(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2017-532043
(P2017-532043A)
(43)公表日　平成29年11月2日(2017.11.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	C	4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 86 頁）

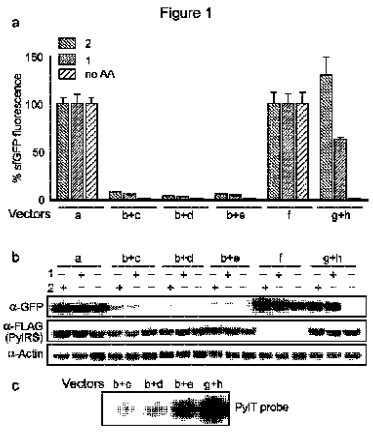
(21)出願番号　特願2017-519813 (P2017-519813)
(86)(22)出願日　平成27年10月21日 (2015.10.21)
(85)翻訳文提出日　平成29年6月6日 (2017.6.6)
(86)国際出願番号　PCT/GB2015/053141
(87)国際公開番号　WO2016/066995
(87)国際公開日　平成28年5月6日 (2016.5.6)
(31)優先権主張番号　1419109.2
(32)優先日　平成26年10月27日 (2014.10.27)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(71)出願人　597166578
メディカル　リサーチ　カウンシル
Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｕｎｃｉｌ
イギリス国　スウィンドン　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
２ｎｄ　Ｆｌｏｏｒ　Ｄａｖｉｄ　Ｐｈｉｌｌｉｐｓ　Ｂｕｉｌｄｉｎｇ，Ｐｏｌａｒｉｓ　Ｈｏｕｓｅ，Ｎｏｒｔｈ　Ｓｔａｒ　Ａｖｅｎｕｅ　Ｓｗｉｎｄｏｎ，Ｗｉｌｔｓｈｉｒｅ　ＳＮ２　１ＦＬ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】非天然アミノ酸のタンパク質への組み込み

(57)【要約】
本発明は、以下のステップを含む、真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法に関する：ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、前記所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、ステップ；ii）所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で真核細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が直交性ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びにiii）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように、真核細胞をインキュベートするステップ。本発明はまた、使用、宿主細胞、組み合わせ、及びキットに関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下のステップを含む、真核細胞において非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むための方法。
ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、前記所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、ステップ；
ii）前記真核細胞を、前記所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下でインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が、前記直交性ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに
iii）前記真核細胞を、前記直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアにより前記非天然アミノ酸を前記所望のタンパク質に組み込まれるように、インキュベートするステップ；
【請求項２】
真核細胞において、非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、前記使用。
【請求項３】
所望のポリペプチドをコードする核酸の翻訳による、前記所望のポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みの補助における使用のためのミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記核酸が、前記所望のポリペプチドへの前記非天然アミノ酸の組み込みを指示する直交性コドンを含む、前記ミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。
【請求項４】
請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド又は核酸を含む真核生物宿主細胞。
【請求項５】
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列
を含む真核生物宿主細胞。
【請求項６】
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列
をコードする核酸を含む組み合わせ又はキット。
【請求項７】
ＢｏｃＫ又はＣｙｐＫ又はＢＣＮＫなどの非天然アミノ酸をさらに含む、請求項５に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項８】
ミュータントｅＲＦ１が、野生型ｅＲＦ１対照と比較して、非天然アミノ酸の組み込みの効率の増加をもたらす、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿

主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項９】
ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０
（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｌ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（viii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（ix）Ｍ５１、Ｋ１３０
（ｘ）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xiii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１０】
ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５Ｄ
（ii）Ｎ１２９Ｐ、Ｋ１３０Ｑ
（iii）Ｔ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆ
（iv）Ｅ５５Ａ
（ｖ）Ｙ１２５Ｆ
（vi）Ｔ５８Ｋ、Ｓ６０Ｔ、Ｓ６４Ｄ、Ｌ１２５Ｆ、Ｎ１２９Ｓ
（vii）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｉ、Ｙ１２５Ｌ
（viii）Ｓ１２３Ｒ、Ｌ１２４Ｗ、Ｙ１２５Ｒ
（ix）Ｓ１２３Ｈ、Ｌ１２４Ａ、Ｙ１２５Ｇ
（ｘ）Ｍ５１Ａ、Ｋ１３０Ｍ
（xi）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｌ、Ｙ１２５Ｖ
（xii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｃ、Ｙ１２５Ｓ
（xiii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｓ、Ｙ１２５Ｓ
（xiv）Ｓ１２３Ｖ、Ｌ１２４Ｔ、Ｙ１２５Ｐ
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１１】
真核細胞が哺乳類細胞又は昆虫細胞である、請求項１、８、９、若しくは１０に記載の方法、請求項２、８、９、若しくは１０に記載の使用、請求項３、８、９、若しくは１０に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、若しくは１０に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、若しくは１０に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１２】
コドンが終止コドンであり、任意で前記終止コドンがＵＡＧである、請求項１、８、９、若しくは１０に記載の方法、請求項２、８、９、若しくは１０に記載の使用、請求項３、８、９、若しくは１０に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７

、８、９、若しくは１０に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、若しくは１０に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１３】
直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアが、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ＰｙｌＴ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを含む、請求項１、８、９、若しくは１０に記載の方法、請求項２、８、９、若しくは１０に記載の使用、請求項３、８、９、若しくは１０に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、若しくは１０に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、若しくは１０に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１４】
ｔＲＮＡが、
（ｉ）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアント、又は
（ii）ＰｙｌＴのＯｐｔバリアント、又は
（iii）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃ－Ｏｐｔバリアント
である、請求項１、８、９、若しくは１０に記載の方法、請求項２、８、９、若しくは１０に記載の使用、請求項３、８、９、若しくは１０に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、若しくは１０に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、若しくは１０に記載の組み合わせ若しくはキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、タンパク質発現、特に、非天然アミノ酸の所望のタンパク質への組み込みの一般的な分野におけるものである。
【背景技術】
【０００２】
遺伝暗号拡張は、１００個より多い非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的組み込みを可能にした。しかしながら、これらのアプローチの有用性は、非天然アミノ酸がタンパク質に組み込まれる効率によって制限され得る。非天然アミノ酸のタンパク質への効率的な翻訳時の部位特異的組み込みは、部位特異的に改変された組換えタンパク質を創製するための新たなアプローチ（Lang, K.; Chin, J. W. Chem Rev 2014, 114, 4764、Kim, C. H.; Axup, J. Y.; Schultz, P. G. Curr Opin Chem Biol 2013, 17, 412）、加えて、タンパク質機能をインビボで正確に制御し、かつ画像化するためのストラテジー（Baker, A. S.; Deiters, A. ACS Chem Biol 2014, 9, 7、Davis, L.; Chin, J. W. Nat Rev Mol Cell Biol 2012, 13, 168）、及びタンパク質機能を制御し、又は報告するためにデザイナー非天然アミノ酸が用いられる多くの他のアプローチを可能にするであろう。
【０００３】
直交性（Orthogonal）ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアは、最も一般的にはアンバー終止コドン（ＵＡＧ）に応答して、非天然アミノ酸の組み込みを指示する。非天然アミノ酸組み込みの効率は、ｉ）直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡのペアがリボソームのＡ部位においてＵＡＧコドンに応答して翻訳伸長を可能にする、それ本来の効率、及びii）終結因子が、アミノアシル化直交性ｔＲＮＡ$_{CUA}$と競合してタンパク質合成を終結させる効率の両方によって定義される。ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアが、遺伝暗号拡張のために開発される、ほぼ間違いなく最も有用なペアであり、その理由は、ｉ）それが、大腸菌（E. coli）、酵母、哺乳類細胞、エレガンス線虫（C. elegans）、及びキイロショウジョウバエ（D. melanogaster）を含む様々な宿主において直交性であること、ii）ＰｙｌＲＳが一般的な２０個のアミノ酸を認識しないこと、iii）ＰｙｌＲＳがそれの同族ｔＲＮＡ$_{CUA}$のアンチコドンを認識しないこと、iv）ＰｙｌＲＳの活性部位が、定方向進化を必要とすることなく、有用な官能基を有する様々な非天然アミノ酸に適応すること、ｖ）ＰｙｌＲＳの活性部位を、大腸菌において様々な有用な官能基を有する、構造的に多様な非天然アミノ酸を認識するように進化させる

ことができること、及びvi）大腸菌において発見されたシンテターゼバリアントが、シンテターゼの定方向進化を実行することが困難である多様な真核生物宿主において用いられ得ること（Chin, J. W. Annu Rev Biochem 2014, 83: 379）である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Lang, K.; Chin, J. W. Chem Rev 2014, 114, 4764
【非特許文献２】Kim, C. H.; Axup, J. Y.; Schultz, P. G. Curr Opin Chem Biol 2013, 17, 412
【非特許文献３】Baker, A. S.; Deiters, A. ACS Chem Biol 2014, 9, 7
【非特許文献４】Davis, L.; Chin, J. W. Nat Rev Mol Cell Biol 2012, 13, 168
【非特許文献５】Chin, J. W. Annu Rev Biochem 2014, 83: 379

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

非天然アミノ酸組み込みは、現在、大腸菌においてより真核細胞において効率が低い。真核細胞における非天然アミノ酸のタンパク質への効率的な部位特異的導入は、遺伝暗号拡張アプローチの可能性を実現することにおいて未解決の課題である。この課題に対処することにより、真核細胞における改変型組換えタンパク質の合成を可能にし、かつタンパク質の機能を真核細胞において高い空間的及び時間的正確さで制御し、かつ画像化するために新しい化学官能性をタンパク質へ導入する新たなストラテジーを増強するであろう。

【０００６】

本発明は、この必要性に対処することを目指す。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明者らは、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において発現する所望のタンパク質へ１個又は２個以上の非天然アミノ酸を効率的に組み込むための直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡのペアに基づいた発現系を開発した。有利には、本明細書に記載された発現系は、そのような細胞において非天然アミノ酸組み込みの効率を増加させる。

【０００８】

加えて、本発明者らは、ｅＲＦ１（通常は哺乳類細胞において全ての３個の終止コドンで翻訳を終結させる）を、他の終止コドンのリードスルーを増加させることなく、ＴＡＧコドンに応答した非天然アミノ酸組み込みの実質的（substantial）増加をもたらすように改変した。本明細書に提示されたデータは、天然ｅＲＦ１が全ての３個の終止コドンを認識するにも関わらず、アンバー終止コドンに応答した真核細胞における非天然アミノ酸組み込みの効率を、オパール又はオーカー終止コドンのリードスルーを増加させることなく、選択的に増強するようにｅＲＦ１を改変することが可能であるという初めての実証を提供している。

【０００９】

終結因子は、大腸菌発現系などの原核生物系において存在する。ｔｓＲＦ１などの温度感受性終結因子は、原核生物発現系におけるアンバーサプレッションの一過性増加について研究されてきた。細菌ＲＦ１のｒＲＮＡとの相互作用は、原核生物系においてｒＲＮＡの５３０ループに特定されている。例えば、国際公開第２００８／０６５３９８号パンフレットは、４ページの３１～３５行目にこの相互作用に言及している。しかしながら、大腸菌から、本発明の対象である真核生物系への移行はない。原核生物タンパク質と真核生物タンパク質の間には、それらの名前は別として、直接的類似性はない。

【００１０】

非常に異なる細菌タンパク質由来のミュータントを、本発明の対象である真核生物タンパク質へ移すことはできない。原核生物系において、異なるＲＦタンパク質は異なる生物学的機能を実行し、真核生物系と比較して、非常に異なる生物学を有する「スプリット機

能」構成となっている。対照的に、真核生物系において、単一のｅＲＦ１タンパク質が、複数の終結機能を提供する。したがって、哺乳類ｅＲＦ１タンパク質は、原核生物系における終結因子タンパク質とは技術的に非常に異なると考えることができる。それゆえに、ＲＦ１機能の選択的破壊によりアンバーコドンに応答した非天然アミノ酸組み込みを増強するために大腸菌において開発されたストラテジー（Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W. Nat Biotechnol 2007, 25, 770、Mukai, T.; Hayashi, A.; Iraha, F.; Sato, A.; Ohtake, K.; Yokoyama, S.; Sakamoto, K. Nucleic Acids Res 2010, 38, 8188、Johnson, D. B.; Xu, J.; Shen, Z.; Takimoto, J. K.; Schultz, M. D.; Schmitz, R. J.; Xiang, Z.; Ecker, J. R.; Briggs, S. P.; Wang, L. Nat Chem Biol 2011, 7, 779、Lajoie, M. J.; Rovner, A. J.; Goodman, D. B.; Aerni, H. R.; Haimovich, A. D.; Kuznetsov, G.; Mercer, J. A.; Wang, H. H.; Carr, P. A.; Mosberg, J. A.; Rohland, N.; Schultz, P. G.; Jacobson, J. M.; Rinehart, J.; Church, G. M.; Isaacs, F. J. Science 2013, 342, 357、Wu, I. L.; Patterson, M. A.; Carpenter Desai, H. E.; Mehl, R. A.; Giorgi, G.; Conticello, V. P. Chembiochem 2013, 14, 968）は、真核生物系に拡張することはできない。ある特定のｅＲＦ１ミュータントが当技術分野において知られている。これらのミュータントは、ｅＲＦ１機能を研究しようと試みる過程において単に記載されている。その開示は、ｅＲＦ１生物学の学術研究に焦点を合わせている。対照的に、本発明者らは、非天然アミノ酸のタンパク質への組み込みにおけるある特定のｅＲＦ１ミュータントの使用を初めて教示する。実際、非天然アミノ酸が、真核細胞において、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアを用いてタンパク質に部位特異的に組み込まれる効率を増強するように真核生物翻訳機構を改変する報告は知られていない。アンバーコドン発現系におけるｅＲＦ１ミュータントの有用性に気付いたのは本発明者らが初めてである。

【００１１】

したがって、本発明者らが、ｅＲＦ１ミュータントの使用によりアンバーコドンの抑制の増強を初めて、教示していることが本発明の利点である。したがって、本発明者らが、アンバーコドンの抑制の増強におけるｅＲＦ１ミュータントの使用を初めて、教示していることが本発明の利点である。

【００１２】

有利には、改善された発現系を改変されたｅＲＦ１と組み合わせることにより、単一の非天然アミノ酸を有するタンパク質の収量が、１７～２０倍に増加する。非天然アミノ酸を含有するタンパク質を、終止コドンを含有しない遺伝子から産生されるタンパク質に匹敵する収量で、産生することができる。さらに、改善された系は、複数の部位（例えば、３つ又は４つ以上の部位）に非天然アミノ酸を組み込むタンパク質の収量を、測定不可能な低レベルからアンバー停止なしの対照の４３％まで増加させる。このアプローチは、部位特異的に改変された治療用タンパク質の効率的な産生、及びタンパク質機能の画像化又は合成調節を可能にする、非天然アミノ酸を有するバージョンによる標的細胞タンパク質の量的置換を可能にし得る。

【００１３】

有利には、本開示は、真核細胞における部位特異的に改変された治療用タンパク質の効率的な産生、加えて、タンパク質機能の画像化又は合成調節を可能にする、非天然アミノ酸を有するバージョンによる標的細胞タンパク質の量的置換を可能にし得る。

【００１４】

したがって、一態様において、本発明は、真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法であって、

ｉ）直交性（Orthogonal）ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、前記所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、

ステップ；
ii）所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、真核細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が直交性ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに
iii）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように、真核細胞をインキュベートするステップ
を含む、方法を提供する。

【００１５】

一態様において、本発明は、真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％、より適切には６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、使用に関する。

【００１６】

一態様において、本発明は、所望のポリペプチドをコードする核酸の翻訳による、前記所望のポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みの補助における使用するためのミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％、より適切には６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記核酸が、前記所望のポリペプチドへの前記非天然アミノ酸の組み込みを指示する直交性コドンを含む、ミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸に関する。

【００１７】

一態様において、本発明は、上記のようなミュータントｅＲＦ１ポリペプチド又は核酸を含む真核生物宿主細胞に関する。

【００１８】

一態様において、本発明は、以下を含む真核生物宿主細胞に関する：
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％、より適切には６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列。

【００１９】

一態様において、本発明は、以下をコードする核酸を含む組み合わせ又はキットに関する：
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％、より適切には６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列。

【００２０】

一態様において、本発明は、ＢｏｃＫ又はＣｙｐＫ又はＢＣＮＫ；より適切にはＢｏｃＫ又はＣｙｐＫなどの非天然アミノ酸をさらに含む、上記のような真核生物宿主細胞又は上記のような組み合わせ若しくはキットに関する。

【００２１】

適切には、前記ミュータントｅＲＦ１は、野生型ｅＲＦ１対照と比較して、非天然アミノ酸の組み込みの効率の増加をもたらす。

【００２２】

適切には、前記ミュータントｅＲＦ１は、以下からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む：
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０

（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｌ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（viii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（ix）Ｍ５１、Ｋ１３０
（ｘ）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（xiii）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５

【００２３】

適切には、前記ミュータントｅＲＦ１は、以下からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む：
（ｉ）Ｅ５５Ｄ
（ii）Ｎ１２９Ｐ、Ｋ１３０Ｑ
（iii）Ｔ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆ
（iv）Ｅ５５Ａ
（ｖ）Ｙ１２５Ｆ
（vi）Ｔ５８Ｋ、Ｓ６０Ｔ、Ｓ６４Ｄ、Ｌ１２５Ｆ、Ｎ１２９Ｓ
（vii）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｉ、Ｙ１２５Ｌ
（viii）Ｓ１２３Ｒ、Ｌ１２４Ｗ、Ｙ１２５Ｒ
（ix）Ｓ１２３Ｈ、Ｌ１２４Ａ、Ｙ１２５Ｇ
（ｘ）Ｍ５１Ａ、Ｋ１３０Ｍ
（xi）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｌ、Ｙ１２５Ｖ
（xii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｃ、Ｙ１２５Ｓ
（xiii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｓ、Ｙ１２５Ｓ
（xiv）Ｓ１２３Ｖ、Ｌ１２４Ｔ、Ｙ１２５Ｐ

【００２４】

適切には、前記真核細胞は、哺乳類細胞又は昆虫細胞である。

【００２５】

適切には、前記コドンは終止コドンである。より適切には、前記終止コドンはＵＡＧである。

【００２６】

適切には、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアは、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ＰｙｌＴ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを含む。

【００２７】

適切には、ｔＲＮＡは以下である：
（ｉ）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアント、又は
（ii）ＰｙｌＴのＯｐｔバリアント、又は
（iii）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃ－Ｏｐｔバリアント。

【００２８】

発明のさらなる態様及び実施形態

第１の態様において、以下を含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において、ｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペアを発現するための核酸コンストラクトが提供される：（ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼを発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列であって、第１及び第２のプロモーターが、互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが、核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸配列。このコンストラクトをコードする

例示的なヌクレオチド配列は、配列番号１に示されている。

【００２９】

適切には、核酸コンストラクトは、真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力があるさらなるプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列をコードする核酸配列をさらに含むことができる。

【００３０】

適切には、所望の核酸配列を発現する能力があるプロモーターは、上記で挙げられた第１の態様による第１のプロモーターと同じ向きに方向づけられる。

【００３１】

適切には、所望の核酸配列を発現する能力があるプロモーターは、第１のプロモーターと同じ、又は第１のプロモーターと異なる。一実施形態において、このプロモーターは、本明細書に記載されているようなＥＦ－１プロモーターであり、若しくはそれに由来し、又はＣＭＶプロモーターであり、若しくはそれに由来する。

【００３２】

適切には、核酸コンストラクトは、本明細書に記載されているようなミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列をさらに含む。一実施形態において、ｅＲＦ１ミュータントは、ｔＲＮＡシンテターゼを発現する第１のＰｏｌ IIオープンリーディングフレームの下流（３’側）のＣＭＶプロモーターから発現する。

【００３３】

適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列及びｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列は、同じオープンリーディングフレームにおいて自己切断型ペプチドを介して連結されている。適切には、ｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列及びミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、同じオープンリーディングフレームにおいて自己切断型ペプチドを介して連結されている。例示的なＴ２Ａ自己切断型ペプチドは、PLoS ONE 6(4) (2011)に記載されている。

【００３４】

第２の態様において、以下を含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において、ｔＲＮＡ及び所望の核酸配列を発現するための核酸コンストラクトであって、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、核酸コンストラクトが提供される：（ｉ）真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列を含む核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列であって、第１及び第２のプロモーターが、互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが、核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸配列。このコンストラクトをコードする例示的なヌクレオチド配列は、配列番号２に示されている。

【００３５】

適切には、コンストラクトは、ミュータントｅＲＦ１、適切には、ミュータント哺乳類ｅＲＦ１、適切には、ミュータントホモサピエンス（homo sapiens）ｅＲＦ１をコードする核酸配列を含み、適切には、ミュータントｅＲＦ１が、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群から選択される、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択される。

【００３６】

適切には、第１及び第２のプロモーターは、互いに逆方向にあり、ｔＲＮＡは、核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する。

【００３７】

適切には、核酸コンストラクトは、プロモーターに直接連結されたｔＲＮＡを含む。この実施形態によれば、ｔＲＮＡは、ｔＲＮＡとプロモーターの間に位置するいかなる中間配列も存在せずに、プロモーターに直接連結される。

【００３８】

適切には、核酸コンストラクトは、プロモーターに直接連結されたｔＲＮＡを含む。この実施形態によれば、ｔＲＮＡは、ｔＲＮＡとプロモーターの間に位置する中間配列がなく、プロモーターに直接連結される。ｔＲＮＡの３’末端は、転写終結配列に間接的に連結することができる。例として、転写終結配列（例えば、ＴＴＴＴＴ）がリンカーを介してｔＲＮＡに接続され、前記リンカーは任意で、配列ＧＡＣＡＡＧＴＧＣＧＧを含んでいてもよい。

【００３９】

適切には、ｔＲＮＡをコードする核酸配列の各コピーは、別々の（それ独自の）プロモーターの制御下にある。

【００４０】

適切には、プロモーター配置は、第１の方向に向けられた伸長因子プロモーター及び第２の方向に向けられたＰｏｌIIIプロモーターを含む。

【００４１】

適切には、第１のプロモーターは、ＥＦ－１プロモーターであるか、又はそれに由来する。

【００４２】

適切には、第２のプロモーターは、Ｕ６プロモーターであるか、又はそれに由来する。

【００４３】

適切には、ｔＲＮＡは、核酸コンストラクト上に４個、５個、６個、７個、又は８個、又は９個以上のコピーで存在する。

【００４４】

適切には、ｔＲＮＡは、野生型ｔＲＮＡ又はバリアントｔＲＮＡ、適切には、ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアントである。

【００４５】

適切には、所望の核酸配列は、少なくとも１個、２個、３個、又は４個、又は５個以上の終止コドン、適切には、少なくとも１個、２個、又は３個のコドンを含む。

【００４６】

適切には、所望の核酸配列は、抗体又は抗体断片をコードする。

【００４７】

適切には、前記ｔＲＮＡシンテターゼは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び／若しくは前記ｔＲＮＡは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性であり、並びに／又は前記ｔＲＮＡシンテターゼは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び前記ｔＲＮＡが内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性である。さらなる態様において、第１の態様による核酸コンストラクトと第２の態様による核酸コンストラクトの組み合わせが提供される。

【００４８】

さらなる態様において、本発明の第１の態様による核酸コンストラクト及び本発明の第２の態様による核酸コンストラクトを含む核酸コンストラクトの組み合わせが提供される。

【００４９】

適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、さらに別のコンストラクト上にある。

【００５０】

さらなる態様において、本発明の第１の態様による核酸コンストラクト又は本発明の第２の態様による核酸コンストラクトを含むベクターが提供される。

【００５１】

さらなる態様において、本発明の第１の態様による核酸コンストラクト及び本発明の第２の態様による核酸コンストラクトを含むベクターを含むベクターの組み合わせが提供される。

【００５２】

適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、さらに別のベクター上にある。

【００５３】

さらなる態様において、本発明の第１の態様による核酸コンストラクト又は本発明の第２の態様による核酸コンストラクト、核酸コンストラクトの組み合わせ、ベクター又はベクターの組み合わせを含む細胞が提供される。

【００５４】

適切には、細胞は、ミュータントｅＲＦ１、適切には、ミュータントホモサピエンスｅＲＦ１をコードする核酸コンストラクトをさらに含む。適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、別個のコンストラクト又はベクター上にある。

【００５５】

適切には、ミュータントｅＲＦ１は、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択され、適切には、変異が、GenBank受託番号ＡＦ０９５９０１．１に記載されているようなホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子配列に導入される。一実施形態において、変異は、コドン最適化されたホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子配列に引き起こされる。コドン最適化されたホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子配列の例は、配列番号３に示されている。

【００５６】

適切には、細胞は哺乳類細胞又は昆虫細胞である。

【００５７】

適切には、細胞は核酸を一過性に又は安定的にトランスフェクトされている。

【００５８】

さらなる態様において、（ｉ）本発明の第１又は第２の態様による核酸コンストラクト、又は（ii）核酸コンストラクトの組み合わせ、又は（iii）ベクター、又は（iv）ベクターの組み合わせ、又は（ｖ）真核細胞、及び任意で（vi）非天然アミノ酸を含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞においてタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのキットが提供される。

【００５９】

適切には、キットは、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸コンストラクト若しくはベクター、又はそれを含む細胞をさらに含む。

【００６０】

さらなる態様において、以下のステップを含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法が提供される：ｉ）細胞を用意するステップであって、前記細胞が、本明細書に記載されているような核酸コンストラクトの組み合わせ又はベクターの組み合わせを含む、ステップ；ii）所望の核酸配列によってコードされる所望のタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及びiii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸配列が組み込まれるように、細胞をインキュベートするステップ。

【００６１】

適切には、少なくとも１個、２個、３個、４個、又は５個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質に組み込まれる。

【００６２】

さらなる態様において、以下のステップを含む、抗体－薬物コンジュゲートを調製する方法が提供される：ｉ）哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞を用意するステップであって、所望の核酸配列が抗体又は抗体断片をコードし、かつ前記細胞が本明細書に記載された核酸コンストラクトの組み合わせ又はベクターの組み合わせを含む、ステップ、及びii）抗体又は抗体断片に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステッ

プ；iii）非天然アミノ酸が組み込まれている抗体又は抗体断片を得るステップ；及びvi）抗体又は抗体断片を、非天然アミノ酸を介して薬物部分とコンジュゲートさせるステップ。

【００６３】

さらなる態様において、真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための、（ｉ）本発明の第１若しくは第２の態様による核酸コンストラクト、及び／又は（ii）核酸コンストラクトの組み合わせ、及び／又は（iii）ベクター、及び／又は（iv）ベクターの組み合わせ、及び／又は（ｖ）哺乳類細胞若しくは昆虫細胞などの真核細胞の使用が提供される。

【００６４】

さらなる態様において、以下のステップを含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法が提供される：ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペア、所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップ；ii）所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及びiii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように、細胞をインキュベートするステップ。

【００６５】

さらなる態様において、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用が提供される。

【００６６】

さらなる態様において、以下のステップを含む、所望のタンパク質内の非天然アミノ酸の組み込みを増加させるｅＲＦ１のミュータントを同定する方法が提供される：（ｉ）所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込む能力がある細胞を用意するステップであって、適切には、前記細胞が、本明細書に記載された核酸コンストラクトの組み合わせ又はベクターの組み合わせを含む、ステップ；（ii）所望のタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、かつｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で、細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに（iii）ｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で、所望のタンパク質への非天然アミノ酸組み込みのレベルを決定するステップであって、ｅＲＦ１のミュータントの存在下での所望のタンパク質への非天然アミノ酸組み込みのレベルが増加すると、前記ｅＲＦ１のミュータントが、所望のタンパク質内の非天然アミノ酸の組み込みを増加させることが示される、ステップ。

【００６７】

さらなる態様において、添付の説明及び図面を参照して、実質的に本明細書に記載されているようなコンストラクト、ベクター、細胞、キット、方法、又は使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００６８】

本発明の実施形態は、ここで、添付の図面を参照して、さらに記載される。

チャート１は、用いられたプラスミドコンストラクト及び非天然アミノ酸を示す。（ａ）用いられたベクターの概略図。ＰｙｌＴは、Ｐｙｌ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$をコードする遺伝子であり、ＰｙｌＴ＊はＵ２５Ｃバリアントをコードする。Ｕ６はＵ６プロモーターを示し、ＣＭＶはＣＭＶプロモーターであり、ＣＭＶ　ｅｎｈは、ＣＭＶプロモーターの５’エンハンサー断片であり、ＥＦ１　ｐｒｏｍはＥＦ－１αプロモーターである。赤色バーは、アンバー終止コドンの位置を示す。（ｂ）１（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－１－リシン）及び２（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－１－リシン）の化学構造。

【図１】哺乳類細胞におけるＴＡＧコドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みのためにＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$発現ベクターを最適化することを示す図である。（ａ）蛍光

アッセイにおいて測定された、１（２ｍＭ）及び２（０．５ｍＭ）のｓｆＧＦＰへの組み込みの定量化。示されたコンストラクトは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において一過性に発現し、ｓｆＧＦＰを、４８５ｎｍにおける励起後の５２０ｎｍにおける蛍光により可溶化物において定量化した。アミノ酸なしの対照が、各ベクター組み合わせに含まれる。データは、終止コドンの代わりにロイシンコドンを有する等価ｓｆＧＦＰ対照プラスミド（チャート１ａにおけるコンストラクトａ）により示される蛍光に対するパーセンテージとしてプロットされている。データは、３連の平均値±ＳＥを表す。（ｂ）ウェスタンブロットにより可視化された可溶化物におけるｓｆＧＦＰ収量。示されたベクターをトランスフェクトされ、示されたアミノ酸の存在下、又はアミノ酸なしで増殖した細胞からの等量の細胞可溶化物をα－ＧＦＰ抗体、α－アクチン抗体、及びα－ＦＬＡＧ抗体でイムノブロッティングした。（ｃ）アミノ酸の非存在下でのコンストラクトｂ＋ｃ、ｂ＋ｄ、ｂ＋ｅ、ｇ＋ｈからの相対的ＰｙｌＴ／ＰｙｌＴ＊発現のノーザンブロット分析。ローディングコントロールについて補足の図１を参照。

【図２】ｅＲＦ１の変異の、終止コドンリードスルー、及びＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを用いる１（２ｍＭ）の組み込みへの効果を示す図である。（ａ）この研究において変異したｅＲＦ１位置。ｅＲＦ１（ＰＤＢ　ＩＤ：３Ｅ１Ｙ）（Lekomtsev, S.; Kolosov, P.; Bidou, L.; Frolova, L.; Rousset, J. P.; Kisselev, L. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 10824）由来のＮ末端ドメインの構造、この研究において変異した残基は赤色で示されている。（ｂ）ヒトｅＲＦ１バリアントは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞のｐｅＲＦ１（Ｘ）（Ｘは、導入された変異を示す）及びＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ（ＴＡＧ）での一過性トランスフェクション後、発現する。陰性対照（－）は内因性ｅＲＦ１を検出し、ｓｈＲＮＡは、内因性ｅＲＦ１のノックダウンである。（ｃ）全ての３個の終止コドンのリードスルーは、サプレッサーｔＲＮＡの非存在下でのＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるウミシイタケ－ＴＡＧ－ホタルルシフェラーゼレポーター及びｅＲＦ１バリアントの発現により決定される。ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ（ＴＡＧ）（又は対応するＴＡＡ、ＴＧＡ、又はセリンコドンバリアント）を細胞に一過性にトランスフェクトし、２０時間後、発現レベルを決定した。ＴＡＧ、ＴＡＡ、又はＴＧＡリードスルーを、セリンコドン（ＴＣＣ）含有コンストラクトからのデータに対して標準化した。データは、４連の測定値の平均値±ＳＥを表す。陰性対照（－）は内因性ｅＲＦ１を検出し、ｓｈＲＮＡは、内因性ｅＲＦ１のノックダウンである。Ｗｔは、キイロショウジョウバエコドン使用頻度でコードし直されたヒトｅＲＦ１である。Δ１００ミュータントについてのデータは、オフスケールであり、値は以下である：１．６％（ＴＡＡ）、２％（ＴＡＧ）、及び１５％（ＴＧＡ）。（ｄ）ｐｅＲＦ１（Ｘ）（Ｘは、導入された変異を示す）、Ｕ６プロモーターからピロリシルｔＲＮＡを発現するプラスミドｃ（チャート１ａ）、及びＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ウミシイタケ－ＴＡＧ－ホタル（ｓｆＧＦＰがウミシイタケ－ＴＡＧ－ホタルに置換されているプラスミドａ（チャート１ａ）のバージョン）でのＨＥＫ２９３Ｔ細胞の一過性トランスフェクション。陰性対照（－）は内因性ｅＲＦ１を検出し、ｓｈＲＮＡは、内因性ｅＲＦ１のノックダウンである。等量の細胞可溶化物を、α－ｅＲＦ１抗体及びα－アクチン抗体でイムノブロッティングした。（ｅ）ｅＲＦ１（Ｘ）バリアントは、ピロリシルｔＲＮＡ／シンテターゼのペアを用いる、アンバー終止コドンに応答した非天然アミノ酸組み込みを増加させる。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に、パネルｄに記載されているようにトランスフェクトし、１ｍＭアミノ酸１の存在下で増殖させ、２０時間後、測定した。％リードスルーを、アンバー終止コドンの代わりにセリンコドンを有するウミシイタケ－ＴＣＣ－ホタルレポーターに対して測定した。

【図３】ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを最適化ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペア発現系と組み合わせることが、哺乳類細胞における複数の非天然アミノ酸の組換えタンパク質への効率的な組み込みを可能にすることを示す図である。（ａ）プラスミドｇ、ｈ（又はｉ、チャート１ａ）及びｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過性にトランスフェクトし、２ｍＭアミノ酸１の存在下又は非存在下で４８時間、増殖させた。完全長ｓｆＧＦＰを、４８５ｎｍにおける励起後、５２０ｎｍで細胞可溶化物において定量化した。データは

、４つの独立した測定の平均値±ＳＥを表す。（ｂ）可溶化物からのウェスタンブロット。（ｃ）０．５ｍＭアミノ酸２を用いることを除いて、パネルａにおいての通り。（ｄ）可溶化物からのウェスタンブロット。

【図４】１個又は３個の非天然アミノ酸を組み込んだ組換えｓｆＧＦＰの発現、精製、及び特徴付けを示す図である。（ａ）プラスミドｇ、ｈ（又はｉ、チャート１ａ）及びｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過性にトランスフェクトし、２ｍＭアミノ酸１又は０．５ｍＭアミノ酸２の存在下又は非存在下で４８時間、増殖させた。完全長ｓｆＧＦＰを、Ｎｉ－ＮＴＡクロマトグラフィーにより精製した。（ｂ）エレクトロスプレーイオン化質量分析により、ｓｆＧＦＰにおける１つ又は３つの部位における非天然アミノ酸１及び２の量的組み込みが確認される（補足の図４も参照）。

【図５】ゲノム組み込みからのｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの安定的発現が、Ｔ－Ｒｅｘ　２９３　Ｆｌｐ－Ｉｎ細胞においてアンバーサプレッションを増強することを示す図である。Ｔ－Ｒｅｘ　２９３　Ｆｌｐ－Ｉｎ系（Life Technologies社）を用いることにより、安定的なｅＲＦ１株が創製され、特定された標的座位における挿入により、挿入された導入遺伝子の均一な発現がもたらされた。Ａ．ゲノムへ組み込まれた、キイロショウジョウバエコドン使用頻度でのｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを含有するＴ－Ｒｅｘ２９３細胞に、プラスミドｇ及びｈ又はｉ（図１、Ａ）を一過性にトランスフェクトした。細胞を、０．５ｍＭアミノ酸２の存在下又は非存在下で４８時間、増殖させた。ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの発現は、トランスフェクションの１６時間前の１μｇ／ｍｌテトラサイクリンの添加により誘導された。認定されたテトラサイクリンを含まない増殖培地を、全実験を通して用いた。完全長ｓｆＧＦＰを、４８５ｎｍにおける励起後、５２０ｎｍで、細胞可溶化物において定量化した。データは、４つの独立した測定の平均値±ＳＥを表す。Ｂ．パネルＡに示された通り、可溶化物からのウェスタンブロット。等量の細胞可溶化物をロードした。内因性ｅＲＦ１に対するｓｈＲＮＡを構成的に発現する安定株を、ｅＲＦ１野生型又はＥ５５Ｄが挿入されたＴ－Ｒｅｘ２９３　Ｆｌｐ－ｉｎ株をレンチウイルスｓｈＲＮＡ（ｅＲＦ１）コンストラクト（Santa Cruz社、図３の通り）での形質転換、及びナイーブ細胞に対するピューロマイシン選択により創製した。ｅＲＦ１野生型及びＥ５５Ｄは、キイロショウジョウバエコドン最適化後のｓｈＲＮＡに相補的な配列の欠如により、ｓｈＲＮＡ（ｅＲＦ１）に対して抵抗性であった。Ｃ．２の存在下又は非存在下での４８時間のコンストラクトｇ及びｈ（図１）の一過性トランスフェクション、及び終結因子バリアントの発現を誘導するための増殖培地における１μｇ／ｍｌテトラサイクリンの添加後、ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）が発現した。完全長ｓｆＧＦＰを、４８５ｎｍにおける励起後、５２０ｎｍで、細胞可溶化物において定量化した。データは、４つの独立した測定の平均値±ＳＥを表す。Ｄ．ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$を発現させることを除いて、パネルＣの通り。

【図６】Ｄｍｅｌ細胞における終止コドンリードスルー、及びＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを用いる１（１ｍＭ）の組み込みに及ぼす、ｅＲＦ１の変異の影響を示す図である。Ａ．Ｄｍｅｌ細胞の、ｐｅＲＦ１（Ｘ）（Ｘは、導入された変異を示す）、及びＵＡＳ－ＰｙｌＲＳ／ＵＡＳ－ＧＦＰ－（ＴＡＧ）－ｍＣｈｅｒｒｙ／（Ｕ６－ＰｙｌＴ）$_4$での一過性トランスフェクション後、（キイロショウジョウバエコドン使用頻度でコードし直された）ヒトｅＲＦ１バリアントが発現する。停止なしの対照（no stop control）は、完全長タンパク質についてのサイズマーカーとしての役割を果たし、陰性対照（－）は、内因性ｅＲＦ１の存在下でのベースラインの抑制効率を確立し、２なしの陰性対照は、１の非存在下でのリードスルーのレベルを示す。細胞にトランスフェクトし、４８時間増殖させた。非飽和曝露条件下でのＧＦＰに対して免疫染色されたブロットから、欠失型産物（truncated product）に対する完全長産物を表すバンドの強度の比率を計算することにより、リードスルーを定量化する。各バーは、３つの独立したトランスフェクション及び定量化実験の平均値±ＳＥを表す。Ｂ．ウェスタンブロットにより可視化された可溶化物におけるタンパク質の発現レベル。パネルＡについて記載されているように、示されたベクターをトランスフェクトされ、１ｍＭアミノ酸１の存在下、又はアミノ酸なしで増殖した細胞からの等量の細胞可溶化物をα－ＧＦＰ抗体、α－ｅＲＦ１抗体、及びα－Ｈ

Ａ抗体により免疫染色した。示されたα－ＧＦＰブロットは、３０秒間、曝露されて、完全長産物についての異なるバンドをプリント上に示した。定量化に用いられたブロットの対応する曝露は、５秒間、曝露され、飽和を示さず、追加の反復試料も同様である。Ｃ．一過性トランスフェクションに用いられたコンストラクト。

【図７】ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄミュータントの存在下での４個の異なる非天然アミノ酸のｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）への組み込みを示す図である。

【図８】（補足の図１）ユニバーサルＰｙｌＴ／ＰｙｌＴＵ２５Ｃプローブを用いたノーザンブロットを示す図である。図１ａ、ｂと類似して、プラスミドｂ＋ｃ、ｂ＋ｄ、ｂ＋ｅ、ｇ＋ｈ（チャート１）での一過性トランスフェクションから２４時間後、全ＲＮＡを抽出した。

【図９】（補足の図２）ｐｅＲＦ１（Ｘ）及びＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ（ＴＡＧ）でのＨＥＫ２９３Ｔ細胞の一過性トランスフェクション後に発現したヒトｅＲＦ１バリアントを示す図である。陰性対照（－）は、内因性ｅＲＦ１を検出する。二重ルシフェラーゼアッセイにおける産生されたタンパク質の絶対的発現レベルは、α－ウミシイタケウェスタンブロットにより示されている。ｔｆｘなしはトランスフェクトされていない細胞である。

【図１０】（補足の図３）溶解バッファーにおけるｓｆＧＦＰの蛍光定量のための較正曲線を示す図である。精製され、かつ段階希釈されたｓｆＧＦＰの蛍光強度が、試料におけるｓｆＧＦＰの濃度に対してプロットされている。そのタンパク質は、細菌発現後、精製され、２８０ｎｍにおける吸光度測定により定量化され、プロテアーゼ阻害剤が追加されたＲＩＰＡバッファー中に希釈された。

【図１１】（補足の図４）ｓｆＧＦＰにおける３つの部位での非天然アミノ酸１及び２の量的組み込みを確認するエレクトロスプレーイオン化質量分析を示す図である。微量のコンポーネントは、天然リシンを生産する、１又は２のうちの一方のカルバメート基での自発的切断を表す。対応する質量損失は、それぞれ、１００Ｄａ又は１１０Ｄａであると計算される。本発明者らは、１のカルバメート切断が、エレクトロスプレーイオン化過程中に起こることを以前に観察している。

【図１２】二重ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、卵巣におけるｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄ又はΔ１００発現の、終止コドンリードスルーへの効果について、トランスジェニックキイロショウジョウバエのハエ系統をスクリーニングする図である。

【図１３】ＦＡＣプロットを示す図である。

【図１４】写真を示す図である。

【図１５】棒グラフを示す図である。

【図１６】ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ及びＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔバリアントを示す図である。

【図１７】ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ及びＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔバリアントの配列を示す図である。

【図１８】写真及び棒グラフを示す図である。

【図１９】ダイアグラムを示す図である。

【図２０】ダイアグラムを示す図である。

【図２１】（Ａ）ダイアグラム、（Ｂ）化学構造、及び（Ｃ）２つのグラフを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００６９】

コンストラクト及びベクター

本明細書で用いられる場合、用語「コンストラクト」又は「ベクター」は、一般的には、連結されている所望の核酸配列を運搬する能力がある核酸を指す。

【００７０】

ベクターの１つの型は「プラスミド」であり、それは、追加のＤＮＡセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖ＤＮＡループを指す。ベクターの別の型は、ウイルスベク

ターであり、それにおいて、追加のＤＮＡセグメントをウイルスゲノムへライゲーションすることができる。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製する能力がある（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入で、宿主細胞のゲノムへ組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。

【００７１】

所望の核酸配列は、コンストラクト、又は発現ベクターなどのベクターに組み込むことができる。ベクターは、適合性宿主細胞において核酸を複製するために用いられ得る。ベクターは宿主細胞から回収され得る。

【００７２】

ベクターは、適合性宿主細胞、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において所望の核酸配列を発現するために用いられる発現ベクターであり得る。適切には、所望の核酸配列は、宿主細胞において所望の核酸配列の発現を与える能力がある、プロモーター又はエンハンサーなどの制御配列に作動可能に連結される。用語「作動可能に連結される」とは、記載されたコンポーネントが、それらがそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にあることを意味する。所望の核酸配列に「作動可能に連結された」調節配列は、所望の核酸配列の発現が、その制御配列に適合した条件下で達成されるようにライゲーションされている。

【００７３】

ベクターは、タンパク質の発現を提供する適切な宿主細胞に形質転換又はトランスフェクトされ得る。この工程は、そのタンパク質をコードする所望の核酸配列のベクターによる発現をもたらし得る条件下で、発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養するステップ、及び任意で、その発現したタンパク質を回収するステップを含み得る。

【００７４】

ベクターは、例えば、複製起点、任意で所望の核酸配列の発現のためのプロモーター、及び任意でプロモーターのレギュレーターと共に提供されるプラスミド又はウイルスベクターであり得る。ベクターは、細菌プラスミドの場合、１個又は２個以上の選択マーカー遺伝子、例えば、アンピシリン耐性遺伝子を含有し得る。

【００７５】

一態様において、以下を含む、真核細胞においてｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペアを発現するための核酸コンストラクトが提供される：（ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼを発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列であって、第１及び第２のプロモーターが、互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸配列。

【００７６】

別の態様において、以下を含む、真核細胞においてｔＲＮＡ及び所望の核酸配列を発現するための核酸コンストラクトであって、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、核酸コンストラクトが提供される：（ｉ）細胞において所望の核酸配列を発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列を含む核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列であって、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸配列。

【００７７】

別の態様において、上記の核酸コンストラクトのそれぞれを含む核酸コンストラクトの組み合わせもまた提供される。

【００７８】

別の態様において、上記の核酸コンストラクトのそれぞれを含み、又は別々に含むベク

ターもまた提供される。

【００７９】

別の態様において、上記の核酸コンストラクトのそれぞれを別々に含むベクターを含むベクターの組み合わせもまた提供される。

【００８０】

ある特定の実施形態において、核酸コンストラクトにおける第１及び第２のプロモーターは、逆方向に配置される別個のプロモーターである。この実施形態によれば、第１及び第２のプロモーターは、プロモーターのそれぞれが、反対の鎖上にコードされて、それらの５’末端が互いに向けて配向される、双方向性プロモーターであると言うことができる。プロモーターに作動可能に連結された核酸のそれぞれは、対応する配向を有する。したがって、例えば、プロモーター及び発現し得るｔＲＮＡ配列を、リバース鎖上にコードすることができる。プロモーター及び発現し得るｔＲＮＡシンテターゼ遺伝子を、フォワード鎖上にコードすることができる。さらなる例として、Ｕ６プロモーター及び発現し得るｔＲＮＡ配列を、リバース鎖上にコードすることができる。さらなる例として、ＥＦ－１ａプロモーター及び発現し得るｔＲＮＡシンテターゼ遺伝子を、フォワード鎖上にコードすることができる。

【００８１】

第１及び第２のプロモーターに加えて、１つ又は２つ以上のさらなるプロモーターもまた含まれてもよく、それらは、第１及び／若しくは第２のプロモーターと同じプロモーターであってもよいし、又は第１及び／若しくは第２のプロモーターと異なってもよい。さらなるプロモーターは、第１又は第２のプロモーターと同じ方向に配向することができる。適切には、さらなるプロモーターは、第１のプロモーターと同じ方向に配向される。

【００８２】

適切には、本明細書に記載されたコンストラクトは、本明細書に記載されているようなミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列をさらに含む。ミュータントｅＲＦ１を発現するプロモーターは、第１又は第２のプロモーターと同じ方向に配向することができる。適切には、そのプロモーターは、第１のプロモーターと同じ方向に配向される。

【００８３】

適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列及びｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列は、同じオープンリーディングフレームで自己切断型ペプチドを介して連結される。適切には、ｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列及びミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、同じオープンリーディングフレームで自己切断型ペプチドを介して連結される。例示的なＴ２Ａ自己切断型ペプチドは、PLoS ONE 6(4) (2011)に記載されている。

【００８４】

適切には、コンストラクトは、多コピーｔＲＮＡ配置を備える。適切には、ｔＲＮＡ遺伝子の少なくとも２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、又は１２個のコピーが、本明細書に記載されたコンストラクト内に備えられる。適切には、ｔＲＮＡ遺伝子の少なくとも４個のコピーがコンストラクト内に備えられる。適切には、ｔＲＮＡ遺伝子の少なくとも８個のコピーがコンストラクト内に備えられる。ｔＲＮＡ遺伝子の複数のコピーが、同じ、又は異なるコンストラクト上に備えられ得る。一実施形態において、ｔＲＮＡ遺伝子の少なくとも４個のコピーが第１のコンストラクト上に備えられ、ｔＲＮＡ遺伝子の少なくとも４個のコピーが第２のコンストラクト上に備えられる。

【００８５】

一実施形態において、ｔＲＮＡ遺伝子の複数のコピーは、単一のプロモーターの制御下にある。別の実施形態において、ｔＲＮＡ遺伝子の複数のコピーは、複数の異なるプロモーターの制御下にある。別の実施形態において、ｔＲＮＡ遺伝子の各コピーは、別々のプロモーターの制御下にあり、そのプロモーターは、同じプロモーター、又は２つ若しくは３つ以上の異なるプロモーターであり得る。別の実施形態において、ｔＲＮＡ遺伝子の各

コピーは複数のプロモーターの制御下にあり、それらのプロモーターは、同じプロモーター、又は２つ若しくは３つ以上の異なるプロモーターであり得る。適切には、各ｔＲＮＡ遺伝子は、別々のプロモーターの制御下にあり、そのプロモーターは、各ｔＲＮＡ遺伝子について同じプロモーターである。適切には、備えられるｔＲＮＡ遺伝子のそれぞれを制御する１つ又は複数のプロモーターは、同じである。この関連において、「同じ」とは、複数のｔＲＮＡ配列を制御する単一のプロモーター配列を含意するというよりむしろ、それの配列に関して同じという意味である。明らかに、本明細書に記載されているような同じプロモーターの複数のコピーがあり得る。

【００８６】

一実施形態において、ｔＲＮＡの少なくとも４個のコピーが備えられ、各コピーがプロモーターに作動可能に連結されている、多コピーｔＲＮＡ配置が備えられる。

【００８７】

別の実施形態において、ｔＲＮＡの少なくとも４個のコピーが備えられ、各コピーがプロモーターに作動可能に連結され、各プロモーターが同じプロモーター、例えば、Ｕ６プロモーターなどのＲＮＡ　ＰｏｌIIIプロモーターである、多コピーｔＲＮＡ配置が備えられる。

【００８８】

一実施形態において、ｔＲＮＡの５’末端は、ｔＲＮＡを発現するために用いられるプロモーターの転写開始部位によって直接特定される。

【００８９】

本明細書に提供されるヌクレオチドコンストラクトは、幅広い適用性を有し、かつアンバーサプレッションに加えて、オパール及び／又はオーカーサプレッションに用いられ得ることは留意されるべきである。本発明の核酸コンストラクトをアンバー／オパール／オーカーサプレッションに適用する場合、当業者は、適切なアンバー／オパール／オーカーコドンと共に、それに応じて、適切なｔＲＮＡ及び／又はｔＲＮＡシンテターゼを選択するであろう。

【００９０】

コンストラクト及びベクターの組み合わせ

本明細書に記載されたコンストラクト及びベクターの組み合わせは、１個又は２個以上の非天然アミノ酸の細胞への組み込みにおける使用が企図される。

【００９１】

例として、以下を含むコンストラクトの組み合わせ：（１）(ｉ)ｔＲＮＡシンテターゼを発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列を含む核酸コンストラクトであって、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸コンストラクト、並びに（２）(ｉ)真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列を含む核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列を含む核酸コンストラクトであって、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸コンストラクト。

【００９２】

一実施形態において、上記で示されたコンストラクト（１）由来の所望の核酸配列は、真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力があるさらなるプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列をコードする核酸配列をさらに含む。この実施形態によれば、コンストラクト（１）は、必ずしも、コンストラクト（２）と共に用いられなければならないわけではなく、なぜなら、コンストラクト（２）由来の所望の核酸配列及びｔＲＮＡがコンストラクト（１）へ組み込まれているからである。この実施形態によれば、別のベクター上にｔＲＮＡの１個若しくは２個以上のさらなるコピーを含むことが望ましくあ

り得る。この他のベクターは、１個又は２個以上のプロモーターの制御下でｔＲＮＡを排他的に含み得る。任意で、所望の場合、他のエレメントがこの他のベクターへ組み込まれてもよい。

【００９３】

上記で示されているような（１）及び（２）を含むコンストラクトの組み合わせが、本明細書に記載されているようなミュータントｅＲＦ１をコードするさらなるコンストラクトと共に用いることができる。

【００９４】

あるいは、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列をコンストラクト（１）及び／又は（２）に組み込むことができる。適切には、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、コンストラクト（１）へ組み込まれる。この実施形態によれば、（ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼを発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列、及び（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列、任意で（iii）真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力があるさらなるプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列をコードする核酸配列、並びに任意で（iv）本明細書に記載されているようなミュータントｅＲＦ１をコードする所望の核酸配列を含む核酸コンストラクトであって、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸コンストラクトが開示されている。

【００９５】

これらのコンストラクトの様々な組み合わせを含むベクター及び細胞もまた開示されている。

【００９６】

ｔＲＮＡシンテターゼ

本明細書において用いられるｔＲＮＡシンテターゼ（適切には、アミノアシル化－ｔＲＮＡシンテターゼ）は様々であり得る。特定のｔＲＮＡシンテターゼ配列が、実施例において用いられたかもしれないが、本発明は、それらの実施例のみに限定されることを意図するものではない。原理上、ｔＲＮＡチャージング（アミノアシル化）機能を与えるいかなるｔＲＮＡシンテターゼも用いることができる。例えば、ｔＲＮＡシンテターゼは、任意の適切な種由来であり得、例えば、古細菌由来、例として、メタノサルシナ属（Methanosarcina）（メタノサルシナ・バーケリーＭＳ（Methanosarcina barkeri MS）、メタノサルシナ・バーケリーｓｔｒ．フサロ（Methanosarcina barkeri str. Fusaro）、メタロサルシナ・マゼイＧｏ１（Methanosarcina mazei Go1）、メタノサルシナ・アセチボランスＣ２Ａ（Methanosarcina acetivorans C2A）、メタノサルシナ・サーモフィラ（Methanosarcina thermophila）など）又はメタノコッコイデス属（Methanococcoides）（メタノコッコイデス・ブルトニイ（Methanococcoides burtonii）など）由来である。あるいは、ｔＲＮＡシンテターゼは、細菌由来、例えば、デスルフィトバクテリウム属（Desulfitobacterium）（デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＤＣＢ－２（Desulfitobacterium hafniense DCB-2）、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＹ５１（Desulfitobacterium hafniense Y51）、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＰＣＰ１（Desulfitobacterium hafniense PCP1）など）、又はデスルホトマクルム・アセトキシダンスＤＳＭ　７７１（Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771）由来であり得る。

【００９７】

一実施形態において、ｔＲＮＡシンテターゼは、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）であり、それは、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ生物学的活性を有するタンパク質である。ＰｙｌＲＳは、ｔＲＮＡを非天然アミノ酸でアシル化する能力がある。

【００９８】

ＰｙｌＲＳは、野生型又は遺伝子改変型ＰｙｌＲＳであり得る。遺伝子改変型ＰｙｌＲＳは、例えば、Neumann et al.（Nat Chem Biol 4:232, 2008）により、及びYanagisawa et al.（Chem Biol 2008, 15:1187）により、及びＥＰ２１９２１８５Ａ１において記載

されている。適切には、非天然アミノ酸の組み込み効率を増加させる遺伝子改変型ｔＲＮＡシンテターゼ遺伝子が選択される。

【００９９】

一実施形態によれば、ＰｙｌＲＳはメタノサルシナ・バーケリー由来であり（ＭｂＰｙｌＲＳ）、任意で、以下に示されたコドン最適化配列を含んでもよく、又はそれからなってもよい：

ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGACAAGAAACCCCTGGACGTGCTGATCAGCGCCACCGGCCTGTGGATGAGCCG
GACCGGCACCCTGCACAAGATCAAGCACCACGAGGTGTCAAGAAGCAAAATCTACATCGAGATGGCCTGCGGCGACCACC
TGGTGGTGAACAACAGCAGAAGCTGCCGGACCGCCAGAGCCTTCCGGCACCACAAGTACAGAAAGACCTGCAAGCGGTGC
CGGGTGTCCGACGAGGACATCAACAACTTTCTGACCAGAAGCACCGAGAGCAAGAACAGCGTGAAAGTGCGGGTGGTGTC
CGCCCCCAAAGTGAAGAAAGCCATGCCCAAGAGCGTGTCCAGAGCCCCCAAGCCCCTGGAAAACAGCGTGTCCGCCAAGG
CCAGCACCAACACCAGCCGCAGCGTGCCCAGCCCCGCCAAGAGCACCCCCAACAGCTCCGTGCCCGCCTCTGCTCCTGCT
CCCAGCCTGACACGGTCCCAGCTGGACAGAGTGGAGGCCCTGCTGTCCCCCGAGGACAAGATCAGCCTGAACATGGCCAA
GCCCTTCCGGGAGCTGGAACCCGAGCTGGTGACCCGGCGGAAGAACGACTTCCAGCGGCTGTACACCAACGACCGGGAGG
ACTACCTGGGCAAGCTGGAACGGGACATCACCAAGTTCTTCGTGGACCGGGGCTTCCTGGAAATCAAGAGCCCCATCCTG
ATCCCCGCCGAGTACGTGGAGCGGATGGGCATCAACAACGACACCGAGCTGTCCAAGCAGATTTTCCGGGTGGACAAGAA
CCTGTGCCTGCGGCCTATGCTGGCCCCCACCCTGTACAACTACCTGCGGAAACTGGACAGAATCCTGCCTGGCCCCATCA
AGATTTTCGAAGTGGGACCCTGCTACCGGAAAGAGAGCGACGGCAAAGAGCACCTGGAAGAGTTTACAATGGTGAATTTT
TGCCAGATGGGCAGCGGCTGCACCCGGGAGAACCTGGAAGCCCTGATCAAAGAGTTCCTGGATTACCTGGAAATCGACTT
CGAGATCGTGGGCGACAGCTGCATGGTGTACGGCGACACCCTGGACATCATGCACGGCGACCTGGAACTGAGCAGCGCCG
TGGTGGGACCCGTGTCCCTGGACCGGGAGTGGGGCATCGACAAGCCCTGGATCGGAGCCGGCTTCGGCCTGGAACGGCTG
CTGAAAGTGATGCACGGCTTCAAGAACATCAAGCGGGCCAGCAGAAGCGAGAGCTACTACAACGGCATCAGCACCAACCT
GTGATGATAA

【０１００】

特定の実施形態によれば、ＰｙｌＲＳはメタロサルシナ・マゼイ由来であり（ＭｍＰｙｌＲＳ）、任意で、以下に示されたコドン最適化配列を含んでもよく、又はそれからなってもよい：

ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGACAAGAAGCCCCTGAACACCCTGATCAGCGCCACAGGACTGTGGATGTCCA
GAACCGGCACCATCCACAAGATCAAGCACCACGAGGTGTCCCGGTCCAAAATCTACATCGAGATGGCCTGCGGCGATCAC
CTGGTCGTCAACAACAGCAGAAGCAGCCGGACAGCCAGAGCCCTGCGGCACCACAAGTACAGAAAGACCTGCAAGCGGTG
CAGAGTGTCCGACGAGGACCTGAACAAGTTCCTGACCAAGGCCAACGAGGACCAGACCAGCGTGAAAGTGAAGGTGGTGT
CCGCCCCCACCCGGACCAAGAAAGCCATGCCCAAGAGCGTGGCCAGAGCCCCCAAGCCCCTGGAAAACACCGAAGCCGCT
CAGGCCCAGCCCAGCGGCAGCAAGTTCAGCCCCGCCATCCCCGTGTCTACCCAGGAAAGCGTCAGCGTCCCCGCCAGCGT
GTCCACCAGCATCTCTAGCATCTCAACCGGCGCCACAGCTTCTGCCCTGGTCAAGGGCAACACCAACCCCATCACCAGCA
TGTCTGCCCCTGTGCAGGCCTCTGCCCCAGCCCTGACCAAGTCCCAGACCGACCGGCTGGAAGTGCTCCTGAACCCCAAG
GACGAGATCAGCCTGAACAGCGGCAAGCCCTTCCGGGAGCTGGAAAGCGAGCTGCTGAGCCGGCGGAAGAAGGACCTCCA
GCAAATCTACGCCGAGGAACGGGAGAACTACCTGGGCAAGCTGGAAAGAGAGATCACCCGGTTCTTCGTGGACCGGGGCT
TCCTGGAAATCAAGAGCCCCATCCTGATCCCCCTGGAGTACATCGAGCGGATGGGCATCGACAACGACACCGAGCTGAGC
AAGCAGATTTTCCGGGTGGACAAGAACTTCTGCCTGCGGCCCATGCTGGCCCCCAACCTGTACAACTACCTGCGGAAACT
GGATCGCGCTCTGCCCGACCCCATCAAGATTTTCGAGATCGGCCCCTGCTACCGGAAAGAGAGCGACGGCAAAGAGCACC
TGGAAGAGTTTACAATGCTGAACTTTTGCCAGATGGGCAGCGGCTGCACCAGAGAGAACCTGGAATCCATCATCACCGAC
TTTCTGAACCACCTGGGGATCGACTTCAAGATCGTGGGCGACAGCTGCATGGTGTACGGCGACACCCTGGACGTGATGCA
CGGCGACCTGGAACTGTCTAGCGCCGTCGTGGGACCCATCCCTCTGGACCGGGAGTGGGGCATCGATAAGCCCTGGATCG
GAGCCGGCTTCGGCCTGGAACGGCTGCTGAAAGTCAAGCACGACTTTAAGAACATCAAGCGGGCTGCCAGAAGCGAGAGC
TACTACAACGGCATCAGCACCAACCTGTGATGATAA

【０１０１】

適切には、ｔＲＮＡシンテターゼをコードするヌクレオチド配列は、コドン最適化されている。

【０１０２】

ｔＲＮＡ

本明細書で用いられるｔＲＮＡは様々であり得る。特定のｔＲＮＡが、実施例において用いられたかもしれないが、本発明は、それらの実施例のみに限定されることを意図するものではない。原理上、選択されたｔＲＮＡシンテターゼと適合性があるならば、いかなるｔＲＮＡも用いることができる。

【０１０３】

ｔＲＮＡは、任意の適切な種由来であり得、例えば、古細菌由来、例として、メタノサルシナ属（メタノサルシナ・バーケリーＭＳ、メタノサルシナ・バーケリーｓｔｒ．フサロ、メタロサルシナ・マゼイＧｏ１、メタノサルシナ・アセチボランスＣ２Ａ、メタノサルシナ・サーモフィラなど）又はメタノコッコイデス属（メタノコッコイデス・ブルトニイなど）由来である。あるいは、ｔＲＮＡは、細菌由来、例えば、デスルフィトバクテリウム属（デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＤＣＢ－２、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＹ５１、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＰＣＰ１など）、又はデスルホトマクルム・アセトキシダンスＤＳＭ　７７１由来であり得る。

【０１０４】

ｔＲＮＡ遺伝子は野生型ｔＲＮＡ遺伝子であり得、又はそれは、変異型ｔＲＮＡ遺伝子であり得る。適切には、非天然アミノ酸の組み込み効率を増加させる変異型ｔＲＮＡ遺伝子が選択される。一実施形態において、変異型ｔＲＮＡ遺伝子、例えば、変異型ｔＲＮＡ$_{CUA}$遺伝子は、Biochemistry (2013) 52, 10に記載されているようなＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアントである。

【０１０５】

一実施形態において、変異型ｔＲＮＡ遺伝子、例えば、変異型ｔＲＮＡ$_{CUA}$遺伝子は、Fan et al 2015（Nucleic Acids Research doi:10.1093/nar/gkv800）に記載されているようなＰｙｌＴのＯｐｔバリアントである。

【０１０６】

一実施形態において、変異型ｔＲＮＡ遺伝子、例えば、変異型ｔＲＮＡ$_{CUA}$遺伝子は、ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアントとのバリアントの両方を有し、すなわち、この実施形態において、ＰｙｌＴ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$遺伝子などのｔＲＮＡは、Ｕ２５Ｃ変異とＯｐｔ変異の両方を含む。

【０１０７】

一実施形態において、ｔＲＮＡをコードする配列は、ｔＲＮＡ^{Pyl}、より適切にはｔＲＮＡ$^{Pyl}_{CUA}$をコードするメタロサルシナ・マゼイ　ピロリシン由来のピロリシンｔＲＮＡ（ＰｙｌＴ）遺伝子である。これは、アンバーサプレッションにより、すなわち、アンバーコドンの認識により非天然アミノ酸を組み込む。

【０１０８】

メタロサルシナ・マゼイ由来のＰｙｌＴをコードする核酸配列の例は以下である：

GGAAACCTGATCATGTAGATCGAATGGACTCTAAATCCGTTCAGCCGGGTTAGATTCCCGG

【０１０９】

別の実施形態において、メタロサルシナ・マゼイ由来のＰｙｌＴはＵ６プロモーターから発現し、ＰｙｌＴの３’末端において、リンカー、続いてターミネーターがある。例示的な配列は以下である（Ｕ６プロモーターは小文字で太字、ＰｙｌＴは下線、リンカーは大文字で太字、ターミネーターは大文字で下線）：

tgggcaggaagagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagaga

taattagaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataattt

cttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagta

tttcgatttcttggctttatatatcttgtggaaaggacgaaacaccggaaacctgatcatgtagatcgaat

ggactctaaatccgttcagccgggttagattcccggggtttccgGACAAGTGCGGTTTTT

【０１１０】

ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペア

適切には、ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアは、２０個の天然に存在するアミノ酸のいずれも認識しないものである。

【０１１１】

対応する、又は同族のｔＲＮＡ又はｔＲＮＡシンテターゼは、異なる種、例えば、メタノコッカス属細菌の異なる種由来で組み合わされ得ると理解されるであろう。例えば、メタノサルシナ・マゼイ由来のピロリシルｔＲＮＡをメタノサルシナ・バーケリー由来のピロリシンｔＲＮＡシンテターゼと共に用いることは可能であり得る。そのようなペアリングの機能性は、当技術分野において知られている方法を用いて、例えば、宿主細胞において異なるコンポーネントを一緒に組み合わせ、産生される所望の無傷のタンパク質について分析することにより、容易に試験される。

【０１１２】

一実施形態において、ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアは、適切にはメタノコッカス属由来の、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアである。

【０１１３】

一実施形態において、ｔＲＮＡシンテターゼは、メタノサルシナ・バーケリー由来のＰｙｌＲＳ（ＭｂＰｙｌＲＳ）であり、又はそれに由来し、ｔＲＮＡはメタノサルシナ・マゼイ　ピロリシン由来のピロリシンｔＲＮＡ（ＰｙｌＴ）であり、又はそれに由来する。

【０１１４】

一実施形態において、ｔＲＮＡシンターゼは、メタノサルシナ・マゼイ由来のＰｙｌＲＳ（ＭｍＰｙｌＲＳ）であり、又はそれに由来し、ｔＲＮＡはメタノサルシナ・マゼイ　ピロリシン由来のピロリシンｔＲＮＡ（ＰｙｌＴ）であり、又はそれに由来する。

【０１１５】

適切には、前記ｔＲＮＡシンテターゼは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び／若しくは前記ｔＲＮＡは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性であり、並びに／又は前記ｔＲＮＡシンテターゼは、真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び前記ｔＲＮＡは、内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性である。

【０１１６】

制御配列

核酸配列に作動可能に連結された制御配列には、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現調節シグナルが挙げられる。これらの制御配列は、そのコンストラクト又はベクターが用いられるように設計されている、宿主細胞と適合性であるように選択され得る。プロモーターという用語は、当技術分野においてよく知られており、サイズ及び複雑さが、最小のプロモーターから、上流エレメント及びエンハンサーを含むプロモーターまで様々である、核酸領域を包含する。

【０１１７】
適切には、プロモーター配列の１つは、ＲＮＡ　Ｐｏｌ　IIIプロモーター、例えば、Ｕ６プロモーターである。適切には、ＲＮＡ　Ｐｏｌ　IIIプロモーターは、ｔＲＮＡ遺伝子に作動可能に連結されている。適切には、この配置は、本開示のコンストラクトにおいて少なくとも４回、５回、６回、７回、又は８回、又は９回以上、反復されている。
【０１１８】
適切には、プロモーター配列の１つは、真核生物伸長因子プロモーター、例えば、ＥＦ－１プロモーター（例えば、ＥＦ－１α）である。適切には、このプロモーターは、ｔＲＮＡシンテターゼ遺伝子及び／又は所望の核酸配列に作動可能に連結されている。適切には、この配置は、本開示のコンストラクトにおいて少なくとも１回、反復されている。
【０１１９】
ＲＮＡ　Ｐｏｌ　IIIプロモーター
適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞においてＲＮＡ　Ｐｏｌ　III転写を指示する能力がある任意のプロモーターが、本明細書に記載されたコンストラクトに用いられ得る。ＲＮＡ　Ｐｏｌ　IIIプロモーターには、遺伝子内及び遺伝子外（内部及び外部）プロモーターが挙げられる。
【０１２０】
適切には、前記プロモーターは、真核生物Ｕ６プロモーター、適切には、ホモサピエンスＵ６プロモーターであり、又はそれに由来する。
【０１２１】
例示的なＵ６プロモーターは、The Journal of Biological Chemistry (1987) 262(3), 1187-1193に記載されている。
【０１２２】
ヒト及び／又はマウス系に使用される例示的なＵ６プロモーターは、Journal of the American Chemical Society (2010) 132(12), 4086-4088に記載されている。
【０１２３】
別の例示的なＵ６プロモーターは、以下に示された配列を含み、又はそれからなる：
TGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG
【０１２４】
適切には、プロモーターは、本明細書に記載されているような１個又は２個以上のｔＲＮＡ遺伝子に作動可能に連結される、哺乳類細胞、例えば、マウス細胞又はヒト細胞においてＲＮＡ　Ｐｏｌ　III転写を指示する能力があるＵ６プロモーターであり、又はそれに由来する。
【０１２５】
伸長因子プロモーター
適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において発現を指示する能力がある任意の真核生物伸長因子プロモーターが、本明細書に記載されたコンストラクトに用いられ得る。
【０１２６】
適切には、前記プロモーターは、真核生物伸長因子１（ＥＦ－１，elongation factor 1）プロモーターであり、又はそれに由来する。
【０１２７】
適切には、前記プロモーターはＥＦ－１αプロモーターであり、又はそれに由来する。
【０１２８】
例示的なＥＦ－１αプロモーターは、Anticancer Res. (2002), 22(6A), 3325-30に記載されている。
【０１２９】

別の例示的なＥＦ－１αプロモーターは、以下に示された配列を含み、又はそれからなる：

CTAGTAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGG
AGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCC
TTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCC
AGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCG
GTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGT
CGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTT
GCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAG

【０１３０】

適切には、プロモーターは、本明細書に記載されているようなｔＲＮＡシンテターゼ及び／又は所望の核酸配列に作動可能に連結された、哺乳類細胞、例えば、マウス細胞又はヒト細胞において転写を指示する能力があるＥＦ－１αプロモーターであり、又はそれに由来する。

【０１３１】

宿主細胞

適切な宿主細胞は、細菌細胞（例えば、大腸菌）が挙げられ得るが、最も適切には、宿主細胞は、真核細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、キイロショウジョウバエなどのショウジョウバエ属）、酵母細胞、線虫（例えば、エレガンス線虫）、マウス（例えば、ハツカネズミ（Mus musculus））、若しくは哺乳類細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ，Chinese hamster ovary）細胞、又はＣＯＳ細胞、ヒト２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ　３Ｔ３細胞、及びマウス赤白血病（ＭＥＬ，mouse erythroleukemia）細胞）、若しくはヒト細胞、又は他の真核細胞である。他の適切な宿主細胞は、当業者に知られている。適切には、宿主細胞は哺乳類細胞、例えば、ヒト細胞又は昆虫細胞である。

【０１３２】

本発明の実施形態において一般的に用いられ得る他の適切な宿主細胞は、実施例セクションで挙げられた宿主細胞である。

【０１３３】

ベクターＤＮＡは、通常の形質転換又はトランスフェクション技術により宿主細胞へ導入することができる。本明細書で用いられる場合、用語「形質転換」及び「トランスフェクション」は、外来核酸分子（例えば、ＤＮＡ）を宿主細胞へ導入するための様々なよく認識された技術を指すように意図され、それには、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈法、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介性トランスフェクション法、リポフェクション法、又はエレクトロポレーション法が挙げられる。宿主細胞に形質転換又はトランスフェクトするための適切な方法は当技術分野においてよく知られている。

【０１３４】

細胞株を創製する場合、安定細胞株が調製されることが一般的に好ましい。例えば、哺乳類細胞の安定的なトランスフェクションについて、用いられる発現ベクター及びトランスフェクション技術に依存して、ほんのわずかな細胞だけが外来ＤＮＡをそれらのゲノムへ組み込み得ることは知られている。これらの組み込み体を同定し、かつ選択するために、（例えば、抗生物質への耐性についての）選択マーカーをコードする遺伝子が、一般的に、所望の遺伝子と共に宿主細胞へ導入される。好ましい選択マーカーには、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、又はメトトレキセートなどの薬物に対する耐性を与えるものが挙げられる。選択マーカーをコードする核酸分子は、同じベクターにおいて宿主細胞へ導入することができ、又は別個のベクターにおいて導入することができる。導入される核酸分子を安定的にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定することができる（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込まれている細胞は生存し、その他の細胞は死ぬ）。

【０１３５】

一実施形態において、本明細書に記載されたコンストラクトは、宿主細胞のゲノムへ組

み込まれる。安定的な組み込みの利点は、個々の細胞間又はクローン間での均一性が達成されることである。別の利点は、最良の産生株の選択が行われ得ることである。したがって、安定細胞株を創製することが望ましい。

【０１３６】

別の実施形態において、本明細書に記載されたコンストラクトが宿主細胞にトランスフェクトされる。コンストラクトを宿主細胞にトランスフェクトすることの利点は、タンパク質収量が最大になり得ることである。

【０１３７】

一態様において、本明細書に記載された核酸コンストラクト又はベクターを含む細胞が記載されている。

【０１３８】

ｅＲＦ１

本明細書における「ｅＲＦ１」への言及は、それ以外であることが文脈から明らかでない限り、真核生物のｅＲＦ１を指す。

【０１３９】

本明細書で、特にｅＲＦ１の議論で用いられる場合、「ミュータント」は、「野生型以外」というそれの普通の意味をもつ。明らかに、野生型残基は、用いられるｅＲＦ１の特定の種によって異なり得る。特定の残基への言及は、GenBank受託番号ＡＦ０９５９０１．１のｅＲＦ１についてのホモサピエンスの野生型参照配列を参照して解釈されるべきである。出願の日付におけるデータベース公開に準ずる。何らかの疑問が生じた際は、これは、２０１５年８月１５日の日付のGenetic Sequence Data Bank NCBI-GenBank Flat File Release 209.0を意味する。

【０１４０】

疑念を避けるために、野生型ヒトｅＲＦ１ポリペプチド配列は以下としてみなされる：

1 maddpsaadr nveiwkikkl iksleaargn gtsmisliip pkdqisrvak mladefgtas
61 niksrvnrls vlgaitsvqq rlklynkvpp nglvvycgti vteegkekkv nidfepfkpi
121 ntslylcdnk fhtealtall sddskfgfiv idgsgalfgt lqgntrevlh kftvdlpkkh
181 grggqsalrf arlrmekrhn yvrkvaetav qlfisgdkvn vaglvlagsa dfktelsqsd
241 mfdqrlqskv lklvdisygg engfnqaiel stevlsnvkf iqekkligry fdeisqdtgk
301 ycfgvedtlk alemgaveil ivyenldimr yvlhcqgtee ekilyltpeq ekdkshftdk
361 etgqehelie smpllewfan nykkfgatle ivtdksqegs qfvkgfggig gilryrvdfq
421 gmeyqggdde ffdlddy（配列番号４）

【０１４１】

特に、本出願に示されたアミノ酸アドレスは、上記のｅＲＦ１参照配列のナンバリングに対応する。ｅＲＦ１の欠失型又は伸長型が用いられる場合（例えば、６ｈｉｓタグが付加される場合、又はポリペプチドの一区画が削除される場合）、アミノ酸ナンバリングは、完全長参照配列の等価の区画に対応するとして扱われるべきであり、「絶対的な」又は固定された融通の利かない数値アドレスとして扱われるべきではない。説明すれば、もし記載がＥ５５の置換を挙げている場合、これは、上記のｅＲＦ１参照配列のアミノ酸５５を意味する。別の種の位置５５が野生型においてＥではない場合には、ヒト野生型配列のＥ５５に対応するアミノ酸は、当技術分野においてよく知られているように、例えば、前記他の種のｅＲＦ１の配列を上記の参照配列とアラインメントし、その対応するアミノ酸を選択することにより同定される。同様に、用いられるポリペプチドが、最初の１０個のアミノ酸の欠失により切断されている場合には、示されるアドレスは、（例えば、Ｅ４５ではなく、むしろ）それでもなおＥ５５である（これは、当技術分野において通常であるように、上記の完全長ｅＲＦ１配列を参照した上で、対応する文脈のアミノ酸を指すと、当業者によって容易に理解されるであろう）。

【０１４２】

本発明者らは、ｅＲＦ１のＮ末端ドメインを除去する他の欠失が、類似した効果を生じるであろうことを教示する。ｅＲＦ１のＮ末端ドメイン（およそアミノ酸１～１３０）は

、メッセンジャーＲＮＡ及び終止コドンと相互作用する。このドメインの全体又は部分が欠失している場合、使用する時、（Δ１００バリアントによって例示される）不活性ｅＲＦ１－ｅＲＦ３複合体を形成し、終止コドンリードスルー（及び毒性）を増加させるはずである。適切には、本発明に用いられるｅＲＦ１は、配列番号４の少なくともアミノ酸１３１以降に対応するアミノ酸配列を含む；適切には、配列番号４の少なくともアミノ酸１０１以降に対応するアミノ酸配列を含む。適切には、本発明に用いられるｅＲＦ１は、配列番号４の少なくともアミノ酸１０１から末端に対応するアミノ酸配列を含む。適切には、本発明に用いられるｅＲＦ１は、配列番号４の少なくともアミノ酸１３１から末端に対応するアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

適切には、配列番号４に対して、ｅＲＦ１のＣ末端が切断されず、又は最小限でのみ切断される。最も適切には、配列番号４に対して、ｅＲＦ１のＣ末端は切断されない。

【０１４４】

必要とされるいかなるアラインメントも、目視により、又はＧＣＧプログラムスイート（GCG Genetics Computer Group University Research Park 575 Science Drive Madison, WI 53711）などの当技術分野において知られた広く入手できる配列アラインメントプログラムのいずれかを用いて、実行されるべきである。最も適切には、アラインメントは、デフォルト設定でClustalWを用いている。

【０１４５】

有利には、ｅＲＦ１のある特定のミュータントは、本開示に従って用いられて、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸組み込みの実質的増加をもたらすことができる。したがって、本明細書に記載されているような核酸コンストラクトを、ある特定のｅＲＦ１ミュータントと共に細胞において発現することは有利であり得る。ｅＲＦ１は、様々なプロモーター、例えば、ＥＦ１プロモーター又はＣＭＶプロモーターを用いて発現し得る。

【０１４６】

最も適切には、本発明のｅＲＦ１ミュータントは、非天然アミノ酸組み込みの効率の増加をもたらす。

【０１４７】

適切には、本発明のｅＲＦ１ミュータントは、天然の翻訳対照と比較して、非天然アミノ酸組み込みの効率を増加させる。

【０１４８】

適切には、本発明のｅＲＦ１ミュータントは、野生型ｅＲＦ１対照と比較して、非天然アミノ酸組み込みの効率の増加をもたらす。これは、本明細書に教示されているように、例えば、実施例セクションを参照して、容易に決定され得る。

【０１４９】

ある特定の実施形態において、ミュータントｅＲＦ１が宿主細胞へ組み込まれ、適切には、宿主細胞へ安定的に組み込まれる。

【０１５０】

ある特定の実施形態において、ミュータントｅＲＦ１は、宿主細胞において、本明細書に記載された核酸コンストラクトの１つ又は２つ以上から発現する。

【０１５１】

ある特定の実施形態において、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列は、別個のコンストラクト又は別個のベクター上にある。

【０１５２】

ＴＢ３－１としても知られる、真核生物翻訳終結因子１（ｅＲＦ１）は、ヒトにおいてＥＴＦ１遺伝子によってコードされるタンパク質である。真核生物において、これは、全ての３個の終止コドンを認識する唯一の終結因子である。タンパク質生合成の終結及び新生ポリペプチド鎖の解離は、リボソームのアミノアシル部位におけるインフレームの終止コドンの存在によってシグナル伝達される。翻訳終結の過程は普遍的であり、タンパク質

終結因子（ＲＦ，release factor）及びＧＴＰによって媒介される。

【０１５３】

例示的なｅＲＦ１遺伝子配列は、GenBank受託番号ＡＦ０９５９０１．１に記載されているような野生型ホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子配列である。適切には、ｅＲＦ１遺伝子は、例えば、キイロショウジョウバエについて、コドン最適化することができる。

【０１５４】

サプレッションの一過性増加を与えた後、哺乳類細胞においてｅＲＦ１発現をノックダウンさせ得るｓｈＲＮＡを用いることもまた、有害であり得る。高レベルの終止コドンリードスルーもまた起こり得る。明らかにこれらの有害な効果は避けられるべきであり、ｓｈＲＮＡは、適切には、本開示に用いられるべきではない。

【０１５５】

本発明において有用なｅＲＦ１ミュータントは、以下の表に開示されている：

【０１５６】

【表１】

列 I ミュータント部位	列 II 例示的な変異	列 III 効果(向上倍率)
E55	E55D	5.1
N129, K130	N129P, K130Q	3.2
T122, S123	T122Q, S123F	3.0
E55	E55A	2.8
Y125	Y125F	2.6
T58, S60, S64, L125, N129	T58K, S60T, S64D, L125F, N129S	2.5
S123, L124, Y125	S123A, L124I, Y125L	2.5
S123, L124, Y125	S123R, L124W, Y125R	1.9
S123, L124, Y125	S123H, L124A, Y125G	1.9
M51, K130	M51A, K130M	1.8
S123, L124, Y125	S123A, L124L, Y125V	1.8
S123, L124, Y125	S123L, L124C, Y125S	1.8
S123, L124, Y125	S123L, L124S, Y125S	1.8
S123, L124, Y125	S123V, L124T, Y125P	1.7
Δ100 (N 末端欠失)*	Δ100 (N 末端欠失)*	6.8
S70, G73 **	S70A, G73S **	0.67

*どの eRF1 ミュータントが用いられるべきかを選択する際、当業者は、細胞生存率と抑制の増加の間の相互作用を考慮するであろう。例えば、Δ100eRF1 ミュータントは、結果として、高レベルの終止コドンリードスルー及び病的細胞を生じ得る。したがって、Δ100eRF1 ミュータントは、適切には、本開示に用いられない。

**組み込みシグナルとしての UAG では有用ではないが、UGA では適用が見出され得る。

【０１５７】
時々、「Ｌ１２４Ｌ」などの変異していない部位の言及がある。明らかに、これは、野生型「Ｌ」が変化していないので変異ではない。これは、Ｌ１２４がその特定のｅＲＦ１において変異していない、すなわち、位置Ｌ１２４が、その特定の変異の組み合わせ／その特定の例示的なｅＲＦ１において野生型（Ｌとして）のままであることを示すものとして理解されるべきである。
【０１５８】
所定の位置における各変異について、類似した効果を与えるであろういくつかの密接に関連したアミノ酸があると考えられる。「例示的なミュータント」は、網羅的であることを意図するものではない。上記の列Ｉにおいて同定された残基に対する「野生型以外」への変異もまた企図される。より適切には、保存的置換が、例えば下記の表に従って、列IIにおいて挙げられた残基になされ得る。下記の表の２番目の列における同じブロック内、好ましくは、３番目の列における同じ行内のアミノ酸が互いに置換され得る：
【０１５９】
【表２】

脂肪族	非極性	ＧＡＰ
		ＩＬＶ
	極性-非荷電	ＣＳＴＭ
		ＮＱ
	極性-荷電	ＤＥ
		ＫＲ
芳香族		ＨＦＷＹ

【０１６０】
例えば、列ＩにおけるＥ５５は、「Ｅ以外」へ変異され得る。より適切には、Ｅ５５は、列IIにおける特定の変異に保存的なアミノ酸へ変異され得、例えば、Ｅ５５Ｄ又はＥ５５Ａ又はＥ５５Ｇ又はＥ５５Ｐである。最も適切には、Ｅ５５は、Ｅ５５Ａ又はＥ５５Ｄなど列IIに具体的に挙げられたアミノ酸へ変異され得、最も適切にはＥ５５Ｄであり得る。同じことが、列Ｉに列挙された他の残基に適用される。
【０１６１】
Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５ミュータントは全て、ＤＬＲアッセイにおいてＥ５５Ｄと比較して良く機能するが（Ｅ５５Ｄの１～２倍良い）、タンパク質発現試験においては、Ｅ５５Ｄより機能性が低い。それらは、それでもなお本発明において有用ではあるが、最も好ましいミュータントはＥ５５Ｄである。
(sfGFP(3TAG)
【０１６２】
いくつかの変異が組み合わせて提示されているが、それらの組み合わせは、本発明の特に好ましい例である。個々のｅＲＦ１ミュータントの使用が開示されている；適切には、

前記ミュータントｅＲＦ１は、Ｅ５５、Ｎ１２９、Ｋ１３０、Ｔ１２２、Ｓ１２３、Ｙ１２５、Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｌ１２５、Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｍ５１、及びＫ１３０からなる群から選択される、配列番号４に対する変異を含む。適切には、前記ミュータントｅＲＦ１は、Ｅ５５Ｄ、Ｎ１２９Ｐ、Ｋ１３０Ｑ、Ｔ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆ、Ｅ５５Ａ、Ｙ１２５Ｆ、Ｔ５８Ｋ、Ｓ６０Ｔ、Ｓ６４Ｄ、Ｌ１２５Ｆ、Ｎ１２９Ｓ、Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｉ、Ｙ１２５Ｌ、Ｓ１２３Ｒ、Ｌ１２４Ｗ、Ｙ１２５Ｒ、Ｓ１２３Ｈ、Ｌ１２４Ａ、Ｙ１２５Ｇ、Ｍ５１Ａ、Ｋ１３０Ｍ、Ｙ１２５Ｖ、Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｃ、Ｙ１２５Ｓ、Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｓ、Ｙ１２５Ｓ、Ｓ１２３Ｖ、Ｌ１２４Ｔ、及びＹ１２５Ｐからなる群から選択される、配列番号４に対する変異を含む。

【０１６３】

ｅＲＦ１は、一過性発現又はゲノム組み込みにより宿主細胞において備えられ得る。例えば、安定的な遺伝的背景においてｅＲＦ１ミュータントの誘導性発現を得るためにTRex Flip-In系（ヒトＨＥＫ２９３由来）を用いる。一実施形態において、関連の核酸が一過性トランスフェクションにより導入される。一実施形態において、関連の核酸が安定細胞株創製により導入される。

【０１６４】

様々な特に適切なミュータント及び組み合わせが本明細書に記載され、それらには、Ｍ５１Ａ／Ｋ１３０Ｍ、Ｔ１２２Ｑ／Ｓ１２３Ｆ、Ｓ７０Ａ／Ｇ７３Ｓ、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆが挙げられる。適切には、本開示で用いられるｅＲＦ１ミュータントは、Ｅ５５における変異を含む。適切には、本開示で用いられるｅＲＦ１ミュータントは、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択される。これらの変異は、GenBank受託番号ＡＦ０９５９０１．１に由来する野生型ホモサピエンスｅＲＦ１アミノ酸配列又はそのコドン最適化バリアントに関してなされる。

【０１６５】

ｅＲＦ１タンパク質は、大部分の真核生物にわたって非常に強い相同性を示す。本発明者らは、本発明者らの変異を導入するための例としてヒトｅＲＦ１を用いたが、他の種由来のｅＲＦ１もまた、同じ変異（例えば、ヒト又は昆虫ｅＲＦ１タンパク質におけるＥ５５Ｄ）を有し得る。本発明者らは、これらの代替種のミュータントｅＲＦ１タンパク質が、本明細書における例示的なｅＲＦについて示されているような、類似した技術的効果を生じるはずであることを教示する。

【０１６６】

本発明者らは、好ましいｅＲＦ１ミュータント（改変型ヒト（ホモサピエンス）ｅＲＦ１バリアント）を用いて、ＣＨＯ細胞（チャイニーズハムスター（C. griseus））、ＨＥＫ細胞（ホモサピエンス）、及びＤｍｅｌ細胞（キイロショウジョウバエ）を含む多様な真核生物の宿主細胞において非天然アミノ酸組み込みを首尾よく増強した。これらの生物体におけるｅＲＦ１タンパク質は高度に保存されている（表１）。

【０１６７】

【表３】

	ホモサピエンス	*チャイニーズハムスター*	*キイロショウジョウバエ*	*サッカロマイセス・セレビシエ(S. cerevisiae)*
ホモサピエンス	---			
チャイニーズハムスター	*92%*	---		
キイロショウジョウバエ	*84%*	*78%*	----	
サッカロマイセス・セレビシエ (S. cerevisiae)	*67%*	*62%*	*67%*	---

表 1. 様々な種における eRF1 のペアワイズ類似性。示されたパーセンテージは、ClustalW アラインメントによって決定される場合のそのタンパク質にわたって保存されたアミノ酸同一性を示す。

【０１６８】

様々な単細胞真核生物（酵母）と多細胞真核生物（哺乳類、昆虫）の間の保存のレベルを考慮すれば、様々な真核生物種由来のｅＲＦ１バリアントが、複数の他の真核生物種の宿主細胞において機能しうるであろうことは支持される。例えば、宿主細胞はヒト、マウス、エレガンス線虫、ロバ、酵母、又は他の真核生物宿主細胞であり得る。

【０１６９】

適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６７％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも８４％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも９２％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する；適切には、ミュータントｅＲＦ１は、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも９８％、又はさらにそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【０１７０】

一実施形態において、適切には、パーセンテージ同一性レベルは、ミュータントｅＲＦ１について列挙された特定の変異が導入される前に計算される。好ましくは、パーセンテージ同一性レベルは、ミュータントｅＲＦ１について列挙された特定の変異を含んで、計算される。

【０１７１】

適切には、宿主細胞はインビトロにある。宿主細胞が生物体内にある場合、適切には、宿主は非ヒトである。

【０１７２】

本発明者らは、例示的なヒトｅＲＦ１を、３つの真核生物種（ヒト、ハムスター、ハエ）由来の細胞株、加えて、真核生物の生きている動物（ハエ）へ導入した。

【０１７３】

改変型ヒトｅＲＦ１は、天然ｅＲＦ１が８４％だけ保存されている種（Ｄｍｅｌ昆虫細胞）において非天然アミノ酸組み込みを増強する。本発明者らは、天然酵母ｅＲＦ１を本発明者らの例示的なヒトｅＲＦ１バリアントで置換するためにコンストラクトを用いている（Nucleic Acids Res. 2010 Sep;38(16):5479-92に由来したプラスミド）。これは、６７％のみの保存率（配列同一性）の多様なｅＲＦ１タンパク質を用いることができ、広い範囲の真核生物を網羅することを示している。

【０１７４】

もちろん、ｅＲＦ１（又はバリアント）の核酸配列は重要ではない；１つの例示的なヒトｅＲＦ１バリアントは、昆虫細胞においてよく発現するようにコドン最適化されているが、ヒト細胞株においても機能する。したがって、（必要に応じての）核酸のコドン最適化は、当業者が判断する事項である。

【０１７５】

アンバーサプレッションが増加することは本発明の利点である。適切には、本明細書に記載されたｅＲＦ１ミュータントがアンバーサプレッションに用いられる。

【０１７６】

さらなる態様において、以下のステップを含む、哺乳類細胞又は昆虫細胞などの真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法が提供される：ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペア、所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップ；ii）所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及びiii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように、細胞をインキュベートするステップ。

【０１７７】

真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用もまた開示されている。

【０１７８】

所望のタンパク質内の非天然アミノ酸の組み込みを増加させるｅＲＦ１のミュータントを同定する方法もまた開示されている。その方法は、以下のステップを含む：（ｉ）所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込む能力がある細胞を用意するステップであって、適切には、前記細胞が、本明細書に記載されているような真核細胞である、ステップ；（ii）所望のタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、かつｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及び（iii）ｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で、所望のタンパク質への非天然アミノ酸組み込みのレベルを決定するステップであって、ｅＲＦ１のミュータントの存在下での所望のタンパク質への非天然アミノ酸組み込みのレベルが増加すると、前記ｅＲＦ１のミュータントが、所望のタンパク質における非天然アミノ酸の組み込みを増加させることが示される、ステップ。

【０１７９】

ｅＲＦ１に１つ又は２つ以上の変異を組み込むための方法には、当技術分野においてよく知られている部位特異的突然変異誘発などが挙げられる。適切には、選択される変異は、参考文献（Kolosov, P.; Frolova, L.; Seit-Nebi, A.; Dubovaya, V.; Kononenko, A.; Oparina, N.; Justesen, J.; Efimov, A.; Kisselev, L. Nucleic Acids Res 2005, 33

, 6418、Bulygin, K. N.; Khairulina, Y. S.; Kolosov, P. M.; Ven'yaminova, A. G.; Graifer, D. M.; Vorobjev, Y. N.; Frolova, L. Y.; Kisselev, L. L.; Karpova, G. G. RNA 2010, 16, 1902、Seit-Nebi, A.; Frolova, L.; Kisselev, L. EMBO Rep 2002, 3, 881、Eliseev, B.; Kryuchkova, P.; Alkalaeva, E.; Frolova, L. Nucleic Acids Res 2011, 39, 599、Lekomtsev, S.; Kolosov, P.; Bidou, L.; Frolova, L.; Rousset, J. P.; Kisselev, L. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 10824、Kryuchkova, P.; Grishin, A.; Eliseev, B.; Karyagina, A.; Frolova, L.; Alkalaeva, E. Nucleic Acids Res 2013, 41, 4573）に記載されているように、アンバーコドンにおける終結に効果を生じるｅＲＦ１のアミノ酸における変異に基づき得る。適切には、選択される変異は、リボソーム内のｍＲＮＡ上の終止コドンと相互作用するｅＲＦ１のＮ末端ドメインに位置し得る（図２ａ参照）。望ましくは、ｅＲＦ１ミュータントは、ＴＡＧなどの選択されたコドンに応答した効率的な非天然アミノ酸組み込みを、他の終止コドンのリードスルーを増加させることなく生じる。

【０１８０】

一実施形態において、ｅＲＦ１などの終結因子ミュータントは、本開示において用いられない。

【０１８１】

一実施形態において、ｅＲＦ１などの内因性終結因子の発現は、宿主細胞から減少又は欠失する。これは、例えば、ｅＲＦ１をコードするゲノム座の１つ若しくは２つ以上の破壊により、又はｅＲＦ１のＲＮＡ媒介性遺伝子サイレンシングを通して、達成することができる。

【０１８２】

非天然アミノ酸を含むタンパク質の作製

直交性の、又は拡張された遺伝暗号が本開示に用いることができ、それにおいて、所望の核酸配列に存在する１個又は２個以上の特定のコドンが、非天然アミノ酸をコードするように割り当てられ、その結果、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアを用いることにより、その非天然アミノ酸を所望のタンパク質中に遺伝的に組み込むことができる。直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアは、ｔＲＮＡに非天然アミノ酸をチャージングする能力があり、かつコドンに応答して、ポリペプチド鎖にその非天然アミノ酸を組み込む能力がある。

【０１８３】

そのコドンは、コドンアンバー、オーカー、オパール、又はクアドルプレットコドンであり得る。コドンは、単に、非天然アミノ酸を運ぶために用いられる直交性ｔＲＮＡに対応しなければならないだけである。適切には、そのコドンはアンバーである。適切には、そのコドンは、直交性コドンである。

【０１８４】

非天然アミノ酸組み込みは、大方の場合、アンバーＵＡＧコドンにおいて実行される。適切には、そのコドンは、ＵＡＧ又はＵＧＡ、最も適切には、ＵＡＧ（アンバー）である。アンバー（ＵＡＧ）終止コドンでの終結因子の活性を最小限にする例示的な変異（例えば、Ｅ５５Ｄ）。記載された他の変異は、アンバー終止コドンの認識に影響しない可能性があるが、ＵＧＡ又はＵＡＡ終止コドン（オパール／オーカー）での終結活性を低下させる。これは、Ｓ７０Ａ、Ｇ７３Ｓによって例示される。当業者は、ＵＡＧ（アンバー）以外のコドンを用いる場合、彼らの要求に適合するようにｅＲＦ１ミュータントを選択するであろう。

【０１８５】

本明細書に記載された特定の例がアンバーコドン及び対応するｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンテターゼを用いていることに留意されるべきである。上記で言及されているように、これらは様々であり得る。あるいは、非天然アミノ酸と共に機能する能力がある代替のｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンテターゼのペアをわざわざ使用又は選択することなく、他のコドンを用いるために、ｔＲＮＡのアンチコドン領域を、単に、選択したコドンに対する所望のアン

チコドン領域へと交換することができる。アンチコドン領域は、ｔＲＮＡのチャージング又は組み込み機能にも、ｔＲＮＡシンテターゼによる認識にも関与せず、それゆえ、そのような交換は完全に当業者の範囲内である。

【０１８６】

したがって、代替の直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアが、必要に応じて用いられ得る。

【０１８７】

宿主細胞は、１個又は２個以上の非天然アミノ酸を含むタンパク質を産生する（例えば、発現する）ために用いることができる。

【０１８８】

本明細書に開示されたコンストラクト又はベクターが導入される宿主細胞は、ｔＲＮＡ、ｔＲＮＡシンテターゼ、及び所望のタンパク質が産生されるように適切な培地中で培養又は維持される。培地はまた、所望のタンパク質が、非天然アミノ酸を組み込むように非天然アミノ酸を含む。そのようなタンパク質は、コード配列内に本明細書に記載されているような１個又は２個以上のコドンを含む核酸によってコードされる。直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアは、ｔＲＮＡに非天然アミノ酸をチャージし、コドンに応答して、非天然アミノ酸をポリペプチド鎖に組み込む。

【０１８９】

さらなる態様において、以下のステップを含む、真核細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法が提供される：ｉ）本明細書に記載されたコンストラクト又はベクターを含む真核細胞を用意するステップ；ii）所望の核酸配列によってコードされる所望のタンパク質に組み込まれる１個又は２個以上の非天然アミノ酸の存在下で、細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が、ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及びiii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように細胞をインキュベートするステップ。

【０１９０】

非天然アミノ酸を含むタンパク質は、ｔＲＮＡ及びｔＲＮＡシンテターゼを含む本明細書に記載された核酸コンストラクト、並びに１個又は２個以上のインフレームでの直交性（終止）コドンを有する所望の核酸配列を含む、本明細書に記載された核酸コンストラクトを宿主細胞へ導入することにより調製される。宿主細胞は、非天然アミノ酸を含む生理学的溶液に曝され、その後、宿主細胞は、所望のタンパク質のコード配列の発現を可能にする条件下で維持される。非天然アミノ酸は、コドンに応答してポリペプチド鎖に組み込まれる。

【０１９１】

有利には、１個より多い非天然アミノ酸が所望のタンパク質に組み込まれる。あるいは、２個又は３個以上の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の２つ又は３つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも３個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の３つ又は４つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも４個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の４つ又は５つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも５個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の５つ又は６つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも６個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の６つ又は７つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも７個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の７つ又は８つ以上の部位で組み込まれ得る。適切には、少なくとも８個の非天然アミノ酸が、所望のタンパク質へ、そのタンパク質内の８つ又は９つ以上の部位で組み込まれ得る。

【０１９２】

複数の非天然アミノ酸が所望のタンパク質に組み込まれる場合、ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡのペアがコドンに応答して、非天然アミノ酸の組み込みを指示することができ

るように、複数のコドンが、コードする核酸配列へ所望の位置に組み込まれる必要があるであろうことは理解されるであろう。核酸をコードする少なくとも１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、又は８個、又は９個以上のコドンが、所望の核酸配列へ組み込まれ得る。

【０１９３】

所望のタンパク質に、単一のタンパク質に１個より多い型の非天然アミノ酸を組み込むことが望まれる場合、第２の、又はさらなる直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアが、第２の、又はさらなる非天然アミノ酸を組み込むために用いられ得る；適切には、前記第２の、又はさらなる直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアは、その２個又は３個以上の非天然アミノ酸が、単一の製造ステップにおいてそのタンパク質内の異なる特定された部位へ特異的に組み込まれ得るように、所望のタンパク質をコードする核酸において異なるコドンを認識する。したがって、ある特定の実施形態において、２つ又は３つ以上の直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアが用いられ得る。

【０１９４】

一旦、非天然アミノ酸が組み込まれた所望のタンパク質が宿主細胞において産生されたならば、それは、酵素的、化学的、及び／又は浸透圧的溶解、並びに物理的破壊を含む、当技術分野において知られた様々な技術によってその宿主細胞から抽出することができる。所望のタンパク質は、分取クロマトグラフィー、アフィニティ精製、又は任意の他の適切な技術などの、当技術分野において知られた標準技術により精製することができる。

【０１９５】

非天然アミノ酸

本明細書で用いられる場合、用語「非天然アミノ酸」は、タンパク質内に天然で存在する２０個のアミノ酸以外のアミノ酸を指す。

【０１９６】

非天然アミノ酸の非限定的例には以下が挙げられる：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－ＧｌｃＮＡｃβ－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－Ｌ－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アナログ；グルタミンアミノ酸の非天然アナログ；フェニルアラニンアミノ酸の非天然アナログ；セリンアミノ酸の非天然アナログ；スレオニンアミノ酸の非天然アナログ；アルキル、アリル、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、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、ヘテロサイクリック、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、若しくはアミノ置換アミノ酸、又はそれらの組み合わせ；光活性化架橋剤を有するアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；光ケージド及び／又は光異化性アミノ酸；ビオチン又はビオチンアナログ含有アミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレング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；化学切断性又は光切断性アミノ酸；伸長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；炭素連結型糖を含有するアミノ酸；酸化還元活性アミノ酸；α－ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸；α，α二置換アミノ酸；β－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。

【０１９７】

本明細書に記載されているように、最適な１個又は２個以上の非天然アミノ酸をタンパ

ク質に組み込むために、当業者は、単に、そのコドンを認識する直交性ｔＲＮＡをチャージングする能力がある正しいシンテターゼを選択するだけである。

【０１９８】

異なる非天然アミノ酸の組み込みの特定の例が本明細書に提供される。

【０１９９】

実施例２において、（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－ｌ－リシン）及び（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－ｌ－リシンの組み込みが実証されている。これらの化合物の構造はチャート１ｂに示されている。これらの基質のどちらも、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{\mathrm{CUA}}$のペアの既知の効率的な基質である（Nat Biotechnol 2014, 32, 465及びJ Am Chem Soc 2009, 131, 8720）。

【０２００】

実施例９において、Ｂｏｃ－Ｋ（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン、ノルボネン－Ｋ（Ｎ$^{\varepsilon}$－ノルボルネン－２－イルオキシカルボニル－Ｌ－リシン）、シクロプロペン－Ｋ（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン）、及びビシクロニン－Ｋ（Ｎ$^{\varepsilon}$－（［（１Ｒ，８Ｓ）－ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イルメトキシ］カルボニル）－リシン）の組み込みが示されている。

【０２０１】

国際公開第２０１０／１３９９４８号パンフレットは、直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアを用いる、所望のタンパク質への、アルキン－アジド結合を支持する能力がある脂肪族又は直鎖状炭素骨格のアミノ酸の組み込みを記載する。

【０２０２】

国際公開第２０１３／１０８４４号パンフレットは、直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアを用いる、所望のタンパク質へのノルボルネンアミノ酸の組み込みを記載する。

【０２０３】

抗体

適切には、所望の核酸は、抗体又は抗体断片をコードする。１個又は２個以上の非天然アミノ酸、適切には、２個、３個、４個、５個、６個、７個、又は８個、又は９個以上の非天然アミノ酸が、抗体又は抗体断片に組み込まれ得る。

【０２０４】

本明細書で用いられる場合、用語「抗体」は、非共有結合的に、可逆的に、及び特異的様式で、対応する抗原を結合する能力がある免疫グロブリンファミリーのタンパク質を指す。その用語は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ科の抗体、キメラ抗体、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ，anti-idiotypic）抗体を含むが、それらに限定されない。抗体は、任意のアイソタイプ／クラスであり得、したがって、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ、又はＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２などの抗体のサブクラスを含み得る。

【０２０５】

本明細書で用いられる場合、用語「抗体断片」は、抗原のエピトープと（例えば、結合、立体障害、安定化／不安定化、空間分布により）特異的に相互作用する能力を保持する抗体の１つ又は２つ以上の部分を指す。結合断片の例には、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ，single-chain Fv）、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ，disulfide-linked Fv）、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片；Ｆ（ａｂ）$_2$断片、ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋により連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片；並びに抗体の単離された相補性決定領域（ＣＤＲ，complementarity determining region）、又は他のエピトープ結合断片が挙げられるが、それらに限定されない。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメイ

ン、ＶＬ及びＶＨは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法によって、それらが、ＶＬ及びＶＨ領域がペアになって一価分子（一本鎖Ｆｖ（「ｓｃＦｖ」）として知られている）を形成する単一のタンパク質として作製されるのを可能にする合成リンカーにより、連結することができる。そのような一本鎖抗体は、用語「抗原結合断片」内に含まれる。これらの抗原結合断片は、当業者に知られた通常の技術を用いて得られ、その断片は、無傷抗体（intact antibodies）と同じ方法で活性についてスクリーニングすることができる。

【０２０６】

抗体は、単一特異性、二重特異性、又は多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、１つの標的タンパク質の異なるエピトープに特異的であり得、又は１つより多い標的タンパク質に特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。抗体は、別のペプチド又はタンパク質などの別の機能性分子に連結することができ、又はそれと共発現することができる。例えば、抗体又はその断片は、別の抗体又は抗体断片などの１つ又は２つ以上の他の分子実体と機能的に連結して、第２の結合特異性を有する二重特異性又は多重特異性抗体を生じることができる。機能的連結は、例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、又は非共有結合性会合を用いて達成され得る。

【０２０７】

他の例示的二重特異性型式には、ｓｃＦｖに基づいた、又はダイアボディ二重特異性型式、ＩｇＧ－ｓｃＦｖ融合、二重可変ドメイン（ＤＶＤ，dual variable domain）－Ｉｇ、クアドローマ、ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ、共通の軽鎖（例えば、ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓを有する共通の軽鎖など）、CrossMab、CrossFab、（SEED）ボディ、ロイシンジッパー、Duobody、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、及び二重作用性Ｆａｂ（ＤＡＦ，dual acting Fab）－ＩｇＧ二重特異性型式が挙げられる（例えば、mAbs (2012) 4:6, 1-11参照）。

【０２０８】

適切には、用いられる抗体はヒト抗体である。用語「ヒト抗体」は、フレームワーク領域とＣＤＲ領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体は定常領域を含有する場合には、定常領域もまた、そのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列若しくはヒト生殖系列配列の変異バージョン、又はヒトフレームワーク配列分析から導かれたコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体に由来する。ヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基を含むことができる（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発により、又はインビボでの体細胞突然変異により導入される変異、又は安定性若しくは製造を促進するための保存的置換）。

【０２０９】

抗体薬物コンジュゲート

１個又は２個以上の非天然アミノ酸が組み込まれた抗体又は抗体断片は、抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ，antibody drug conjugate）を調製するために用いられ得る。

【０２１０】

ＡＤＣは、薬物部分にコンジュゲートした抗体又は抗体断片を含む。薬物部分は、ＡＤＣが存在する細胞へ所望の影響を生じる任意の薬物部分であり得る。例として、それは、抗がん剤、抗血液疾患剤、自己免疫治療剤、抗炎症剤、抗真菌剤、抗細菌剤、抗寄生虫剤、抗ウイルス剤、麻酔剤、又は放射性元素などであり得る。

【０２１１】

抗体又は抗体断片は、要求に応じて、１つ又は２つ以上の同一の、又は異なる薬物部分にコンジュゲートすることができる。抗体又は抗体断片は、所定の生物学的応答を改変する薬物部分にコンジュゲートし得る。したがって、例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質、ペプチド、又はポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質には、例えば、毒素、細胞毒、腫瘍壊死因子などのタンパク質、サイトカイン、アポトーシス剤、抗血管新生剤、又はリンホカインなどの生物学的応答調節物質が挙げられる。

【０２１２】
薬物部分を抗体又は抗体断片にコンジュゲートするための様々な方法は、当技術分野においてよく知られている。例えば、抗体への部位特異的薬物コンジュゲーションについての最新の方法を概説するMAbs (2014) 6(1): 46-53を参照することができる。タンパク質の化学的修飾についての様々な技術もまた、当技術分野において知られている（例えば、Nat Chem Biol. (2011) 7, 876-84、Bioconjugate Techniques, Elsevier (2008)、及びChem Biol. (2010) 17, 213-27参照）。
【０２１３】
薬物部分は、リンカーを介して抗体又は抗体断片に連結することができる。本明細書で用いられる場合、「リンカー」は、抗体又は抗体断片を薬物部分に連結する能力がある任意の化学的部分を指す。リンカーは、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断、及びジスルフィド結合切断などの切断に感受性が高い（切断可能リンカー）。あるいは、リンカーは、切断に対して実質的に抵抗性であり得る（例えば、安定的なリンカー又は非切断性リンカー）。
【０２１４】
ＡＤＣは、当技術分野において知られた様々なアッセイにより、それらの物理的／化学的性質及び／又は生物学的活性について特徴付け及び選択することができる。例えば、抗体は、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、ビアコア（Biacore）、又はウェスタンブロットなどの知られた方法によりそれの抗原結合活性について試験することができる。トランスジェニック動物及び細胞株は、予防的又は治療的処置として可能性があるＡＤＣをスクリーニングするのに特に有用である。有用なＡＤＣについてのスクリーニングは、候補ＡＤＣを様々な用量にわたってトランスジェニック動物に投与するステップ、及び評価される疾患又は障害へのＡＤＣの効果について様々な時点でアッセイするステップを含み得る。代替として、又は追加として、薬物は、妥当な場合、疾患の誘発剤への曝露の前に、又はそれと同時に、投与することができる。候補ＡＤＣは、ミディアム又はハイスループットスクリーニング形式で、連続的かつ個々に、又は並行して、スクリーニングされ得る。
【０２１５】
したがって、さらなる態様において、以下のステップを含む抗体－薬物コンジュゲートを調製する方法が提供される：ｉ）所望の核酸配列が抗体又は抗体断片をコードする、本明細書に記載された真核細胞を用意するステップ；ii）抗体又は抗体断片に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；iii）非天然アミノ酸が組み込まれている抗体又は抗体断片を得るステップ；及びvi）抗体又は抗体断片を、非天然アミノ酸を介して薬物部分とコンジュゲートするステップ。非天然アミノ酸と薬物部分との間のリンカーが用いられ得る。
【０２１６】
一実施形態において、１個又は２個以上（例えば、２個、３個、４個、５個、６個、７個、又は８個、又は９個以上）の非天然アミノ酸を含む抗体又は抗体断片は、非天然アミノ酸と薬物部分との間の連結を通して薬物部分にコンジュゲートされる。伝統的には、薬物部分は抗体又は抗体断片におけるシステイン又はリシン残基へ非選択的にコンジュゲートされる。しかしながら、このストラテジーは不均一な産物をもたらす場合が多く、ＡＤＣ曝露の生物学的、物理的、及び薬理学的性質の最適化を必要とする。コンジュゲーション部位及び化学量論の正確な制御で均一なＡＤＣを合成するためのコンジュゲーション地点としての非天然アミノ酸の使用は、薬物動態の向上及び効力の向上を含み得るいくつかの利点を与える。したがって、部位特異的コンジュゲーション方法は非常に望ましい。
【０２１７】
今まで、多くのＡＤＣが、抗体あたり平均４つの薬物を標的としてきた。この比は、細胞毒性と薬物動態学的安定性の最適な組み合わせとして選択されている（Acc. Chem. Res (2008) 41(1) 98-107及びClin. Cancer. Res (2004) 10(20):7063-7070参照）。したがって、特定の実施形態は、非天然アミノ酸と薬物部分の間の連結を通して薬物部分にコン

ジュゲートすることができ、又はコンジュゲートする約４個の非天然アミノ酸を含む抗体又は抗体断片に関する。

【０２１８】

一つの例示的な実施形態において、抗体は、トラスツズマブなどの抗ＨＥＲ２／ｎｅｕＩｇＧ１ヒト化抗体又はそのバリアント若しくは誘導体である。

【０２１９】

１つ又は２つ以上の小分子のコンジュゲーションのための異なる天然に存在しないアミノ酸（例えば、Ｎε－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン）が組み込まれる。その分子は、テトラジン化学作用を用いて、非天然アミノ酸含有ｍＡｂとコンジュゲートすることができる。その分子は、免疫応答を誘導する細胞毒性分子又は化学的部分を含み得る。

【０２２０】

有利には、Ｎε－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシンは、アンバーコドンにおいて非常に高い組み込み比率（及びその後、より高いタンパク質発現）を示す。パブリックドメインでタンパク質コンジュゲーションに用いられるＵＡＡの多くと比較して、シクロプロペンは、より長い側鎖及びより多く溶媒に曝されるコンジュゲーションハンドルを有する。高率のアンバーコドン組み込みと組み合わされた、この長い側鎖は、ｍＡｂスキャフォールド内のより多くの部位においてＵＡＡの組み込みを可能にするはずである。この柔軟性は、異なる抗体－薬物コンジュゲートをカスタマイズするのに重要であり得る。

【０２２１】

キット

１個又は２個以上の非天然アミノ酸を含む所望のタンパク質を産生するためのキットもまた提供される。

【０２２２】

一態様において、以下を含む、真核細胞においてタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのキットが提供される：（ｉ）本明細書に記載された核酸コンストラクト、又は（ii）本明細書に記載された核酸コンストラクトの組み合わせ、又は（iii）本明細書に記載されたベクター、又は（iv）本明細書に記載されたベクターの組み合わせ、又は（ｖ）本明細書に記載された細胞、及び任意で、（vi）非天然アミノ酸。

【０２２３】

適切には、キットは、ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸コンストラクト若しくはベクター、又はそれを含む細胞をさらに含む。

【０２２４】

キットはまた、そのようなタンパク質を産生するために試薬を用いる方法を記載する印刷された使用説明書も含み得る。

【０２２５】

一般的な組換えＤＮＡ技術

本発明は、他に指示がない限り、当業者の能力の範囲内である、化学、分子生物学、微生物学、及び組換えＤＮＡ技術の通常の技術を用いる。そのような技術は、文献に説明されている。例えば、M. Green & J. Sambrook, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。このテキストは参照により本明細書に組み入れられている。

【０２２６】

ここで、本発明を、以下のように番号を付けられた段落を以て記載する：

段落１．真核細胞、適切には哺乳類細胞又は昆虫細胞においてｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペアを発現するための核酸コンストラクトであって、

（ｉ）ｔＲＮＡシンテターゼを発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列、及び

（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮ

Ａをコードする核酸配列
を含み、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸コンストラクト。
【０２２７】
段落２．真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力があるさらなるプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列をコードする核酸配列をさらに含む、段落１に記載の核酸コンストラクト。
【０２２８】
段落３．プロモーターが第１のプロモーターと同じ方向に向けられ、任意で、真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力があるプロモーターが、第１のプロモーターと同じ、又は第１のプロモーターと異なる、段落２に記載の核酸コンストラクト。
【０２２９】
段落４．ミュータントｅＲＦ１、適切には、ミュータントホモサピエンスｅＲＦ１をコードする核酸配列をさらに含み、適切には、ミュータントｅＲＦ１が、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択される、段落１～３のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３０】
段落５．ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列及びｔＲＮＡシンテターゼをコードする核酸配列が、同じオープンリーディングフレームで自己切断型ペプチドを介して連結されている、段落４に記載の核酸コンストラクト。
【０２３１】
段落６．真核細胞においてｔＲＮＡ及び所望の核酸配列を発現するための核酸コンストラクトであって、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸を組み込む位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含み、前記核酸コンストラクトが、
（ｉ）真核細胞において所望の核酸配列を発現する能力がある第１のプロモーターに作動可能に連結された所望の核酸配列を含む核酸配列、及び
（ii）ｔＲＮＡを発現する能力がある第２のプロモーターに作動可能に連結されたｔＲＮＡをコードする核酸配列
を含み、第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、又はｔＲＮＡが、核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、核酸コンストラクト。
【０２３２】
段落７．ミュータントｅＲＦ１、適切には、ミュータントホモサピエンスｅＲＦ１をコードする核酸配列をさらに含み、適切には、ミュータントｅＲＦ１が、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択される、段落６に記載の核酸コンストラクト。
【０２３３】
段落８．第１及び第２のプロモーターが互いに逆方向にあり、かつｔＲＮＡが核酸コンストラクト上に複数のコピーで存在する、段落１～７のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３４】
段落９．ｔＲＮＡがプロモーターに直接的に連結され、又はプロモーターに間接的に連結され、適切には、核酸コンストラクトが、リンカーと共にｔＲＮＡに接続した転写終結配列を含む、段落１～８のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３５】
段落１０．ｔＲＮＡをコードする核酸配列の各コピーが別々のプロモーターの制御下にある、段落１～９のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３６】
段落１１．プロモーター配置が、第１の方向に向けられた伸長因子プロモーター及び第２の方向に向けられたＰｏｌ　IIIプロモーターを含む、段落１～１０のいずれかに記載

の核酸コンストラクト。
【０２３７】
段落１２．第１のプロモーターがＥＦ－１プロモーターであり、又はそれに由来する、段落１～１１のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３８】
段落１３．第２のプロモーターがＵ６プロモーターであり、又はそれに由来する、段落１～１２のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２３９】
段落１４．ｔＲＮＡが、核酸コンストラクト上に４個、５個、６個、７個、又は８個、又は９個以上のコピーで存在する、段落１～１３のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２４０】
段落１５．ｔＲＮＡが、野生型又はバリアントｔＲＮＡ、適切には、ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアントである、段落１～１４のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２４１】
段落１６．所望の核酸配列が、少なくとも１個、２個、３個、又は４個の終止コドンを含む、段落１～１５のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２４２】
段落１７．所望の核酸配列が抗体又は抗体断片をコードする、段落２～１６のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２４３】
段落１８．前記ｔＲＮＡシンテターゼが真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び／若しくは前記ｔＲＮＡが真核細胞において内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性であり、並びに／又は前記ｔＲＮＡシンテターゼが真核細胞において内因性ｔＲＮＡと直交性であり、及び前記ｔＲＮＡが内因性ｔＲＮＡシンテターゼと直交性である、段落１～１７のいずれかに記載の核酸コンストラクト。
【０２４４】
段落１９．段落１～５及び８～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、並びに段落６～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクトを含む、核酸コンストラクトの組み合わせ。
【０２４５】
段落２０．ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列が別個のコンストラクト上にある、段落１９に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ。
【０２４６】
段落２１．段落１～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクトを含むベクター。
【０２４７】
段落２２．段落１～５及び８～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクトを含むベクター、並びに段落６～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクトを含むベクターを含む、ベクターの組み合わせ。
【０２４８】
段落２３．ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸配列が別個のベクター上にある、段落２２に記載のベクターの組み合わせ。
【０２４９】
段落２４．段落１～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、段落１９若しくは段落２０に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ、段落２１に記載のベクター、又は段落２２若しくは段落２３に記載のベクターの組み合わせを含む細胞。
【０２５０】
段落２５．ミュータントｅＲＦ１、適切には、ミュータントホモサピエンスｅＲＦ１をコードする核酸コンストラクトをさらに含む、段落２４に記載の細胞。
【０２５１】

段落２６．ミュータントｅＲＦ１が、Ｅ５５Ｄ、Ｅ５５Ａ、Ｎ１２９Ｐ／Ｋ１３０Ｑ、及びＹ１２５Ｆからなる群、又はそれらの２つ若しくは３つ以上の組み合わせから選択され、適切には、変異がGenBank受託番号ＡＦ０９５９０１．１に記載されているようなホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子配列に導入される、段落２５に記載の細胞。

【０２５２】

段落２７．細胞が昆虫細胞又は哺乳類細胞である、段落２４～２６のいずれかに記載の細胞。

【０２５３】

段落２８．核酸を一過性に、又は安定的にトランスフェクトされている、段落２４～２７のいずれかに記載の細胞。

【０２５４】

段落２９．（ｉ）段落１～５及び８～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、並びに段落６～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、又は
（ii）段落１９若しくは段落２０に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ、又は
（iii）段落２１に記載のベクター、又は
（iv）段落２２若しくは段落２３に記載のベクターの組み合わせ、又は
（ｖ）段落２７若しくは段落２８に記載の昆虫細胞若しくは哺乳類細胞、及び任意で、
（vi）非天然アミノ酸
を含む、真核細胞、適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞において、タンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのキット。

【０２５５】

段落３０．ミュータントｅＲＦ１をコードする核酸コンストラクト若しくはベクター、又はそれを含む細胞をさらに含む、段落２９に記載のキット。

【０２５６】

段落３１．以下のステップを含む、真核細胞、適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞において、所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法：
ｉ）段落２７又は段落２８に記載の細胞を用意するステップであって、前記細胞が、段落１９若しくは段落２０に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ、又は段落２２若しくは段落２３に記載のベクターの組み合わせを含む、ステップ；及び
ii）所望の核酸配列によってコードされる所望のタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；及び
iii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸を組み込むように細胞をインキュベートするステップ。

【０２５７】

段落３２．少なくとも３個、４個、又は５個の非天然アミノ酸が所望のタンパク質に組み込まれる、段落３１に記載の方法。

【０２５８】

段落３３．以下のステップを含む、抗体－薬物コンジュゲートを調製する方法：
ｉ）段落２７又は段落２８に記載の細胞を用意するステップであって、前記細胞が、段落１９若しくは段落２０に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ、又は段落２２若しくは段落２３に記載のベクターの組み合わせを含み、かつ所望の核酸配列が抗体又は抗体断片をコードする、ステップ；
ii）抗体又は抗体断片に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；
iii）非天然アミノ酸が組み込まれている抗体又は抗体断片を得るステップ；及び
vi）抗体又は抗体断片を、非天然アミノ酸を介して薬物部分とコンジュゲートさせるステップ。

【０２５９】

段落３４．真核細胞、適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞において所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための、（ｉ）段落１～５及び８～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、及び段落６～１８のいずれかに記載の核酸コンストラクト、又は（ii）段落１９若しくは段落２０に記載の核酸コンストラクトの組み合わせ、又は（iii）段落２１に記載のベクター、又は（iv）段落２２若しくは段落２３に記載のベクターの組み合わせ、又は（ｖ）段落２７若しくは段落２８に記載の昆虫細胞若しくは哺乳類細胞の使用。

【０２６０】

段落３５．以下のステップを含む、真核細胞、適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞において、所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むための方法：

ｉ）直交性のｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペア、所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸を組み込むための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、ステップ；

ii）所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で真核細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が直交性ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに

iii）直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼのペアにより所望のタンパク質に前記非天然アミノ酸が組み込まれるように真核細胞をインキュベートするステップ。

【０２６１】

段落３６．真核細胞、適切には、哺乳類細胞又は昆虫細胞において、所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用。

【０２６２】

段落３７．以下のステップを含む、所望のタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みを増加させるｅＲＦ１のミュータントを同定する方法：

（ｉ）所望のタンパク質に非天然アミノ酸を組み込む能力がある細胞を用意するステップであって、適切には、前記細胞が、直交性のｔＲＮＡシンテターゼとｔＲＮＡのペア、所望の核酸配列、及び任意で、ミュータントｅＲＦ１を発現し、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置にｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、ステップ；

（ii）所望のタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下で、かつｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で、細胞をインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸がｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに

（iii）ｅＲＦ１のミュータントの存在下及び非存在下で、所望のタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みのレベルを決定するステップであって、ｅＲＦ１のミュータントの存在下での所望のタンパク質への非天然アミノ酸組み込みのレベルが増加すると、前記ｅＲＦ１のミュータントが、所望のタンパク質内の非天然アミノ酸の組み込みを増加させることが示される、ステップ。

【０２６３】

段落３８．添付の説明及び図面を参照した、実質的に本明細書に記載されているような、コンストラクト、ベクター、細胞、キット、方法、又は使用。

【０２６４】

実施形態の説明

本発明の例証的な実施形態が、添付の図面を参照して、本明細書で詳細に開示されているが、本発明が、厳密な実施形態に限定されないこと、及びそれにおいて、当業者により、添付の特許請求の範囲及びそれらの等価物によって定義されるような本発明の範囲から逸脱することなく、様々な変化及び改変がもたらされ得ることは、理解される。

【０２６５】

添付の非従属的及び従属的な特許請求の範囲において、さらなる特定かつ好ましい態様が示されている。従属的な特許請求の範囲の特徴は、必要に応じて、非従属的な特許請求

の範囲の特徴と、及び特許請求の範囲に明確に示された組み合わせ以外の組み合わせで、組み合わせられ得る。

【０２６６】

装置の特徴が、機能を提供するように操作可能であると記載されている場合、これは、その機能を提供し、又はその機能を提供するように適応し、若しくは構成される装置の特徴を含むと理解されるであろう。

［実施例］

【実施例１】

【０２６７】

材料及び方法

ＤＮＡコンストラクト

レポーターコンストラクトを、以前に記載されたプラスミドpMbPylRS-mCherry-TAG-EGFP-HA1から導き、制限部位をｓｆＧＦＰ　１５０ＴＡＧで置換し、ヒト細胞株（Life Technologies社）における発現のためにコドン最適化し（補足情報表Ｓ１）、プラスミドCMV-PylRS/CMV-sfGFP(TAG)を創製した。同じ領域を、ウミシイタケ－ＴＡＧ－ホタルルシフェラーゼカセットで置換し、プラスミドCMV-PylRS/CMV-DLR(TAG)を創製した。pJet1.2（Thermo scientific社）において、KOD Hot Startポリメラーゼ（Novagen社）を用いて、ｓｆＧＦＰ　１５０ＴＡＧ又はウミシイタケ－ＴＡＧ－ホタルルシフェラーゼカセットへ部位特異的突然変異誘発により終止コドン又はセンスコドンを導入した。その結果生じたミュータントをpMbPylRS-mCherry-TAG-EGFP-HAへサブクローニングすることにより、ｓｆＧＦＰ　１５０Ｌｅｕ（ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ｓｆＧＦＰ）及びｓｆＧＦＰ　１０１，１３３，１５０ＴＡＧ（ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$）、並びにＴＡＡ（ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ（ＴＡＡ））、ＴＧＡ（ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ（ＴＧＡ））、及びＳＥＲ（ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ＤＬＲ）を含有する二重ルシフェラーゼレポータープラスミドを得た。

【０２６８】

4xU6 PylTプラスミドシリーズについて、PB220PA-1骨格（System Biosciences社）を用いた。ＣＭＶカセットを、CD532A-2（System Biosciences社）由来のＥＦ－１αカセットで置換し、SpeI／SalI断片をPB220PA-1のSpeI／SalIへサブクローニングした。最適化されたＵ６プロモーター／メタノサルシナ・マゼイ　ピロロリシンｔＲＮＡインサート（補足情報表Ｓ１）を、SpeI／AvrIIフランキング部位と共に合成した(Life technologies社)。４×Ｕ６　ＰｙｌＴタンデムカセットを、ＥＦ１プロモーターの５’側の固有のSpeI部位へのSpeI／AvrII断片の挿入の繰り返しにより構築した。(U6-PylT*)4/EF-1α-PylRS、(U6-PylT*)4/EF-1α-sfGFP(TAG)、及び(U6-PylT*)4/EF-1α-sfGFP（ＴＡＧ）$_3$プラスミドを、ＡＧ２８、ＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－ｓｆＧＦＰ、及びＣＭＶ－ＰｙｌＲＳ／ＣＭＶ－Ｓ２由来の関連遺伝子のサブクローニングにより構築した。MfeIとNheIの間のｍＣｈｅｒｒｙ－ＴＡＧ－ＥＧＦＰカセット　ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$。

【０２６９】

ホモサピエンスｅＲＦ１遺伝子（GenBank：ＡＦ０９５９０１．１）を、キイロショウジョウバエに対してコドン最適化し（補足情報表Ｓ１）、Ｎ末端Ｈｉｓ６タグ、Ｃ末端三重停止（UAAUGAUAG）によって伸長した。コドン最適化を、Helixweb toolkit2を用いて実施した。追加の変異を部位特異的突然変異誘発により導入し（補足情報表２）、その結果生じたコンストラクトを、制限部位HindIII／NotIを用いて哺乳類発現ベクターｐｃＤＮＡＴＭ５／ＦＲＴ／ＴＯへクローニングして、ｐｅＲＦ１（Ｘ）ベクター（Ｘは変異を表し、ｅＲＦ１はＣＭＶプロモーターから発現する）を創製した。

【０２７０】

細胞培養、抗体、及びアッセイ

接着性ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、１０％ＦＢＳを追加したダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ，Dulbecco's modified Eagle's medium）－Glutamax（Gibco）上、５％CO_2雰囲気中、３７℃で維持した。TransIT（登録商標）-293（Mirus社）トランスフェクショ

ン試薬、又はポリエチレンイミン（Max PEI、Polysciences社）を３：１のＰＥＩ：ＤＮＡ比で用いて、製造会社のプロトコールに従って、一過性トランスフェクションを実施した。

【０２７１】

タンパク質の発現及びｅＲＦ１の減少（depletion）を、ｅＲＦ１に対する抗体（ab30928、Abcam）、アクチンに対する抗体（#4967、Cell Signaling Technology社）、ＦＬＡＧに対する抗体（A8592、Sigma-Aldrich社）、ＨＩＳに対する抗体（27E8、Cell Signaling Technology社）、ＨＡに対する抗体（C29F4、Cell Signaling Technology社）、及び対応する二次ＨＲＰ連結型抗体（#7074、#7076、#7077、Cell Signaling Technology社）を用いたイムノブロッティングにより確認した。ｅＲＦ１の減少は、他のトランスフェクトされたプラスミドと同等の量での市販のｅＲＦ１　ｓｈＲＮＡ（sc-37871-SH、Santa Cruz Biotechnology社）のトランスフェクションにより達成された。

【０２７２】

アミノ酸１は市販されており（E1610.0025、Bachem社）、アミノ酸２を、以前に記載されているように合成した。タンパク質発現について、アミノ酸溶液を、培養培地における中和されたストック溶液として調製し、プレインキュベートされたトランスフェクション混合物（TransIT-293、９６ウェルプレート）と共に、又はさらにトランスフェクションから４時間後、培養培地を交換するかのいずれかで、培養細胞へ加えた（ＰＥＩ、２４ウェルプレート、１０ｃｍ培養皿、Ｔ７５フラスコ）。

【０２７３】

ノーザンブロッティング

全ＲＮＡを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞からQiazol溶解試薬（Qiagen社）を用いて単離し、イソプロパノールで沈殿させた。ノーザンブロッティングをNorthernMax-Glyキット（Ambion社）で実施した；ＲＮＡをグリオキサールロード色素中で変性させ、２％アガロースゲル上で分離し、BrightStar-Plus正荷電ナイロン膜（Ambion社）上へに転写し、Stratalinker 2400 UV架橋剤（Strategene社）を介してＵＶにより架橋した。膜を５’－ビオチン化ＤＮＡプローブ（5’-GGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAG-3’）と３７℃で一晩、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたプローブを、化学発光核酸検出モジュール（Thermo scientific社）を用いて検出した。

【０２７４】

二重ルシフェラーゼアッセイ

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、９６ウェルプレート（Costar #3595、Corning社）において、ウェルあたり推奨された量の２倍の量のＤＮＡ（合計０．２μｇ）及びTransIT（登録商標）-293試薬（０．６μｌ）を用いてトランスフェクトした。二重ルシフェラーゼアッセイを、簡易化した製造会社のプロトコール（Promega社）に従って実施した。１６時間の増殖後、培養培地を除去し、細胞を２０μｌのpassive溶解バッファー中で、室温で１５分間溶解させた。その後、１０μｌの可溶化物を、白色９６ウェルプレート（Nunc 236105、Thermo scientific社）内の５０μｌのルシフェラーゼアッセイバッファーIIに加えた。その後、ホタルルシフェラーゼ発光測定値をとり（Pherastar FS、BMG Labtech社）、反応を消光し、５０μｌ　Stop & Gloバッファーの添加後、ウミシイタケ発光測定を行った。実験を４連で実施し、３つの反復試料を二重ルシフェラーゼ測定に用い、その残りの反復試料を、コンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche社）を含む５０μＬのＲＩＰＡバッファー（Sigma社）中での溶解後のイムノブロッティングに用いた。

【０２７５】

ｓｆＧＦＰバリアントの一過性発現

蛍光アッセイについてのｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）及びｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$の発現を、２４ウェルプレートにおいて実施した。日常的に、ウェルあたり１００００００個の細胞を播種し、一晩、増殖させ、プラスミドあたり１６０ｎｇ　ＤＮＡ、１．５μｌのＰＥＩ（１ｍｇ／ｍｌ）、及び５０μｌ　血清低減培地（Opti-MEM、Gibco）を用いて一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションから４時間後、培地を交換し、アミノ酸１又

は２を新鮮な増殖培地へ加えた。４８時間の増殖後、上清を慎重に取り出し、細胞をコンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche社）が添加された１００μｌ　ＲＩＰＡバッファー（Sigma社）中で振盪しながら溶解させた。５０μｌの可溶化液を９６ウェルプレート（Costar #3595、Corning社）へ移し、蛍光強度を４８５／５２０ｎｍで決定した（Pherastar FS、BMG Labtech社）。ｓｆＧＦＰを、可溶化液中、較正曲線を用いて定量化した（補足の図Ｓ１）。

【０２７６】

較正を目的として、大腸菌ＤＨ１０ｂ細胞において、ｐ１５Ａに基づいたプラスミドからｐＢＡＤプロモーターの制御下でｓｆＧＦＰを発現し、以前に記載されているように（Davis, L.; Chin, J. W. Nat Rev Mol Cell Biol 2012, 13, 168）、Ｎｉ－アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。タンパク質純度を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、クーマシー染色により検証した。

【０２７７】

参照試料における絶対的タンパク質濃度を、コンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche社）を追加したＲＩＰＡバッファー（Sigma社）中で段階希釈（１段階あたり１：１０）して、２８０ｎｍ（吸光係数０．６８４５）における吸光度を測定することにより決定した。所定濃度のｓｆＧＦＰについての蛍光強度（励起４８５ｎｍ、発光５２０ｎｍ）を、９６ウェルプレート（Costar、Corning社）において５０μｌの体積で、３連で測定した。所定の取得設定についてのマイクロプレートリーダー（Pherastar FS、BMG Labtech社）の線形範囲の外側の測定値を捨て、残りのデータ点を線形曲線へフィッティングした。細胞可溶化液におけるｓｆＧＦＰ蛍光のその後の測定を、同じ条件下で実施し、ｓｆＧＦＰ濃度を標準曲線を参照して決定した（Prism6、Graphpad）。

【０２７８】

質量分析のためのタンパク質発現を１０ｃｍ培養皿において実施した。１０ｃｍ組織培養皿において、ＨＥＫ２９３Ｔに、ＰＥＩと共に１５μｇ　ＤＮＡをトランスフェクトした。細胞培養培地を、トランスフェクションから４時間後に交換し、アミノ酸と共に７２時間インキュベートした。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、１ｍＬ　ＲＩＰＡバッファー中に溶解した。透明可溶化液を５０μＬ　GFP-Trap（登録商標）M（ChromoTek社）に加え、４℃で４時間インキュベートした。ビーズを磁気的に分離し、１ｍＬ　ＲＩＰＡ、１ｍＬ　ＰＢＳ、１ｍＬ　ＰＢＳ＋５００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＬ　ｄｄH_2Oで洗浄し、１％酢酸／ｄｄH_2O中に溶出した。

【０２７９】

質量分析

エレクトロスプレー質量分析を、6130四重極分光計を備えたAgilent 1200 LC-MSシステムを用いて行った。溶媒系は、バッファーＡとしてのH_2O中０．１％ギ酸、及びバッファーＢとしてのアセトニトリル（ＭｅＣＮ）中０．１％ギ酸からなった。タンパク質ＵＶ吸光度を、２１４ｎｍ及び２８０ｎｍでモニターした。タンパク質ＭＳ取得を、正イオンモードで行い、総タンパク質質量を、MS Chemstationソフトウェア（Agilent Technologies社）内のデコンボルーションにより計算した（Bertram, G.; Innes, S.; Minella, O.; Richardson, J.; Stansfield, I. Microbiology 2001, 147, 255）。

【実施例２】

【０２８０】

ｔＲＮＡレベルの増加は、非天然アミノ酸組み込み効率を増加させる

本発明者らは、哺乳類細胞において非天然アミノ酸組み込みの効率を増加させるために$tRNA_{CUA}$の発現レベルを最適化した。研究者らは、ＰｙｌＲＳ、$tRNA_{CUA}$のコピー数、及びプロモーターの選択が異なる様々なＰｙｌＲＳ及びｔＲＮＡプラスミドを用いている（Mukai, T.; Kobayashi, T.; Hino, N.; Yanagisawa, T.; Sakamoto, K.; Yokoyama, S. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008, 371, 818、Chen, P. R.; Groff, D.; Guo, J.; Ou, W.; Cellitti, S.; Geierstanger, B. H.; Schultz, P. G. Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 4052、Gautier, A.; N

guyen, D. P.; Lusic, H.; An, W.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2010, 132, 4086、Xiao, H.; Chatterjee, A.; Choi, S. H.; Bajjuri, K. M.; Sinha, S. C.; Schultz, P. G. Angew Chem Int Ed Engl 2013, 52, 14080）。しかしながら、哺乳類細胞においてＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアにより組み込まれた非天然アミノ酸を有するタンパク質の収量を定量化する報告も、アンバー終止コドンを含有しない遺伝子から発現した対照タンパク質の発現に対する、非天然アミノ酸組み込みの効率を定量化する報告もない。これらの実験は、天然タンパク質合成と比較して、哺乳類細胞においてどれくらいよく非天然アミノ酸が組み込まれるかを理解するために重要である。

【０２８１】

本発明者らは、まず、ＣＭＶプロモーターにおける単一コピーのＰｙｌＲＳを有するプラスミドｂ、及びそれぞれＣＭＶエンハンサーと共にＵ６プロモーターにより駆動される４コピーのｔＲＮＡ$_{CUA}$を有するプラスミドｃを用いて、非天然アミノ酸組み込みの効率を試験した（Mukai, T.; Kobayashi, T.; Hino, N.; Yanagisawa, T.; Sakamoto, K.; Yokoyama, S. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008, 371, 818、Gautier, A.; Nguyen, D. P.; Lusic, H.; An, W.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2010, 132, 4086）（コンストラクト概略図はチャート１ａに示されている）。この系は、ｓｆＧＦＰ（Miyake-Stoner, S. J.; Refakis, C. A.; Hammill, J. T.; Lusic, H.; Hazen, J. L.; Deiters, A.; Mehl, R. A. Biochemistry 2010, 49, 1667）（ＣＭＶ－ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ））における位置１５０のアンバーコドンに応答して１（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン）又は２（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン）（チャート１ｂ）（どちらも、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアについての既知の効率的な基質（Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Bianco, A.; Ernst, R. J.; Sachdeva, A.; Elsasser, S. J.; Davis, L.; Lang, K.; Pisa, R.; Greiss, S.; Lilley, K. S.; Chin, J. W. Nat Biotechnol 2014, 32, 465、Nguyen, D. P.; Lusic, H.; Neumann, H.; Kapadnis, P. B.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2009, 131, 8720））の組み込みを指示し、効率は５％及び７％であった（図１ａ、ｂ）；全ての組み込み効率は、位置１５０のアンバーコドンの代わりにロイシンコドンを有することの他の点では同一の対照コンストラクト（プラスミドａ、チャート１）から産生されたｓｆＧＦＰレベルに対するパーセンテージとして報告される。次に、本発明者らは、最適化されたＵ６プロモーターにおいて４コピーのｔＲＮＡ$_{CUA}$を単一コピーのｔＲＮＡ$_{CUA}$で置換し、非天然アミノ酸組み込み効率のわずかな減少がもたらされた（プラスミドｂ及びｄ）。

【０２８２】

最初の４コピーカセット（ｃ）とは違って、新しいＵ６　ｔＲＮＡ$_{CUA}$カセット（ｄ）は、ＣＭＶエンハンサーを含有せず、ヌクレアーゼプロセシングを必要としない、ｔＲＮＡについての厳密な５’末端を産生する。ノーザンブロット（図１ｃ）は、ｄから産生されたＰｙｌ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$のレベルが、ｃから産生されたレベルに匹敵することを実証している。これは、変化したｔＲＮＡ発現コンストラクトが、ｔＲＮＡ遺伝子のコピーあたりのｔＲＮＡのより多くのコピーを備えることを示している。ｔＲＮＡ$_{CUA}$をＵ２５Ｃバリアント（Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P. G. Biochemistry 2013, 52, 10）で置換することは、２．７％～３．５％から４．７～５．１％へとわずかに組み込み効率を増加させ（プラスミドｂ及びｅ、チャート１）、ｔＲＮＡ$_{CUA}$レベルへわずかな効果を生じた。

【０２８３】

それぞれが（Ｕ２５Ｃを有する）Ｕ６　Ｐｙｌ　ｔＲＮＡ$_{CUA}$の４コピーを含有するタンデムアレイを創製し、かつタンパク質をコードする遺伝子についてのプロモーターをＣＭＶからＥＦ－１αへ切り換えることにより（プラスミドｇ及びｈ、チャート１）、１又は２を有するｓｆＧＦＰの実質的増加がもたらされた。この系において、アミノ酸１は、ｓｆＧＦＰにおけるアンバーコドンに応答して、６２％の効率で組み込まれ、一方、２はおよそ１２９％の効率で組み込まれた。ウェスタンブロットにより、タンパク質をコー

ドする遺伝子のプロモーターをＥＦ－１αに変えても、ＰｙｌＲＳ（抗ＦＬＡＧ　ｂ＋ｅ対ｇ＋ｈ、図１ｂ）も野生型ｓｆＧＦＰ（ａ対ｆ、図１ｂ）もレベルが変化しないことが実証され、これは、ＰｙｌＲＳレベルもｓｆＧＦＰ発現の最大レベルも、ＥＦ－１αプロモーターに変えることにより大きく変化することはないことを示している。しかしながら、ノーザンブロットにより、ｔＲＮＡレベルが、この系において、試験された全ての他の系においてよりはるかに高いことが実証され、本発明者らが観察する非天然アミノ酸組み込み効率の大きな増加が、ｔＲＮＡレベルの増加により引き起こされることを強く示唆している。

【実施例３】

【０２８４】

選択されたｅＲＦ１バリアントの異所性発現は終止コドンのリードスルーを増加させない

次に、本発明者らは、ｅＲＦ１を改変することにより、他の終止コドンのリードスルーを増加させることなく、非天然アミノ酸組み込み効率をさらに増強することができるかどうかを問うた。非天然アミノ酸組み込みの効率が、最適化シンテターゼ及びｔＲＮＡ系を用いてすでに良好であったが、本発明者らは、ｅＲＦ１改変が、この効率をさらに向上させ、かつタンパク質における複数の部位に非天然アミノ酸を効率的に組み込むことを可能にすることを構想した。

【０２８５】

本発明者らは、まず、遺伝学的又は生化学的研究（Kolosov, P.; Frolova, L.; Seit-Nebi, A.; Dubovaya, V.; Kononenko, A.; Oparina, N.; Justesen, J.; Efimov, A.; Kisselev, L. Nucleic Acids Res 2005, 33, 6418、Bulygin, K. N.; Khairulina, Y. S.; Kolosov, P. M.; Ven'yaminova, A. G.; Graifer, D. M.; Vorobjev, Y. N.; Frolova, L. Y.; Kisselev, L. L.; Karpova, G. G. RNA 2010, 16, 1902、Seit-Nebi, A.; Frolova, L.; Kisselev, L. EMBO Rep 2002, 3, 881、Eliseev, B.; Kryuchkova, P.; Alkalaeva, E.; Frolova, L. Nucleic Acids Res 2011, 39, 599、Lekomtsev, S.; Kolosov, P.; Bidou, L.; Frolova, L.; Rousset, J. P.; Kisselev, L. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 10824、Kryuchkova, P.; Grishin, A.; Eliseev, B.; Karyagina, A.; Frolova, L.; Alkalaeva, E. Nucleic Acids Res 2013, 41, 4573）からアンバーコドンにおける終結に効果を生じると報告されているｅＲＦ１におけるアミノ酸位置を同定した。これらの変異は、リボソーム内のｍＲＮＡ上の終止コドンと相互作用するｅＲＦ１のＮ末端ドメイン（図２ａ）にある。哺乳類細胞においてｅＲＦ１ミュータントの翻訳終結への効果を評価するために、本発明者らは、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、並びに追加され、過剰発現したヒトｅＲＦ１及びｅＲＦ１ミュータントを有するＨＥＫ２９３Ｔ細胞において、アンバー、オパール、及びオーカー終止コドンにおけるサプレッサーｔＲＮＡ非依存性リードスルーを定量化した（図２ｂ）。ｅＲＦ１は、主にｅＲＦ１上のＣ末端ドメインを通して仲介されて（Cheng, Z.; Saito, K.; Pisarev, A. V.; Wada, M.; Pisareva, V. P.; Pestova, T. V.; Gajda, M.; Round, A.; Kong, C.; Lim, M.; Nakamura, Y.; Svergun, D. I.; Ito, K.; Song, H. Genes Dev 2009, 23, 1106）、翻訳終結を媒介する、ｅＲＦ３との複合体を形成する。ｅＲＦ３は、内因性ｅＲＦ１に匹敵するレベルで細胞に存在し、それゆえに、ｅＲＦ３が、形成し得る終結複合体の数を制限する（Le Goff, X.; Philippe, M.; Jean-Jean, O. Mol Cell Biol 1997, 17, 3164）。ｅＲＦ１　Ｎ末端ドメインミュータントの過剰発現は、これらの複合体を、ｅＲＦ１ミュータントを含有するように（質量作用により）偏らせ得、それによりｅＲＦ１ミュータントの表現型を明らかにし得る。

【０２８６】

本発明者らは、各ｅＲＦ１バリアントを細胞へ導入し（図２ｂ）、３つの二重ルシフェラーゼレポーターを用いて、終止コドンの基礎的リードスルーを測定した（図２ｃ）。各レポーターは、Ｎ末端ウミシイタケルシフェラーゼ、続いて終止コドン（アンバー、オパール、又はオーカー）及びＣ末端ホタルルシフェラーゼを含有した（Grentzmann, G.; Ingram, J. A.; Kelly, P. J.; Gesteland, R. F.; Atkins, J. F. RNA 1998, 4, 479、Kee

ling, K. M.; Lanier, J.; Du, M.; Salas-Marco, J.; Gao, L.; Kaenjak-Angeletti, A.; Bedwell, D. M. RNA 2004, 10, 691、Salas-Marco, J.; Fan-Minogue, H.; Kallmeyer, A. K.; Klobutcher, L. A.; Farabaugh, P. J.; Bedwell, D. M. Mol Cell Biol 2006, 26, 438、Conard, S. E.; Buckley, J.; Dang, M.; Bedwell, G. J.; Carter, R. L.; Khass, M.; Bedwell, D. M. RNA 2012, 18, 1210）。終止コドンのリードスルーは、０．０８％～０．１２％（ＴＡＧ　０．０９％、ＴＧＡ　０．１２％、ＴＡＡ　０．０８％）であり、さらなる実験のためのベンチマークを提供した。ｅＲＦ１の異所性発現は、全ての３個の終止コドンのリードスルーの減少をもたらし（ＴＡＧ　０．０３％、ＴＧＡ　０．０７％、ＴＡＡ　０．０４％）、細胞におけるｅＲＦ１のレベルの増加と一致した（Le Goff, X.; Philippe, M.; Jean-Jean, O. Mol Cell Biol 1997, 17, 3164）。このリードスルーの減少は小さく、ｅＲＦ３のレベルが内因性ｅＲＦ１のレベルと匹敵すること、及びｅＲＦ３レベルが、形成され得る機能性終結複合体の数を制限することと一致する（Le Goff, X.; Philippe, M.; Jean-Jean, O. Mol Cell Biol 1997, 17, 3164）。

【０２８７】

ｅＲＦ１バリアントの導入は、野生型ｅＲＦ１の導入と比較して終止コドンリードスルーを増加させた。しかしながら、２つを除く、試験された全てのｅＲＦ１ミュータントについて、全ての３個の終止コドンのリードスルーが、異所的に発現したｅＲＦ１の非存在下で見出されるレベルより上へ増加しなかった。本発明者らは、試験されたｅＲＦ１バリアントの大部分の異所性発現が、終止コドンのリードスルーを基礎レベルより上に増加させないと結論付ける。

【０２８８】

終止コドンのリードスルーを、細胞において正常に見出されるレベルより上へ増加させる２つのｅＲＦ１ミュータントは、ｅＲＦ１　Δ１００（リードスルーを１．６％（ＴＡＡ）、２％（ＴＡＧ）、及び１５％（ＴＧＡ）へ増加させるミュータント）、及びＴＧＡコドンにおけるリードスルーを２倍、選択的に増加させるＴ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆミュータント（Lekomtsev, S.; Kolosov, P.; Bidou, L.; Frolova, L.; Rousset, J. P.; Kisselev, L. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 10824）である。ｓｈＲＮＡによる内因性ｅＲＦ１レベルの低下は、全ての３個の終止コドンについての基礎的リードスルーを２～３倍増加させた。

【０２８９】

ｅＲＦ１　Δ１００ミュータントの全ての終止コドンのリードスルーへの効果があることが予想される。残基が欠失しているそのＮ末端ドメインが、ｍＲＮＡにおける全ての３個の終止コドンの認識を媒介するが、ｅＲＦ３との相互作用を媒介しないからである（Merkulova, T. I.; Frolova, L. Y.; Lazar, M.; Camonis, J.; Kisselev, L. L. FEBS Lett 1999, 443, 41、Cheng, Z.; Saito, K.; Pisarev, A. V.; Wada, M.; Pisareva, V. P.; Pestova, T. V.; Gajda, M.; Round, A.; Kong, C.; Lim, M.; Nakamura, Y.; Svergun, D. I.; Ito, K.; Song, H. Genes Dev 2009, 23, 1106、Kononenko, A. V.; Mitkevich, V. A.; Dubovaya, V. I.; Kolosov, P. M.; Makarov, A. A.; Kisselev, L. L. Proteins 2008, 70, 388、des Georges, A.; Hashem, Y.; Unbehaun, A.; Grassucci, R. A.; Taylor, D.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V.; Frank, J. Nucleic Acids Res 2014, 42, 3409）。したがって、そのミュータントは、ｅＲＦ３との不活性複合体を形成し、終結を媒介することができる機能性ｅＲＦ１／ｅＲＦ３複合体の数を減少させると予測される。同様に、ｅＲＦ１の減少が全ての終止コドンにおける終結の減少をもたらすはずであるため、ｅＲＦ１に対するｓｈＲＮＡの全ての終止コドンへの効果が予想される（Janzen, D. M.; Geballe, A. P. Nucleic Acids Res 2004, 32, 4491）。

【実施例４】

【０２９０】

ｅＲＦ１ミュータントは非天然アミノ酸組み込み効率を増加させる

ｅＲＦ１、ｅＲＦ１ミュータント、及びｓｈＲＮＡの非天然アミノ酸組み込みへの効果を調べるために、本発明者らは、細胞に、関連したｅＲＦ１ミュータントをトランスフェ

クトした（図２ｄ）。アンバーサプレッションの二重ルシフェラーゼレポーター、直交性ピロリシルｔＲＮＡ－シンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアの単一コピーを有する各試料もまた用意した（その配置はチャート１におけるｂ＋ｄとして示されているが、二重ルシフェラーゼレポーターがｓｆＧＦＰに取って代わっている）。本発明者らは、ｅＲＦ１バリアントによりもたらされる増強を測定することができるダイナミックレンジを最大化するためにこの系を用いた。アミノ酸１を全ての細胞に加えた。１つの場合において、異所的に発現したｅＲＦ１ミュータントの効果を、内因性ｅＲＦ１をノックダウンすることと比較することを可能にするために、内因性ｅＲＦ１に対するｓｈＲＮＡコンストラクト（Janzen, D. M.; Geballe, A. P. Nucleic Acids Res 2004, 32, 4491）を加えた。

【０２９１】

二重ルシフェラーゼアッセイを用いて、ｅＲＦ１の非天然アミノ酸組み込み効率への効果を決定した（図２ｅ）。異所的に発現する終結因子の非存在下で、非天然アミノ酸組み込みの効率は、このアッセイにおいておよそ５～３％であった。組み込み効率は、野生型終結因子の異所性発現でわずかに減少し、内因性ｅＲＦ１のｓｈＲＮＡノックダウンにより１３％へ増加した。１についての組み込みの効率は、Ｓ７０Ａ、Ｇ７３Ｓミュータントを除く全てのミュータント終結因子の存在下で増加した。このミュータントは、生物作用能性ＵＡＲ特異的ｅＲＦ１として以前に記載された（Eliseev, B.; Kryuchkova, P.; Alkalaeva, E.; Frolova, L. Nucleic Acids Res 2011, 39, 599、Liang, H.; Wong, J. Y.; Bao, Q.; Cavalcanti, A. R.; Landweber, L. F. J Mol Evol 2005, 60, 337）。

【０２９２】

以下の２つのｅＲＦ１ミュータントは、最も効率的な非天然アミノ酸組み込みをもたらした：ｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）、２７％；及びｅＲＦ１（Δ１００）、３６％。Δ１００ミュータント及びＥ５５Ｄミュータントでの組み込み効率は、異所的に発現する終結因子を含有しない細胞における組み込み効率の５～７倍高い。興味深いことに、ｅＲＦ１Δ１００ミュータントは、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアの存在下及び非存在下においてアンバーリードスルーを強く増強するが、どちらの状況においても産生されるルシフェラーゼの総量を大きく低下させ、翻訳効率への全体的な効果を生じる、全ての３個の終止コドンにおける終結の極端な障害と一致する（補足情報図２）。加えて、Δ１００ミュータントは、サプレッサーｔＲＮＡの非存在下において全ての３個の終止コドンのリードスルーをもたらす；したがって、本発明者らは、この終結因子ミュータントをさらに調べなかった。本発明者らは、さらなる研究をｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）に焦点を絞った。この終結因子ミュータントは、ウサギ網状赤血球リボソームを用いるインビトロアッセイにおいて、アンバーコドンに応答してより効率的に、オーカー及びオパールコドンに応答してイニシエーターｔＲＮＡからホルミルーメチオニンを除去することが同定されている（Kolosov, P.; Frolova, L.; Seit-Nebi, A.; Dubovaya, V.; Kononenko, A.; Oparina, N.; Justesen, J.; Efimov, A.; Kisselev, L. Nucleic Acids Res 2005, 33, 6418）。

【実施例５】

【０２９３】

複数の非天然アミノ酸を組み込むために最適化された系

次に、本発明者らは、最適化されたシンテターゼ及びｔＲＮＡ系と、ｅＲＦ１のＥ５５Ｄミュータントを組み合わせた（図３）。本発明者らは、１の存在下で増殖するＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを含有する細胞へのｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）の添加が、１のｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）への組み込みを６２％から８５％へ増加させることを見出している（図３ａ）。同様に、１がＧＦＰの位置Ｋ１０１、Ｄ１３３、及びＶ１５０１４にアンバー終止コドンを含有するｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$に組み込まれる効率を、ｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）の添加が、５％から１２％へ増加させる（図３ａ、ｂ）。ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）からのｓｆＧＦＰ－１の収量は、10^5個の細胞から０．６５μｇであり、一方、ｓｆＧＦＰ－（ＴＡＧ）$_3$からのｓｆＧＦＰ－（１）３の収量は、10^5個の細胞あたり０．１μｇであった（補足情報図３；全ての収量は、播種された細胞の数あたりで引用され、トランス

フェクションから４８時間後に測定された）。

【０２９４】

本発明者らは、２の存在下で増殖するＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペアを含有する細胞へのｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）の添加が、２のｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）への組み込みを１２９％から１５７％へ増加させること、及びｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）の添加が、ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$からのｓｆＧＦＰ－（２）$_3$の産生の効率を１１％から４３％へ４倍にすることを見出している（図３ｃ、ｄ）。ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）からのｓｆＧＦＰ－２の収量は、10^5個の細胞あたり１．７６μｇであり、一方、ｓｆＧＦＰ－（ＴＡＧ）$_3$からのｓｆＧＦＰ－（２）$_3$の収量は、10^5個の細胞あたり０．４９μｇであった（補足情報図３）。完全長ｓｆＧＦＰを、最適化された系を含有する細胞可溶化物から精製した（図４ａ）。エレクトロスプレーイオン化質量分析は、１及び２の１分子及び３分子の、ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）及びｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$、それぞれからのｓｆＧＦＰへの部位特異的組み込みを実証した（図４ｂ、補足情報図４）。図４ａにおけるアミノ酸なしの対照と組み合わせた、このデータは、ｅＲＦ１（Ｅ５５Ｄ）の存在下での非天然アミノ酸の高忠実度の組み込みを実証している。

【実施例６】

【０２９５】

誘導性ｅＲＦ１ミュータントのゲノム組み込みはアンバーサプレッションを増強する

これまで記載されたｅＲＦ１増強発現系は、細胞への非天然アミノ酸組み込みのために全ての必要なコンポーネントを導入するために３つのプラスミドの並行したトランスフェクションに依存する。ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄのゲノム組み込みにより、２つのみのプラスミド（図１、ｈ又はｉと組み合わされたコンストラクトｇ）がトランスフェクトされなければならないだけで、細胞へ送達されるこれらのプラスミドの量を増加させる。

【０２９６】

ｅＲＦ１についてのテトラサイクリン誘導性プロモーターを用いることにより、必要とされる時、テトラサイクリンの増殖培地への添加により、標準細胞培養維持モードから高効率アンバーサプレッションモードへ切り換えることができる細胞株を創製した。

【０２９７】

ｅＲＦ１バリアントを、Flp-In（商標）T-REx（商標）２９３細胞株（Life Technologies社）へ導入した。その細胞株は、単一の転写活性ゲノムＦＲＴ標的部位を含有し、それにより、ゲノム挿入部位による発現レベルの変動を排除する。したがって、それは異なる安定細胞株において複数の遺伝子コンストラクトの効果を比較するための理想的なツールである。本発明者らは、pcDNA（商標）5/FRT/TO（Life Technologies社）に基づいて必要なＦＲＴドナープラスミドを創製した。

【０２９８】

キイロショウジョウバエの再コード化されたヒトｅＲＦ１野生型とｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄバリアントのどちらも、首尾よくゲノムへ組み込まれた。生じたTrex　２９３野生型及びＥ５５Ｄ細胞株は、誘導性条件下と非誘導性条件下の両方において、数カ月間、維持することができ、毒性効果が無視できることを示唆した。

【０２９９】

アンバーサプレッション効率を、１：１の比でＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$とｓｆＧＦＰレポーターを含有するコンストラクト（コンストラクトｇ＋ｈ／ｉ、図１）の一過性トランスフェクションにより決定した。０．５ｍＭ　アミノ酸２の存在下、アンバーサプレッションは、ｓｆＧＦＰ（野生型）と比較して、１μｇ／ｍＬテトラサイクリンの添加によるｅＲＦ１発現の誘導で、ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）において７５％から９９％へ、ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$において８％から２０％へ増加させた（図５Ａ）。

【０３００】

観察された効果は、一過性トランスフェクションによるｅＲＦ１の導入と比較して顕著ではない（図４）。ｅＲＦ１について細胞可溶化物を免疫染色することにより、ｅＲＦ１のレベルが誘導で首尾よく上昇しているが（図５Ｄ）、一過性トランスフェクション後の

ｅＲＦ１発現と比較して顕著ではない（図４、Ｂ／Ｄ）ことが示されている。これは、細胞あたりの一過性トランスフェクションによるプラスミドの複数のコピーの送達と比較した、単一のゲノム組み込み部位の存在と一致する。内因性の野生型ｅＲＦ１の存在下において、アンバーサプレッションは、ＵＡＧコドンで終結させる能力を有する野生型ｅＲＦ１／ｅＲＦ３複合体の形成を阻止するのに十分なｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄが存在する場合のみ、増強することができる。

【実施例７】

【０３０１】

ｓｈＲＮＡ（ｅＲＦ１）の構成的発現は、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの安定的組み込みを有する細胞株においてアンバーリードスルーを増加させる

ｅＲＦ１バリアントの強い発現は、アンバーサプレッションの増強を可能にするため（図３）、トランスジェニックｅＲＦ１の存在下で内因性ｅＲＦ１を低下させるはずである（Carnes et al. 2003；Ilegems et al. 2004）。ｓｈＲＮＡによる内因性ｅＲＦ１レベルの低下は、基礎的終止コドンリードスルーの非特異的増加に結びつけられる（図３Ｂ、Ｃ）。アンバーサプレッション潜在能力が増強した安定細胞株の概念に沿って、以前に用いられたｓｈＲＮＡのｅＲＦ１特異的セットを、今、ゲノムへのランダムレンチウイルス組み込みにより細胞株へ導入した（Santa Cruz Biotechnology社）。組み込み事象が成功した細胞を、獲得されたピューロマイシンに対する耐性に基づいて選択した。ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄ及びｅＲＦ１野生型を含有する両方の細胞株を創製し、テトラサイクリンの存在下及び非存在下において、数週間、維持することができた。

【０３０２】

アンバーサプレッション効率を、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペア、及びｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）又はｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$レポーターコンストラクト（プラスミドｇ＋ｈ／Ｉ、図１）の一過性トランスフェクション後、決定した。アンバーサプレッション効率は、バックグラウンドに対する総ｓｆＧＦＰ蛍光として示され、その同じ細胞株におけるｓｆＧＦＰ（野生型）に対して標準化されている。

【０３０３】

ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの組み込み及び誘導は、０．５ｍＭ　２の存在下で、「ブランク」親細胞株、TRex 293 Flp-Inと比較して８７％から９９％へ、アンバーサプレッションの増加を引き起こした。対照的に、ｅＲＦ１野生型の誘導は、アンバーサプレッションを平均して８１％へ低下させた。

【０３０４】

ｅＲＦ１特異的ｓｈＲＮＡの構成的発現を有する細胞株は、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄ背景において１１４％へ相対的蛍光を増加させたが、ｅＲＦ１野生型背景において７９％での抑制を維持した（図５Ｃ）。ｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）$_3$レポーターに関するアンバーサプレッション効率は、TRex 293 Flp-In親細胞株において７．６％であった。ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを発現する安定株は、アンバーサプレッションの１９％への増加を示し、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄとｓｈ ＲＮＡ（ｅＲＦ１）の両方を発現する細胞株において３１％へさらに増加している。対照的に、ｅＲＦ１野生型を発現する細胞株は、７．６％での親細胞株と比較して、アンバーサプレッションの変化を示していない。ｅＲＦ１野生型とｓｈＲＮＡ（ｅＲＦ１）の両方を発現する由来細胞株は、抑制効率の５％への微量の低下を示している（図５Ｄ）。

【０３０５】

全体的に見れば、相対的アンバーサプレッション効率は、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの単一コピーの安定的な組み込みにより増強することができ、さらなる増強は、内因性ｅＲＦ１レベルの低下か、又はｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄの発現の増加のいずれかを必要とする。いずれの場合においても、ｓｆＧＦＰ－２の量的発現を達成することができ、ｓｆＧＦＰ－２$_3$は、ｓｆＧＦＰの３０～４０％の効率で産生することができる。

【実施例８】

【０３０６】

ｅＲＦ１ミュータントは、Ｄｅｍｌ細胞において非天然アミノ酸組み込み効率を増加させる

本発明者らはまた、昆虫細胞に基づいた発現系において、選択されたｅＲＦ１ミュータントの効果を評価した。Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ２細胞などのショウジョウバエ属（Drosophila）由来の細胞株が、タンパク質のラージスケール発現に日常的に用いられる。これらの系におけるタンパク質内の非天然アミノ酸の組み込みは、Ｍ．マゼイＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$のペア及び適切な発現系を用いて実証されている（Bianco et al. 2012；Elliott et al. 2014）。

【０３０７】

非天然アミノ酸組み込みを駆動させるために、以下の４つのコンストラクトを用いた：ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$発現コンストラクト、ＧＦＰ－ｍＣｈｅｒｒｙ又はＧＦＰ－ＴＡＧ－ｍＣｈｅｒｒｙを含有するレポーターコンストラクト、ＵＡＳドライバー、及び各ｅＲＦ１バリアントについての発現コンストラクト。

【０３０８】

全体的に見れば、Ｄｍｅｌ細胞におけるトランスフェクション効率は、哺乳類系においてより低く、生じた細胞可溶化物及びブロットは、トランスフェクトされた細胞とトランスフェクトされていない細胞の混合物を示し、見かけ上の効果を低下させている（図６Ａ）。目で見える指標は、内因性ｅＲＦ１バンドより下に異所性の欠失型ｅＲＦ１に対応する弱いバンドを示すΔ１００ミュータントである（図６Ｂ）。図６Ａに示されたアンバーサプレッションの定量化は、３つの独立したトランスフェクション実験に基づいており、対応するブロットを個々に定量化している。

【０３０９】

野生型終結因子の発現は、リードスルーの非常にわずかな低下を引き起こすが、ｅＲＦ１　Δ１００ミュータントの発現は、リードスルーレベルを４．８％から２３％へと５倍、増加させる。この効果は、欠失型ＧＦＰの総量の大幅な低下を伴い、全体的な翻訳過程の著しい障害を示唆している（図６Ｂ）。

【０３１０】

Ｅ５５Ｄミュータントは、試験されたバリアントのリードスルーレベルの２番目に大きい増加、１５％への４倍の増加を示している。同様に、変異Ｅ５５Ａ及びＮＫ１２９ＰＱは、リードスルーを１２％へとおおよそ３倍、増加させている。ＵＧＡリードスルーを増強させることが報告されているミュータントＳ７０Ａ　Ｇ７３Ｓは、アンバーサプレッションへの効果を示さない。用いられる細胞構成とレポーター系の両方における違いに関わらず、これらの結果は、哺乳類細胞において前に観察された相対的効果の大きさを密接に反映している。唯一の例外が変異Ｙ１２５Ｆであり、それは、Ｄｍｅｌ細胞において無視できるほどの効果しか生じないが、哺乳類系においてＵＡＧリードスルーを向上させるように思われる。

【実施例９】

【０３１１】

ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄミュータントは広範な非天然アミノ酸及びｔＲＮＡシンテターゼバリアントの組み込み効率を増加させる

４つの別々の非天然アミノ酸：Ｂｏｃ－Ｋ（Ｎ^{ε}－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン、ノルボネン－Ｋ（Ｎ^{ε}－ノルボルネン－２－イルオキシカルボニル－Ｌ－リシン）、シクロプロペン－Ｋ（Ｎ^{ε}－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リシン）、及びビシクロニン－Ｋ（Ｎ^{ε}－（［（１Ｒ，８Ｓ）－ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イルメトキシ］カルボニル）－リシン）のｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）への組み込みは、図７に示されているように、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄミュータントの存在下で向上した。実施例６で生成されたT-REx　２９３　ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを誘導的に発現するために用いた。

【０３１２】

アンバーサプレッション効率を、１：１の比でＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$及びｓｆＧ

ＦＰ$_{150TAG}$レポーター（コンストラクトｇ＋ｈ／ｉ、図１）を含有するコンストラクトの一過性トランスフェクションにより決定した。アンバーサプレッション効率を、ウェスタンブロッティングによるｓｆＧＦＰの発現に基づいて決定した。全ての場合において、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄミュータントの存在は、ｓｆＧＦＰの発現を増加させた。

【実施例１０】

【０３１３】

考察

本発明者らは、非天然アミノ酸組み込みの効率を天然の翻訳対照に対して定め、これにより、非天然アミノ酸組み込み効率のベンチマークの向上を定量的に評価することが可能となった。本発明者らが創製した最適化された系は、アミノ酸１及び２に関する非天然アミノ酸組み込み効率の１７～２０倍の向上をもたらしている。アミノ酸１について、組み込み効率は、終止コドンなしの対照の５％から８５％へ増加し、一方、アミノ酸２について、組み込み効率は、終止コドンなしの対照の７％から１５７％へと増加している。さらに、最適化された系は、３つの位置において１及び２を組み込むタンパク質の収量を、測定不可能な低いレベルから、それぞれ、停止なしの対照の１２％及び４３％へ増加させている。

【０３１４】

様々な因子が、非天然アミノ酸組み込みの劇的な向上に寄与し、それらには、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$発現を最適化するためのｔＲＮＡ$_{CUA}$レベルの最適化、並びに改変型ｅＲＦ１バリアントの開発及び使用が挙げられる。非天然アミノ酸の組み込みは、最適化されたＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$系だけを用いて、単一のアンバーコドンに応答して相当に効率的であるが、効率は、ｅＲＦ１（例えば、Ｅ５５Ｄ）の添加によってさらに向上する。ｅＲＦ１ミュータントの非天然アミノ酸組み込みへの効果は、複数部位において非天然アミノ酸を組み込む場合、より劇的であり、３つの部位にアミノ酸１を含有するタンパク質の収量を２～３倍、３つの部位に２を含有するタンパク質の収量を４倍増加させる。

【実施例１１】

【０３１５】

代替ｅＲＦ１ミュータントの実証

本発明者らは、最初に、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞株における一過性トランスフェクションにより、ｅＲＦ１バリアントをスクリーニングした。下記の表は、それらの非天然アミノ酸組み込み（ＢｏｃＫ）への効果によってランク付けされた、スクリーニングされた変異を挙げている。関連したプロトコール及び補足材料は、上記の実施例においての通りである。

【０３１６】

【表４】

変異	効果(向上倍率)	アッセイ/コメント
E55D	5.1	DLR アッセイ, 2mM BocK
N129P, K130Q	3.2	DLR アッセイ, 2mM BocK
T122Q, S123F	3.0	DLR アッセイ, 2mM BocK
E55A	2.8	DLR アッセイ, 2mM BocK
Y125F	2.6	DLR アッセイ, 2mM BocK
T58K, S60T, S64D, L125F, N129S	2.5	DLR アッセイ, 2mM BocK
S123A, L124I, Y125L	2.5	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
S123R, L124W, Y125R	1.9	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
S123H, L124A, Y125G	1.9	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
M51A, K130M	1.8	DLR アッセイ, 2mM BocK
S123A, L124L, Y125V	1.8	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
S123L, L124C, Y125S	1.8	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
S123L, L124S, Y125S	1.8	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
S123V, L124T, Y125P	1.7	sfGFP(3TAG), 2mM BocK
Δ100 (N 末端欠失)	6.8	DLR アッセイ, 2mM BocK
S70A, G73S	0.67	組み込みシグナルとしての UAG では有用でないが、UGA では適用が見出され得る。 DLR アッセイ, 2mM BocK

【実施例１２】

【０３１７】

多様な真核生物種におけるｅＲＦ１ミュータントの機能性

本発明は、多様な真核生物種において適用される。本発明は、ハエ細胞（例えば、ショウジョウバエ属）などの昆虫細胞、酵母細胞などの真菌細胞、及び他の真核細胞において適用することができる。

【０３１８】

本発明者らは、ミュータントｅＲＦ１を昆虫（Ｄｍｅｌ）細胞株へ導入するために一過性トランスフェクションを用いた。

【０３１９】

方法：

Ｄ．ｍｅｌ　２細胞（Ｓ２）の一過性トランスフェクション

ショウジョウバエ属Ｓ２細胞（Ｄ．Ｍｅｌ；Invitrogen社）を、標準細胞培養実践に従って、Ｔ７５フラスコ中、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン及びｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ（５０Ｉ．Ｕ．／ｍＬ　ペニシリン、５０μｇ／ｍＬ　ストレプトマイシン）で強化された完全なExpress 5 SFM培地（Life technologies有限会社.）において維持した。トランスフェクションの２４時間前、細胞を、掻爬又は振盪により表面から剥離させ、５ｍｌの懸濁細胞を、

８ｍｌのあらかじめ温めた培地で希釈した。２４ウェルプレートについて、ウェルあたり０．５ｍｌ　懸濁細胞を播種し、一晩、増殖させた。Fugene HD（Promega社）を用いて細胞に一過性にトランスフェクトした。各ウェルについて、１．７５μｌ　Fugene HDを１５μｌ滅菌水と混合し、室温で５分間、インキュベートした。同様に、０．７５μｇ　ＤＮＡ（０．３μｇの各レポーター、ＰｙｌＲＳ／ＰｙｌＴ、及びｅＲＦ１コンストラクト、０．１５μｇ　ＧＡＬ４）を、１５μｌ滅菌水中に希釈し、希釈されたFugene HD試薬に加え、室温で１５分間、インキュベートした。標的細胞を含有する各ウェルにおいて、使用済の増殖培地を取り去り、細胞を５００μｌ滅菌ＰＢＳで慎重に洗浄した。その後、５００μｌのExpress 5培地、０．２ｍＭ　$CuSo_4$（Sigma社）、２ｍＭ／ｍｌグルタミン、及び必要とされる場合、非天然アミノ酸で各ウェルを満たした。１を滅菌水／ＮａＯＨに溶解し（２０ｍＭ　１）、増殖培地へ加えた。その後、ｐＨを、４Ｍ　ＨＣｌを用いて６．５に調整した。他に指示がない限り、増殖培地における２の最終濃度は２ｍＭであった。３０μｌトランスフェクション混合物のうちの２５μｌを、各ウェルへ滴下した。プレートを慎重に振盪し、２５℃で一晩、インキュベートした。トランスフェクションから１６時間後、各ウェルを、ＰＢＳを用いて洗浄し、細胞を１００μｌ　ＲＩＰＡバッファー（Sigma社）中に溶解し、室温で振盪させながら、１５分間、コンプリートプロテアーゼインヒビター（Roche社）を加えた。

【０３２０】

非天然アミノ酸組み込みを、ＧＦＰ－ＴＡＧ－ｍＣｈｅｒｒｙコンストラクトの発現により決定した。欠失型タンパク質に対する完全長タンパク質の比率を、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞について記載されているように、ＧＦＰについて免疫染色されたブロット上での定量化により決定した。

【０３２１】

キイロショウジョウバエの遺伝子コンストラクト

末端His_6タグ及び三重停止終結シグナルを含有する、キイロショウジョウバエのコドン使用頻度について最適化されたヒトｅＲＦ１遺伝子を、プラスミドSG105（Bianco et al, 2012）へBamHI／NotI制限部位を用いてクローニングした（プライマーeRF1_SG105）。SG105はUASpに由来し、ｗｈｉｔｅ座の下流に第２の多重クローニング部位を含有する（Rorth, 1998）。AB51は、Ｕ６－ＰｙｌＴカセットの６コピー、及びＵＡＳ－ＰｙｌＲＳを含有する（Ambra Bianco、未公開データ）。

【０３２２】

キイロショウジョウバエにおける非天然アミノ酸組み込み効率の決定

ｅＲＦ１バリアントを含有するトランスジェニックハエ系統を、ショウジョウバエ胚注入サービス（Bestgene株式会社）を用いて、Ｐエレメント注入により創製した。プラスミドSG105へクローニングされたｅＲＦ１　Δ１００及びＥ５５Ｄコンストラクトは、首尾よくマイクロインジェクションされ、それぞれ、９個及び７個の固有系統を生んだ。

【０３２３】

ハエ系統ストックをアップルプレート上に１６℃で維持した。遺伝的交雑及び非天然アミノ酸組み込み実験について、ハエを２５℃で維持した。ｅＲＦ１　Δ１００又はＥ５５Ｄバリアントを含有するハエ系統を、ＦＴ７４－Ｓ２－ｎｏｓハエ系統由来の未交尾の雌と交配させた。生じた子孫を、各ｅＲＦ１系統に依存した遺伝子マーカーの正しい組み合わせについてスクリーニングし、さらなる実験のために維持した。

【０３２４】

ＦＴ７４－Ｓ２－ｎｏｓ系統は、ＰｙｌＲＳ／$PylT_{CUA}$のペアを用いる非天然アミノ酸組み込みを支持し、二重ルシフェラーゼレポーターを発現する。ゲノム上に組み込まれているコンストラクトは、ＵＡＳ二重ルシフェラーゼ（ＴＡＧ）レポーター、ＵＡＳ－ＰｙｌＲＳ、Ｕ６－ＰｙｌＴカセット（Triple-Rep-L）の４コピー、及びｎｏｓ－Ｇａｌ４－ＶＰ１６カセット（Bloomington 4937）である。これらのコンストラクト及び系統の創製は、Bianco et al, 2012に論じられている。

【０３２５】

酵母ペーストへ混合された化合物２をハエに与えた。２を水／ＮａＯＨ中に１０ｍＭの最終濃度まで溶解し、ペースト状の稠度に達するまで、乾燥酵母を加えた。ペーストを中和するために１Ｍ　ＨＣｌを加えた。ハエ系統における非天然アミノ酸組み込みを測定するために、非天然アミノ酸組み込み、加えてｅＲＦ１バリアントのための必要なコンポーネントを発現する各系統の１５匹の雌ハエに、チューブ中で５匹の雄をあてがい、少量の１０ｍＭ　２－酵母ペーストを用意した。２４時間後及び４８時間後、ハエを新鮮な２－酵母ペーストを有する新しいチューブへ移した。３日目、その朝、２－酵母ペーストを有する新鮮なチューブへの移動を実施し、その午後、雌ハエを解剖した。解剖のため、ハエをCO_2パッド上に集めた。雌ハエを、顕微鏡下の解剖ガラスへ移し、後方先端の注意深い除去により卵巣を胸部から単離した。１０～１２匹のハエからの卵巣をＰＢＳバッファー中に収集し、１．５ｍｌ微量遠心管へ移した。その遠心管を、卓上遠心機において、最低設定で３０秒間、遠心分離し、上清を除去した。１００μｌ　１×passive溶解バッファー（Promega社）を加えた後、プラスチック乳棒を用いて、卵巣を、その溶液が乳状に達するまですりつぶした。最高速度での３分間の遠心分離によりデブリを除去した。上清を慎重に取り出し、最高速度で１分間、再びペレットにした。１０μｌのこの可溶化物を、試料あたり３連で、９６ウェル形式の二重ルシフェラーゼアッセイに用いた。アッセイ（Promega社）を、哺乳類細胞可溶化物について記載されているように実施した。

【０３２６】

図１２参照。

Ａ．遺伝的背景の図示。ピロリシルａａＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$のペア、二重ルシフェラーゼレポーター、及び卵巣特異的プロモーターを発現するハエ系統ＦＴ７４－Ｓ２－Ｎｏｓ／ＴＭ６由来の未交尾の雌を、マイクロインジェクション（Bestgene社）後、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄ又はΔ１００のランダムゲノム挿入により作出された均衡ハエ系統（balanced fly lines）由来の雄と交配させた。Ｂ、Ｃ．二重ルシフェラーゼアッセイにおける終止コドンリードスルーの測定。各遺伝的交配からの正しい遺伝子マーカーを有する１２匹の雌を収集し、１０ｍＭ　ＣｙＰ酵母ペーストで７２時間、飼育した。卵巣を切開により収集し、プールし、ＵＡＧリードスルーについて試験した。パネルＢは、ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄ組み込み事象から生じた全てのハエ系統についての結果を挙げている；パネルＣは、ｅＲＦ１　Δ１００についての結果を挙げている。

【実施例１３】

【０３２７】

ＨＥＫ細胞におけるＰｙｌＴ　Ｕ２５ＣバリアントとＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔバリアントの両方の効率的アンバーサプレッション

ＧＦＰ１５０ＵＡＧ、及び４×　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ又は４×　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　ＯｐｔをトランスフェクトされたＨＥＫ細胞、ＦＡＣＳによりＧＦＰ蛍光について分析、グラフについて、パーセンテージのラベルを付され、ピンク色の円で囲まれたＧＦＰ陽性集団、反復試料のＭＦＩ。標準トランスフェクション及びフローサイトメトリープロトコール、２ｍＭ　ＢｏｃＫにおける発現。図１３参照。

【０３２８】

トラスツズマブ重鎖、位置Ａ１１４ＵＡＧのウェスタンブロット、別々のプラスミドにおけるＬＣ及びＨＣ、それぞれ、４×　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ又は４×　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔを用いる。グラフについて、測定された反復試料のブロット強度。標準トランスフェクション及びウェスタンブロットプロトコール、２ｍＭ　ＢｏｃＫにおける発現。図１４及び図１５参照。

【０３２９】

比較のための親Ｍ．マゼイ　Ｐｙｌ　ｔＲＮＡ（ｃｕａアンチコドン）、Ｕ２５Ｃ誘導体、Ｕ２５Ｃ及びＯｐｔ誘導体についてのｔＲＮＡクローバー型図。Ｕ２５Ｃ変異は緑色、６ヌクレオチドのＯｐｔ変異はピンク色で示されている。図１６参照。

【０３３０】

ｔＲＮＡバリアントについてのＤＮＡ配列の配列アラインメント（相違は黒色）、ＣＣ

Ａテールは哺乳類プラスミドにおいて明確にはコードされず、細胞により転写後、付加されることに留意されたい。図１７参照。

【０３３１】

Ｍ．マゼイ　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔ

GGAAACGTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCAGTGGGGTTAGATTCCCCACGTTTCCG

【０３３２】

（１×）ヒトＵ６プロモーター：：Ｍ．マゼイ　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔ：：３’ＵＴＲ及びターミネーター

CCTAGTTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAA
TTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTT
GCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATA
TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAACGTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCAGTGGGGTTAGAT
TCCCCACGTTTCCGGACAAGTGCGGTTTTT

【０３３３】

クローニングされた場合の（４×）ヒトＵ６プロモーター：：Ｍ．マゼイ　ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃ　Ｏｐｔ：：３’ＵＴＲ及びターミネーター

TGGGCGATGTGCGCTCTGCCCACTGACGGGCACCGGAGCGATCGCAGATCCCCTAGTTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTC
CCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAG
ATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGA
CTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAA
ACGTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCAGTGGGGTTAGATTCCCCACGTTTCCGGACAAGTGCGGTTTT
TAGAATTACAACTTATATCGTATGGGCTAGACTCGAGCCTAGTTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCA
TATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAA
TACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTA
CCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAACGTGATCATGTAG
ATCGAACGGACTCTAAATCCGTTCAGTGGGGTTAGATTCCCCACGTTTCCGGACAAGTGCGGTTTTTGCGGCCGCGATAT
CTGCAGAATTCACACTGGACTAGGATCCGAGCTCCCTAGTTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATAT
TTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATAC
GTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCG
TAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAACGTGATCATGTAGATC
GAACGGACTCTAAATCCGTTCAGTGGGGTTAGATTCCCCACGTTTCCGGACAAGTGCGGTTTTTGGTACCAAGCTTAAGC
AGACTCGTCGTGACTACATTAGCCTAGTTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGA
TACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAA
GTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGT
ATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAACGTGATCATGTAGATCGAACGGACTCTA
AATCCGTTCAGTGGGGTTAGATTCCCCACGTTTCCGGACAAGTGCGGTTTTTCCTAGTGGCCTTGGAGGCCTTTTCCCCG
TATCCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGC

この４×カセットは、ＧＦＰ（１５０　ｕａｇ）を有するｐＫＹＭ１などの上記の様々なベクターにおいて、４×ＰｙｌＴ　Ｕ２５Ｃカセットに取って代わり得る。トラスツズマブＬＣ及びＨＣ（１１４　ｕａｇ）。

【実施例１４】

【０３３４】

ｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄは抗体発現を増加させる

全ての実験を、他に指示がない限り、２ｍＭ　ｂｏｃＫを用いて行った。「ＣｙｐＫ」として挙げられたものは、０．５ｍＭ　シクロプロペンを用いて行った。どちらもピロリシン模倣体である。ＨＣ及びＬＣは別々のプラスミド上にあり、標準ＰＥＩプロトコールを用いて１：１の比で同時トランスフェクトした。ＧＦＰ研究について、単一のプラスミドのみをトランスフェクトした。非天然機構ｔＲＮＡ／シンテターゼは、ＧＦＰ／ｍＡｂ遺伝子と同じプラスミド上にあるため、これらの研究について追加のプラスミドは必要ではない。

【０３３５】

抗体発現は、両方の抗体遺伝子、加えて、ピロリシン非天然アミノ酸ｔＲＮＡ及びシンテターゼを含有する単一のベクターからＬＣ－ｉｒｅｓ－ＨＣ型式で行われた。この４×ＰｙｌＴ（ｕ２５ｃ）／ＰｙｌＳコンストラクトは上記の通りである。

【０３３６】

ｅＲＦ１は、標準発現ベクターであるｐｃＤＮＡ５から発現させた。ｅＲＦ１を、抗体プラスミドに１：５の比でトランスフェクトした。実験を、懸濁液ＨＥＫ系であるＥｘｐｉ２９３細胞において行い、標準プロトコールを使用しＰＥＩを用いてトランスフェクトした。培養物はそれぞれ３０ｍＬ、１８０ｕｇのＰＥＩと共に６０ｕｇのＤＮＡ、７日間の発現であった。

【０３３７】

ウェスタンブロットを、ＨＲＰにコンジュゲートした抗ＨＣ抗体及び抗ＬＣ抗体を用いて、培養の上清から直接的に行った。重鎖の位置Ａｌａ１１４におけるＵＡＧアンバーコドンを有するトラスツズマブは、ＨＥＫ細胞において、本発明者らの発現系と共にｅＲＦ１　Ｅ５５Ｄを用いて、発現の増加を示す。図１８参照。

【０３３８】

コンストラクトは図１９におけるものである。プラスミドのダイアグラムは図２０にある。配列は下記である。

【０３３９】

ｐＫＹＭ１　ＬＣ－ｉｒｅｓ－ＨＣ

GTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA
ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT
GACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA
CGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT
TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG
TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAG
TGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGG
ACTCTAGAGGATCGAATTAAGCTTGGTACCGCCGCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGC
AACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCTCTGTCTGCGTCTGTTGGTGACCGCGTTACCATCA
CCTGCCGTGCGTCCCAGGACGTTAACACCGCCGTGGCGTGGTATCAACAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACTGCTGATC
TACTCCGCGTCTTTCCTGTACTCTGGTGTTCCGTCTCGTTTCAGCGGTTCTCGTTCTGGTACTGACTTCACCCTCACCAT
CTCTTCTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCCACCGACCTTCGGTCAGGGCA
CCAAAGTTGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCA
GAGCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACAGAGCAGGATTCCAAGGATTCCACATACAGCCTGAGCAGCACACTGACACTGT
CCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACACACCAGGGACTGTCCTCCCCTGTGACAAAGAGC
TTCAACAGAGGAGAATGCTGAGGCCGCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAA
GGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCC
TGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAG
CAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGAC
AGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTG
GATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATT
GTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCG
AACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATAATACCTCCGGAATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAG
TAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAATCTGGTGGTGGTCTGGTTCAACCGGGTGGCTCCCTG
CGTCTGTCTTGTGCGGCCTCTGGTTTTAACATCAAAGATACCTATATCCACTGGGTTCGTCAGGCGCCAGGCAAAGGTCT
GGAATGGGTTGCGCGTATCTACCCGACCAACGGTTACACCCGCTACGCGGACTCTGTTAAAGGTCGTTTCACCATCTCTG
CGGACACCTCTAAAAACACCGCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGCGGAAGACACCGCCGTTTACTACTGCTCTCGT

TGGGGTGGTGACGGTTTCTACGCGATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGCTGGTTACCGTTTCTTCTTAGTCGACCAAGGG
CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG
TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGT
GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCCCCGGGTTGAGCTCGAGTCTAGAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAGTAATGAGTTTAAACTCGACAATCAACCTC
TGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA
TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCA
TTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGC
CTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCC
ATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG
ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCC
CTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAAACGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCT
ATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTCGGTCCCAGGGCT
GGCACTCTGTCGATACCCCACCGAGACCCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACCCCACCCCCCA
AGTTCGGGTGAAGGCCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTGCGCAGCTCTATAAA
GTAACAAAACTTTTATGAGGGACAGCCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCCGCTAGGGGGCAG
CAGCGAGCCGCCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCTCCCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGG
CACGGGGAAGGTGGCACGGGATCGCTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGGATAC
GGGGAAAAGGCCTCCAAGGCCACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTT
AGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATA
CTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACT
TTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTAT
CGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAAC
CCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCA
CAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTA
AAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTA
ATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCC
AACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACAT
GATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCA
TATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGT
ACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGG
AATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCT
GAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGA
AATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGA
AATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAAC
AGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGTAAGGATCTGCGAT
CGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC
GGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGG
GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTT
CGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCC

GCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTC
CGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTT
GTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAGCTAGCGTTTAAACTTAAGCT
TGCCACCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGACAAGAAGCCCCTGAACACCCTGATCAGCGCCACAGGACTGTGGA
TGTCCAGAACCGGCACCATCCACAAGATCAAGCACCACGAGGTGTCCCGGTCCAAAATCTACATCGAGATGGCCTGCGGC
GATCACCTGGTCGTCAACAACAGCAGAAGCAGCCGGACAGCCAGAGCCCTGCGGCACCACAAGTACAGAAAGACCTGCAA
GCGGTGCAGAGTGTCCGACGAGGACCTGAACAAGTTCCTGACCAAGGCCAACGAGGACCAGACCAGCGTGAAAGTGAAGG
TGGTGTCCGCCCCCACCCGGACCAAGAAAGCCATGCCCAAGAGCGTGGCCAGAGCCCCCAAGCCCCTGGAAAACACCGAA
GCCGCTCAGGCCCAGCCCAGCGGCAGCAAGTTCAGCCCCGCCATCCCCGTGTCTACCCAGGAAAGCGTCAGCGTCCCCGC
CAGCGTGTCCACCAGCATCTCTAGCATCTCAACCGGCGCCACAGCTTCTGCCCTGGTCAAGGGCAACACCAACCCCATCA
CCAGCATGTCTGCCCCTGTGCAGGCCTCTGCCCCAGCCCTGACCAAGTCCCAGACCGACCGGCTGGAAGTGCTCCTGAAC
CCCAAGGACGAGATCAGCCTGAACAGCGGCAAGCCCTTCCGGGAGCTGGAAAGCGAGCTGCTGAGCCGGCGGAAGAAGGA
CCTCCAGCAAATCTACGCCGAGGAACGGGAGAACTACCTGGGCAAGCTGGAAAGAGAGATCACCCGGTTCTTCGTGGACC
GGGGCTTCCTGGAAATCAAGAGCCCCATCCTGATCCCCCTGGAGTACATCGAGCGGATGGGCATCGACAACGACACCGAG
CTGAGCAAGCAGATTTTCCGGGTGGACAAGAACTTCTGCCTGCGGCCCATGCTGGCCCCCAACCTGTACAACTACCTGCG
GAAACTGGATCGCGCTCTGCCCGACCCCATCAAGATTTTCGAGATCGGCCCCTGCTACCGGAAAGAGAGCGACGGCAAAG
AGCACCTGGAAGAGTTTACAATGCTGAACTTTTGCCAGATGGGCAGCGGCTGCACCAGAGAGAACCTGGAATCCATCATC
ACCGACTTTCTGAACCACCTGGGGATCGACTTCAAGATCGTGGGCGACAGCTGCATGGTGTACGGCGACACCCTGGACGT
GATGCACGGCGACCTGGAACTGTCTAGCGCCGTCGTGGGACCCATCCCTCTGGACCGGGAGTGGGGCATCGATAAGCCCT
GGATCGGAGCCGGCTTCGGCCTGGAACGGCTGCTGAAAGTCAAGCACGACTTTAAGAACATCAAGCGGGCTGCCAGAAGC
GAGAGCTACTACAACGGCATCAGCACCAACCTGTGATGAGGATCCGCGGCCGCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACG
TTACTGGCCGAAGCCGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA
TCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAT
GTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
CACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
AGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCT
CGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
AATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAG
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
CTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAA
AAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAC
CGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGC
TACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTA
CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
A
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCA

ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTC
TCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGC
GCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGG

リーダーペプチドを含むＨＣ　Ａ１１４Ｘ　ＤＮＡ配列

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTTCAGCTGGTTGAATCTGG
TGGTGGTCTGGTTCAACCGGGTGGCTCCCTGCGTCTGTCTTGTGCGGCCTCTGGTTTTAACATCAAAGATACCTATATCC
ACTGGGTTCGTCAGGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCGCGTATCTACCCGACCAACGGTTACACCCGCTACGCG
GACTCTGTTAAAGGTCGTTTCACCATCTCTGCGGACACCTCTAAAAACACCGCGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGTGC
GGAAGACACCGCCGTTTACTACTGCTCTCGTTGGGGTGGTGACGGTTTCTACGCGATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGC
TGGTTACCGTTTCTTCTTAGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACGGTCTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAA
TCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT

リーダーペプチドを含むＬＣ　ＤＮＡ配列

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTCCCC
GAGCTCTCTGTCTGCGTCTGTTGGTGACCGCGTTACCATCACCTGCCGTGCGTCCCAGGACGTTAACACCGCCGTGGCGT
GGTATCAACAGAAACCGGGTAAAGCGCCAAAACTGCTGATCTACTCCGCGTCTTTCCTGTACTCTGGTGTTCCGTCTCGT
TTCAGCGGTTCTCGTTCTGGTACTGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCGACCTACTACTG
CCAGCAGCACTACACCACCCCACCGACCTTCGGTCAGGGCACCAAAGTTGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTG
TCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCC
AGAGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACAGAGCAGGATTC
CAAGGATTCCACATACAGCCTGAGCAGCACACTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG
AAGTGACACACCAGGGACTGTCCTCCCCTGTGACAAAGAGCTTCAACAGAGGAGAATGCTGA

Ａ１１４Ｘ変異を有するＨＣのタンパク質配列、＊はＵＡＧ非天然部位を表す。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY
LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS*STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ＬＣタンパク質配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【実施例１５】

【０３４０】

ｅＲＦ１　Ｅ５５ＤはＨＥＫ細胞においてＢＣＮ組み込みを増強する

ＨＥＫ２９３　３日目の発現、１ｍＭ　ＢＣＮ（Ｎイプシロン－（ビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イルメトキシ）カルボニル－Ｌ－リシン））、１：１：１比プラスミド、上記のような標準プロトコール。図２１参照

Genetic Encoding of Bicyclononynes and trans-Cyclooctenes for Rapid Site-Specific Protein Labeling in Vitro and in Live Mammalian Cells via Fluorogenic Diels-Alder Reactions. J. Am. Chem. Soc. 2012 134:10317-10320
K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox & J. W. Chin.

【０３４１】

略語

ＰｙｌＲＳ、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ；ＰｙｌＴ、ピロリシルｔＲＮＡ；ｅＲＦ１、真核生物終結因子１；ｅＲＦ３、真核生物終結因子３；ｓｆＧＦＰ、スーパーフォルダー緑色蛍光タンパク質。

【０３４２】

（参考文献）

(1) Lang, K.; Chin, J. W. Chem Rev 2014, 114, 4764.
(2) Kim, C. H.; Axup, J. Y.; Schultz, P. G. Curr Opin Chem Biol 2013, 17, 412.
(3) Baker, A. S.; Deiters, A. ACS Chem Biol 2014, 9, 7
(4) Davis, L.; Chin, J. W. Nat Rev Mol Cell Biol 2012, 13, 168.
(5) Chin, J. W. Annu Rev Biochem 2014, 83: 379
(6) Bertram, G.; Innes, S.; Minella, O.; Richardson, J.; Stansfield, I. Microbiology 2001, 147, 255.
(7) Jackson, R. J.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V. Adv Protein Chem Struct Biol 2012, 86, 45.
(8) Dever, T. E.; Green, R. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012, 4, a013706.
(9) Scolnick, E.; Tompkins, R.; Caskey, T.; Nirenberg, M. Proc Natl Acad Sci U S A 1968, 61, 768.
(10) Petry, S.; Brodersen, D. E.; Murphy, F. V. t.; Dunham, C. M.; Selmer, M.; Tarry, M. J.; Kelley, A. C.; Ramakrishnan, V. Cell 2005, 123, 1255.
(11) Konecki, D. S.; Aune, K. C.; Tate, W.; Caskey, C. T. J Biol Chem 1977, 252, 4514.
(12) Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W. Nat Biotechnol 2007, 25, 770.
(13) Mukai, T.; Hayashi, A.; Iraha, F.; Sato, A.; Ohtake, K.; Yokoyama, S.; Sakamoto, K. Nucleic Acids Res 2010, 38, 8188.
(14) Johnson, D. B.; Xu, J.; Shen, Z.; Takimoto, J. K.; Schultz, M. D.; Schmitz, R. J.; Xiang, Z.; Ecker, J. R.; Briggs, S. P.; Wang, L. Nat Chem Biol 2011, 7, 779.
(15) Lajoie, M. J.; Rovner, A. J.; Goodman, D. B.; Aerni, H. R.; Haimovich, A. D.; Kuznetsov, G.; Mercer, J. A.; Wang, H. H.; Carr, P. A.; Mosberg, J. A.; Rohland, N.; Schultz, P. G.; Jacobson, J. M.; Rinehart, J.; Church, G. M.; Isaacs, F. J. Science 2013, 342, 357.
(16) Wu, I. L.; Patterson, M. A.; Carpenter Desai, H. E.; Mehl, R. A.; Giorgi, G.; Conticello, V. P. Chembiochem 2013, 14, 968.
(17) Mukai, T.; Kobayashi, T.; Hino, N.; Yanagisawa, T.; Sakamoto, K.; Yokoyama, S. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008, 371, 818.
(18) Chen, P. R.; Groff, D.; Guo, J.; Ou, W.; Cellitti, S.; Geierstanger, B. H.; Schultz, P. G. Angewandte Chemie International Edition 2009, 48, 4052.
(19) Gautier, A.; Nguyen, D. P.; Lusic, H.; An, W.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2010, 132, 4086.
(20) Xiao, H.; Chatterjee, A.; Choi, S. H.; Bajjuri, K. M.; Sinha, S. C.; Schultz, P. G. Angew Chem Int Ed Engl 2013, 52, 14080.
(21) Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Bianco, A.; Ernst, R. J.; Sachdeva, A.; El

sasser, S. J.; Davis, L.; Lang, K.; Pisa, R.; Greiss, S.; Lilley, K. S.; Chin, J. W. Nat Biotechnol 2014, 32, 465.
(22) Nguyen, D. P.; Lusic, H.; Neumann, H.; Kapadnis, P. B.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2009, 131, 8720.
(23) Miyake-Stoner, S. J.; Refakis, C. A.; Hammill, J. T.; Lusic, H.; Hazen, J. L.; Deiters, A.; Mehl, R. A. Biochemistry 2010, 49, 1667.
(24) Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P. G. Biochemistry 2013, 52, 10
(25) Kolosov, P.; Frolova, L.; Seit-Nebi, A.; Dubovaya, V.; Kononenko, A.; Oparina, N.; Justesen, J.; Efimov, A.; Kisselev, L. Nucleic Acids Res 2005, 33, 6418.
(26) Bulygin, K. N.; Khairulina, Y. S.; Kolosov, P. M.; Ven'yaminova, A. G.; Graifer, D. M.; Vorobjev, Y. N.; Frolova, L. Y.; Kisselev, L. L.; Karpova, G. G. RNA 2010, 16, 1902.
(27) Seit-Nebi, A.; Frolova, L.; Kisselev, L. EMBO Rep 2002, 3, 881.
(28) Eliseev, B.; Kryuchkova, P.; Alkalaeva, E.; Frolova, L. Nucleic Acids Res 2011, 39, 599.
(29) Lekomtsev, S.; Kolosov, P.; Bidou, L.; Frolova, L.; Rousset, J. P.; Kisselev, L. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104, 10824.
(30) Kryuchkova, P.; Grishin, A.; Eliseev, B.; Karyagina, A.; Frolova, L.; Alkalaeva, E. Nucleic Acids Res 2013, 41, 4573.
(31) Grentzmann, G.; Ingram, J. A.; Kelly, P. J.; Gesteland, R. F.; Atkins, J. F. RNA 1998, 4, 479.
(32) Keeling, K. M.; Lanier, J.; Du, M.; Salas-Marco, J.; Gao, L.; Kaenjak-Angeletti, A.; Bedwell, D. M. RNA 2004, 10, 691.
(33) Salas-Marco, J.; Fan-Minogue, H.; Kallmeyer, A. K.; Klobutcher, L. A.; Farabaugh, P. J.; Bedwell, D. M. Mol Cell Biol 2006, 26, 438.
(34) Conard, S. E.; Buckley, J.; Dang, M.; Bedwell, G. J.; Carter, R. L.; Khass, M.; Bedwell, D. M. RNA 2012, 18, 1210.
(35) Le Goff, X.; Philippe, M.; Jean-Jean, O. Mol Cell Biol 1997, 17, 3164.
(36) Merkulova, T. I.; Frolova, L. Y.; Lazar, M.; Camonis, J.; Kisselev, L. L. FEBS Lett 1999, 443, 41.
(37) Cheng, Z.; Saito, K.; Pisarev, A. V.; Wada, M.; Pisareva, V. P.; Pestova, T. V.; Gajda, M.; Round, A.; Kong, C.; Lim, M.; Nakamura, Y.; Svergun, D. I.; Ito, K.; Song, H. Genes Dev 2009, 23, 1106.
(38) Kononenko, A. V.; Mitkevich, V. A.; Dubovaya, V. I.; Kolosov, P. M.; Makarov, A. A.; Kisselev, L. L. Proteins 2008, 70, 388.
(39) des Georges, A.; Hashem, Y.; Unbehaun, A.; Grassucci, R. A.; Taylor, D.; Hellen, C. U.; Pestova, T. V.; Frank, J. Nucleic Acids Res 2014, 42, 3409.
(40) Janzen, D. M.; Geballe, A. P. Nucleic Acids Res 2004, 32, 4491.
(41) Liang, H.; Wong, J. Y.; Bao, Q.; Cavalcanti, A. R.; Landweber, L. F. J Mol Evol 2005, 60, 337.

【０３４３】

（補足的参考文献）

(1) Gautier, A.; Nguyen, D. P.; Lusic, H.; An, W.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2010, 132, 4086.
(2) Hoover, D. M.; Lubkowski, J. Nucleic Acids Res 2002, 30, e43. S12
(3) Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Bianco, A.; Ernst, R. J.; Sachdeva, A.; Elsasser, S. J.; Davis, L.; Lang, K.; Pisa, R.; Greiss, S.; Lilley, K. S.; Chin, J. W. Nat Biotechnol 2014, 32, 465.
(4) Arbely, E.; Torres-Kolbus, J.; Deiters, A.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2012,

134, 11912.
(5) Wilkins, M. R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J. C.; Williams, K. L.; Appel, R. D.; Hochstrasser, D. F. Methods Mol Biol 1999, 112, 531.
(6) Nguyen, D. P.; Garcia M. M.; Kapadnis P. B.; Neumann, N.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2009, 131, 40.
(7) Nguyen, D. P.; Mahesh, M.; Elsasser, S. J.; Hancock, S. M.; Uttamapinant, C.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2014, 136, 2240.

【０３４４】

本明細書に引用又は記載されたいかなる刊行物も、本出願の出願日より前に開示された関連情報を提供する。本明細書における言明は、本発明者らがそのような開示に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。上記の明細書において言及された全ての刊行物は、参照により本明細書に組み入れられている。本発明の様々な改変及びバリエーションは、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく、当業者に明らかであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関して記載されているが、主張されているような本発明は、そのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことは理解されるべきである。実際、分子生物学及び化学又は関連分野における当業者に明らかである、本発明を実行するための記載された様式の様々な改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあることを意図される。

【０３４５】

補足の表Ｓ１

この研究に用いられた合成遺伝子のヌクレオチド配列。Ａ．改変Ｕ６－ＰｙｌＴ＊発現カセットの配列。ＰｙｌＴは下線が引かれ、アンチコドンは赤色でマークされている。Ｂ．ホモサピエンスコドン最適化され、かつＣ末端ポリヒスチジンタグを有するｓｆＧＦＰ（ＴＡＧ）の配列。位置１５０におけるアンバーコドンは赤色でマークされている。Ｃは、Ｎ末端ポリヒスチジンタグを有するキイロショウジョウバエについてのコドン最適化後のヒトｅＲＦ１配列を示す。

【０３４６】

【表５】

A. U6-PylT U25C

agtcagtcactagtTGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAG
GCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCA
TATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCgaaaacctgatcatgtagatcgaaCgactctaaatccgttcagccggttagattcccggggtttccgGACAAGTGCGGTTTTTcctaggg
gtcagtc

B. sfGFP(TAG) ホモサピエンス最適化、C 末端 His タグ

ATGGTGTCCAAGGGCGAGGAACTGTTCACCGGCGTGGTGCCCATCCTGGTGGAACTGGATGGCGA
CGTGAACGGCCACAAGTTCTCTGTGCGGGGAGAGGGCGAAGGCGACGCCACAAATGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCTACCCTCGTGACCACACTG
ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCAGATACCCCGACCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAG
CGCCATGCCCGAGGGCTACGTGCAGGAACGGACCATCAGCTTCAAGGACGACGGCACCTACAAGA
CCAGAGCCGAAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTCGTGAACCGGATCGAGCTGAAGGGCATCGAT
TTCAAAGAGGACGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAACTTCAACAGCCACTACGGTGTA
CATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGGCACAACGTGGAA
GATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGAGATGGCCCCGTGCT
GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGAGCGTGCTGAGCAAGGACCCCAACGAGAAGCGGG
ACCACATGGTGCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCTGGCATCACCCACGGCATGGACGAGCTGTAC
AAGGGCAGCCACCATCACCATCACCATTAATAATAA

C. *ホモサピエンス* eRF1 *キイロショウジョウバエ*最適化、N 末端 His タグ

ATGCATCATCACCATCACCACGCCGATGATCCAAGCGCCGCAGACCGCAATGTTGAGATCTGGAA
GATAAAAAAGCTGATAAAGAGCTTGGAGGCCGCACGGGGCAACGGCACGTCCATGATATCCCTCA
TTATCCCACCAAAGGATCAGATCAGCCGTGTGGCGAAGATGTTGGCGGATGAGTTCGGAACGGCC
AGTAACATTAAAAGTCGCGTGAACCGGCTGTCGGTCTTGGGCGCCATCACTTCCGTGCAGCAACGT
CTGAAACTGTACAACAAAGTCCCACCCAACGGTTTGGTCGTCTACTGCGGTACGATAGTTACCGAG
GAAGGAAAGGAGAAGAAAGTGAATATTGATTTCGAACCATTTAAACCGATAAACACTAGCTTGTA
CTTGTGCGACAATAAGTTTCATACAGAGGCACTCACGGCCCTGCTGAGCGACGACTCGAAATTCGG
ATTCATTGTCATTGATGGAAGTGGAGCGCTGTTCGGCACGCTGCAGGGTAACACGCGCGAGGTCTT
GCACAAATTCACCGTGGACTTGCCCAAAAAGCATGGCCGTGGTGGCCAGAGCGCCCTCAGGTTTG
CGCGGCTGCGCATGGAGAAGCGCCATAACTACGTGCGCAAGGTCGCAGAGACGGCTGTGCAGCTG
TTCATCTCGGGTGATAAGGTAAATGTCGCGGGACTGGTGCTCGCCGGCAGCGCGGACTTCAAAAC
CGAGCTGAGTCAGTCCGACATGTTCGATCAGCGTCTGCAGTCGAAGGTACTGAAGCTCGTCGACAT
TAGCTACGGCGGCGAGAACGGCTTCAATCAGGCCATCGAACTGAGTACCGAAGTCCTCAGTAACG
TAAAGTTTATTCAGGAAAAAAAGTTGATTGGACGCTACTTTGATGAAATAAGCCAAGATACGGGC
AAATACTGTTTTGGCGTCGAGGATACTCTGAAAGCGCTCGAGATGGGAGCAGTGGAAATACTCAT
CGTATATGAAAATCTCGATATAATGCGCTATGTACTGCATTGCCAAGGAACAGAAGAGGAGAAAA
TTCTCTACCTCACCCCGGAGCAAGAGAAGGACAAGAGCCATTTTACAGACAAGGAGACGGGCCAA
GAGCACGAGCTCATTGAGTCGATGCCCTTGCTCGAATGGTTTGCCAACAACTACAAGAAGTTCGGC
GCGACCCTGGAAATTGTCACGGATAAATCGCAGGAGGGCAGCCAGTTTGTGAAGGGCTTCGGTGG
CATCGGCGGCATCCTCCGCTACCGGGTGGATTTCCAAGGCATGGAATATCAAGGTGGAGATGATG
AATTCTTCGATTTGGATGATTACTAATGATAG

【０３４７】

補足の表Ｓ２

部位特異的突然変異誘発に用いられたオリゴヌクレオチド

【０３４８】

【表６】

eRF1_E55Af	5'-GAAGATGTTGGCGGATGCCTTCGGAACGGCCAGTAAC-3'
eRF1_E55Ar	5'-GTTACTGGCCGTTCCGAAGGCATCCGCCAACATCTTC-3'
eRF1_E55Df	5'-GATGTTGGCGGATGATTTCGGAACGGCCAG-3'
eRF1_E55Dr	5'-CTGGCCGTTCCGAAATCATCCGCCAACATC-3'
eRF1_Y125Ff	5'-CCGATAAACACTAGCTTGTTCTTGTGCGACAATAAGTTTC-3'
eRF1_Y125Fr	5'-GAAACTTATTGTCGCACAAGAACAAGCTAGTGTTTATCGG-3'
eRF1_TS122QFf	5'-CATTTAAACCGATAAACCAATTCTTGTACTTGTGCGAC-3'
eRF1_TS122QFr	5'-GTCGCACAAGTACAAGAATTGGTTTATCGGTTTAAATG-3'
eRF1_NK129PQf	5'-GCTTGTACTTGTGCGACCCACAGTTTCATACAGAGGCAC-3'
eRF1_NK129PQr	5'-GTGCCTCTGTATGAAACTGTGGGTCGCACAAGTACAAGC-3'
eRF1_SVLG70AVLSf	5'-GCGTGAACCGGCTGGCCGTGCTGAGCGCCATCACTTCC-3'
eRF1_SVLG70AVLSr	5'-GGAAGTGATGGCGCTCAGCACGGCCAGCCGGTTCACGC-3'
eRF1_K130Mf	5'-GTACTTGTGCGACAATATGTTTCATACAGAGGCAC-3'
eRF1_K130Mr	5'-GTGCCTCTGTATGAAACATATTGTCGCACAAGTAC-3'
eRF1_M51Af	5'-GTGTGGCGAAGGCCTTGGCGGATGAG-3'
eRF1_M51Ar	5'-CTCATCCGCCAAGGCCTTCGCCACAC-3'
DLR_Ser_f	5'- CTGAAGAACGAGCAAATCTCCACGGGGGCCCCTAGGAGATC-3'
DLR_Ser_r	5'-GATCTCCTAGGGGCCCCCGTGGAGATTTGCTCGTTCTTCAG-3'
DLR_TAA_f	5'-GAAGAACGAGCAAATCTAAACGGGGGCCCCTAGGAG-3'
DLR_TAA_r	5'-CTCCTAGGGGCCCCCGTTTAGATTTGCTCGTTCTTC-3'
DLR_TAG_f	5'-GAAGAACGAGCAAATCTAGACGGGGGCCCCTAGG -3'
DLR_TAG_r	5'-CCTAGGGGCCCCCGTCTAGATTTGCTCGTTCTTC -3'
DLR_TGA_f	5'-CTGAAGAACGAGCAAATCTGAACGGGGGCCCCTAGGAGATC -3'
DLR_TGA_r	5'-GATCTCCTAGGGGCCCCCGTTCAGATTTGCTCGTTCTTCAG -3'
sfGFP_TAG150Lf	5'-CTTCAACAGCCACCTGGTGTACATCACC-3'
sfGFP_TAG150Lr	5'-GGTGATGTACACCAGGTGGCTGTTGAAG-3'
sfGFP_D133TAGf	5'-GGCATCGATTTCAAAGAGTAGGGCAACATCCTGGG-3'
sfGFP_D133TAGr	5'-CCCAGGATGTTGCCCTACTCTTTGAAATCGATGCC-3'
sfGFP_K101TAGf	5'-GGACCATCAGCTTCTAGGACGACGGCACCTACAAGACC-3'
sfGFP_K101TAGr	5'-GGTCTTGTAGGTGCCGTCGTCCTAGAAGCTGATGGTCC-3'

【０３４９】

配列

配列番号１

ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAAT
TCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAA
TAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG
GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTA
AAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAA
GGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGC
GCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCT
CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCA

CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCCTCGTTCATTCACGTTTTTGAACCCGTGGAGGACGGGCAGACTCGCGG
TGCAAATGTGTTTTACAGCGTGATGGAGCAGATGAAGATGCTCGACACGCTGCAGAACACGCAGCTAGATTAACCCTAGA
AAGATAATCATATTGTGACGTACGTTAAAGATAATCATGCGTAAAATTGACGCATGTGTTTTATCGGTCTGTATATCGAG
GTTTATTTATTAATTTGAATAGATATTAAGTTTTATTATATTTACACTTACATACTAATAATAAATTCAACAAACAATTT
ATTTATGTTTATTTATTTATTAAAAAAAAACAAAAACTCAAAATTTCTTCTATAAAGTAACAAAACTTTTATGAGGGACA
GCCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCCGCTAGGGGGCAGCAGCGAGCCGCCCGGGGCTCCGCT
CCGGTCCGGCGCTCCCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTGGCACGGGATCG
CTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGGATACGGGGAAAAGGCCTCCAAGGCCACT
AGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATC
AGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATG
ATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTA
ATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATC
ATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAAC
GGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATC
GAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATT
ATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCC
TTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCC
GGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCC
TTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATA
ATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTC
AAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTC
CTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGAT
CTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGG
TAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTA
TTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATA
TGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGTAAGGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCA
GAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAG
TCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCA
CGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTG
AACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTA
GACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGT
TACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGACTACAAGGACGA
CGACGACAAGGACAAGAAGCCCCTGAACACCCTGATCAGCGCCACAGGACTGTGGATGTCCAGAACCGGCACCATCCACA
AGATCAAGCACCACGAGGTGTCCCGGTCCAAAATCTACATCGAGATGGCCTGCGGCGATCACCTGGTCGTCAACAACAGC
AGAAGCAGCCGGACAGCCAGAGCCCTGCGGCACCACAAGTACAGAAAGACCTGCAAGCGGTGCAGAGTGTCCGACGAGGA
CCTGAACAAGTTCCTGACCAAGGCCAACGAGGACCAGACCAGCGTGAAAGTGAAGGTGGTGTCCGCCCCCACCCGGACCA
AGAAAGCCATGCCCAAGAGCGTGGCCAGAGCCCCCAAGCCCCTGGAAAACACCGAAGCCGCTCAGGCCCAGCCCAGCGGC
AGCAAGTTCAGCCCCGCCATCCCCGTGTCTACCCAGGAAAGCGTCAGCGTCCCCGCCAGCGTGTCCACCAGCATCTCTAG
CATCTCAACCGGCGCCACAGCTTCTGCCCTGGTCAAGGGCAACACCAACCCCATCACCAGCATGTCTGCCCCTGTGCAGG
CCTCTGCCCCAGCCCTGACCAAGTCCCAGACCGACCGGCTGGAAGTGCTCCTGAACCCCAAGGACGAGATCAGCCTGAAC
AGCGGCAAGCCCTTCCGGGAGCTGGAAAGCGAGCTGCTGAGCCGGCGGAAGAAGGACCTCCAGCAAATCTACGCCGAGGA
ACGGGAGAACTACCTGGGCAAGCTGGAAAGAGAGATCACCCGGTTCTTCGTGGACCGGGGCTTCCTGGAAATCAAGAGCC
CCATCCTGATCCCCCTGGAGTACATCGAGCGGATGGGCATCGACAACGACACCGAGCTGAGCAAGCAGATTTTCCGGGTG
GACAAGAACTTCTGCCTGCGGCCCATGCTGGCCCCCAACCTGTACAACTACCTGCGGAAACTGGATCGCGCTCTGCCCGA
CCCCATCAAGATTTTCGAGATCGGCCCCTGCTACCGGAAAGAGAGCGACGGCAAAGAGCACCTGGAAGAGTTTACAATGC
TGAACTTTTGCCAGATGGGCAGCGGCTGCACCAGAGAGAACCTGGAATCCATCATCACCGACTTTCTGAACCACCTGGGG
ATCGACTTCAAGATCGTGGGCGACAGCTGCATGGTGTACGGCGACACCCTGGACGTGATGCACGGCGACCTGGAACTGTC
TAGCGCCGTCGTGGGACCCATCCCTCTGGACCGGGAGTGGGGCATCGATAAGCCCTGGATCGGAGCCGGCTTCGGCCTGG
AACGGCTGCTGAAAGTCAAGCACGACTTTAAGAACATCAAGCGGGCTGCCAGAAGCGAGAGCTACTACAACGGCATCAGC

ACCAACCTGTGATGATAAGGATCCAAAATGTACAGCGGCCGCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGA
AGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGC
CCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGA
ATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAAC
CCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTG
CCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCC
AGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAA
CGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATAATACCTCCGGAATGATTGAACAAGATG
GATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCT
GATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA
ACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTG
AAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAA
GTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACA
TCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCG
CGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGC
TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA
GGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTA
TCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGACAATCAACCTCTGGAT
TACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCC
TTTGTATCATGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAG
CATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGAATTGACTCAAATGA
TGTCAATTAGTCTATCAGAAGCTATCTGGTCTCCCTTCCGGGGGACAAGACATCCCTGTTTAATATTTAAACAGCAGTGT
TCCCAAACTGGGTTCTTATATCCCTTGCTCTGGTCAACCAGGTTGCAGGGTTTCCTGTCCTCACAGGAACGAAGTCCCTA
AAGAAACAGTGGCAGCCAGGTTTAGCCCCGGAATTGACTGGATTCCTTTTTTAGGGCCCATTGGTATGGCTTTTTCCCCG
TATCCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCGTTCAGAGGAAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCCGTGC
CCGGGCTGTCCCCGCACGCTGCCGGCTCGGGGATGCGGGGGGAGCGCCGGACCGGAGCGGAGCCCCGGGCGGCTCGCTGC
TGCCCCCTAGCGGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGGCTTTGGGGGGGGGCTGTCCCTGATATCTATAACAAGAAA
ATATATATATAATAAGTTATCACGTAAGTAGAACATGAAATAACAATATAATTATCGTATGAGTTAAATCTTAAAAGTCA
CGTAAAAGATAATCATGCGTCATTTTGACTCACGCGGTCGTTATAGTTCAAAATCAGTGACACTTACCGCATTGACAAGC
ACGCCTCACGGGAGCTCCAAGCGGCGACTGAGATGTCCTAAATGCACAGCGACGGATTCGCGCTATTTAGAAAGAGAGAG
CAATATTTCAAGAATGCATGCGTCAATTTTACGCAGACTATCTTTCTAGGGTTAATCTAGCTGCATCAGGATCATATCGT
CGGGTCTTTTTTCCGGCTCAGTCATCGCCCAAGCTGGCGCTATCTGGGCATCGGGGAGGAAGAAGCCCGTGCCTTTTCCC
GCGAGGTTGAAGCGGCATGGAAAGAGTTTGCCGAGGATGACTGCTGCTGCATTGACGTTGAGCGAAAACGCACGTTTACC
ATGATGATTCGGGAAGGTGTGGCCATGCACGCCTTTAACGGTGAACTGTTCGTTCAGGCCACCTGGGATACCAGTTCGTC
GCGGCTTTTCCGGACACAGTTCCGGATGGTCAGCCCGAAGCGCATCAGCAACCCGAACAATACCGGCGACAGCCGGAACT
GCCGTGCCGGTGTGCAGATTAATGACAGCGGTGCGGCGCTGGGATATTACGTCAGCGAGGACGGGTATCCTGGCTGGATG
CCGCAGAAATGGACATGGATACCCCGTGAGTTACCCGGCGGGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTC
GTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT
CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC
ACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTT

GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCC
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACC
GCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTG
CAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACG
ATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTA
AGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAAT
ACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAA
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
CAT

配列番号2

ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTTAAAAT
TCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAA
TAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG
GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTA
AAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAA
GGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGC
GCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCT
CTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCA
CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCCTCGTTCATTCACGTTTTTGAACCCGTGGAGGACGGGCAGACTCGCGG
TGCAAATGTGTTTTACAGCGTGATGGAGCAGATGAAGATGCTCGACACGCTGCAGAACACGCAGCTAGATTAACCCTAGA
AAGATAATCATATTGTGACGTACGTTAAAGATAATCATGCGTAAAATTGACGCATGTGTTTTATCGGTCTGTATATCGAG
GTTTATTTATTAATTTGAATAGATATTAAGTTTTATTATATTTACACTTACATACTAATAATAAATTCAACAAACAATTT
ATTTATGTTTATTTATTTATTAAAAAAAAACAAAAACTCAAAATTTCTTCTATAAAGTAACAAAACTTTTATGAGGGACA
GCCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCCGCTAGGGGGCAGCAGCGAGCCGCCCGGGGCTCCGCT
CCGGTCCGGCGCTCCCCCCGCATCCCCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTGGCACGGGATCG
CTTTCCTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGGATACGGGGAAAAGGCCTCCAAGGCCACT
AGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATC
AGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATG
ATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTA
ATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATC
ATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAAC
GGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATC
GAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATT
ATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCC
TTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCC
GGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCC
TTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATA
ATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTC
AAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTC
CTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAACCCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGAT
CTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGG
TAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTA
TTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATA
TGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGGAAAAACCGCACTTGTCCGGAAACCCCGGGAATCTAAC
CCGGCTGAACGGATTTAGAGTCCATTCGATCTACATGATCAGGTTTCCGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAG

CCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACTGCAAACTAC
CCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCACGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCTAATTATCTC
TCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTTCCTGCCCAACTAGTAAGGATC
TGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAA
TTGAACGGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGG
GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGCTG
AAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGT
TCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCC
TTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTAC
GTCTTTGTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACTCTAGAGCTAGCGAATTCGAA
TTTAAATCGGATCACCACCATGGTGTCCAAGGGCGAGGAACTGTTCACCGGCGTGGTGCCCATCCTGGTGGAACTGGATG
GCGACGTGAACGGCCACAAGTTCTCTGTGCGGGGAGAGGGCGAAGGCGACGCCACAAATGGCAAGCTGACCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCTACCCTCGTGACCACACTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCAG
ATACCCCGACCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCCGAGGGCTACGTGCAGGAACGGACCATCAGCT
TCAAGGACGACGGCACCTACAAGACCAGAGCCGAAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTCGTGAACCGGATCGAGCTGAAG
GGCATTGATTTCAAAGAGGACGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAACTTCAACAGCCACTAGGTGTACATCAC
CGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGGCACAACGTGGAAGATGGCAGCGTGCAGCTGGCCG
ACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGAGATGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGAGCGTG
CTGAGCAAGGACCCCAACGAGAAGCGGGACCACATGGTGCTGCTGGAATTCGTGACCGCCGCTGGCATCACCCACGGCAT
GGACGAGCTGTACAAGGGCAGCCACCATCACCATCACCATTGATAAGGATCCCAGTTACCATCGATGATCCGCGGCCGCG
CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGT
CTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACA
AACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTG
TATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTC
TCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTG
CACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAA
AAACACGATAATACCTCCGGAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATT
CGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTC
TTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACG
GGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCA
GGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTG
ATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTC
GATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGA
CGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA
TCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGC
GGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
TGACGAGTTCTTCTGAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC
AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCAT
CAATGTATCTTATCATGTCTGGAATTGACTCAAATGATGTCAATTAGTCTATCAGAAGCTATCTGGTCTCCCTTCCGGGG
GACAAGACATCCCTGTTTAATATTTAAACAGCAGTGTTCCCAAACTGGGTTCTTATATCCCTTGCTCTGGTCAACCAGGT
TGCAGGGTTTCCTGTCCTCACAGGAACGAAGTCCCTAAAGAAACAGTGGCAGCCAGGTTTAGCCCCGGAATTGACTGGAT
TCCTTTTTTAGGGCCCATTGGTATGGCTTTTTCCCCGTATCCCCCCAGGTGTCTGCAGGCTCAAAGAGCAGCGAGAAGCG
TTCAGAGGAAAGCGATCCCGTGCCACCTTCCCCGTGCCCGGGCTGTCCCCGCACGCTGCCGGCTCGGGGATGCGGGGGGA
GCGCCGGACCGGAGCGGAGCCCCGGGCGGCTCGCTGCTGCCCCCTAGCGGGGGAGGGACGTAATTACATCCCTGGGGGCT
TTGGGGGGGGGCTGTCCCTGATATCTATAACAAGAAAATATATATATAATAAGTTATCACGTAAGTAGAACATGAAATAA
CAATATAATTATCGTATGAGTTAAATCTTAAAAGTCACGTAAAAGATAATCATGCGTCATTTTGACTCACGCGGTCGTTA
TAGTTCAAAATCAGTGACACTTACCGCATTGACAAGCACGCCTCACGGGAGCTCCAAGCGGCGACTGAGATGTCCTAAAT
GCACAGCGACGGATTCGCGCTATTTAGAAAGAGAGAGCAATATTTCAAGAATGCATGCGTCAATTTTACGCAGACTATCT

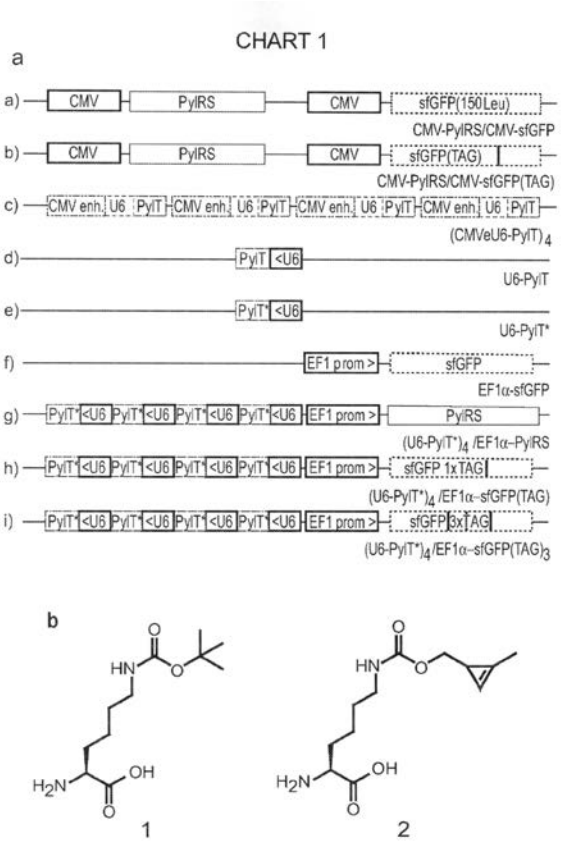
10 20 30 40 50

TTCTAGGGTTAATCTAGCTGCATCAGGATCATATCGTCGGGTCTTTTTTCCGGCTCAGTCATCGCCCAAGCTGGCGCTAT
CTGGGCATCGGGGAGGAAGAAGCCCGTGCCTTTTCCCGCGAGGTTGAAGCGGCATGGAAAGAGTTTGCCGAGGATGACTG
CTGCTGCATTGACGTTGAGCGAAAACGCACGTTTACCATGATGATTCGGGAAGGTGTGGCCATGCACGCCTTTAACGGTG
AACTGTTCGTTCAGGCCACCTGGGATACCAGTTCGTCGCGGCTTTTCCGGACACAGTTCCGGATGGTCAGCCCGAAGCGC
ATCAGCAACCCGAACAATACCGGCGACAGCCGGAACTGCCGTGCCGGTGTGCAGATTAATGACAGCGGTGCGGCGCTGGG
ATATTACGTCAGCGAGGACGGGTATCCTGGCTGGATGCCGCAGAAATGGACATGGATACCCCGTGAGTTACCCGGCGGGC
GCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCG
GAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTC
CAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTC
TTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAA
AAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTA
AATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGA
GGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG
AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
AGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGT
CGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCA
TAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC
ATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
TGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA
AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT

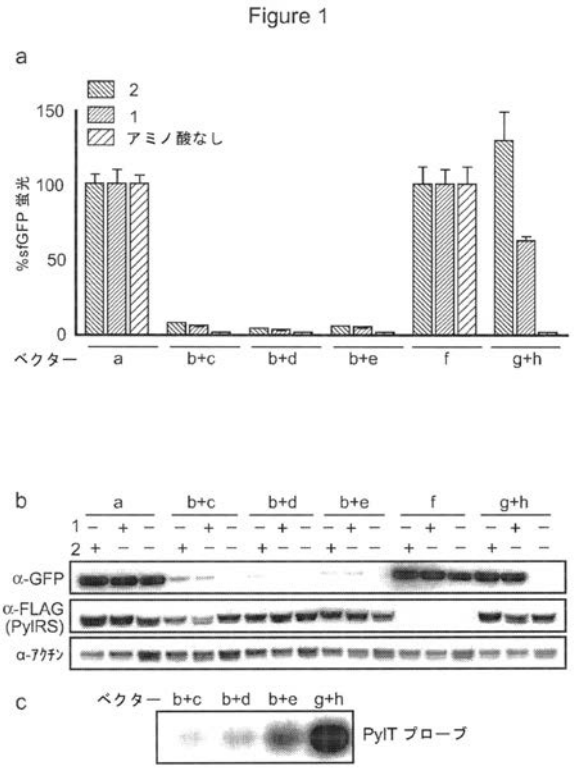
配列番号3

ATGGCCGATGATCCAAGCGCCGCAGACCGCAATGTTGAGATCTGGAAGATAAAAAAGCTGATAAAGAGCTTGGAGGCCGC
ACGGGGCAACGGCACGTCCATGATATCCCTCATTATCCCACCAAAGGATCAGATCAGCCGTGTGGCGAAGATGTTGGCGG
ATGAGTTCGGAACGGCCAGTAACATTAAAAGTCGCGTGAACCGGCTGTCGGTCTTGGGCGCCATCACTTCCGTGCAGCAA
CGTCTGAAACTGTACAACAAAGTCCCACCCAACGGTTTGGTCGTCTACTGCGGTACGATAGTTACCGAGGAAGGAAAGGA
GAAGAAAGTGAATATTGATTTCGAACCATTTAAACCGATAAACACTAGCTTGTACTTGTGCGACAATAAGTTTCATACAG
AGGCACTCACGGCCCTGCTGAGCGACGACTCGAAATTCGGATTCATTGTCATTGATGGAAGTGGAGCGCTGTTCGGCACG
CTGCAGGGTAACACGCGCGAGGTCTTGCACAAATTCACCGTGGACTTGCCCAAAAAGCATGGCCGTGGTGGCCAGAGCGC
CCTCAGGTTTGCGCGGCTGCGCATGGAGAAGCGCCATAACTACGTGCGCAAGGTCGCAGAGACGGCTGTGCAGCTGTTCA
TCTCGGGTGATAAGGTAAATGTCGCGGGACTGGTGCTCGCCGGCAGCGCGGACTTCAAAACCGAGCTGAGTCAGTCCGAC
ATGTTCGATCAGCGTCTGCAGTCGAAGGTACTGAAGCTCGTCGACATTAGCTACGGCGGCGAGAACGGCTTCAATCAGGC
CATCGAACTGAGTACCGAAGTCCTCAGTAACGTAAAGTTTATTCAGGAAAAAAAGTTGATTGGACGCTACTTTGATGAAA
TAAGCCAAGATACGGGCAAATACTGTTTTGGCGTCGAGGATACTCTGAAAGCGCTCGAGATGGGAGCAGTGGAAATACTC
ATCGTATATGAAAATCTCGATATAATGCGCTATGTACTGCATTGCCAAGGAACAGAAGAGGAGAAAATTCTCTACCTCAC
CCCGGAGCAAGAGAAGGACAAGAGCCATTTTACAGACAAGGAGACGGGCCAAGAGCACGAGCTCATTGAGTCGATGCCCT
TGCTCGAATGGTTTGCCAACAACTACAAGAAGTTCGGCGCGACCCTGGAAATTGTCACGGATAAATCGCAGGAGGGCAGC
CAGTTTGTGAAGGGCTTCGGTGGCATCGGCGGCATCCTCCGCTACCGGGTGGATTTCCAAGGCATGGAATATCAAGGTGG
AGATGATGAATTCTTCGATTTGGATGATTACTAATGATAG

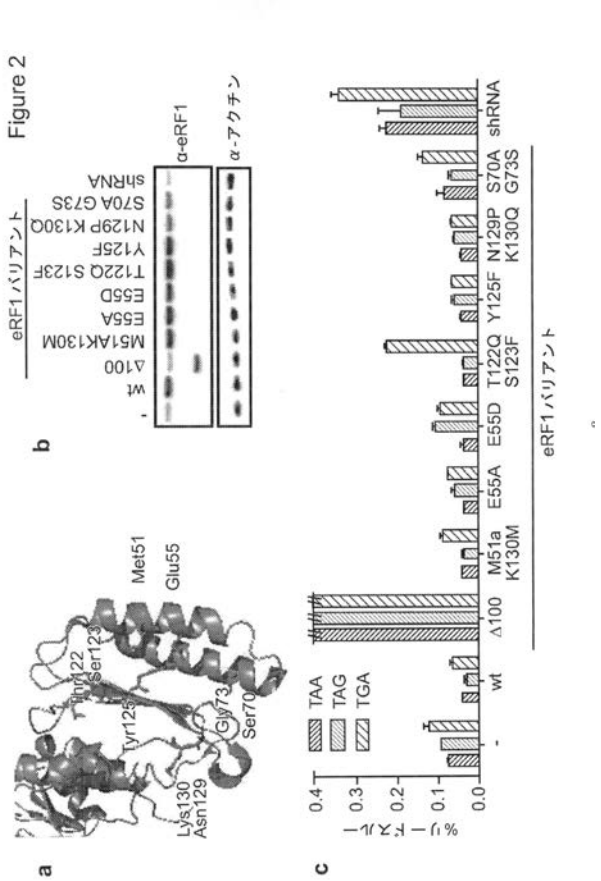
【図１－０】



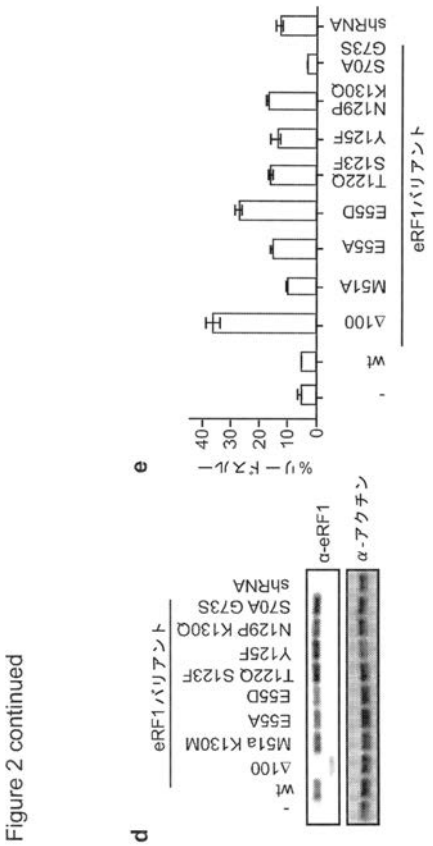
【図１】



【図２－１】

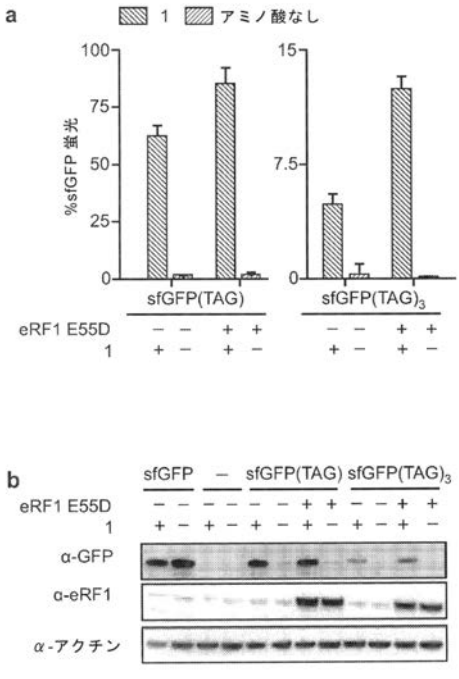


【図２－２】



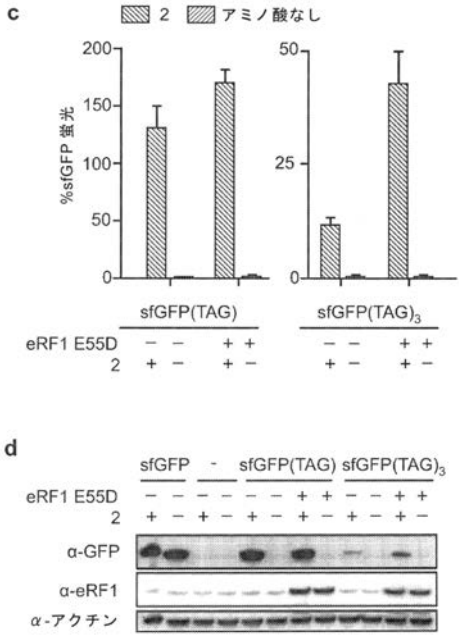
【図３－１】

Figure 3



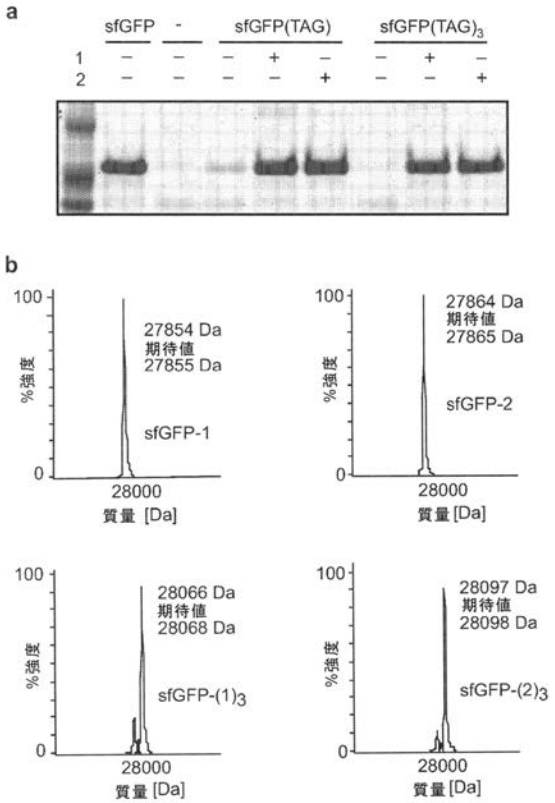
【図３－２】

Figure 3 continued



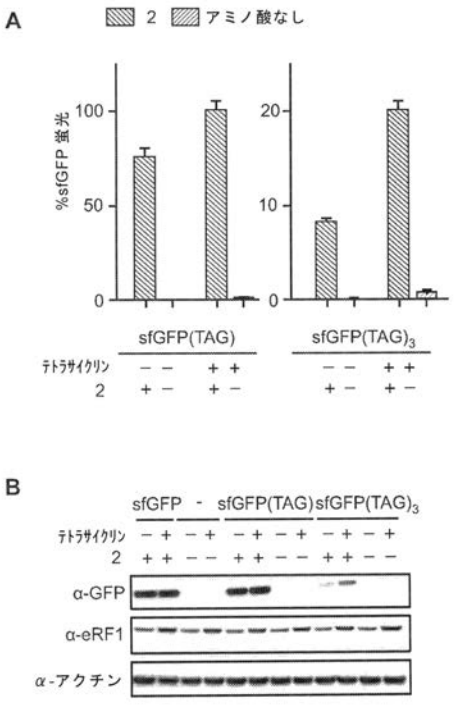
【図４】

Figure 4



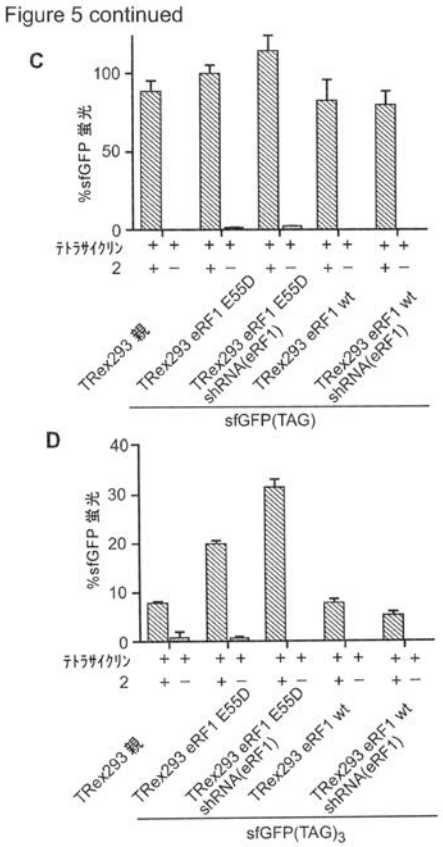
【図５－１】

Figure 5



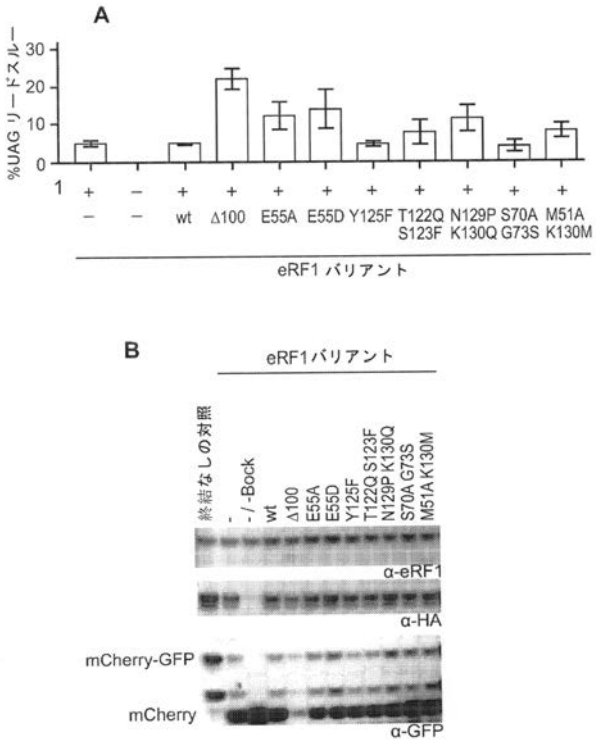
【図５－２】

Figure 5 continued



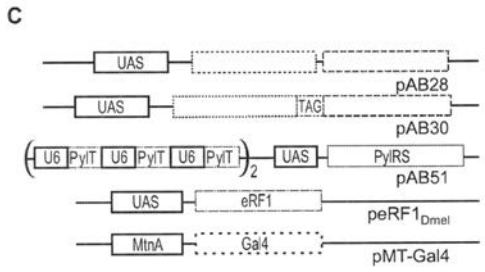
【図６－１】

Figure 6



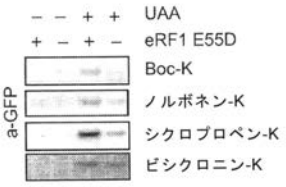
【図６－２】

Figure 6 continued



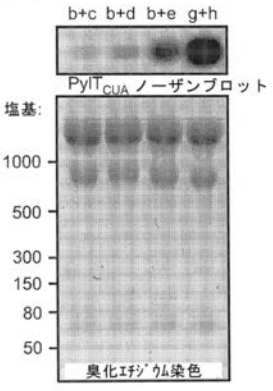
【図７】

Figure 7



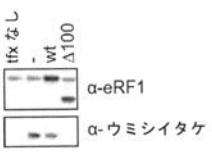
【図８】

Figure 8 (補足の図 1)



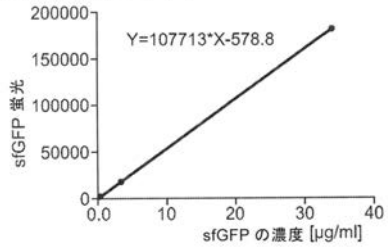
【図９】

Figure 9 (補足の図 2)



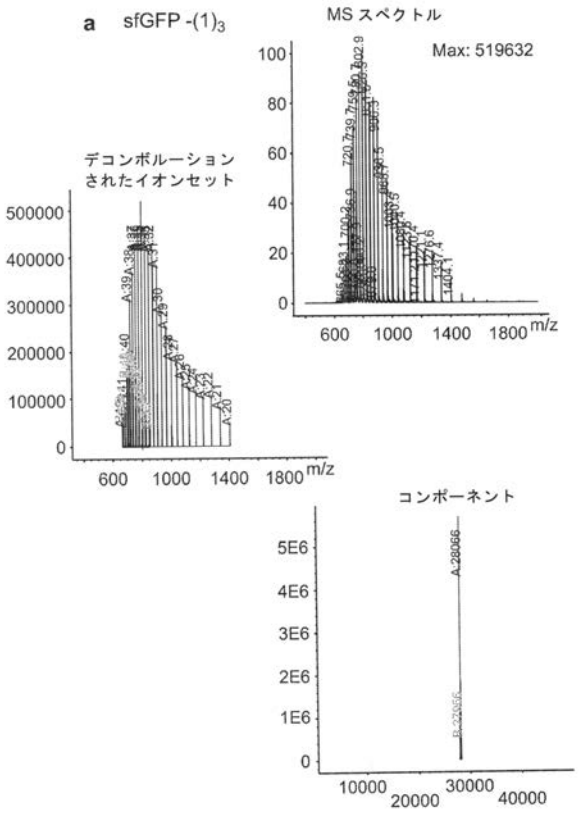
【図１０】

Figure 10 (補足の図 3)



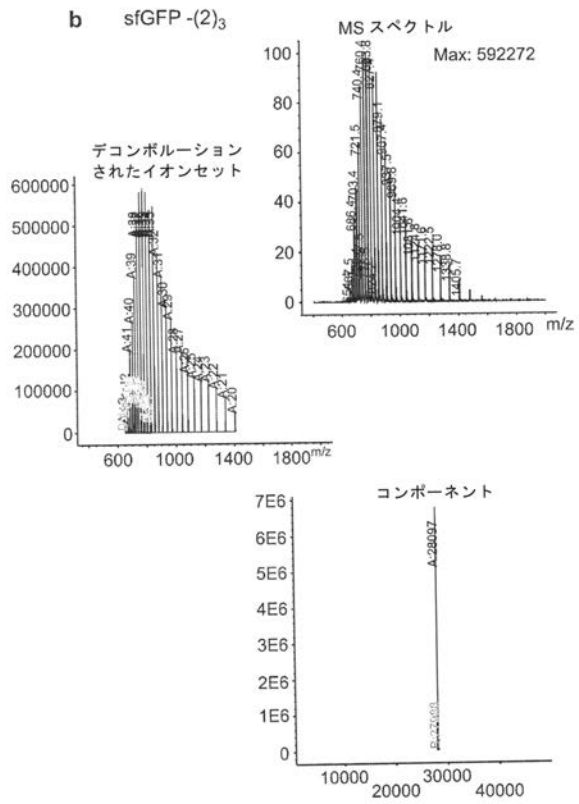
【図１１－１】

Figure 11 (補足の図 4)



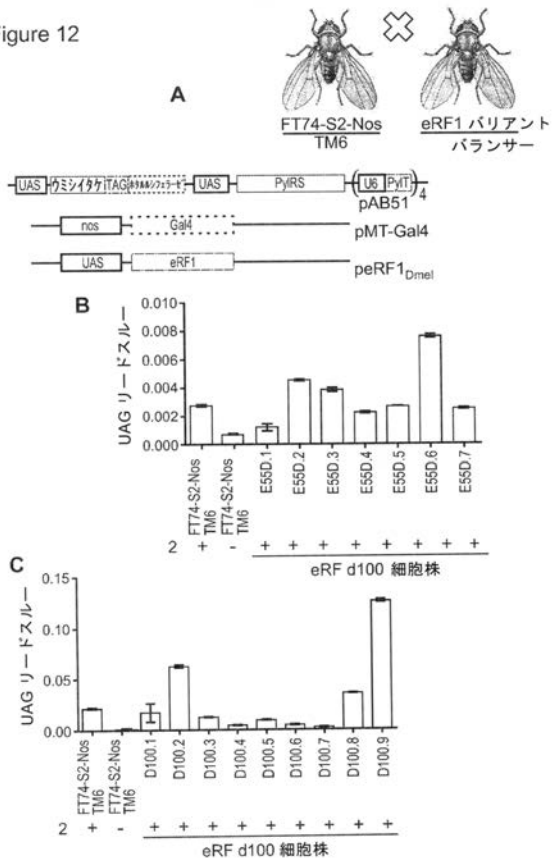
【図１１－２】

Figure 11 (補足の図 4) continued



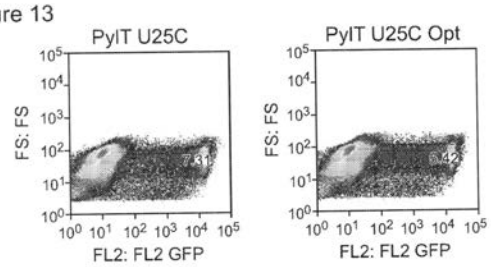
【図１２】

Figure 12



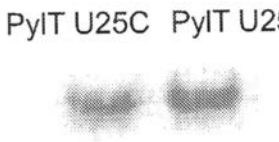
【図１３】

Figure 13



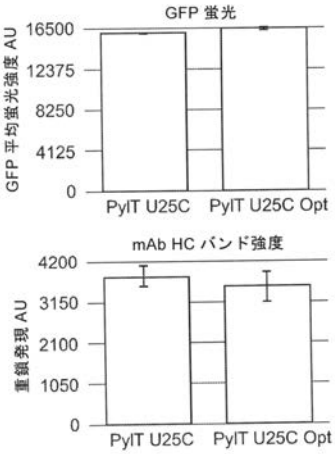
【図１４】

Figure 14



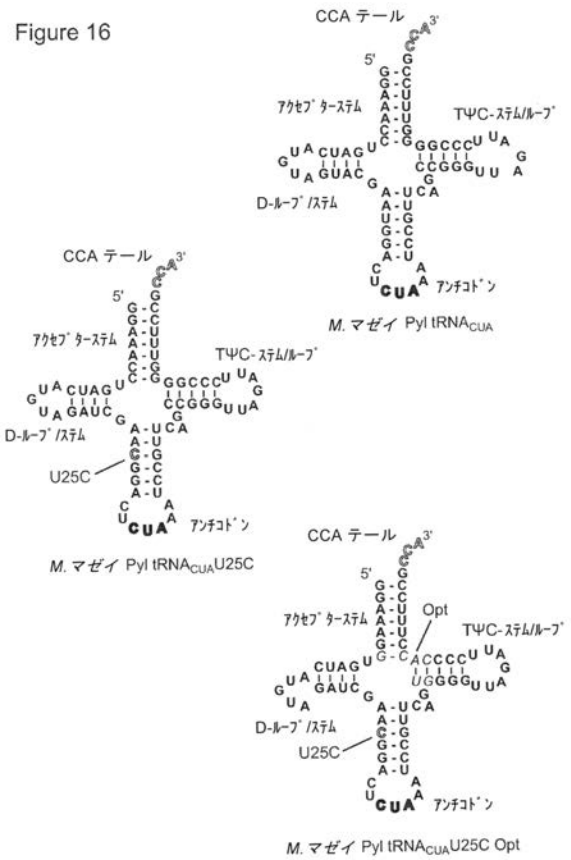
【図１５】

Figure 15



【図１６】

Figure 16



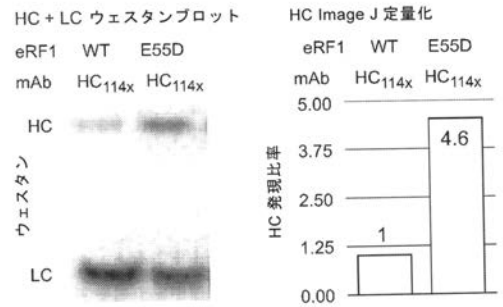
【図１７】

Figure 17



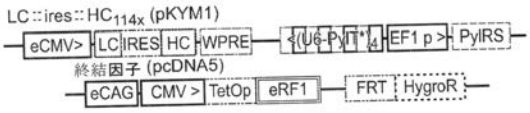
【図１８】

Figure 18



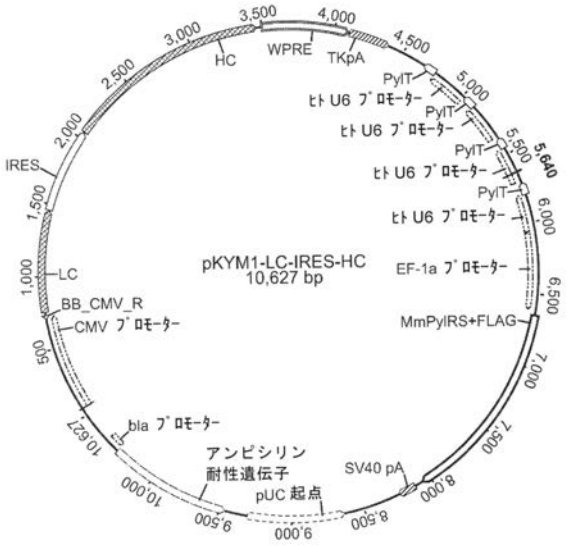
【図１９】

Figure 19



【図２０】

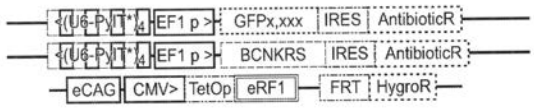
Figure 20



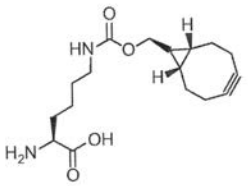
【図２１－１】

Figure 21

(A)



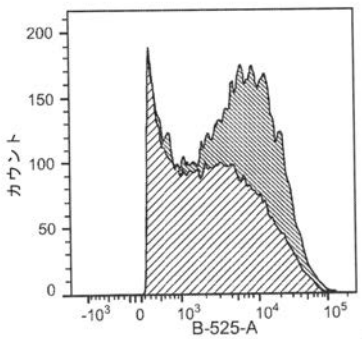
(B)



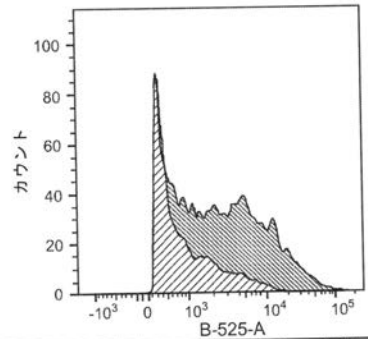
【図２１－２】

Figure 21 continued

(C)



	試料名	サブセット名	カウント
▨	HEK293_04_VB8_1_GFP150TAG_wtRF.fcs	Q2:B-525-A+,FSC-A+	19898
▨	HEK293_05_VB8_1_GFP150TAG_E55D.fcs	Q2:B-525-A+,FSC-A+	18872



	試料名	サブセット名	カウント
▨	HEK293_10_b_VB8_1_GFP3xTAG_wtRF.fcs	Q2:B-525-A+,FSC-A+	3188
▨	HEK293_11_b_VB8_1_GFP3xTAG_E55D.fcs	Q2:B-525-A+,FSC-A+	4743

【配列表】
2017532043000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年8月26日(2016.8.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下のステップを含む、真核細胞において非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むための方法。
ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、前記所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列、及びミュータントｅＲＦ１を発現する真核細胞を用意するステップであって、前記ミュータントｅＲＦ１が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０
（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｙ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｍ５１、Ｋ１３０
（viii）Ｓ７０、Ｇ７３
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含み、前記所望の核酸配列が、非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、ステップ；
ii）前記真核細胞を、前記所望の核酸配列によってコードされるタンパク質に組み込まれる非天然アミノ酸の存在下でインキュベートするステップであって、前記非天然アミノ酸が、前記直交性ｔＲＮＡシンテターゼの基質である、ステップ；並びに
iii）前記真核細胞を、前記直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアにより前記非天然アミノ酸を前記所望のタンパク質に組み込まれるように、インキュベートするステップ；
【請求項２】
真核細胞において、非天然アミノ酸を所望のタンパク質に組み込むためのミュータントｅＲＦ１の使用であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０
（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｙ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｍ５１、Ｋ１３０

（viii）Ｓ７０、Ｇ７３
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、前記使用。
【請求項３】
所望のポリペプチドをコードする核酸の翻訳による、前記所望のポリペプチドへの非天然アミノ酸の組み込みの補助における使用のためのミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸であって、前記ミュータントｅＲＦ１が、他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、前記ミュータントｅＲＦ１が、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、前記ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０
（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｙ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｍ５１、Ｋ１３０
（viii）Ｓ７０、Ｇ７３
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含み、前記核酸が、前記所望のポリペプチドへの前記非天然アミノ酸の組み込みを指示する直交性コドンを含む、前記ミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、又はそれをコードする核酸。
【請求項４】
請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド又は核酸を含む真核生物宿主細胞。
【請求項５】
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０
（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｙ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｍ５１、Ｋ１３０
（viii）Ｓ７０、Ｇ７３
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、ミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列
を含む真核生物宿主細胞。
【請求項６】
（ｉ）直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペア、及び
（ii）他の終止コドンのリードスルーを実質的に増加させることなく、１個又は２個以上の終止コドンに応答した非天然アミノ酸の組み込みを増加させ、配列番号４のヒト野生型ｅＲＦ１配列と少なくとも６０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、
（ｉ）Ｅ５５
（ii）Ｎ１２９、Ｋ１３０

（iii）Ｔ１２２、Ｓ１２３
（iv）Ｙ１２５
（ｖ）Ｔ５８、Ｓ６０、Ｓ６４、Ｙ１２５、Ｎ１２９
（vi）Ｓ１２３、Ｌ１２４、Ｙ１２５
（vii）Ｍ５１、Ｋ１３０
（viii）Ｓ７０、Ｇ７３
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、ミュータントｅＲＦ１、及び任意で、
（iii）非天然アミノ酸の組み込みのための位置に前記ｔＲＮＡによって認識されるコドンを含む、所望のタンパク質をコードする所望の核酸配列
をコードする核酸を含む組み合わせ又はキット。
【請求項７】
ＢｏｃＫ又はＣｙｐＫ又はＢＣＮＫなどの非天然アミノ酸をさらに含む、請求項５に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項８】
ミュータントｅＲＦ１が、野生型ｅＲＦ１対照と比較して、非天然アミノ酸の組み込みの効率の増加をもたらす、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項９】
ミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５Ｄ
（ii）Ｎ１２９Ｐ、Ｋ１３０Ｑ
（iii）Ｔ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆ
（iv）Ｅ５５Ａ
（ｖ）Ｙ１２５Ｆ
（vi）Ｔ５８Ｋ、Ｓ６０Ｔ、Ｓ６４Ｄ、Ｙ１２５Ｆ、Ｎ１２９Ｓ
（vii）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｉ、Ｙ１２５Ｌ
（viii）Ｓ１２３Ｒ、Ｌ１２４Ｗ、Ｙ１２５Ｒ
（ix）Ｓ１２３Ｈ、Ｌ１２４Ａ、Ｙ１２５Ｇ
（ｘ）Ｍ５１Ａ、Ｋ１３０Ｍ
（xi）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｌ、Ｙ１２５Ｖ
（xii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｃ、Ｙ１２５Ｓ
（xiii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｓ、Ｙ１２５Ｓ
（xiv）Ｓ１２３Ｖ、Ｌ１２４Ｔ、Ｙ１２５Ｐ
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。
【請求項１０】
終止コドンがＴＡＧ（アンバー）であり、かつミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｅ５５Ｄ
（ii）Ｎ１２９Ｐ、Ｋ１３０Ｑ
（iii）Ｅ５５Ａ
（iv）Ｙ１２５Ｆ
（ｖ）Ｔ５８Ｋ、Ｓ６０Ｔ、Ｓ６４Ｄ、Ｙ１２５Ｆ、Ｎ１２９Ｓ
（vi）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｉ、Ｙ１２５Ｌ
（vii）Ｓ１２３Ｒ、Ｌ１２４Ｗ、Ｙ１２５Ｒ
（viii）Ｓ１２３Ｈ、Ｌ１２４Ａ、Ｙ１２５Ｇ
（ix）Ｍ５１Ａ、Ｋ１３０Ｍ

（ｘ）Ｓ１２３Ａ、Ｌ１２４Ｌ、Ｙ１２５Ｖ
（xi）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｃ、Ｙ１２５Ｓ
（xii）Ｓ１２３Ｌ、Ｌ１２４Ｓ、Ｙ１２５Ｓ
（xiii）Ｓ１２３Ｖ、Ｌ１２４Ｔ、Ｙ１２５Ｐ
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。

【請求項１１】

終止コドンがＴＧＡ（オパール）であり、かつミュータントｅＲＦ１が、
（ｉ）Ｔ１２２Ｑ、Ｓ１２３Ｆ
（ii）Ｓ７０Ａ、Ｇ７３Ｓ
からなる群から選択される、配列番号４に対する変異又は変異の組み合わせを含む、請求項１に記載の方法、請求項２に記載の使用、請求項３に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、若しくは７に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６に記載の組み合わせ若しくはキット。

【請求項１２】

真核細胞が哺乳類細胞又は昆虫細胞である、請求項１、８、９、１０、若しくは１１に記載の方法、請求項２、８、９、１０、若しくは１１に記載の使用、請求項３、８、９、１０、若しくは１１に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、１０、若しくは１１に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、１０、若しくは１１に記載の組み合わせ若しくはキット。

【請求項１３】

コドンが終止コドンであり、任意で前記終止コドンがＵＡＧである、請求項１、８、９、１０、若しくは１１に記載の方法、請求項２、８、９、１０、若しくは１１に記載の使用、請求項３、８、９、１０、若しくは１１に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、１０、若しくは１１に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、１０、若しくは１１に記載の組み合わせ若しくはキット。

【請求項１４】

直交性ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡのペアが、ピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ＰｙｌＴ $tRNA_{CUA}$ のペアを含む、請求項１、８、９、１０、若しくは１１に記載の方法、請求項２、８、９、１０、若しくは１１に記載の使用、請求項３、８、９、１０、若しくは１１に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、１０、若しくは１１に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、１０、若しくは１１に記載の組み合わせ若しくはキット。

【請求項１５】

ｔＲＮＡが、
（ｉ）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃバリアント、又は
（ii）ＰｙｌＴのＯｐｔバリアント、又は
（iii）ＰｙｌＴのＵ２５Ｃ－Ｏｐｔバリアント
である、請求項１、８、９、１０、若しくは１１に記載の方法、請求項２、８、９、１０、若しくは１１に記載の使用、請求項３、８、９、１０、若しくは１１に記載のミュータントｅＲＦ１ポリペプチド、請求項４、５、７、８、９、１０、若しくは１１に記載の真核生物宿主細胞、又は請求項６、８、９、１０、若しくは１１に記載の組み合わせ若しくはキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/053141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P21/02 C12N15/67
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)
C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/077186 A1 (SKACH WILLIAM [US] ET AL) 29 March 2012 (2012-03-29) paragraphs [0008], [-0012]; claims 1-20	1-14
Y	ILEGEMS E ET AL: "Downregulation of eRF1 by RNA interference increases mis-acylated tRNA suppression efficiency in human cells", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 17, no. 12, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 821-827, XP003016883, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZH096 page 825, column 2, last paragraph - page 827, column 1, paragraph 4	1-14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
2 February 2016	02/03/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seroz, Thierry

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/053141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOLOSOV PETR ET AL: "Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1", 2005, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, VOL. 33, NR. 19, PAGE(S) 6418-6425, XP002753738, ISSN: 0305-1048 abstract; page 6420, column 2, last paragraph - page 6421, column 2, paragraph 3 -----	1-14
Y	BULYGIN KONSTANTIN N ET AL: "Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome", RNA (COLD SPRING HARBOR), vol. 16, no. 10, October 2010 (2010-10), pages 1902-1914, XP002753739, ISSN: 1355-8382 the whole document -----	1-14
Y	SEIT-NEBI ALIM ET AL: "Conversion of omnipotent translation termination factor eRF1 into ciliate-like UGA-only unipotent eRF1.", September 2002 (2002-09), EMBO REPORTS, VOL. 3, NR. 9, PAGE(S) 881-886, XP002753740, ISSN: 1469-221X page 882, column 2, paragraph 4 -----	1-14
Y	KRYUCHKOVA POLINA ET AL: "Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 41, no. 8, April 2013 (2013-04), pages 4573-4586, XP002753741, page 4574, column 1, paragraph 2 page 4576, column 1, last paragraph - page 4576, column 2, paragraph 1 page 4578, column 1, paragraph 4-7 -----	1-14
Y	LEKOMTSEV SERGEY ET AL: "Different modes of stop codon restriction by the stylonychia and paramecium eRF1 translation termination factors", June 2007 (2007-06), PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, VOL. 104, NR. 26, PAGE(S) 10824-10829, XP002753742, ISSN: 0027-8424 abstract; page 10825, column 2, paragraph 2 page 10828, column 1, paragraph 5 ----- -/--	1-14

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/053141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WOLFGANG H. SCHMIED ET AL: "Efficient Multisite Unnatural Amino Acid Incorporation in Mammalian Cells via Optimized Pyrrolysyl tRNA Synthetase/tRNA Expression and Engineered eRF1", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 136, no. 44, 28 October 2014 (2014-10-28), pages 15577-15583, XP55188529, US ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja5069728 the whole document	1-14
A	CHIN JASON W: "Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals.", ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY 2014, vol. 83, 10 February 2014 (2014-02-10), pages 379-408, XP002753743, ISSN: 1545-4509 the whole document	1-14
A	THOMAS S ELLIOTT ET AL: "Proteome labeling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 5, 13 April 2014 (2014-04-13) , pages 465-472, XP55188555, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2860 the whole document	1-14
A	WO 2006/110182 A2 (SCRIPPS RESEARCH INST [US]; SCHULTZ PETER [US]; ALFONTA LITAL [US]; CH) 19 October 2006 (2006-10-19) the whole document	1-14

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2015/053141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012077186 A1	29-03-2012	NONE	
WO 2006110182 A2	19-10-2006	AU 2005330514 A1	19-10-2006
		BR PI0517381 A	07-10-2008
		CA 2583735 A1	19-10-2006
		CN 101048506 A	03-10-2007
		CN 102827827 A	19-12-2012
		EP 1807515 A2	18-07-2007
		EP 2380982 A1	26-10-2011
		EP 2383340 A2	02-11-2011
		JP 5135504 B2	06-02-2013
		JP 5539948 B2	02-07-2014
		JP 2008517631 A	29-05-2008
		JP 2012254073 A	27-12-2012
		US 2008233611 A1	25-09-2008
		US 2013244245 A1	19-09-2013
		WO 2006110182 A2	19-10-2006

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,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,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(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 100188352
弁理士 松田 一弘
(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(74)代理人 100145920
弁理士 森川 聡
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 チン ジェイソン ダブリュー.
イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバイオメディカルキャンパス フランシスクリックアベニュー 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 シュミート ウルフガング エイチ.
イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバイオメディカルキャンパス フランシスクリックアベニュー 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 エルサッサー シモン ジェイ.
イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバイオメディカルキャンパス フランシスクリックアベニュー 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 キム ユージーン ワイ.
イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバイオメディカルキャンパス フランシスクリックアベニュー 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

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 CA06 CA09 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA72X AA86X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44