3、CAK は 4 である。レーン 1 及び 2 は別々のゲルからのものである。c. LC / MS / MS はトリアゾール化合物形成を確認する。架橋を含有する二重荷電されたペプチドの MS / MS スペクトル (m/z = 1226, 6092、これは、架橋されたペプチドについて予測された質量の 1.8 ppm 以内である)。

【図5】直交性遺伝コードを合成するための戦略を示す図である。相互に直交した 2 対 (MbPylRS / MbtrNA_{CUA} 及び MjAzPheRS* / tRNA_{UCCU}) を、進化した直交性リボソーム (Ribo-Q) と組み合わせることで、直交性 mRNA (O-mRNA) 上の UAG コドン及び AGGA コドンを解読して、遺伝的にコードされた部位に 2 つの異なる非天然アミノ酸を含有するタンパク質を产生することができるシステムが作製される。UAG は、MbPylRS / MbtrNA_{CUA} によって、4 (CAK) 又は 3 (BocLys) として解読され、一方、AGGA は 2 として解読される。

【図6】直交性クアドラプレット解読リボソームの進化を示す図である。天然のリボソーム (灰色) 及び前駆体直交性リボソーム (緑色) は、トリプレットアンチコドンを有する tRNA を利用して、それぞれ、wt-mRNA (黒色) 及び直交性 mRNA (紫色) の両方におけるトリプレットコドンを解読する。拡張アンチコドン tRNA (赤色) を用い

10

20

30

40

50

たクアドラプレットコドンの解読は、両方のリボソームで低効率（薄灰色の矢）である。直交性リボソームの合成進化は、変異体（オレンジ色パッチ）の直交性リボソームが、拡張アンチコドン t RNA を用いて、直交性 mRNA 上のクアドラプレットコドンをより効率的に解読する進化したシナリオへと導く。直交性リボソームは天然の mRNA を読まず、天然のリボソームは改変されていないので、天然の mRNA 上の拡張アンチコドン t RNA の解読は影響を受けない。

【図 7】リボソーム解読センターの包括的変異誘発を示す図である。A. 結合した t RNA 及び mRNA を伴ったリボソームの小サブユニットの構造。t RNA アンチコドンのステムループが、A 部位（黄色）、P 部位（シアン）、及び E 部位（濃紺）に結合している。mRNA を紫色で示す。16S リボソーム RNA を緑色、リボソームタンパク質を灰色で示す。11のライブラリーで変異の標的にされた、解読センター内の 118 残基をオレンジ色で示す（この図は、Pymol v0.99 (www.pymol.org) 及び PDB ID 2J00 を用いて作成した）。B. 大腸菌 16S リボソーム RNA の二次構造 (www.rna.cccbb.uteas.edu)。変異の標的にされるヌクレオチドをオレンジ色にして示す。

【図 8】Ribo-Q が、異なったクアドラプレットコドンの t RNA 依存的な解読を強化することを示す図である。Ribo-X、Ribo-Q1-4、及び O-リボソームは、pRSF-O-rDNAベクターから産生された。O-cat (UAGA103、UAGA146) 中の UAGA コドンの解読の t RNA ser2UCUA 依存的な増強、O-cat (CCU103、CCCU146) 中の CCCU コドンの解読の t RNA ser2AGGG 依存的な増強、及び O-cat (AAGA146) 中の AAGA コドンの解読の t RNA ser2UCUU 依存的な増強を、漸増濃度のクロラムフェニコールにおける生存によって測定した。pRSF-O-rDNAベクター及び対応する O-cat ベクターを、GeneHog s 細胞内へと同時形質転換した。形質転換細胞を、2% グルコースを含有する SOB 培地中で 1 時間回復させ、200 ml の LB-GKT (2% グルコース、25 μg ml⁻¹ カナマイシン、及び 12.5 μg ml⁻¹ テトラサイクリンを含有する LB 培地) に播種するのに用いた。終夜培養 (37、250 r.p.m.、16 時間) の後、2 mL の細胞を遠心法 (3000 g) によってペレットにし、等容積の LB-KT (12.5 μg ml⁻¹ カナマイシン及び 6.25 μg ml⁻¹ テトラサイクリンを含有する LB 培地) で 3 回洗浄した。再懸濁したペレットを、18 ml の LB-KT に播種するのに用い、この結果得られた培養物をインキュベートした (37、250 r.p.m. の振盪、90 分間)。O-rRNA をコードしたプラスミドの発現を誘導するために、2 ml の培養物を 18 ml の LB-IKT (1.1 mM イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、12.5 μg ml⁻¹ カナマイシン、及び 6.25 μg ml⁻¹ テトラサイクリンを含有する LB 培地) に添加し、4 時間インキュベートした (37、250 r.p.m.)。50 μg ml⁻¹ クロラムフェニコールを補った LB-IKT 寒天 (1 mM IPTG、12.5 μg ml⁻¹ カナマイシン、及び 6.25 μg ml⁻¹ テトラサイクリンを含有する LB 寒天) 上にアリコート (250 μl、600 nm の光学濃度 (OD600) = 1.5) をブレーティングし、インキュベートした (37、40 時間)。

【図 9】進化したリボソームの翻訳フィデリティーが天然のリボソームのものに匹敵することを示す図である。A. ³⁵S-システインの誤取込みによって測定されたトリプレット解読の誤読頻度は、ribos-Q1、ribos-Q3-Q4、ribos-X、進化していない直交性リボソーム、及び野生型のリボソームで区別がつかない。GST-MBP を ³⁵S システインの存在下で各リボソームによって合成し、グルタチオンセファロース上で精製し、トロンビンで消化した。左のパネルは、トロンビン消化産物のクマシ染色を示す。アノテーションのないバンドは、主としてトロンビン調製物から生じる。右のパネルは、Storage ホスファーアイメジャーを用いて画像化した同じゲルのタンパク質の ³⁵S 標識化を示す。レーン 1 ~ 6 は、示されているリボソーム (P1P2 プロモーターから rRNA をドライブする pSC101* コンストラクトからリボソーム RNA が产生される) 及び p0-gst-malE (直交性リボソーム用) 又は pgst-malE (野生型リボソーム用) を含有する細胞から得られ

10

20

30

40

50

た精製タンパク質のトロンビン切断反応を示す。サイズマーカーは、着色スタンダード(Bio-Rad社製161-0305)である。この方法で測定される、rib o - Qリボソームによって翻訳されたコドン1つあたりの誤りの頻度は、 1×10^{-3} 未満であった。前駆体直交性リボソーム、rib o - X及び野生型リボソームを用いた対照実験は、本発明者らがそれらのフィデリティーに同じ限界を設定することを可能にした。この限界は、 3×10^{-5} S誤取込みを用いた以前に測定した誤り頻度(1コドンあたり 4×10^{-3} の誤り)と比較することが好ましい(Rice, J. B., Libby, R. T. & Reeve, J. N. Mistranslation of the mRNA encoding bacteriophage T7 0.3 protein. *J Biol Chem* 259, 6505-10 (1984))。B. 二重ルシフェラーゼ(dual-luciferase)アッセイで測定される、トリプレット解読におけるrib o - Q1の翻訳フィデリティーは、進化していないリボソームのものに匹敵する。この系では、C末端ホタルルシフェラーゼが、必須リジン残基をコードするコドンK529(AAA)で変異導入されている。変異遺伝子の発現から生じるホタルルシフェラーゼ活性を野生型のホタルルシフェラーゼと比較し、発現のいかなる可変性も、同時翻訳されるN末端ウミシイタケ(Renilla)ルシフェラーゼの活性を用いて正規化することによって、この変異体コドンがtRNA^{Lys}(UUU)によって誤読される程度を決定する。以前の研究は、この系で測定されたホタルルシフェラーゼ活性が、コードされた変異を含有している、より豊富なタンパク質から生じる低い活性ではなく、主として、変異体コドンに反応してリジンを誤取込みした少量のタンパク質の合成の結果生じることを実証している(Kramer, E. B. & Farabaugh, P. J. The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *Rna* 13, 87-96 (2007))。rib o - Q1のフィデリティーを検査する実験では、pSC101*-ribo-Q1、並びにpO-DLR及びそのコドン529バリエントを含有する細胞からの溶解物をアッセイした。対照実験は、pSC101*-O-ribosome、並びにpO-DLR及びそのコドン529バリエントを含有する細胞からの溶解物を用いた。C. rib o - Qのクアドラプレット解読フィデリティーは、進化していないリボソームのものに匹敵する。効率は、N末端ウミシイタケルシフェラーゼ及びC末端ホタルルシフェラーゼを有する二重ルシフェラーゼコンストラクト(Ren - FF)を用いて決定した。レポーターは、2つのルシフェラーゼの間のリンカーにクアドラプレットAGGAコドンを含むように変異導入された(Ren - AGGA - FF)。Ren - AGGA - FFを、非同族のアンチコドンSer2A tRNA(UCUA又はAGGG)及びrib o - Q又はO - リボソームのいずれかと共にDH10B細胞内に形質転換した。Ren - AGGA - FFのリードスルー効率は、ホタルルミネッセンス/ウミシイタケルミネッセンスの比率を取ることによって、測定した。このデータを、tRNAの存在下でRen - FFコンストラクトを用いた場合の同じホタルル/ウミシイタケ比で割った(調査中のAGGAコドンの外にある部位へのtRNAの影響について正規化するため)。これらの非同族tRNAによる解読のレベルを、機能が関連するtRNAによる解読の分率として得るために、これらのデータを、UCCUアンチコドンを有する機能が関連するSer2A tRNAを用いた同じ実験から得られたデータと比較した。データは少なくとも4つの試行の平均を表す。エラーバーは標準偏差を表す。D. クアドラプレット解読における4番目の塩基の特異性。O - リボソーム、許容部位におけるクアドラプレットコドンを有する、直交性rbsの制御下にあるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの遺伝子、及び大腸菌Ser2A tRNA_{UCGU}の示された組合せを発現する大腸菌DH10Bに、漸増量のクロラムフェニコールの存在下で増殖するそれらの能力について得点を付けた。活性の分率は、mRNA中の機能が関連するコドンと特定のO - リボソームとを含有する組合せに対する、細胞の最大CM抵抗性である。

【図10】rib o - Xの強化されたアンバー解読を維持した状態で、单一及び二重のUAGコドンに反応して、rib o - Q1がBpaRS/tRNA_{UCUA}依存的な非天然アミノ酸の取り込み効率を強化することを示す図である。同一条件下でグルタチオンセファロースから精製された等容積のタンパク質が各レーンに添加されている。直交性リボソームは、pSC101*-ribo-X、pSC101*-ribo-Q1から產生されている。Bpa、p - ベンゾイル -

10

20

30

40

50

L - フェニルアラニン(1)。BpaRS/tRNA_{cua}対は、6コピーのMjtRN
A_{cua}を含有するpSUPBpaから產生されている。(UAG)_nは、O-gst(UAG)_nma1E又はgst(UAG)_nma1E内のgstとma1Eとの間のアンバー終止コドンの数(n)を表す。GSTに対するGST-MBPの比率は、RF-1媒介終止に対するアンバー抑制の効率を反映する。完全長GST-MBPのバンドを示すこのゲルの一部は、本文の図2に示されている。

【図11】Ribo-Q1が、AGGAクアドラプレットコドンに反応したAzPheRS^{*}/tRNA_{uccu}非天然アミノ酸取込みの効率を強化することを示す図である。A.Ribo-Q1はpSC101^{*}-ribo-Q1から產生される。AzPhe、2.5mM 2。AzPheRS^{*}/tRNA_{uccu}対は、單一コピーのMjtRNA_{uccu}を含有するpDULE AzPheRS^{*}/tRNA_{uccu}から產生される。(AGGA)_nは、O-gst(AGGA)_nma1E又はgst(AGGA)_nma1E内のgstとma1Eとの間のクアドラプレットコドンの数(n)を表す。GSTに対するGST-MBPの比率は、フレームシフト抑制の効率を反映する。完全長GST-MBPのバンドを示すこのゲルの一部は、本文の図2に示されている。B & C。それぞれ1つ又は2つのAzPheSを組み込むトリプシン断片のMS/MSスペクトル。

【図12】MbPy1RS/MbtRNA_{cua}及びMjtYrrRS/tRNA_{cua}対は、それらのアミノアシリ化特異性が相互に直交していることを示す図である。A.MbPy1RS/MbtRNA_{cua}(ライム)及びMjtYrrRS/tRNA_{cua}(灰色)の解読ネットワーク、並びにその非天然アミノ酸を組み込む誘導体。特有の非天然アミノ酸が、シンセターゼのそれぞれによって特異的に認識され、その機能が関連するtRNAをアミノアシリ化するのに使用される。本発明者らは、MbPy1RS/tRNA_{cua}対(Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. Science 296, 1459-62 (2002)、Polycarpo, C. et al. An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 12450-4 (2004)、Hao, B. et al. A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. Science 296, 1462-6 (2002))及びMjtYrrRS/tRNA_{cua}対がそれらのアミノアシリ化特異性において互いに直交しているかどうか尋ねた。本発明者らの実験は、2つのアミノアシリルtRNAシンセターゼ/tRNA_{cua}対の間に交差アシリ化(灰色の矢)がないことを実証する(シンセターゼとtRNAの異なった組合せを用いて、myo4TAG-His₆におけるアンバーコドンを解読することによって示される通り、下記参照)。しかし、両方のtRNAとも、アンバーコドンに反応してそれらのアミノ酸の取込みを指示する。B.大腸菌DH10Bは、pMyo4TAG-His₆で形質転換された。pMyo4TAG-His₆は、位置4のアンバーコドン及びC末端ヘキサヒスチジンタグを有するマッコウクジラミオグロビンの遺伝子と、MbtRNA_{cua}又はMjtRNA_{cua}のいずれかのための発現力セットとを保持するプラスミドである。MbPy1RS又はMjtYrrRSは、それぞれpBKPy1S又はpBKMjTyrRSで提供した。MbPy1RSを発現する細胞には、シンセターゼの基質として10mM 3(BocLys)を与えた。細胞によって產生されたミオグロビン-His₆を、Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGEによって分析し、クマシー染色又はHis₆タグに対するウエスタンプロットで検出した。

【図13】クアドラプレットコドンに反応した2の遺伝学的コーディングを示す図である。A.MjAzPheRSは、その機能が関連するアンバー抑制tRNA_{cua}を2でアミノアシリ化する。2つの互いに直交したtRNAが解読するコドンを区別するため、及びクアドラプレットコドンに反応して非天然アミノ酸を取込むための対を作製するために、本発明者らは、MjtRNA_{cua}のアンチコドンをCUAからUCCUに改変して、MjtRNA_{uccu}を作製した。この後、結果として得られたtRNA_{uccu}は、もはや親MjAzPheRSの基質ではない。MjtRNA_{uccu}をアミノアシリ化するAzPheRS-7のバージョンを作製するために、本発明者らは、このtRNAのアン

10

20

30

40

50

チコドンを認識する親シンセターゼ内の 6 つの残基 (Y 230、C 231、P 232、F 261、H 283、D 286) を同定し(Kobayashi, T. et al. Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion. Nat Struct Biol 10, 425-32 (2003))、これらの残基をすべての可能な組合せへと変異導入して、 10^{-8} の可能なシンセターゼ変異体のライブラリーを作製した。Mj t RNA_{UCCU} を特異的にアミノアシル化する Az PheRS 変異体を選択するために、本発明者らは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼレポーター (pREP JY(UC CU)、pREP YC-JYCUA(Santoro, S. W., Wang, L., Herberich, B., King, D. S. & Schultz, P. G. An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. Nat Biotechnol 20, 1044-8 (2002)) に由来する) を作製した。このレポーターは、位置 111、さまざまなアミノ酸の取込みを許容する部位に 4 塩基コドン AGGA を含有している。Az PheRS / Mj t RNA_{UCCU} の非存在下又は存在下では、このレポーターは、低レベル ($30 \sim 50 \mu\text{g m}^{-1}$) のクロラムフェニコール抵抗性を与える。本発明者らは、Mj t RNA_{UCCU} との組合せにおいて、pREP JY(UCCU) 上の AGGA コドンに反応して、特異的に 2 の取込みを指示するシンセターゼバリアントを、 $150 \mu\text{g m}^{-1}$ のクロラムフェニコール上で選択した。本発明者らは、24 のシンセターゼ / tRNA_{UCCU} 対を、2 及び pREP JY(UCCU) の存在下における、それらのクロラムフェニコール抵抗性によって特徴付けた。7 つの最良のシンセターゼ / tRNA_{UCCU} の組合せは、2 及び pREP JY(UCCU) を含有する細胞に、 $250 \sim 350 \mu\text{g m}^{-1}$ のクロラムフェニコール抵抗性を与える (図 14)。2 の非存在下において、本発明者らは、いくつかのシンセターゼについて、バックグラウンドレベル ($30 \mu\text{g m}^{-1}$) の抵抗性しか観察しなかった。これは、シンセターゼ / Mj t RNA_{UCCU} 対が、クアドラプレットコドン AGGA に反応して、特異的に 2 の取込みを指示することを示す。これらの 7 つのクローニングの配列決定は、類似してはいるが、同じではない変異を明らかにした (図 14)。B. ライブラリー設計。その機能が関連する tRNA (オレンジ) に結合した Mj Ty rRS (灰色) の構造。ライブラリーで変異導入される、アンチコドンを認識するシンセターゼの残基、及び天然のアンチコドンの塩基 (G 34、U 35、A 36) が青色で示されている (図は、Pymol、www.pymol.org、及び pdb ファイル 1J1U を用いて作成された)。C. Az PheRS^{*} - 2 / Mj t RNA_{UCCU} 対による Myo4 (AGGA) - His₆ からの完全長ミオグロビンの産生は 2 の存在に依存している。このテキストの残りでは、本発明者らは、簡便のため、Mj Az PheRS^{*} - 2 を Mj Az PheRS^{*} と呼ぶ。Mj Az PheRS^{*} / tRNA_{UCCU} は、ミオグロビン遺伝子内に配置された AGGA コドンを効率的に抑制する。それぞれ位置 4 のアンバーコドン又は AGGA コドン、及び C 末端ヘキサヒスチジンタグを有するマッコウクジラミオグロビンの遺伝子と、Mj t RNA_{CUA} 又は Mj t RNA_{UCCU} のいずれかの発現カセットとを保持するプラスミドである、pMyo4TAG-His₆ 又は pMyo4AGGA-His₆ で大腸菌 DH10B を形質転換した。Mj Az PheRS 又は Mj Az PheRS^{*} は、それぞれ pBKmjAzPheRS 又は pBKmjAzPheRS^{*} で提供された。シンセターゼのための基質として 2.5 mM 2 を細胞に与えた。細胞によって産生されたミオグロビン - His₆ を、Ni²⁺ アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE によって分析し、クマシ染色で検出した。D. Mj Az PheRS^{*} / tRNA_{UCCU} は、2 で特異的に AGGA コドンを解読する。2.5 mM 2 の存在下における、Myo4 (AGGA) 及び Mj Az PheRS^{*} / tRNA_{UCCU} を発現する細胞から精製されたミオグロビン - His₆ への 2 の取込みを ESI-MS で分析した。観察されたピーク (18457.75 Da) の質量は、単一の 2 を含有するミオグロビンの計算された質量に対応している (18456.2 Da)。

【図 14】選択された Mj Az PheRS^{*} バリアントのアミノ酸依存的成長を示す図である。pBK MjAzPheRS-7 上に構築されたライブラリーからの単離株及び pREP JY(UCCU) (Mj t RNA_{UCCU} 及び位置 D 111 の AGGA コドンを有するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする) で大腸菌 DH10B を同時形質転換した。細胞

10

20

30

40

50

は、 1 mM 2 の存在下又は非存在下で 5 時間育て、非天然アミノ酸を含む、又は含まない、 $25 \mu \text{g} \text{ ml}^{-1}$ カナマイシン、 $12.5 \mu \text{g} \text{ ml}^{-1}$ テトラサイクリン及び示された濃度のクロラムフェニコールを含有する LB アガーブレート上に刺した。37 で 18 時間の後にブレートを写真撮影した。AGGA コドンに反応して、チロシン、2、及びプロパルギル-L-チロシン(図15)を組み込むための変異の配列決定は、共通の変異 Y230K、C231K、及び P232K を有するが、位置 F261、H283、及び D286 における多岐にわたる変異を有するクローニングを明らかにする。これは、アミノ酸 230、231、及び 232 がアンチコドンに対する親和性及び特異性を与えること、並びに 261、283、及び 286 はアミノ酸アイデンティティーとアンチコドンのアイデンティティーを共役させ得ることを示唆する。

【図15】選択された MJPrTyrrRS* バリアントのアミノ酸依存的成長を示す図である。MJPrTyrrRS 上に構築されたライプラリーからの単離株を用いて、図14におけるように大腸菌 DH10B を形質転換し、非天然アミノ酸依存性の成長があるかどうか試験した。MJPrTyrrRS との比較に変異を下記の表に示す。

【図16】MbPy1RS / MbtrNA_{cua} と MJAzPheRS* / tRNA_{ucc}_c の対が、異なった特有のコドンに反応して、異なった非天然アミノ酸を組み込むことを示す図である。A. 直交した 2 対 (MbPy1RS / MbtrNA_{cua} 及び MJAzPheRS* / tRNA_{ucc}_c) は、2 つの異なったアミノ酸 (N6-[tert-ブチルオキシ]カルボニル]-L-リジン及び 2) で mRNA 中の 2 つの異なったコドン (UAG 及び AGGA) を解読する。MbPy1RS は、MJtrNA_{ucc}_c をアミノアシル化せず、MbtrNA_{cua} は、MJAzPheRS* の基質とならない。B. MbPy1RS / MbtrNA_{cua} 及び MJAzPheRS* / tRNA_{ucc}_c の異なる組合せによる、マッコウクジラミオグロビンの遺伝子の位置 4 における機能が関連するコドンの抑制。図6C における記載のように、大腸菌 DH10B を pMyo4TAG-His₆ 又は pMyo4AGGA-His₆ で形質転換した。細胞に、それぞれ MbPy1RS (pBKPy1S 上) 又は MJAzPheRS* (pBKMjPheRS* 上) 及び 2.5 mM N6-[tert-ブチルオキシ]カルボニル]-L-リジン又は 5 mM 2 を提供した。細胞によって產生されたミオグロビン-His₆ を、Ni²⁺ アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE によって分析し、クマシ染色で検出した。本発明者らは、MbPy1RS 対を用いて、UAG コドンに反応した、弱い取込みを見る。この取込みは、以前に観察されたように、MJAzPheRS* の存在とは独立しており、富栄養培地の大腸菌シンセターゼによる tRNA の低レベルのバックグランドアシル化の結果として生じる。

【図17】直交した翻訳を介した、単一タンパク質におけるアジド及びアルキンのコーディングを示す図である。A. 2 つの非天然アミノ酸を含有する GST-CaM-His₆ の発現。大腸菌 DH10B を 4 つのプラスミドで形質転換した：pCDF Py1ST (MbPy1RS 及び MbtrNA_{cua} を発現する)、pDULE AzPheRS* / tRNA_{ucc}_c (MJAzPheRS* / tRNA_{ucc}_c をコードする)、pSC101*ribo-Q1、及び p-O-gst-CaM-His₆ 1AGGA 40UAG (カルモジュリン(CaM)の位置 1 の AGGA コドン及び位置 40 のアンバーコドンを含有する、直交性リボソームによって翻訳された GST-CaM-His₆ 融合体)。プラスミドを維持するための抗生物質、並びに示されている通り、2.5 mM

4 及び / 又は 5 mM 2 を含有する LB 培地中で細胞を育てた。細胞を採取し、溶解し、タンパク質を GSH ビーズ上で精製した。結合したタンパク質を、10 mM GSH を含む PBS 中に溶出し、SDS-PAGE によって分析した。このゲルの一部が、本文の図3 に示されている。この方法によって、最大 0.5 mg/L までの収率で、完全長タンパク質が產生された。

【図18】補表1：この研究で用いられたオリゴヌクレオチドを示す図である。

【0097】

これより、本発明を例示によって説明する。これらの実施例は、例示的なものと意図されており、添付の特許請求の範囲を限定するものとは意図されていない。

【0098】

10

20

30

40

50

[実施例]

プラスミド構築

以前に記載されている g s t - m a l E タンパク質発現ベクター pgst-malE 及び p0-gst-malE⁹ は、それぞれ野生型リボソーム及び直交性リボソームによって翻訳される。これらのベクターを鋳型として用いて、 g s t と m a l E オープンリーディングフレームとの間のリンカー領域に 1 つ又は 2 つのクアドラプレットコドンを含有するバリエントを構築した。

【 0 0 9 9 】

g s t と、 m a l E (pgst(AGGA)malE 及び p0-gst(AGGA)malE) との間に単一の A G G A クアドラプレットコドンを含有するベクターを作製するために、プライマー G M × 1 A G G A f 及び G M × 1 A G G A r (この研究で用いられたすべてのプライマーは補表 1 に記載されている) を用いて、 QuikChange 変異誘発 (Stratagene 社製) によって、 g s t と m a l E との間のリンカー内の T y r コドン、 T A C を A G G A に変えた。二重 A G G A 変異体を求めて、本発明者らは、さらに、プライマー G M × 2 A G G A f 及び G M × 2 A G G A r を用いたクイックチェンジ (quick change) PCR によって、 m a l E 内の 4 番目のコドンを G A A から A G G A に変異させて、ベクター pgst(AGGA)₂malE 及び p0-gst(AGGA)₂malE を作製した。質量分析用のタンパク質発現に用いられたベクター p0-gst-malE(Y252 AGGA) は、その中で、 M B P の Y 1 7 のコドンが A G G A に変異されており、プライマー M B P Y 1 7 A G G A f 及び M B P Y 1 7 A G G A r を用いた Quikchange 変異誘発 (Stratagene 社) によって作製された。

10

20

【 0 1 0 0 】

選択された O - リボソームの構成的産生のためのベクターを作製するために、クアドラプレット解読能を直交性リボソームに与える、 pRSF-OrDNA 内の変異を、 pSC101 ベースの O - r RNA 発現ベクターに移した。 pSC101^{*}-ribo-X を鋳型として用いて、プライマー s c 1 0 1 Q r 並びに s c 1 0 1 Q 1 f (R i b o - Q 1 用) 、 s c 1 0 1 Q 3 f (R i b o - Q 3 用) 、及び s c 1 0 1 Q 4 f (R i b o - Q 4 用) を用いた酵素的逆 PCR によって、 1 6 S r DNA 中に変異を導入した。

30

【 0 1 0 1 】

pDULE AzPheRS^{*} t RNA_{UCCU} (M j t RNA_{UCCU} 及び M j A z P h e R S^{*} のための遺伝子を含有し、それぞれ l p p プロモーターの制御下にある) は、 Quikchange によって、 M j t RNA_{CUA} のアンチコドンを U C C U に変え、制限酵素 Nde I 及び Stu I で pBK MjAzPheRS^{*}-2 を切断することによって得られる M j A z P h e R S^{*} - 2 遺伝子の、 pDULE MjBPARS M j t RNA_{UCCU} 上の同じ部位への連結を介して、 M j B P A - R S の O R F を M j A z P h e R S^{*} - 2 に取り替えることによって作製した。 pCDF Py1ST (構成的プロモーターから M b P y 1 R S 及び M b t RNA_{CUA} を発現するプラスミド) は、 M b P y 1 R S 及び M b t RNA_{CUA} の発現カセットを含有する PCR 産物を、 pCDF DUET-1 (Novagen) の Bam HI 及び Sal I 又は Sal I 及び Not I 部位にクローニングすることによって作製した。上記 PCR 産物は、 pBK PyIRS 及び pREP PyIT の適切な領域を増幅することによって入手した。

40

【 0 1 0 2 】

G S T と C a M の融合体をコードするプラスミドは、 p-O-gst-malE 内の M B P の O R F をヒト C a M で置き換えることによって作製した。 C a M の遺伝子を pET3-CaM (K. Nagai より寄贈) から、プライマー C a m E c o f 及び C a m H 6 H i n d r (C 末端 H i s₆ タグを付加する) を用いた PCR によって増幅し、 pO-gst-malE の Eco RI 及び Hind III 部位にクローニングした。プライマー C a M 1 a g g a f 及び C a M 1 a g g a r を用いた後続ラウンドの Quikchange 変異誘発によって、 C a M のメチオニン - 1 を A G G A に変異させた (同時に、 G S T と C a M との間のリンカーの一部を除去する) 。第 2 ラウンドの変異誘発で、プライマー C a M K 1 4 9 T A G f 及び C a M K 1 4 9 T A G r を用いて、位置 1 4 9 にアンバーコドンを導入した。立体障害のある対照を作製するために、プライマー C a M 4 0 t a g f 及び C a M 4 0 t a g r を用いる代わりに、アンバーコドンを位

50

置40に挿入した。

【0103】

リボソームライブラリー及びクアドラプレット解読レポーターの構築

pTrcRSF-O-ribo-Xを鋳型として用いた酵素的逆PCRによって、11の異なる16S rDNAライブラリーを構築した(Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. Nat Chem Biol 1, 159-66 (2005)、Stemmer, W. P. & Morris, S. K. Enzymatic inverse PCR: a restriction site independent, single-fragment method for high-efficiency, site-directed mutagenesis. Biotechniques 13, 214-20 (1992))。この結果得られたpRSF-O-rDNAライブラリーは、16S rRNA上の規定の領域内に7～13ヌクレオチドの変異を有し、補足の表1中のライブラリー構築プライマーを用いた複数ラウンドの酵素的逆PCRによって構築された。各ライブラリーは、10⁹超の多様性を有し、99%超のカバー度を確実にしている。11のライブラリーで変異導入されたヌクレオチドにはオーバラップがあり、全体として、それらはリボソームのA部位における解読センターの全表面をカバーする。

【0104】

直交性リボソームによるクアドラプレット解読のレポーターを作製するために、本発明者らは、以前に記載されているO-cat(UAGA146)/tRNA(UAGA)ベクターを鋳型として用いた(Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007))。このベクターは、1ppプロモーター及びrrnCの転写ターミネータ上に大腸菌tRNA^{Ser}^{r2}のバリエントを含有している。上記tRNAは、直交性リボソーム結合部位の下流にあるクロラムフェニコールアセチルトランスクエラーゼ(cat)遺伝子内に、改変アンチコドンと、セリン146のためのセレクターコドンを有する。Ser146は必須であり、取込みのフィデリティーを確実にする保存された触媒セリン残基である。O-cat(AAGA 103 AAGA146)/tRNA(UCUU)を作製するために、位置146及び103にAAGAコドンを導入し、プライマー-CAT146AGGAf、CAT146AGGAr、及びCAT103AGGAf、CAT103AGGArを用いたQuik change変異誘発によって、tRNAのアンチコドンをUCUUに変換した。クアドラプレットコドンAGGA、CCCCUを含有するO-catレポーター(プライマー-CAT146CCCCUf、CAT146CCCCUr、並びにCAT103CCCCUf及びCAT103CCCCUrを用いる)及び対応するtRNA(Ser2AGGAf、Ser2AGGAr、Ser2CCCCUf、及びSer2CCCCUr)も、Quikchange変異誘発によって作製した。単一のクアドラプレットセレクターコドンを含有するレポーターは、ベクター構築過程における中間体であった。O-cat遺伝子を有するが、tRNAを欠くベクターは、O-cat内のコドンに変異導入するクイックチェンジ(Quik change)プライマー-CAT146AAGf、CAT146AGGAr、CAT103AGGAf、CAT103AGGAr、CAT146CCCCUf、CAT146CCCCUr、CAT103CCCCUf、及びCAT103CCCCUrを用いて、O-cat(UAGA146)を鋳型として用いて作製した。O-cat(UAGA146)は、tRNAカセットを含有していない。

【0105】

クアドラプレット解読が強化されている直交性リボソームの選択

クアドラプレット解読が改善されているO-リボソームを選択するために、エレクトロポレーションによって、O-cat(AAGA146)を含有しているGeneHog大腸菌(invitrogen社製)細胞を各pRSF-O-rDNAライブラリーで形質転換させた。形質転換細胞を、2%グルコースを含有するSOB培地中で1時間回復させ、200mlのLB-GKT(2%グルコース、25μg m l⁻¹カナマイシン、及び12.5μg m l⁻¹テトラサイクリンを含有するLB培地)に播種するのに用いた。終夜培養(37、250r.p.m.、16時間)の後、2mLの細胞を遠心法(3000g)によってペレットにし、等容積のLB-KT(12.5μg m l⁻¹カナマイシン及び6.25μg m l⁻¹

10

20

30

40

50

¹ テトラサイクリンを含有する L B 培地) で 3 回洗浄した。再懸濁したペレットを、 18 m l の L B - K T に播種するのに用い、この結果得られた培養物をインキュベートした (37 、 250 r . p . m . の振盪、 90 分間) 。 O - r RNA をコードしたプラスミドの発現を誘導するために、 2 m l の培養物を 18 m l の L B - I K T (1 . 1 mM イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) 、 12 . 5 μ g m l ⁻¹ カナマイシン、及び 6 . 25 μ g m l ⁻¹ テトラサイクリンを含有する L B 培地) に添加し、 4 時間インキュベートした (37 、 250 r . p . m .) 。アリコート (250 m l 、 600 nm の光学濃度 (OD₆₀₀) = 1 . 5) を連続希釈し、異なる濃度 (それぞれ、 75 μ g m l ⁻¹ 、 100 μ g m l ⁻¹ 、 150 μ g m l ⁻¹ 及び 200 μ g m l ⁻¹ 、) のクロラムフェニコールを補った L B - I K T 寒天 (1 mM IPTG 、 12 . 5 μ g m l ⁻¹ カナマイシン、及び 6 . 25 μ g m l ⁻¹ テトラサイクリンを含有する L B 寒天) 上にプレーティングし、インキュベートした (37 、 40 時間) 。

【 0106 】

クアドラプレット解読が強化している進化した直交性リボソームの特性分析

O - c a t (A A G A 1 4 6) / t R N A s e r ² (U C U U) レポータープラスミド由来の、選択された pRSF-O-rDNA プラスミドを分離するために、選択されたクローニングから総プラスミド DNA を精製し、 NotI 制限エンドヌクレアーゼで消化し、それで DH10B 大腸菌を形質転換させた。個々の形質転換体を、カナマイシン寒天及びテトラサイクリン寒天にレプリカプレーティングし、レポーターからの pRSF-O-rDNA のプラスミド分離を制限消化及びアガロースゲル分析によって確認した。

10

【 0107 】

選択された 16 S rDNA クローニングのクアドラプレット解読活性を定量化するために、選択された pRSF-O-rDNA プラスミドを、 O - c a t (A G G A 1 0 3 、 A G G A 1 4 6) / t R N A s e r ² (U C C U) と同時に形質転換した。細胞を回復させ (SOB 、 2 % グルコース、 1 時間) 、 10 mL の L B - G K T に播種するのに用い、これをインキュベートした (16 時間、 37 、 250 r . p . m .) 。この結果得られた培養物 1 m l を、 9 m l の L B - K T に播種するのに用い、これをインキュベートした (90 分、 37 、 250 r . p . m .) 。 L B - K T 培養物 1 m l を、 9 m l の L B - I K T 培地に播種するのに用い、これをインキュベートした (37 、 250 r . p . m . 、 4 時間) 。個々のクローニングを 96 ウェルブロックに移し、 0 ~ 500 μ g m l ⁻¹ の濃度のクロラムフェニコールを含有している L B - I K T 寒天プレート上に 96 ウェル用のピンツールを用いて整列させた。プレートをインキュベートさせた (37 、 16 時間) 。本発明者は、他のクアドラプレットコドン - アンチコドン対についても同様な実験を行った。

20

【 0108 】

インビトロ C A T アッセイ用の可溶性細胞溶解物を抽出するために、誘導された L B - I K T 培養物各 1 m l を 3000 g の遠心法によってペレットにした。細胞ペレットを 500 μ l の洗浄用緩衝液 (40 mM Tris - H C l 、 150 mM NaC l 、 1 mM EDTA 、 pH 7 . 5) で 3 回、 500 μ l の溶解用緩衝液 (250 mM Tris - H C l 、 pH 7 . 8) で 1 回洗浄した。 200 μ l の溶解用緩衝液中の細胞を、ドライアイス / エタノール中の瞬間冷凍及びそれに続く 50 ウォーターバス内の急速解凍 5 サイクルによって溶解させた。細胞破片を遠心法 (12000 g 、 5 分) によって溶解物から除去し、上側 150 μ l の上清を 20 度凍結させた。溶解物中の C A T 活性をアッセイするために、 10 μ l の可溶性細胞抽出物を 2 . 5 μ l の FAST CAT Green (デオキシ) 基質 (Invitrogen 社製) と混合し、プレインキュベートした (37 、 5 分) 。 2 . 5 μ l の 9 mM アセチル - C o A (Sigma 社製) を添加し、インキュベートした (37 、 1 時間) 。冰冷酢酸エチルの添加 (2001 、ボルテックス 20 秒間) によって反応を停止させた。水相及び有機相を遠心法 (12000 g 、 10 分) によって分離し、上側 100 μ l の酢酸エチル層を収集した。収集された溶液 1 μ l を、クロロホルム : メタノール (85 : 15 v o l / v o l) 中の薄層クロマトグラフィー用シリカゲル薄層クロマトグラフィープレート (Merck 社製) 上にスポット添加した。空間的に分離された基質及び産物の蛍光

30

40

50

を、ホスファーイメジヤー (Storm 860、Amersham Biosciences社製) を用いて、それぞれ 450 nm 及び 520 nm の励起波長及び発光波長で可視化及び定量化した。

【0109】

gst-malE 融合体の小規模の発現及び精製

プラスミドの適切な組合せを含有する大腸菌を、50 ml の終夜培養物からペレットにし (3000 g、10 分間)、800 μl のNovagen BugBusterタンパク質抽出試薬 (1 × プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche社製)、1 mM PMSF、1 mg ml⁻¹ リゾチーム (Sigma社製)、1 mg ml⁻¹ DNase I (Sigma社製) を補った) 中に再懸濁及び溶解し、インキュベートした (60 分、25 °C、1000 r.p.m.)。溶解物を遠心法 (6 分、25000 g、2 °C) によって清澄化した。溶解物からのGST含有タンパク質をバッチで50 μl のグルタチオンセファロースビーズ (GE Healthcare社製) に結合させた (1 時間、4 °C)。ビーズを1 ml のPBSで3回洗浄し、その後、60 μl の1 × SDS ゲル添加緩衝液中で10分間、80 °C で加熱することによって溶離を行った。全ての試料を10 %のBis-Trisゲル (Invitrogen社製) で分析した。

10

【0110】

直交性クアドラプレット解読リボソームの翻訳フィデリティーの測定

³⁵S - システイン誤取込み : pO-gst-malE 及び pSC101*-O-ribosome、pO-gst-malE 及び pSC101*-ribo-X、pO-gst-malE 及び pSC101*-ribo-Q、又は pgst-malE のいずれかを含有する大腸菌を LB 培地 (最終濃度 3 mM の ³⁵S - システイン (1000 Ci mmol⁻¹)、750 μM メチオニン、25 μg ml⁻¹ アンピシリン、及び 12.5 μg ml⁻¹ カナマイシンで補った) 中において 0.1 の OD₆₀₀ に再懸濁し、細胞をインキュベートした (3.5 時間、37 °C、2500 r.p.m.)。この結果得られた培養物 10 mL をペレットにし (5000 g、5 分間)、2 回洗浄し (洗浄 1 回あたりの 1 mL PBS)、1 % Triton-X を含有する溶解用緩衝液 1 mL に再懸濁し、インキュベートし (30 分、37 °C、1000 r.p.m.)、氷上で上下にピペッティングすることによって溶解させた。清澄化された細胞抽出物を 100 μl のグルタチオンセファロースビーズに結合させ (1 時間、4 °C) ビーズをペレットにし (5000 g、10 秒間)、1 mL の PBS で 2 回洗浄した。ビーズを 10 mL のポリプロピレンカラム (Biorad社製) に添加し、洗浄 (30 mL の PBS; 10 mL の 0.5 M NaCl、0.5 × PBS; 30 mL の PBS) した後、10 mM のグルタチオンを補った 1 mL の PBS で溶離を行った。精製された GST-MBP を 12.5 単位のトロンビンで 1 時間消化し、GST 断片及び MalE 断片を産生させた。反応物を 15 % トリクロロ酢酸で沈殿させ、SDS-PAGE ゲルに添加し、GST、MBP、及びトロンビンを分離し、InstantBlue (Expedeon社製) で染色した。GST 及び MBP タンパク質バンド中の ³⁵S 活性を、Storm ホスホリメータ (Molecular Dynamics社製) 及び ImageQuant (GE Healthcare社製) を用いて、デンシトメトリーによって定量化した。検査したリボソームそれぞれのコドンあたりのエラー頻度を、以下の通りに測定した。GST は 4 つのシステインコドンを含有しており、したがって、GST から生じる 1 秒あたりの計測数 (c.p.s., counts per second) を 4 で割ると、A、すなわちシステインの定量的な取込みあたりの c.p.s. を得る。MBP はシステインコドンを含有していないが、非システインコドンでの誤取込みが B c.p.s. を与える。GST 及び MBP は等モル量で存在するので、(A / B) × 410 は、1 残基のシステインが誤取込みされるために翻訳されるアミノ酸の数 C を与える。ここで、410 は、MBP を含有するトロンビン切断断片中のアミノ酸の数である。20 種のアミノ酸全ての誤取込みの頻度がシステインのものと同じであると仮定すると、誤取込み 1 回あたりに翻訳されるコドンの数は C / 20 であり、(C / 20)⁻¹ によって 1 コドンあたりのエラー頻度が得られる。

20

30

30

40

【0111】

二重ルシフェラーゼアッセイ : 既に特性分析されたpO-DLRは、直交性リボソーム結合部位に、5' 側のウミシイタケルシフェラーゼ (R-luc) と、3' 側のホタルルシフェラーゼ (F-luc) との間の遺伝子融合体を含有している (Wang, K., Neumann, H., Pe

50

ak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. Nat Biotechnol 25, 770-7 (2007))。pO-DLR及びそのK529コドン変種は、pSC101*-O-ribosome又はpSC101*-ribo-Q1を有する大腸菌内に導入して形質転換を行った。示されている場合、個々の実験で指定される、変異導入されたアンチコドンを有する追加大腸菌Ser2A tRNAがプラスミドp15A-tRNA-A-Ser2A上で供給された。この場合、追加のプラスミドを維持するために、25 μg ml⁻¹のテトラサイクリンをすべての培養培地に添加した。AGGAコドンを認識するサプレッサーtRNAを用いた実験では、Aで始まるコドンが後に続く、天然のAGGコドンを、プライマーDLR952AAGXf及びDLR953AGGXrを用いた、QuikChangeによって、pO-DLRのリンク領域から除去した。

10

【0112】

アンピシリン(50 μg ml⁻¹)及びカナマイシン(25 μg ml⁻¹)を補った2mLのLB中で、個々のコロニーをインキュベートし(37、250r.p.m.、36時間)、ペレットにし(5000g、5分間)、氷冷ミリポア水で洗浄し、300 μLの(1mg ml⁻¹リゾチーム、1mg ml⁻¹DNase I、10mM Tris(pH 8.0)、1mM EDTA)中に再懸濁した。細胞を氷上で20分間インキュベートし、ドライアイス上で凍結させ、氷上で解凍させた。二重ルシフェラーゼレポーター・アッセイシステム(Promega社製)を用いて、この抽出物の10 μl試料をホタルルシフェラーゼ(F-1uc)及びウミシイタケルシフェラーゼ(R-1uc)の活性に関してアッセイした。Orionマイクロプレートルミノメーター(Berthold Detection Systems社製)を用いて、リボソームレポーターの各組合せを、4つの独立した培養からアッセイし、以前の記載の通りにデータを分析した。報告している誤差は標準偏差である。

20

【0113】

Rib o - Q1によるp-アジド-L-フェニルアラニン(2)取込みの質量分析による特性分析

p-O-gst-malE(Y252AGGA)、pSC101* Ribo-Q1、及びpDULE-AzPheRS^{*} tRNA_{UCCU}を含有する大腸菌DH10Bを質量分析用のタンパク質を産生するのに用いた。タンパク質を2.5mMの存在下で発現させ、グルタチオン上で精製した。精製されたタンパク質をSDS-PAGEによって分離し、Instant Blue(Expedeon社製)で染色し、完全長GST-MBPを含有するバンドをLC/MS/MS(NextGen Science社製)による分析のために切り出した。試料を60にてDTTで還元し、室温に冷却した後、ヨードアセトアミドでアルキル化した。次いで、試料をトリプシンで消化し(37、4時間)、ギ酸の添加によって反応を停止させた。試料を、ThermoFisher社製LTQ Orbitrap XL上のナノLC/MS/MSによって分析した。30 μlの加水分解産物を5mm 75 μm ID C12(Jupiter Proteo、Phenomenex社製)ベント付きカラムに10 μl min⁻¹の流速で添加した。勾配溶出は、15cm 75 μm ID C12カラムに、300n1 min⁻¹にて、1時間の勾配で行った。質量分析計をデータ依存モードで作動させ、イオンをMS/MS用に選択した。Orbitrap MSスキャンを60000 FWHMの分解能で行った。Mascot(www.matrixscience.com)を用いてMS/MSデータの検索を行った。

30

【0114】

クアドラプレット解読MjAzPheRSの進化

pBK_MjAzPheRS-7(Chin, J. W. et al. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. J Am Chem Soc 124, 9026-7 (2002))(カナマイシン抵抗性プラスミド、GlnRSプロモーター及びターミネータ上にMjAzPheRS-7を含有している)を鋳型として使用して、アンチコドンを認識するMjAzPheRSの領域のライプラリーを作製した。2ラウンドの酵素的逆PCRで、残基Y230、C231、P232、F261、H283、及びD286のコドンをNNKにランダム化し、10⁸変異体クローンのライプラリーを作製した。pREP JY(UCCU)は、QuikChange変異誘発(Stratagene社製)によって、pREP YC-JYCUA(Santoro, S. W., Wang,

40

50

L., Herberich, B., King, D. S. & Schultz, P. G. An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. Nat Biotechnol 20, 1044-8 (2002))中のMj tRNA_{cua}のアンチコドンをCUCUAAAからCUUCCUAAに変え、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子内のアンバーコドンをA G G Aに変えることによって作製した。このプラスミドを保有する大腸菌D H 1 0 Bを変異体ライブラリーで形質転換し、1 mM 2を補ったL B - K T (25 µg m l⁻¹のカナマイシン及び12.5 µg m l⁻¹のテトラサイクリンを補ったL B 培地)中で増殖させた。1 mM 2及び50 ~ 250 µg m l⁻¹の範囲の濃度のクロラムフェニコールを含有するL B - K T プレート上に10⁹の細胞をプレーティングした。インキュベーション(36時間、37)の後、個々のクローンを、0 ~ 250 µg m l⁻¹クロラムフェニコールの存在下、1 mM 2の存在下及び非存在下における、L B - K T プレート上で2依存性増殖について試験した。アミノ酸依存性の増殖を示すクローンからのプラスミドのDNAを単離し、pREP JY(UCCU)を除去するために、Hind IIIで消化した。カナマイシン抵抗性プラスミドの形質転換及び再単離の後、DNAの配列決定を行った。

10

【0115】

他のアミノ酸を組み込むクアドラプレット解読対を選択するために、適切な開始鋳型及び非天然アミノ酸を用いて、上記の手順を反復した。

【0116】

MbPy1RS / Mb tRNA_{cua} 及び MjTyrRS / Mj tRNA_{cua} の相互直交性の調査

20

MbPy1RSの、Mj tRNA_{cua}をアミノアシル化する能力を試験するために、G1nRSプロモーター及びターミネータの制御下にMbPy1RSをコードするpBK MbPyIRS、並びに位置4にアンバーコドンを有するマッコウクジラミオグロビン及びMj tRNA_{cua}を発現するpMyo4TAG-His₆で、大腸菌D H 1 0 Bを形質転換した。細胞をL B - K T 中、37で、終夜、増殖させた。終夜培養を、10 mM N6-[(tert-ブチルオキシ)カルボニル] - L - リジン (BocLys, 3)を補った新たなL B - K T (50 ml)に1:50で接種した。37、3時間の後、0.2%アラビノースの添加によってタンパク質発現を誘導した。さらに3時間の後、細胞を採取し、PBSで洗浄した。プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche社製)、1 mM PMSF、並びに約1 mg m l⁻¹リゾチーム及び0.1 mg m l⁻¹DNAse Iを補った、1 mlのNi洗浄緩衝液(10 mM Tris / Cl、20 mMイミダゾール(imidazole)、200 mM NaCl pH 8.0)中、25で振盪することによって、タンパク質を抽出した。抽出液を遠心分離(5分、25000 g、4)で清澄化し、50 µl Ni²⁺-NTAビーズを補って、攪拌しながら、4で1時間インキュベートした。ビーズをバッチで3回、1 ml Ni洗浄緩衝液で洗浄し、200 mMイミダゾールを補った100 µlの試料緩衝液で溶出を行った。同族対相互又はMjTyrRSとMb tRNA_{cua}との間におけるアミノアシル化活性を試験するために、適切なプラスミド(pBK MjTyrRS又はpBK MbPyIRS及びpMyo4TAG-His₆又はpMyo4TAG-His₆-PyIT)及び非天然アミノ酸(3又は無し)を用いて類似の実験を行った。タンパク質を4 ~ 12% SDS-PAGEによって分析し、Instant Blueで染色した。

30

【0117】

クアドラプレット抑制AzPheRS*の特性分析

適切なpBKプラスミド及び2.5 mM 2を用いて、pMyo4TAG-His₆又はpMyo4AGGA-His₆からのミオグロビンの発現及び精製を、上記の通りに行った。タンパク質を4 ~ 12% SDS-PAGEによって分析した。

40

【0118】

ESI質量分析による、AzPheRS*でpMyo4AGGA-His₆から産生されたMyo4AzPheの特性分析

ミオグロビンは、本質的には上述の通り、しかし、11スケールでプラスミドpBK AzPh eRS*及びpMyo4AGGA-His₆を用いて、大腸菌D H 1 0 Bで発現させた。プロテアーゼ阻害剤

50

カクテル (Roche社製)、1 mM PMSF、1 mg ml⁻¹リゾチーム、及び0.1 mg ml⁻¹DNAse Iを補った30 ml Ni洗浄緩衝液中、25℃で振盪することによって、タンパク質を抽出した。遠心分離(15分、38000g、4℃)によって抽出物を清澄化し、0.3 ml Ni²⁺-NTAビーズを補って、攪拌させながら4℃で1時間インキュベートした。ビーズをカラム内に注ぎ込み、40 ml Ni洗浄緩衝液で洗浄した。結合したタンパク質を、200 mMイミダゾールを含有する同じ緩衝液の0.5 ml画分中に溶出させ、透析によって、10 mM炭酸アンモニウム、pH 7.5に再緩衝化した。50 µlの試料を、1%ギ酸を含む50%メタノール中に1:1に混合し、総質量をエレクトロスプレーイオン化を用いたLC/MS飛行時間質量分析計(Micromass社製)で決定した。試料を10 µl min⁻¹で注入し、較正を、陽イオンモードでウマ心臓ミオグロビンを用いて行った。50回のスキャンを平均し、多重荷電されたタンパク質の質量スペクトルを、MassLynxバージョン4.1(Micromass社製)を用いてデコンボリューションすることによって分子質量を得た。野生型ミオグロビンの理論上の質量は、ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)を用いて計算し、2の理論上の質量を手動で調整した。

10

【0119】

GST-MBP 234AzPhe 239CAKのMS/MS分析

大腸菌DH10BをpDULE AzPheRS^{*}/tRNA_{uccu}及びpCDF PyISTで形質転換し、対数期までLB-ST(25 µg ml⁻¹スペクチノマイシン及び12.5 µg ml⁻¹テトラサイクリン)中で増殖させた。エレクトロコンピテント細胞を調製し、直交性リボソームの構成的発現用プラスミド(pSC101^{*}Ribo-Q)及びp-O-gst(234AGGA 239TAG)malEで形質転換した。形質変換の回収物を、LB-AKST(50 µg ml⁻¹アンピシリン、12.5 µg ml⁻¹カナマイシン、25 µg ml⁻¹スペクチノマイシン、及び12.5 µg ml⁻¹テトラサイクリンを含有するLB培地)を接種するのに用いた。培養物を37℃で飽和状態まで培養し、主培養物を1:50で接種するのに用いた。細胞を37℃で終夜増殖させ、遠心分離によって採取し、-20℃で保存した。GST-MBPタンパク質を、2.5 mMの各AzPhe(2)及びCAK(4)を用いて、100 mlのスケールで発現させた。上述の通りにタンパク質を抽出及び精製した。PBSでビーズを洗浄した後に、50 mM -メルカプトエタノールを含有する100 µlの1×試料緩衝液中で、5分間、80℃に加熱することによって、タンパク質を溶離させた。タンパク質試料を4~12% SDS-PAGEによって分析し、Instant Blueで染色した。完全長GST-MBPを含有するバンドを切除し、LC/MS/MS分析(NextGen Science社による)用に提出した。

20

【0120】

GST-CaM-His₆ 1AzPhe 149CAKの環化

大腸菌DH10Bを、上述の通り、発現プラスミドp-O-gst-CaM-His₆1AGGA 149UAG又はp-O-gst-CaM-His₆ 1AGGA 40UAGを用いて、4つのプラスミドで順次に形質転換した。タンパク質を、上述の通り、5 mM 2及び2.5 mM 4を用いて、0.5 Lスケールで発現させた。細胞を抽出し、GST-CaM-His₆を、ミオグロビン-His₆について記載の通りに精製し、50 mM Na₂HPO₄、pH 8.3に対して透析を行った。環化反応を行うために、160 µlのタンパク質試料を、5 mMアスコルビン酸、5 mM CuSO₄、及び10 mMバソフェナントロリンの新しい溶液40 µlと混合した。反応物を4℃でインキュベートし、4~12% SDS-PAGEによって分析した。

30

【0121】

質量分析によって環化産物を分析するために、本発明者らは、後続の分析が容易になるように、非天然アミノ酸の取込み部位周辺に追加のトリプシン切断部位を導入した。したがって、点変異Q4K及びM146K(p-O-gst-CaM-His₆ 1AGGA 149UAGにおけるAGGAコドンに対する付番)、並びにTAGコドンの後に直接続くG₃KリンカーをQuikChangeによって導入した。タンパク質は、非常に類似した収率で、上記の通り、発現、精製、及び環化された。続いて、環化されたタンパク質をSDS-PAGEゲルから切り出し、

40

50

質量分析による分析用に提出した(NextGen Sciences社、Ann Arbor, USA)。

【0122】

(参考文献)

- 1 Xie, J. & Schultz, P. G. A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 775-82 (2006)
- 2 Steer, B. A. & Schimmel, P. Major anticodon-binding region missing from an archaeabacterial tRNA synthetase. *J Biol Chem* 274, 35601-6 (1999)
- 3 Chin, J. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L. & Schultz, P. G. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11020-4 (2002)
- 4 Srinivasan, G., James, C. M. & Krzycki, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-62 (2002)
- 5 Polycarpo, C. et al. An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12450-4 (2004)
- 6 Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins. *Nat Chem Biol* 4, 232-4 (2008)
- 7 Nguyen, D. P. et al. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. *J Am Chem Soc* 131, 8720-1 (2009)
- 8 Rackham, O. & Chin, J. W. A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat Chem Biol* 1, 159-66 (2005)
- 9 Wang, K., Neumann, H., Peak-Chew, S. Y. & Chin, J. W. Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion. *Nat Biotechnol* 25, 770-7 (2007)
- 10 Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 2596-9 (2002)
- 11 Hohsaka, T. & Sisido, M. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr Opin Chem Biol* 6, 809-15 (2002)
- 12 Ohtsuki, T., Manabe, T. & Sisido, M. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. *FEBS Lett* 579, 6769-74 (2005)
- 13 Murakami, H., Hohsaka, T., Ashizuka, Y. & Sisido, M. Site-directed incorporation of p-nitrophenylalanine into streptavidin and site-to-site photinduced electron transfer from a pyrenyl group to a nitrophenyl group on the protein framework. *Journal of the American Chemical Society* 120, 7520-7529 (1998)
- 14 Rodriguez, E. A., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8650-5 (2006)
- 15 Monahan, S. L., Lester, H. A. & Dougherty, D. A. Site-specific incorporation of unnatural amino acids into receptors expressed in mammalian cells. *Chemistry and Biology* 10, 573-580 (2003)
- 16 Anderson, J. C. et al. An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7566-71 (2004)
- 17 Atkins, J. F. & Bjork, G. R. A gripping tale of ribosomal frameshifting: extragenic suppressors of frameshift mutations spotlight P-site realignment. *Microbiology Mol Biol Rev* 73, 178-210 (2009)
- 18 Stahl, G., McCarty, G. P. & Farabaugh, P. J. Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding. *Trends Biochem Sci* 27, 178-83 (2002)

10

20

30

40

50

- 19 Selmer, M. et al. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA . Science 313, 1935-42 (2006)
- 20 Magliery, T. J., Anderson, J. C. & Schultz, P. G. Expanding the genetic code : selection of efficient suppressors of four-base codons and identification of "shifty" four-base codons with a library approach in Escherichia coli. J Mol Biol 307, 755-69 (2001)
- 21 Khazaie, K., Buchanan, J. H. & Rosenberger, R. F. The accuracy of Q beta RNA translation. 1. Errors during the synthesis of Q beta proteins by intact Escherichia coli cells. Eur J Biochem 144, 485-9 (1984) 10
- 22 Laughrea, M., Latulippe, J., Filion, A. M. & Boulet, L. Mistranslation in twelve Escherichia coli ribosomal proteins. Cysteine misincorporation at neutral amino acid residues other than tryptophan. Eur J Biochem 169, 59-64 (1987)
- 23 Kramer, E. B. & Farabaugh, P. J. The frequency of translational misreading errors in E. coli is largely determined by tRNA competition. Rna 13, 87-96 (2007)
- 24 Chin, J. W. et al. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. J Am Chem Soc 124, 9026-7 (2002)
- 25 Mukai, T. et al. Adding L-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. Biochem Biophys Res Commun 371, 818-22 (2008)
- 26 Camarero, J. A., Pavel, J. & Muir, T. W. Chemical Synthesis of a Circular Protein Domain: Evidence for Folding-Assisted Cyclization. Angewandte Chemie - International Edition 37, 347-349 (1998) 20
- 27 Scott, C. P., Abel-Santos, E., Wall, M., Wahnon, D. C. & Benkovic, S. J. Production of cyclic peptides and proteins in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13 638-43 (1999)
- 28 Li, P. & Roller, P. P. Cyclization strategies in peptide derived drug design . Curr Top Med Chem 2, 325-41 (2002)
- 29 Walensky, L. D. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. Science 305, 1466-70 (2004)
- 30 Trauger, J. W., Kohli, R. M., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. & Walsh, C. T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase . Nature 407, 215-8 (2000) 30
- 31 Stemmer, W. P. & Morris, S. K. Enzymatic inverse PCR: a restriction site independent, single-fragment method for high-efficiency, site-directed mutagenesis. Biotechniques 13, 214-20 (1992)
- 32 Santoro, S. W., Wang, L., Herberich, B., King, D. S. & Schultz, P. G. An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. Nat Biotechnol 20, 1044-8 (2002)
- 33 Rice, J. B., Libby, R. T. & Reeve, J. N. Mistranslation of the mRNA encoding bacteriophage T7 O.3 protein. J Biol Chem 259, 6505-10 (1984) 40
- 34 Hao, B. et al. A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. Science 296, 1462-6 (2002)
- 35 Kobayashi, T. et al. Structural basis for orthogonal tRNA specificities of tyrosyl-tRNA synthetases for genetic code expansion. Nat Struct Biol 10, 425-32 (2003)

【 0 1 2 3 】

上記明細書中で参照されたすべての出版物を、参照により本明細書に組み込む。本発明の範囲から逸脱していない、記載した本発明の態様及び実施形態の様々な改変及び変形が当業者には明らかであろう。特定の好ましい実施形態に関して本発明を説明したが、特許請求の範囲に記載した通りの本発明は、そのような特定の実施形態に過度に限定すべき

でないことを理解するべきである。実際、記載されている、本発明を実行するための形態の様々な改変形態が当業者には明らかであり、そのような改変形態も、添付されている特許請求項の範囲に包含されるものとする。

【 义 1 】

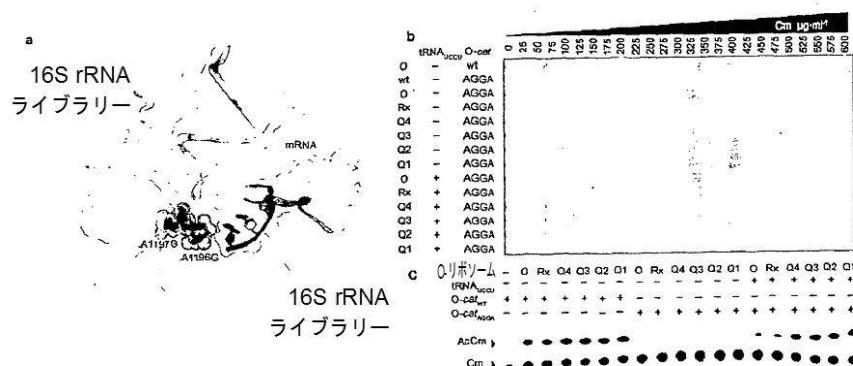


Figure 1

【図2】

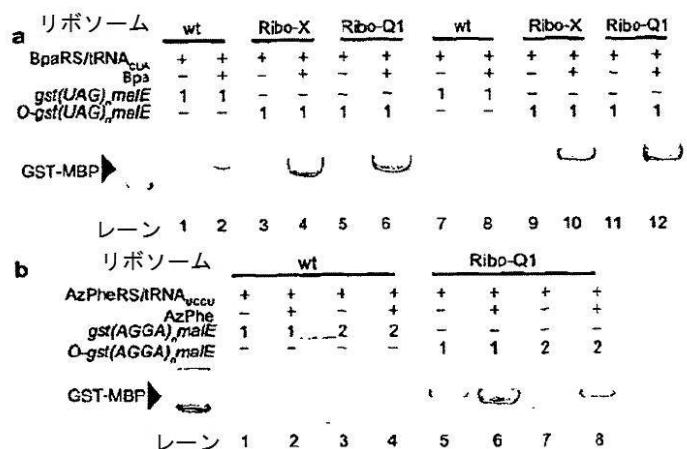
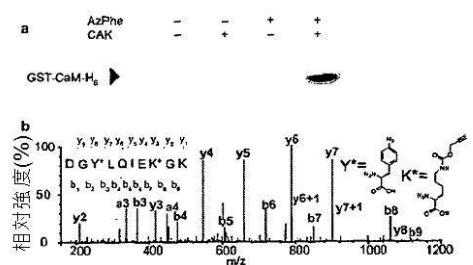


Figure 2

【図3】



【図4】

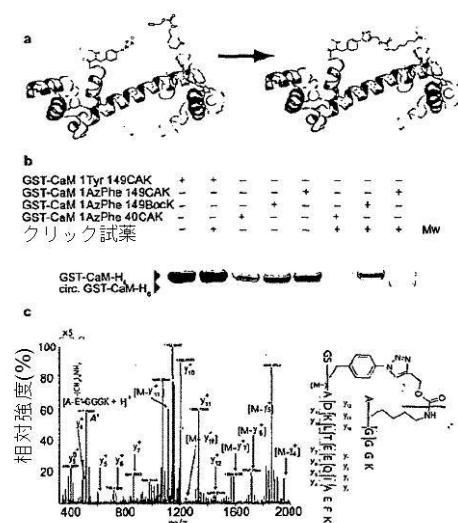


Figure 4

【図5】

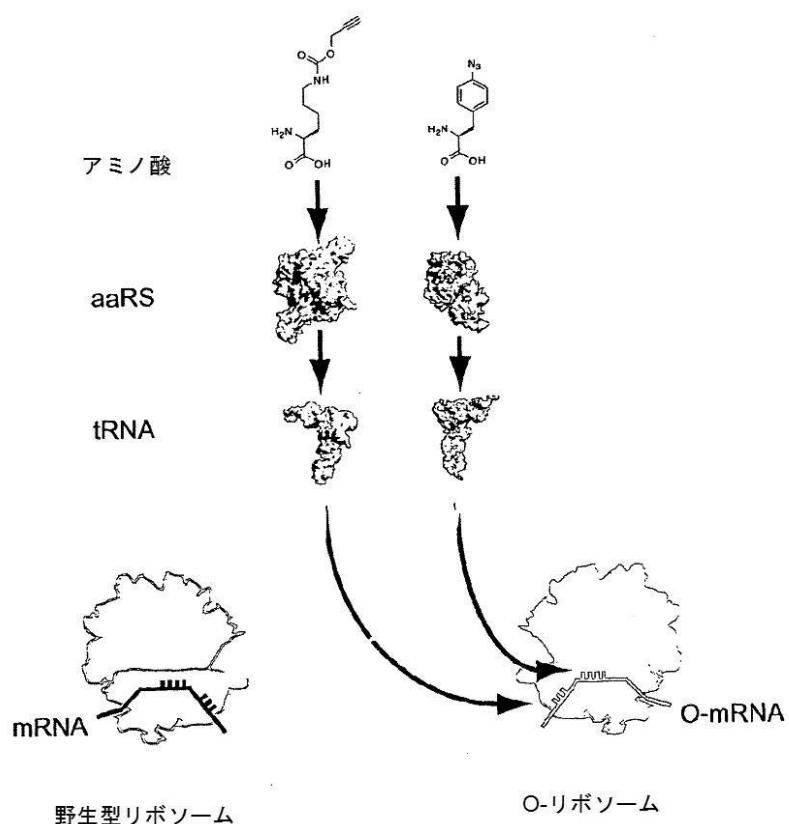


Figure 5

【図 6】

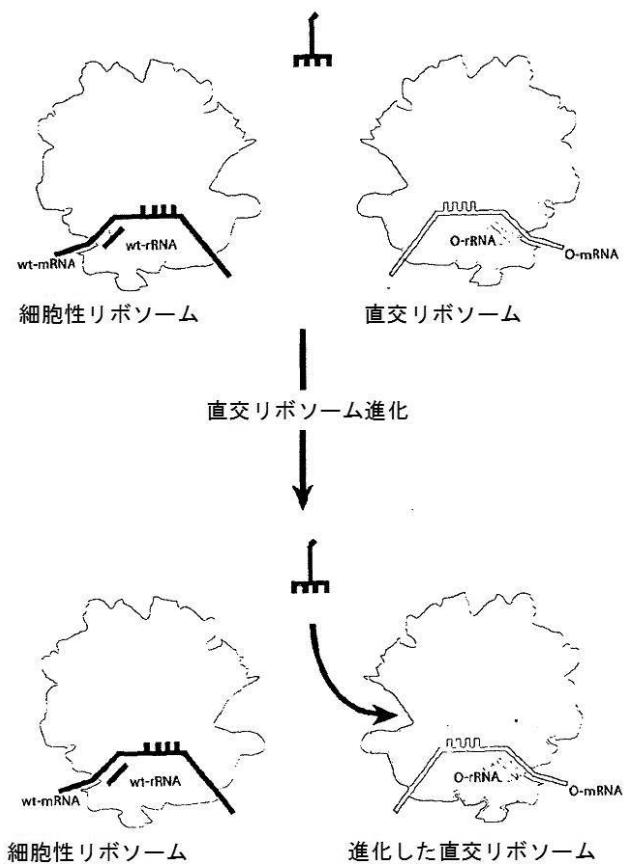


FIGURE 6

Figure 6

【図 7】

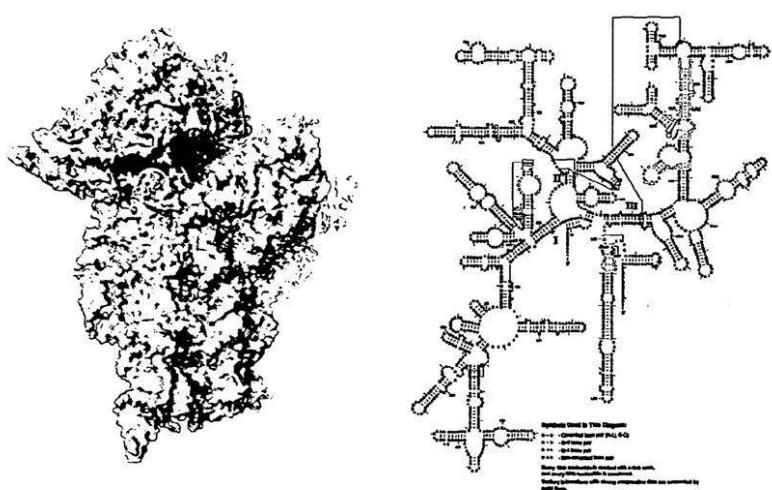


Figure 7

【図8】

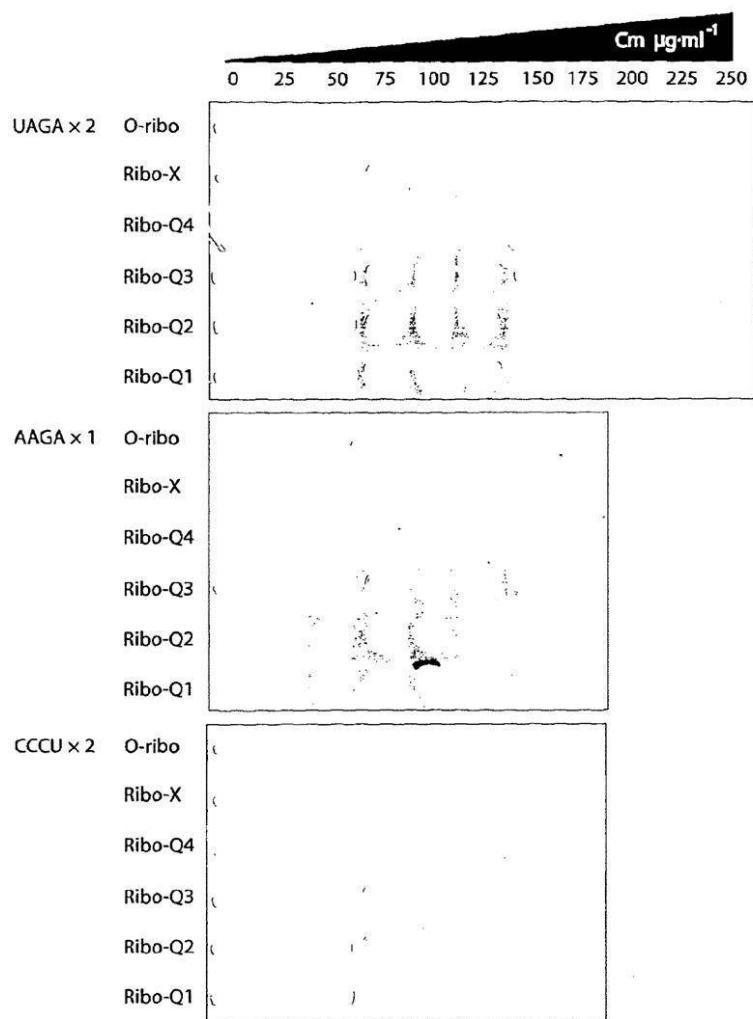


Figure 8

【図9】

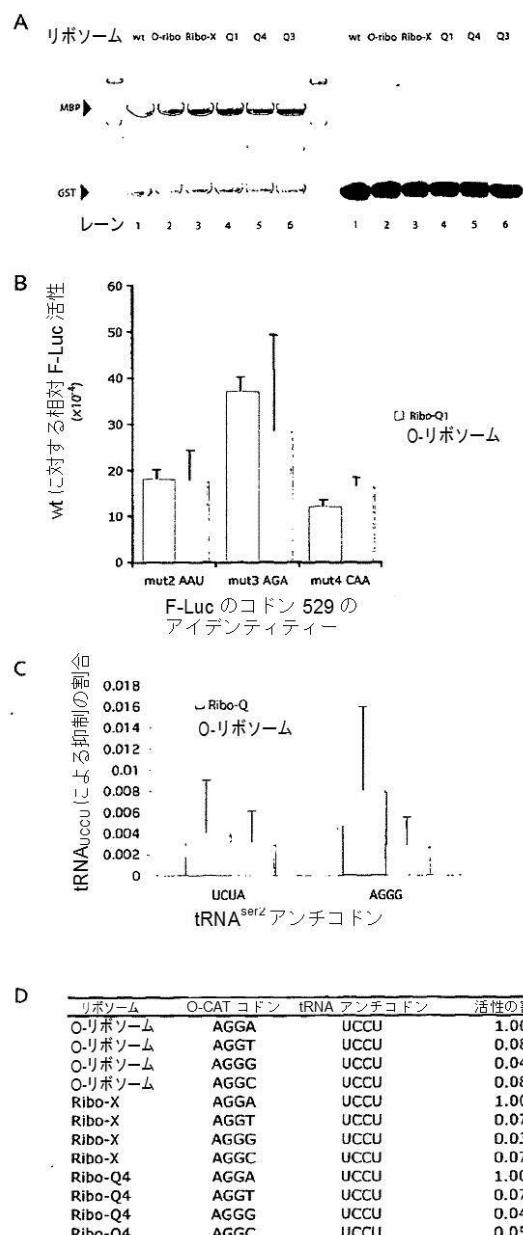


Figure 9

【図 10】

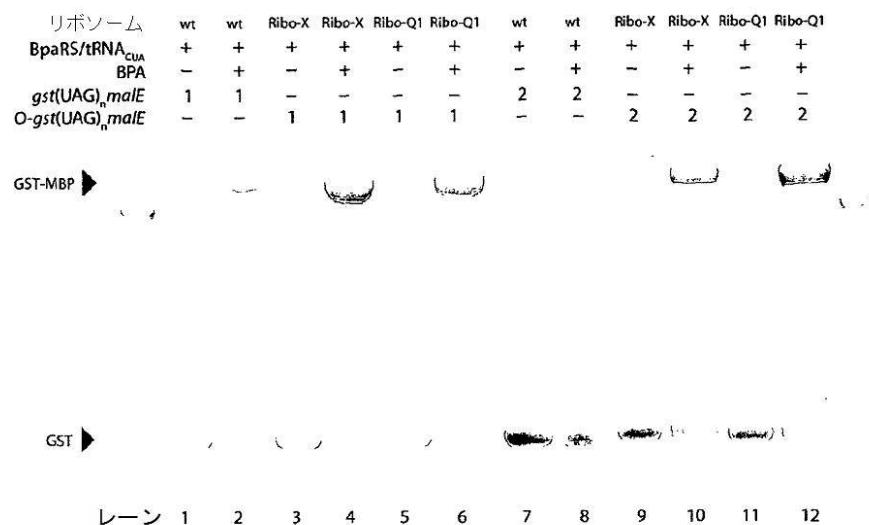


Figure 10

【図 11】

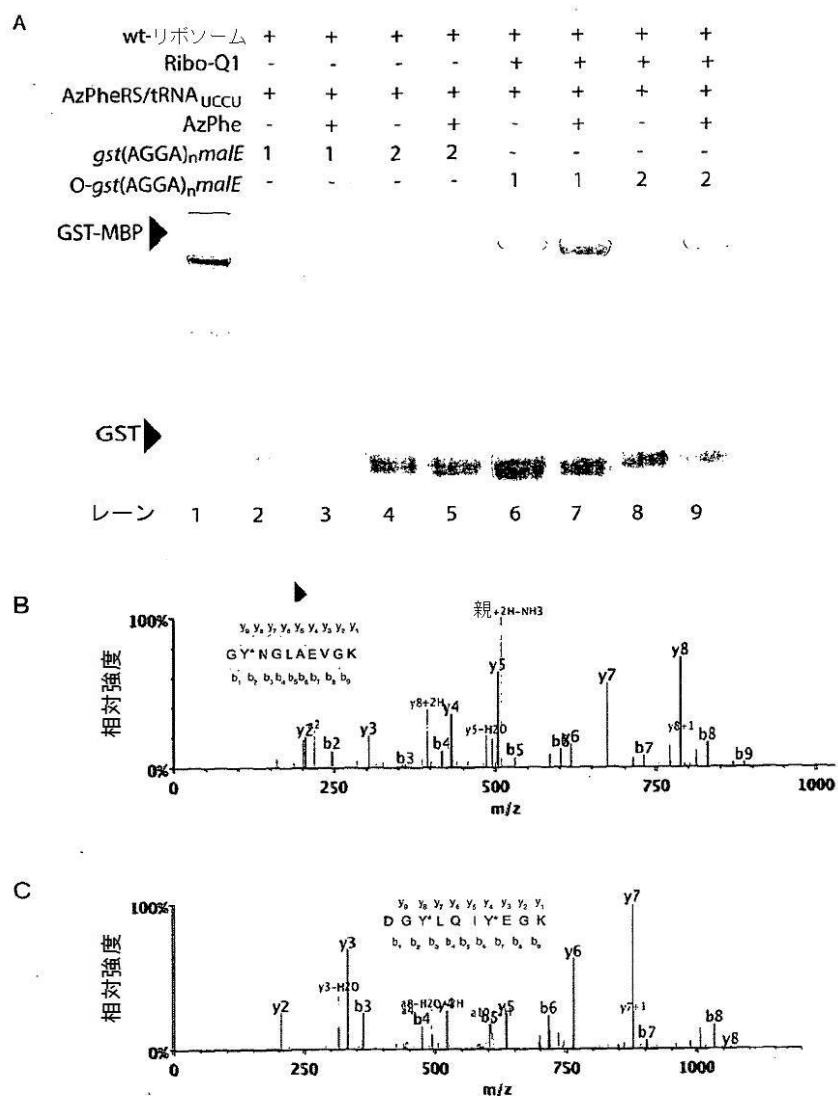
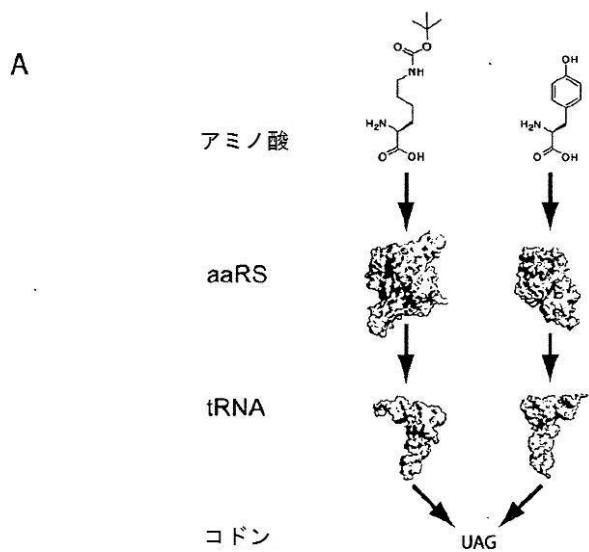


Figure 11

【図 12】



B

<i>MjTyrRS</i>	-	-	+	+
<i>MjtRNA_{CUA}</i>	-	+	-	+
<i>MbPylRS / 10 mM BocLys</i>	+	+	-	-
<i>MbtRNA_{CUA}</i>	+	-	+	-

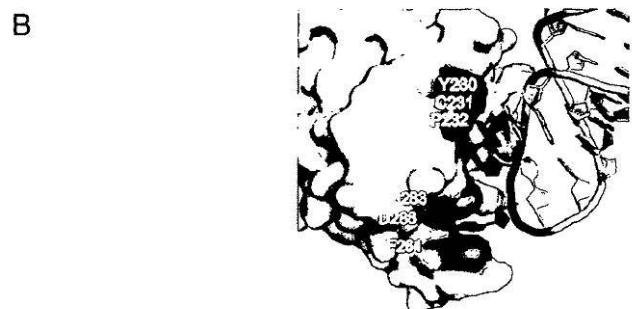
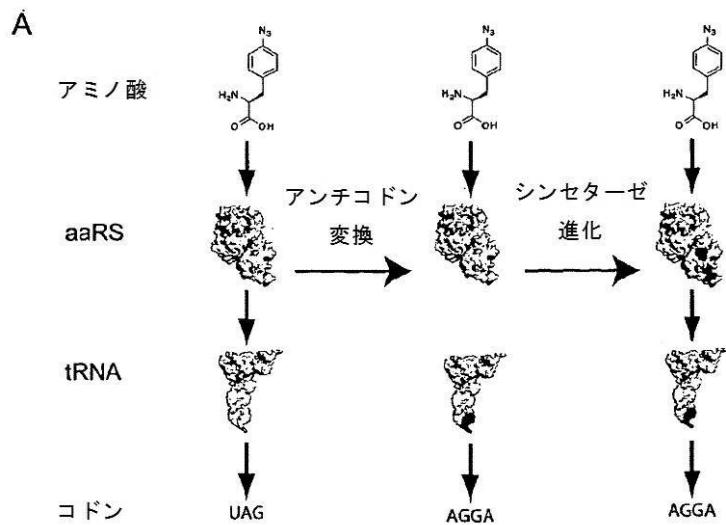
Myo ▶

クマシー

Anti-His₆

Figure 12

【図13】



C	<i>MjAzPhe-RS</i>	-	-	+	+	+	+	D
	<i>MjAzPhe-RS*</i>	+	+	-	-	-	-	
	<i>MjtRNA_{CUA}</i>	-	-	-	-	+	+	
	<i>MjtRNA_{UCGU}</i>	+	+	+	+	-	-	
	AzPhe	+	-	+	-	+	-	
	Myo4TAG	-	-	-	-	+	+	
	Myo4AGGA	+	+	+	+	-	-	

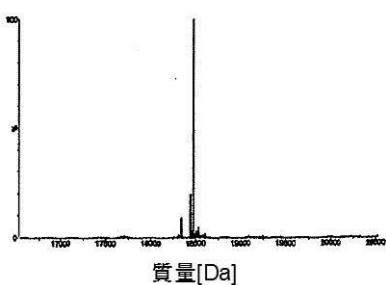
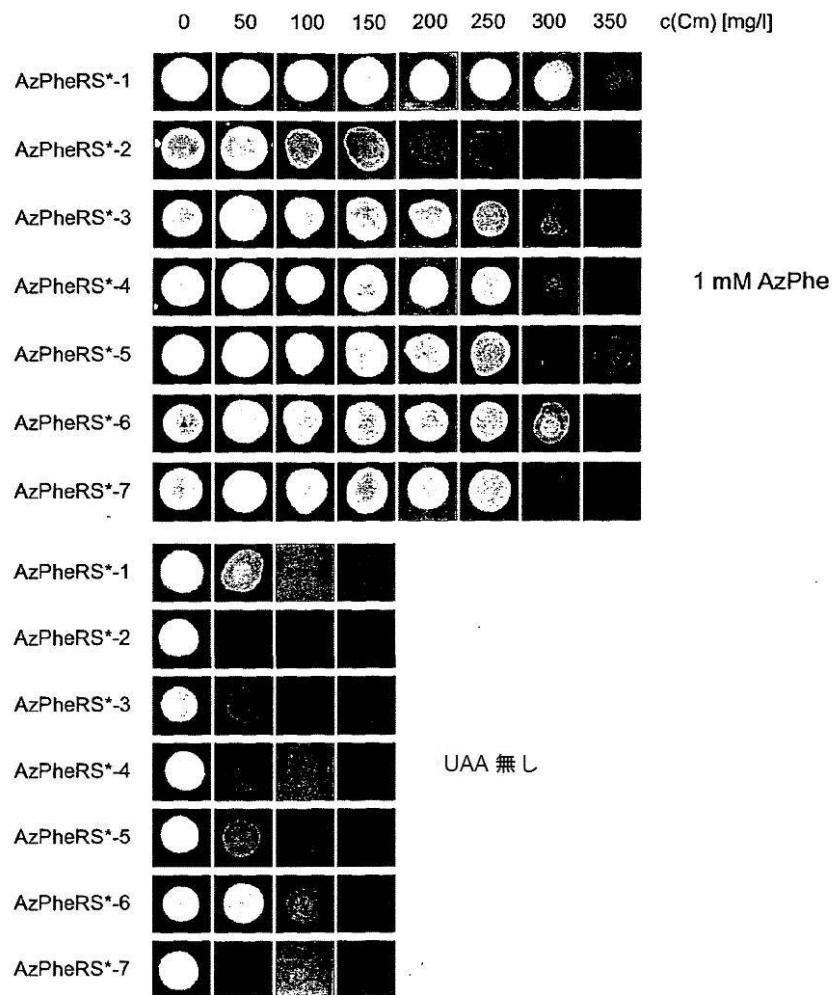


Figure 13

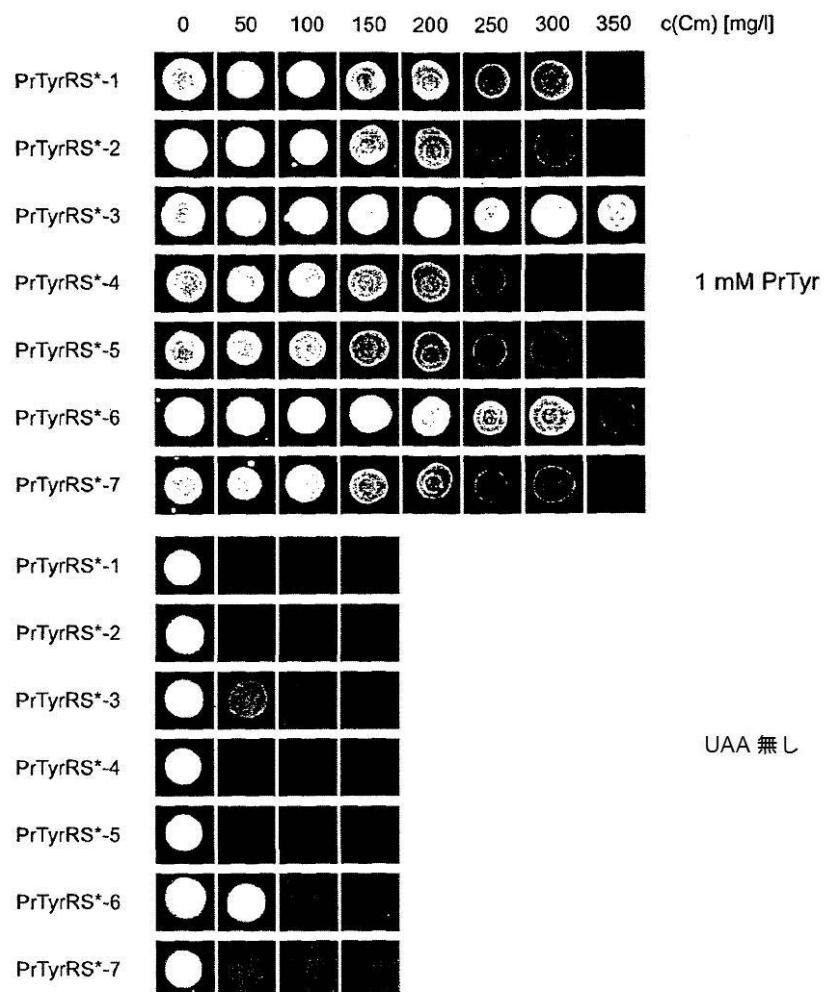
【図 14】



名称	Y230	C231	P232	F261	H283	D286
MjAzPheRS*-1	P	R	R	F	G	G
MjAzPheRS*-2	K	K	K	P	W	G
MjAzPheRS*-3	H	P	P	G	G	G
MjAzPheRS*-4	A	Q	N	G	W	E
MjAzPheRS*-5	K	K	K	T	W	P
MjAzPheRS*-6	L	S	L	P	I	S
MjAzPheRS*-7	K	K	K	F	Q	S

Figure 14

【図 15】



名称	Y230	C231	P232	F261	H283	D286
MjPrTyrRS*-1	G	G	G	Y	A	L
MjPrTyrRS*-2	G	G	G	Y	A	L
MjPrTyrRS*-3	G	G	G	Y	A	L
MjPrTyrRS*-4	M	S	G	F	G	G
MjPrTyrRS*-5	T	R	K	P	T	C
MjPrTyrRS*-6	K	K	K	G	Q	W
MjPrTyrRS*-7	R	R	K	P	T	Q

Figure 15

【図 16】

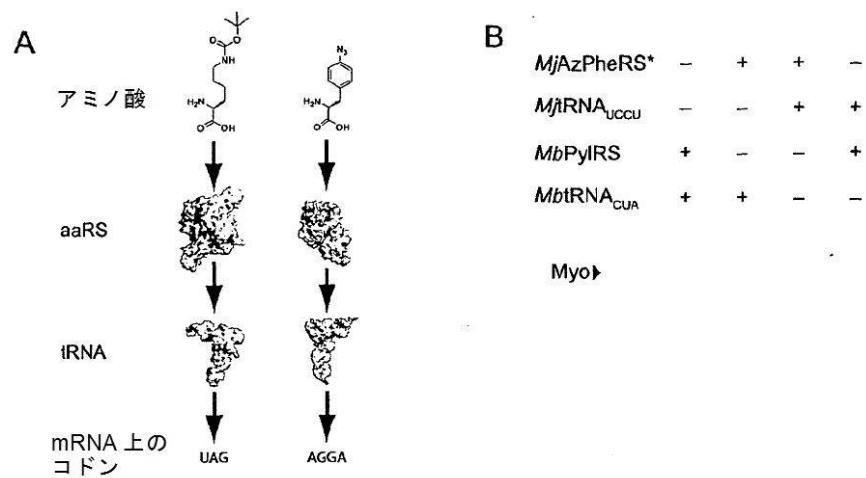


Figure 16

【図17】

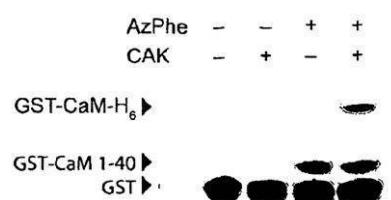


Figure 17

【図 18 - 1】

FIGURE 18

補表 1	
名称	配列 5'-3'
Lib1	516-520 + 529-535
Lib1fN7	GGAAAGGTCTCACAGCCGCNNNNNNCGGAGGGTCAAGCGTTAACCGAATTACTG
Lib1rN5	CGAAGGTCTAGCTGCNNNNNCAGTTACCGGTTCTCTCGGGTAACGTCAATG
Lib2	1405-1409 + 1491-1496
Lib2a 1405-1409	GGAAAGGTCTCACCGCCCNNNNNACATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAAC
Lib2afN5	GGAAAGGTCTCTGGTGTACAAGCCGGAACGTTACCGTGGCATTC
Lib2ar	GGAAAGGTCTCTGGTGTACAAGCCGGAACGTTACCGTGGCATTC
Lib2b 1491-1496	GGAAAGGTCTACTGGGTNNNNNTAACAAAGGTAAACGTAGGGGACCTCGGGTTGGATCATGGGATTAC
Lib2bfN6	GGAAAGGTCTCTCCAGTCATGAATCACAAGTGGTAAGGCCCTCCGAAG
Lib2br	GGAAAGGTCTCTCCAGTCATGAATCACAAGTGGTAAGGCCCTCCGAAG
Lib3	1396-1401 + 1501-1506
Lib3a 1396-1401	GGAAAGGTCTCACTGTACNNNNNNCCGTACACCATGGACTGGTTGCAAAGAAGCTAG
Lib3afN6	GGAAAGGTCTCAAGCCGGAACGTTACCGTGGCATTC
Lib3ar	GGAAAGGTCTCAAGCCGGAACGTTACCGTGGCATTC
Lib3b 1501-1506	GGAAAGGTCTCAGCTGAANNNNNAACCTAGGGGACCTCGGTTGGATCATGGGATTAC
Lib3bfN6	GGAAAGGTCTCAGCTGAANNNNNAACCTAGGGGACCTCGGTTGGATCATGGGATTAC
Lib3br	GGAAAGGTCTCAGCTGAANNNNNAACCTAGGGGACCTCGGTTGGATCATGGGATTAC
Lib4	974-975 + 954-961 + 1225-1226
Lib4ab 974+975	GGAAAGGTCTCACACCGCGNNNGAACCTTACCTGGCTTGACATCCACGGAAAGTTTC
Lib4afN6	GGAAAGGTCTCACACCGCGNNNGAACCTTACCTGGCTTGACATCCACGGAAAGTTTC
Lib4ar	GGAAAGGTCTCACACCGCGNNNGAACCTTACCTGGCTTGACATCCACGGAAAGTTTC
Lib4c 1225+1226	GGAAAGGTCTCACACGGCTNNACAGTGTACAATGGCCATAACAAAGAGAAG
Lib4cfN2	GGAAAGGTCTCACACGGCTNNACAGTGTACAATGGCCATAACAAAGAGAAG
Lib4cr	GGAAAGGTCTCACACGGCTNNACAGTGTACAATGGCCATAACAAAGAGAAG

【図 18 - 2】

FIGURE 18 CONTINUED

Lib5	962-973
Lib5fN12	GGAAAGGTCTCTGGTTTAATTNNNNNNNNNAAGAACCTTACCTGGCTTGACATCCACGGAAAGTTTC
Lib5r	GGAAAGGTCTCACACATGCTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib9	1048-1055 + 1205-1209
Lib9a 1048-1055	GGAAAGGTCTCTCGTGGAGACAGNNNNNNNTGGCTGCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTG
Lib9afN8	GGAAAGGTCTCTCGTGGAGACAGNNNNNNNTGGCTGCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTG
Lib9ar	GGAAAGGTCTCTCGTGGAGACAGNNNNNNNTGGCTGCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTG
Lib9b 1205-1209	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib9bfN5	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib9br	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10	1058-1062 + 1194-1199
Lib10a 1194-1199	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10afN5	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10ar	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10b 1058-1062	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10bfN5	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib10br	GGAAAGGTCTCACCGTCACTCCACCGCTTGCGGGCCCCGGTCAATTG
Lib11	1057-1058 + 1199-1203
Lib11a 1199-1203	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG
Lib11afN5	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG
Lib11ar	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG
Lib11b 1057-1058	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG
Lib11bfN2	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG
Lib11br	GGAAAGGTCTCACCGTCAAGNNNNATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTACAATG

【図 18 - 3】

FIGURE 18 CONTINUED

Lib12	1062-1066	+	1190-1194
Lib12a	1190-1194		
Lib12afN5	GGAAAGGTCTCAGTGGGATNNNNNAAGTCATCATGGCCCTAACGACAGGGCTACACACGTGCTAC		
Lib12ar	GGAAAGGTCTCTCACCTTCCAGTTATCACTGGCACTCTCCCTTC		
Lib12b	1062-1066		
Lib12bfN5	GGAAAGGTCTCAATTGGCTGNNNNNAGCTCGTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGAACAGAG		
Lib12br	GGAAAGGTCTCACCATGCACCCACTGCTCACGGTTCCGAAGGCCACATT		
Lib13	1053-1058	+	1199-1205
Lib13a	1053-1058		
Lib13afN6	GGAAAGGTCTCAGGTGCTNNNNNTGTCGTCAAGCTCGTGTGAAATGTTGGTTAAGTC		
Lib13ar	GGAAAGGTCTCACACTGTCTCACGGTTCCGAAGGCCACATTCTC		
Lib13b	1199-1205		
Lib13bfN7	GGAAAGCTCTCAGCCTCAAGNNNNNNNGCCCTTAACGACCCAGGGTACACACGTGCTACAATG		
Lib13br	GGAAAGGTCTCAGCACCTGTCTCACGGTTCCGAAGGCAC		
SuLib	964 965 967 968 970 971 1054 1194 1196 1197		
SuLiba	964 965 967 968 970 971 1054		
SuLibafN1	GGAAAGGTCTCTCACAGATGAGAATGTCGCTTCGGAAACCGTGAGACAGGTGCTGNATGGCTGTCGTCAAGCTCGTGTGTAATGTTG		
SuLibarN6	GGAAAGGTCTCATCTGAAAATTCCTGGATGTCAGAACAGGTAAGGTCTCGNNNNNNNCAGATTAAACCACATGCTCACCGCTTGTGGC		
SuLibb	1196 1197		
SuLibbfN3	GGAAAGGTCTCAGATGATGNCNNGTCATCATGGCCCTAACGACAGGGTACACACGTGCTACAATG		
SuLibbr	GGAAAGGTCTCTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTATCACTGGCAGTCTCCCTT		
CAT146AAGAf	TGTTCTTCTCAAGAGCCAACCCGTGGGTAGCTTC		
CAT146AAGAr	ACGGGTTGGCTCTGACGAAGAACATGTTTCGATG		

【図 18 - 4】

FIGURE 18 CONTINUED

CAT146AGGAF	TGTTCTTCTCAGGAGCCAACCCGTGGGTAGCTTC
CAT146AGGAr	ACGGGTTGGCTCTGACGAAGAACATGTTTCGATG
CAT103AGGAF	GAACACCTTCAGGAACCCCTGTGGACCGAAATACCAACGAC
CAT103AGGAr	CACAGGCTTCCCTGAAGGTTTGGCTCTGGTGAAG
CAT146CCCUF	TGTTCTTCTCCCCCTGCCAACCCGTGGGTAGCTTC
CAT146CCCUr	ACGGGTTGGCAGGGACGAAGAACATGTTTCGATG
CAT103CCCUF	GAACACCTTCCCTAGCCCTGTGGACCGAAATACCAACGAC
CAT103CCCUr	CACAGGCTAGGGGAGGGTTTGGCTCTGGTGAAG
CAT146UAGAf	TGTTCTTCTCTAGAGCCAACCCGTGGGTAGCTTC
CAT146UAGAr	ACGGGTTGGCTCTAGACGAAGAACATGTTTCGATG
CAT103UAGAf	GAACACCTTCTAGAACGCCCTGTGGACCGAAATACCAACGAC
CAT103UAGAr	CACAGGCTTCTAGAACGGTTTGGCTCTGGTGAAG
Ser2AAGAf	ACCGGTATTCTTACACCGGAGTAGGGGCAACTCTA
Ser2AAGAr	CTCCGGTGTAAAGAACCGGTCCGTCAAGCCGCTC
Ser2AGGAF	ACCGGTCTCTAAACCGGAGTAGGGGCAACTCTA
Ser2AGGAr	CTCCGGTTAGGAAGAACCGGTCCGTCAAGCCGCTC
Ser2CCCUF	ACCGGTGTAGGGTAACCCGAGTAGGGGCAACTCTA
Ser2CCCUr	CTCCGGTTACCCUACACCGGTCCGTCAAGCCGCTC
Ser2UAGAf	ACCGGTATTCTAACACCGGAGTAGGGGCAACTCTA
Ser2UAGAr	CTCCGGTGTUAGAACACCGGTCCGTCAAGCCGCTC

【図 18 - 5】

FIGURE 18 CONTINUED

sc101Q1f	GGAAAGGTCTCAGATGATGTCGGGTACATGCCCTACGACCAGGGTACACACGTGCTAC
sc101Q3f	GGAAAGGTCTCAGATGACGTTGGTCATCATGCCCTACGACCAGGGTACACACGTGCTAC
sc101Q4f	GGAAAGGTCTCAGATGACGTAAGATCAGATGCCCTACGACCAGGGTACACACGTGCTAC
sc101Qr	GGAAAGGTCTCATCCCCACCTCCAGTTATCACTGGCAGTCTC
GMx1AGGAf	CGTGACGGGAGGACTCAAATCGAAGAAGGTAACCTGGTAATCTGGATTAACG
GMx1AGGAr	TCTTCGATTTGACTCTCCGTACCGATGAATTCCGGGATC
GMx2AGGAf	GACGGGAAGACTCAAATCAGGAGAAGGTAACCTGGTAATCTGGATTAACG
GMx2AGGAr	TACCTTCTTGTATTTGACTCTCCGTACCGATGAATTCCGGGATC
MBP17AGGAf	CGATAAAGCAGGAAACGGTCTCGCTGAAGTCCGGT
MBP17AGGAr	CGAGACCGTTCTGCCTTATGCCGTTAATCCA
MBPS211tagf	ACACCGATTACTAGATCGCAGAACGTCCTTTAAT
MBPS211tagr	GCTTCTCGATCTAGTAATCGGTCTGCATTAT
MBPN234tagf	GGGCATGGTCTCAGATCGACACCAGCAAAGTGAAT
MBPN234tagr	CTGGTGTGATCTAGGACCATGCCACGGGCGTT
GMK2360f	ACGGGAGGACTCAAATCGAATAGGGTAACCTGGT
GMK2360r	CCTATTGCAATTGGAGTCCCTCCGTACCGATGAAT
GM238UAGf	CGAAAATCGAATAGGGTAACCTGGTAATCTGGATT
GM238UAGr	ACCACTTTACCCATTTCGATTTGATCCTAGAGT
MjtYAGGA2f	CGGGGGACTTCCATTATCCGATGTCCTGGT
MjtYAGGA2r	ATGGGGATTAGGAAGTCCGGTCTACCAAG
CATp111AGGAf	AATACACAGGAGTTCCCGCACGTTCTA

【図 18 - 6】

FIGURE 18 CONTINUED

CATp111AGGAf	CGGAATCTCTGTTATTCACTCCAGAG
GMAGAf	AAATCGAAAGGAGCTAAACTGGTAATCTGGATTA
GMAGAr	AGTTTACCTCTTGCATTTGAGCTACCGCTAC
Myo4AGGAf	TGGTCTGAGGAGAAGGTGAATGGCAGCTGGTCT
Myo4AGGAf	TCACCTCTCCTCAGAACCATGGTTATCCTCT
PylSbamf	CCAGGATCTGGAGTTGTCAGCCCTGTC
PylSSalr	ATGGTCCACCCCCAACGGCCCTTTTG
PylTSalf2	GCGTCGACACAGATGAGGTGTTCCACAG
PylTNotr2	TATGGGGCCCCCAGAACATATCCATGGCTC
CamEcof	CGGGAAATCAAGCTGACCAACTGACAGAACAG
CamH6indr	ACTAAGCTTAGTGATGGTGATGGCTCATCATTGTC
CaM1aggaf	GCCTGGATCCAGGAGCTGACCAACTGACAGAACAG
CaM1aggar	CTTGGTCAGCTCTGGATCCACCGGAACCCAGATC
CaMK149TAGf	TGATGACAGCATAGCATACCCATACCCATCACTAA
CaMK149TAGr	ATGGTGATGCTATGCTCATCATTGTAACAACAT
CaM40tagf	TGAGGTCGCTTACAAAAACCAACGGGAAGCAGAA
CaM40tagr	GTGGGGTTTGCTAAAGCGACCTCATACGGTGCC

【配列表】

2013514799000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2010/002296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/11 C12P21/02 ADD.		
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) C12N C12P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARK S WILSON ET AL: "Novel Archaea and Bacteria Dominate Stable Microbial Communities in North America's Largest Hot Spring", MICROBIAL ECOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 56, no. 2, 13 December 2007 (2007-12-13), pages 292-305, XP019623389, ISSN: 1432-184X abstract page 294, right-hand column, paragraph 2; figure 5	8,9
A	WO 2008/065398 A2 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; CHIN JASON [GB]; WANG KAIHANG [GB]; NEUMANN) 5 June 2008 (2008-06-05) claims 1-6	1-9
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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	Date of mailing of the international search report	
20 April 2011	03/05/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Vreugde, Sarah	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2010/002296

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUTH GREGORY W ET AL: "Using a targeted chemical nuclease to elucidate conformational changes in the E. coli 30S ribosomal subunit", BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 14, 11 April 2000 (2000-04-11), pages 4068-4074, XP002633712, ISSN: 0006-2960 page 4073, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 -----	1-9
A	WANG KAIHANG ET AL: "Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 770-777, XP002478973, ISSN: 1087-0156, DOI: DOI:10.1038/NBT1314 [retrieved on 2007-06-24] abstract -----	1-9
A	RACKHAM OLIVER ET AL: "A network of orthogonal ribosome center dot mRNA pairs", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 1, no. 3, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 159-166, XP002478971, ISSN: 1552-4450, DOI: DOI:10.1038/NCHEM0719 [retrieved on 2008-07-17] abstract -----	1-9
A	O'CONNOR MICHAEL ET AL: "Decoding fidelity at the ribosomal A and P sites: Influence of mutations in three different regions of the decoding domain in 16S rRNA", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 6, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 1185-1193, XP002478972, ISSN: 0305-1048, DOI: DOI:10.1093/NAR/25.6.1185 abstract ----- -/-	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No
PCT/GB2010/002296

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIE JIANMING ET AL: "A CHEMICAL TOOLKIT FOR PROTEINS--AN EXPANDED GENETIC CODE", NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY, MACMILLAN MAGAZINES, LONDON, GB, vol. 7, no. 10, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 775-782, XP009084566, page 777, middle column, last paragraph -----	1-9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2010/002296

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008065398	A2 05-06-2008	CA 2670588 A1	05-06-2008	EP 2099912 A2 16-09-2009

フロントページの続き

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

(74)代理人 100120086

弁理士 高津一也

(74)代理人 100131093

弁理士 堀内真

(72)発明者 チン・ジェイソン

イギリス国 シービー2 0エイチキュー ケンブリッジ ヒルズロード エムアールシーラボラトリーオブモレキュラーバイオロジー

(72)発明者 ワン・カイハン

イギリス国 シービー2 0エイチキュー ケンブリッジ ヒルズロード エムアールシーラボラトリーオブモレキュラーバイオロジー

(72)発明者 ニューマン・ハインツ

ドイツ国 ゲッティンゲン 37077 ユストゥスフォンリービッヒウェフ11 モル・ストラクトバイオル・ゲッティンゲン ゲオルクアウグストユニヴァーシティ

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA09 CA11 DA06 EA04 FA20

4B065 AA26X AA26Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA60