(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年5月27日(27.05.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
**WO 2021/100833 A1**

(51) 国際特許分類:
*C07K 1/00* (2006.01)
*C07K 7/00* (2006.01)
*C40B 40/08* (2006.01)
*C40B 40/10* (2006.01)
*C12M 1/00* (2006.01)
*C12N 15/11* (2006.01)
*C12P 21/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/043289
(22) 国際出願日： 2020年11月19日(19.11.2020)
(25) 国際出願の言語： 日本語
(26) 国際公開の言語： 日本語
(30) 優先権データ：
特願 2019-209114 2019年11月19日(19.11.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (**THE UNIVERSITY OF TOKYO**) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 Tokyo (JP).

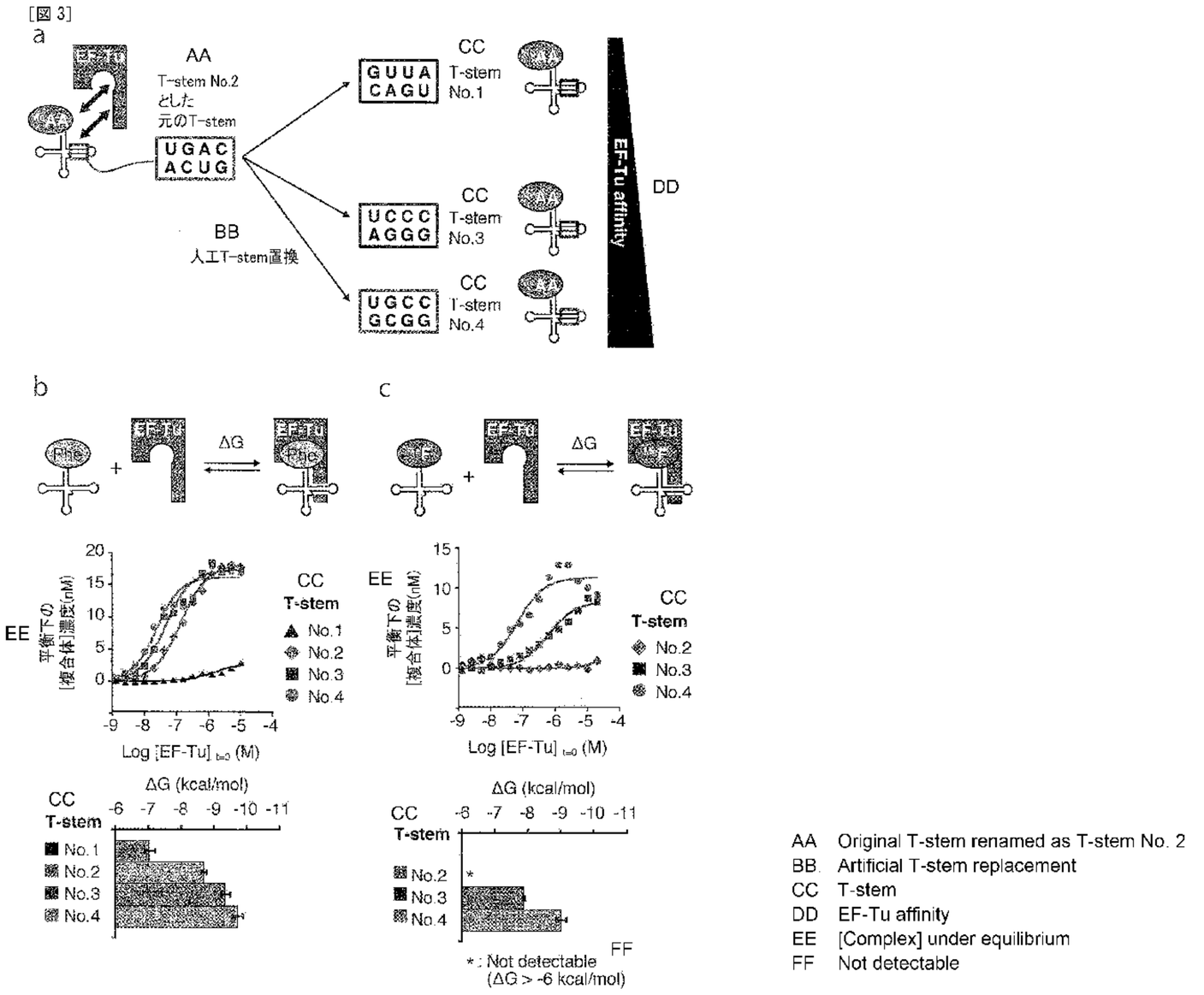
(72) 発明者: 菅 裕明(**SUGA, Hiroaki**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 加藤 敬行(**KATOH, Takayuki**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 岩根 由彦(**IWANE, Yoshihiko**); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目３番１号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(**INABA, Yoshiyuki** et al.); 〒1066123 東京都港区六本木６－１０－１ 六本木ヒルズ森タワー２３階 ＴＭＩ総合法律事務所 Tokyo (JP).

(54) **Title:** MODIFICATION OF TRNA T-STEM FOR ENHANCING N-METHYL AMINO ACID INCORPORATION

(54) 発明の名称： Ｎ－メチルアミノ酸の取り込みを増強するｔＲＮＡのＴステムの改変

[図 3]




(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of developing a method for synthesizing a novel peptide which can co-incorporate a plurality of different N-methyl amino acids and discover a highly N-methylated peptide having improved membrane-permeability and stability to proteolysis. The present invention provides tRNA that encodes N-methyl amino acids and has a T-stem in which $N_1N_2GGN_3$ pairs with $N_4CCN_5U$ ($N_1$ is G or A, one among $N_2$ and $N_4$ is G and the other is C, and $N_3$ and $N_4$ are any pairing amino acids).

[続葉有]

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約:本発明の解決しようとする課題は、改良された膜透過性およびタンパク質分解に対する安定性を有する高次にＮ－メチル化されたペプチドを発見することを可能にする、複数の異なるＮ－メチルアミノ酸の同時取込みを可能にする新規なペプチドの合成方法を開発することである。本発明は、$N_1N_2$Ｇ Ｇ $N_3$及び$N_4$Ｃ Ｃ $N_5$Ｕが対合するＴステムを有する、Ｎ－メチルアミノ酸をコードするｔＲＮＡ(($N_1$はＧ又はＡであり、$N_2$及び$N_4$は一方がＧであり、他方がＣであり、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸である。)を提供する。

# 明　細　書

## 発明の名称 ：

## Ｎ－メチルアミノ酸の取り込みを増強するｔＲＮＡのＴステムの改変

## 技術分野

[0001]　本発明は、Ｎ－メチルアミノ酸の取り込みを増強するｔＲＮＡのＴステムの改変に関する。

## 背景技術

[0002]　中分子としてのペプチドは、大きな表面認識特性（非特許文献１－３）を有する標的タンパク質に対して高い親和性と選択性を有するため、新しい薬物足場として大きな注目を集めている。中でも、天然に存在する生理活性ペプチドは、しばしば複数の主鎖Ｎ－メチル修飾を有し、このようなＮ－メチル化は、ペプチド分子上の膜透過性およびプロテアーゼ耐性を増加させることが明らかにされている（非特許文献１－１１）。

このような理想的な薬物動態特性を有する新規なペプチドベースの薬物を発見するために、薬物動態特性をさらに改善するために、豊富な多様な異なるＮ－メチルアミノ酸（$^{Me}$ＡＡ）を含む非標準ペプチドライブラリを開発するのことは理想的である。

しかしながら、$^{Me}$ＡＡが翻訳機構のための基質として最適ではないという実際的な障害があり、翻訳の早期終結が起こり得るか、あるいは不正確なアミノ酸が所望の$^{Me}$ＡＡの代わりに誤って取り込まれ得るため、Ｎ－メチル化ペプチド合成の取り込み効率及び精度が低下する（非特許文献１２－１４）。非特許文献１４には、１９の$^{Me}$ＡＡのうち、５つの$^{Me}$ＡＡのみが効率的な取込み効率（＞８０％がタンパク質性アミノ酸（ｐＡＡ）対照）を示し、６つの$^{Me}$ＡＡが中等度（１０～８０％）であり、他の８つの$^{Me}$ＡＡは貧弱で検出不能（＜１０％）であることが開示されている。

モデルペプチドへの単一の$^{Me}$ＡＡの取込み効率を改善するためのいくつかの工夫が報告されているが（非特許文献１２、１５及び１６）、複数の異なる$^{Me}$

ＡＡを同じペプチドに同時に取り込むことは依然として困難である。

## 先行技術文献

## 非特許文献

[0003] 非特許文献1：Passioura, T., Katoh, T., Goto, Y. & Suga, H. Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides. Annu. Rev. Biochem. 83, 727-752, doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035456 (2014).

非特許文献2：Driggers, E. M., Hale, S. P., Lee, J. & Terrett, N. K. The exploration of macrocycles for drug discovery-an underexploited structural class. Nat. Rev. Drug Discov. 7, 608-624, doi:10.1038/nrd2590 (2008).

非特許文献3：Koehn, F. E. & Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 4, 206-220, doi:10.1038/nrd1657 (2005).

非特許文献4：Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. & Speicher, D. W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science 226, 544-547 (1984).

非特許文献5：Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Is the Cyclosporin-a-Binding Protein Cyclophilin. Nature 337, 473-475, doi:DOI 10.1038/337473a0 (1989).

非特許文献6：Walsh, C. T., Zydowsky, L. D. & McKeon, F. D. Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. J. Biol. Chem. 267, 13115-13118 (1992).

非特許文献7：Altschuh, D., Vix, O., Rees, B. & Thierry, J. C. A conformation of cyclosporin A in aqueous environment revealed by the X-ray structure of a cyclosporin-Fab complex. Science 256, 92-94 (1992).

非特許文献8：Conradi, R. A., Hilgers, A. R., Ho, N. F. & Burton, P. S. The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells

. II. Peptide bond modification which results in improved permeabilit y. Pharm. Res. 9, 435-439 (1992).

非特許文献9：Haviv, F. et al. Effect of N-methyl substitution of the peptide bonds in luteinizing hormone-releasing hormone agonists. J. M ed. Chem. 36, 363-369 (1993).

非特許文献10：Chikhale, E. G., Ng, K. Y., Burton, P. S. & Borchardt, R. T. Hydrogen bonding potential as a determinant of the in vitro and in situ blood-brain barrier permeability of peptides. Pharm. Res. 11 , 412-419 (1994).

非特許文献11：Miller, S. M. et al. Comparison of the Proteolytic Susc eptibilities of Homologous L-Amino-Acid, D-Amino-Acid, and N-Substitu ted Glycine Peptide and Peptoid Oligomers. Drug Dev. Res. 35, 20-32, doi:DOI 10.1002/ddr.430350105 (1995).

非特許文献12：Roberts, R. W. & Szostak, J. W. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 1229 7-12302 (1997).

非特許文献13：Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H. & Suga, H. A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis . Nat. Methods 3, 357-359, doi:10.1038/nmeth877 (2006).

非特許文献14：Ohta, A., Murakami, H., Higashimura, E. & Suga, H. Synt hesis of polyester by means of genetic code reprogramming. Chem. Biol . 14, 1315-1322, doi:10.1016/j.chembiol.2007.10.015 (2007).

非特許文献15：Goto, Y. et al. Reprogramming the translation initiatio n for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides. ACS ch emical biology 3, 120-129, doi:10.1021/cb700233t (2008).

非特許文献16：Goto, Y., Murakami, H. & Suga, H. Initiating translatio n with D-amino acids. RNA 14, 1390-1398, doi:10.1261/rna.1020708 (200

8).

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明が解決しようとする課題は、改良された膜透過性およびタンパク質分解に対する安定性を有する高次にＮ－メチル化されたペプチドを発見することを可能にする、複数の異なるＮ－メチルアミノ酸の同時取込みを可能にする新規なペプチドの合成方法を開発することである。

## 課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、鋭意検討した結果、アミノアシルｔＲＮＡのＴステムに着目し、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

[0006] 本発明は以下のとおりである。

（１）

$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有する、Ｎ－メチルアミノ酸をコードするｔＲＮＡ。

（$N_1$はＧ又はＡであり、$N_2$及び$N_5$は一方がＧであり、他方がＣであり、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸である。）

（２）

（１）に記載のｔＲＮＡ及びＥＦ－Ｔｕタンパク質を含む、翻訳系。

（３）

（１）に記載のｔＲＮＡ又は（２）に記載の翻訳系を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドライブラリの製造方法。

（４）

（１）に記載のｔＲＮＡ又は（３）に記載の翻訳系を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドとペプチドをコードするｍＲＮＡとの複合体ライブラリの製造方法。

（５）

（１）に記載のｔＲＮＡ又は（２）に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前に$N_1N_2$

ＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＮ$_5$Ｕが対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、Ｎ$_1$Ｎ$_2$ＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＮ$_5$Ｕが対合するＴステムを有する以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、（３）又は（４）に記載の製造方法。

（６）

（１）に記載のｔＲＮＡ又は（２）に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前にＡＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＣＵが対合するＴステムを有するｔＲＮＡ並びにＧＣＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＧＵが対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、（５）に記載の製造方法。

（７）

（１）に記載のｔＲＮＡ又は（２）に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前にＡＧＧＧ（Ｎ$_4$）$_m$ＣＣＣＣＵ（配列番号１）を有するｔＲＮＡ及びＧＣＧＧＧ（Ｎ$_4$）$_m$ＣＣＣＧＵ（配列番号２）を有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、（５）に記載の製造方法。

（８）

Ｎ－メチルアミノ酸をチャージしたｔＲＮＡとＥＦ－Ｔｕとの親和性として、ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ）が－７．５～－１０となるｔＲＮＡを選択して、Ｎ－メチルアミノ酸をｔＲＮＡにチャージする、（３）～（８）に記載の製造方法。

（９）

（３）、（５）～（８）のいずれかに記載の方法によって製造されるペプチドライブラリ又は（４）～（８）のいずれかに記載の方法によって製造されるペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリ。

（１０）

同一ペプチド構造内に２以上のＮ－メチルアミノ酸を含むペプチドを含む、（９）に記載のペプチドライブラリ又はペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリ。

## 発明の効果

[0007] 本発明によれば、高次にＮ－メチル化されたペプチドを発見することを可能にする、複数の異なるＮ－メチルアミノ酸の同時取込みを可能にする新規なペプチドの合成方法を提供することができる。

## 図面の簡単な説明

[0008] [図1]図１は、ＥＦ－ＴｕとアミノアシルｔＲＮＡとの間の相互作用の概略図を示す。図１ａは、リボソームへのタンパク質を構成するアミノ酸（ｐｒｏｔｅｉｎｏｇｅｎｉｃ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ：ｐＡＡ）－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ媒介性送達を示す。図１ｂは、Ｎ－メチルアミノ酸（$^{Me}$ＡＡ）－ｔＲＮＡの相互作用の仮説的障害を模式的に示す。ｐＡＡ－ｔＲＮＡとの競合下でのＥＦ－Ｔｕとの不十分な親和性を意味する。図１ｃは、本発明におけるコンセプトの模式図を示す。図１ｄは、用いたＮ－メチルアミノ酸を示す。$^{Me}$Ｇ：Ｎ－メチルグリシン、$^{Me}$Ｓ：Ｎ－メチルセリン、$^{Me}$Ａ：Ｎ－メチルアラニン、$^{Me}$Ｆ：Ｎ－メチルフェニルアラニン、$^{Me}$Ｌ：Ｎ－メチルロイシン、$^{Me}$Ｍ：Ｎ－メチルメチオニン、$^{Me}$Ｔ：Ｎ－メチルスレオニン、$^{Me}$Ｙ：Ｎ－メチルチロシン、$^{Me}$Ｄ：Ｎ－メチルアスパラギン酸、$^{Me}$Ｖ：Ｎ－メチルバリン、$^{Me}$ＮＩ：Ｎ－メチルノルロイシン、$^{Me}$Ｎｖ：Ｎ－メチルノルバリン、$^{Me}$Ｙｍ：Ｎ－メチル－ｐ－メトキシフェニルアラニン、$^{Ac}$Ｋ：ε－Ｎ－アセチルリジン。

[図2]図２は、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性及び$^{Me}$ＡＡ含有ペプチドの不正確な合成の相関を示す。図２ａは、標準的なｐＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性を示す。エラーバーは、標準偏差を意味する。図２ｂは、多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$ｓと$^{Ac}$Ｋ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$との弱いＥＦ－Ｔｕ親和性を示す。図２ｃは、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性の原因を示す。この図は、ＥＦ－Ｔｕ及びＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{Phe}$の共結晶構造（ＰＤＢ　ＩＤ：１ＴＴＴ）から作成された（参考文献１）。図２ｄは、$^{Me}$ＡＡ又は$^{Ac}$Ｋのそれぞれを含むペプチドの翻訳精度の結果を示す。各実験において、ＧＵＣコドンを含むｍＲＮＡ１２を、目的のｎｐＡＡ－ｔＲＮ$^{AAsnE2}_{GAC}$を含むＦＩＴシステムで翻訳した。†ピークは、非タンパク質性アミノ酸（ｎｏｎ　ｐｒｏｔｅ

ｉｎｏｇｅｎｉｃ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄ：ｎｐＡＡ）の代わりにＩｌｅを含む副生成物に対応する。

[図3]図３は、Ｔステム置換戦略によるアミノアシルｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性の強化を示す。図３ａは、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性を強化するための戦略を示す。$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＴステム配列を、異なるＥＦ－Ｔｕ親和性を有する３種類の異なる配列で置き換えた。元のＴステムはＴステムＮｏ．２とし、新たに調製したＴステムはＴステムＮｏ．１、３及び４とした。これらのＥＦ－Ｔｕ親和性は、Ｎｏ．が増加するにつれて増大すると考えられる。図３ｂ及び図３ｃは、異なるＴステム配列を有するＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｂ）及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｃ）のＥＦ－Ｔｕ親和性の定量化。アスタリスクは、親和性が検出できないレベル（ΔＧ　＞　－６ｋｃａｌ／ｍｏｌ）であることを示す。エラーバーは、標準偏差を意味する。図３ｃでは、コントロールとして、非チャージのｔＲＮＡを用いた。

[図4]図４は、適切なＴステムを選択することにより、翻訳の精度と効率が向上することを示す。図４ａ及び図４ｂは、１５分間の翻訳反応後のペプチド産物のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳを示す。ＧＵＣコドンは、異なるＴステム配列を有するＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ａ）及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｂ）で翻訳された。†ピークは、Ｐｈｅ（ａ）及び$^{Me}$Ｆ（ｂ）の代わりにＩｌｅを含む副産物に対応する。図４ｃ及び図４ｄは、Ｐｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｃ）及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$_{AsnE2}^{GAC}$（ｄ）を含むＦＩＴシステムにおけるペプチド発現レベルの時間経過を示す。

[図5]図５は、最適条件下で６つの異なる$^{Me}$ＡＡを含むモデルペプチドの正確で効率的な合成を示す。図５ａは、ＥＦ－Ｔｕ親和性チューニングの概要を示す。図５ｂは、フレキシザイム触媒アシル化の効率に基づく各$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ濃度の調整を示す。図５ｃは、ｍＲＮＡ１３とその結果として生じるＰ１３ペプチドの配列を示す。矢印は配列官の関連性を示す。図５ｄは、１５のｐＡＡと共に６の$^{Me}$ＡＡをコードするリプログラミングされた遺伝子を示す。図５ｅ及び図５ｆは、トリシン‐ＳＤＳ‐ＰＡＧＥ（ｅ）及びＭＡＬＤＩ

－ＴＯＦ－ＭＳ（ｆ）によるペプチド産物の分析に基づく従来システムと最適システムとの比較を示す。

[図6]図６は、１５のｐＡＡと共に９つの異なる$^{Me}$ＡＡを含む高度にＮ－メチル化されたペプチドの発現を示す。図６ａは、ｍＲＮＡ１４とその結果として生じるＰ１４ペプチドの配列を示す。ＣＵＣ、ＵＵＧ、ＧＵＣ、ＣＵＧ、ＡＵＣ、ＧＣＧ、ＵＵＣ、ＧＵＧ及びＧＣＣコドンは、それぞれ、$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS5}_{GAG}$、$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS5}_{CAA}$、$^{Me}$Ｖ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS1}_{GAC}$、$^{Me}$Ｎｌ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS1}_{CAG}$、$^{Me}$Ｙ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{GAU}$、$^{Me}$Ａ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{CGC}$、$^{Me}$Ｙｍ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS1}_{GAA}$、$^{Me}$Ｎｖ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{CAC}$及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{GGC}$によって翻訳された。図６ｂは、９の$^{Me}$ＡＡ及び１５のｐＡＡをコードするリプログラミングされた遺伝子を示す。図６ｃは、ＥＦ－Ｔｕ親和性チューニングの概要を示す。図６ｄ及び図６ｅは、９の異なる$^{Me}$ＡＡを含むＰ１４ペプチドの発現を示す。ｍＲＮＡは、２０ｐＡＡ（対照として）を含むＦＩＴシステム又は１５のｐＡＡ（Ｐｈｅ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ及びＡｌａを除く）及び９の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡを含むＦＩＴシステムのいずれかで翻訳された。ペプチド産物をＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ（ｄ）及びトリシン－ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ｅ）により分析した。

[図7]図７は、図２ｄの副生成物の確認結果を示す。

[図8]図８は、非チャージのｔＲＮＡがＥＦ－Ｔｕに結合しないことを確認するための制御実験結果を示す。

[図9]図９は、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ及び$^{Ac}$Ｋ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性を強化することによる、向上された翻訳精度を示す。図９ａは、ｍＲＮＡ１２とその結果として生じるＰ１２－ｎｐＡＡペプチドの配列を示す。ＧＵＣコドンは、目的のｎｐＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$によって翻訳された。図９ｂ～図９ｆは、異なるＴステム配列を有する$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｂ）、$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｃ）、$^{Me}$Ａ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｄ）、$^{Me}$Ｌ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｅ）及び$^{Ac}$Ｋ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｆ）について、ＥＦ－Ｔｕ親和性及び翻訳精度に対するそれらの効果を調査した。アスタリスクは親和性が検出できないレベル（ΔＧ

＞　－６ｋｃａｌ／ｍｏｌ）であることを示す。エラーバーは、標準偏差を示す。†ピークはｎｐＡＡの代わりにＩｌｅを含む副生成物に対応する。

[図10]図１０は、他の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡに対するＥＦ－Ｔｕ親和性強化を示す。図１０ａ～図１０ｈは、異なるＴステム配列を含む$^{Me}$Ｍ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ａ）、$^{Me}$Ｔ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｂ）、$^{Me}$Ｙ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｃ）、$^{Me}$Ｄ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｄ）、$^{Me}$Ｖ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｅ）、$^{Me}$Ｎｖ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｆ）、$^{Me}$Ｎｌ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｇ）及び$^{Me}$Ｙｍ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$（ｈ）のＥＦ－Ｔｕ親和性を示す。アスタリスクは親和性が検出できないレベル（ΔＧ　＞　－６ｋｃａｌ／ｍｏｌ）であることを示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

## 発明を実施するための形態

[0009]　本発明のｔＲＮＡは、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有する、Ｎ－メチルアミノ酸をコードするｔＲＮＡである。

Ｔステムを形成する$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$において、$N_1$はＧ又はＡであり、$N_2$及び$N_5$は一方がＧであり、他方がＣであり、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸である。

[0010]　本発明者らは、Ｎ－メチルアミノ酸の非効率的な取り込みの原因を以下のように仮定した。リボソームはＥＦ－Ｔｕ（Ｅｌｏｎｇａｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｔｈｅｒｍｏ　ｕｎｓｔａｂｌｅ）の触媒作用によって、アミノ酸がチャージされたｔＲＮＡであるアミノアシルｔＲＮＡをリボソームＡ部位に入れる（図１ａ）。ＥＦ－Ｔｕは、アミノ酸部位とＴステム部位の２つの異なる部位でアミノアシルｔＲＮＡに結合する。アミノ酸部位における前者の相互作用のみを考慮すると、結合親和性はアミノ酸の種類によって大きく異なる。異なる親和性を補うために、天然においてはＴステム構造を進化させて、ＥＦ－Ｔｕと２０個のアミノアシルｔＲＮＡのそれぞれの親和性が等価になるようにしている。この等価な親和性により、ＥＦ－Ｔｕは、２０種類のタンパク質性アミノアシルｔＲＮＡ（ｐＡＡ－ｔＲＮＡ）をすべて、同様の効率でリボソームに送達することができる（図１ｂ）。対照的に、もしＥＦ－ＴｕとＮ－メチルアミノアシルｔＲＮＡ（$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ）間の親和

性が弱ければ、MeＡＡ－ｔＲＮＡはｐＡＡ－ｔＲＮＡとの競合下でＥＦ－Ｔｕに結合できず、MeＡＡ含有ペプチドの合成効率の低下をもたらす。この仮説が観察された非効率の実際の原因であるならば、MeＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性の同調は翻訳効率を改善することができ、それによって種々のMeＡＡを同じペプチドに同時に組み込むことができるかもしれないと考えた。

本発明において、ほとんどのMeＡＡ－ｔＲＮＡの親和性がｐＡＡ－ｔＲＮＡの平均値よりも小さいことを実験的に確認し、MeＡＡ－ｔＲＮＡは十分な強度でＥＦ－Ｔｕに結合できないという考えが支持された（図１ｃ）。次いで、MeＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性をｐＡＡ－ｔＲＮＡの平均値に同調させる方法を開発した（図１ｃ）。得られた最適化ＦＩＴシステムは、Ｎ－メチル化ペプチドの合成効率と精度の改善を示した。これらの結果から、本発明により新しい方法が、高度にＮ－メチル化されたペプチドのライブラリを合成することを可能にし、これは将来の改善された薬物動態特性を有する実用的な非標準ペプチド薬剤の発見を促進すると期待される。

[0011] 本発明のｔＲＮＡにおける、他の構造、すなわち、アクセプターステム、アンチコドンステム、アンチコドンループ、バリアブルループ、Ｄアームの塩基配列は、任意であってよい。中でも、アンチコドンループは、Ｎ－メチルアミノ酸を割り当てるコドンに対応した塩基配列を適宜有していればよい。

ｔＲＮＡの３’末端は、ＣＣＡ配列を有し、任意のアミノ酸と結合する。本発明のｔＲＮＡは、Ｎ－メチルアミノ酸と結合している。

本明細書では、ｔＲＮＡがＮ－メチルアミノ酸をコードするとは、ｔＲＮＡが、Ｎ－メチルアミノ酸とｔＲＮＡのＣＣＡ配列を介して結合していることを意味する。

[0012] 本発明のｔＲＮＡにおけるＴステムにおいて、それぞれ、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が塩基対を形成する限り、$N_1$～$N_5$として任意の塩基を選択してよいが、本発明においては、特に、$N_1$はＧ又はＡであり、$N_2$及び$N_5$は一方がＧであり、他方がＣであり、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸である。

ここで、$N_2$及び$N_5$は一方がＧであり、他方がＣであるとは、$N_2$がＧである場合、$N_5$はＣであり、$N_2$がＣである場合、$N_5$はＧである。

また、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸であるとは、$N_3$及び$N_4$はそれぞれ任意の塩基であり得るが、$N_3$及び$N_4$が対合する塩基対であることを必要とする。

Ｔステムを形成する$N_1N_2ＧＧN_3$及び$N_4ＣＣN_5$Ｕは、$ＡN_2ＧＧN_3$及び$N_4ＣＣN_5$Ｕであるか、$ＧN_2ＧＧN_3$及び$N_4ＣＣN_5$Ｕであることが好ましく、$ＡＧＧＧN_3$及び$N_4ＣＣＣ$Ｕであるか、$ＧＣＧＧN_3$及び$N_4ＣＣＧ$Ｕであることがより好ましい。

Ｔステムは、Ｔループをなす塩基配列と結合して、Ｔアームを形成する。

$N_3$及び$N_4$は対合する塩基対であるが、本発明におけるＴステムの好ましい態様である、ＡＧＧＧが、ＣＣＣＵと塩基対を形成し、ＧＣＧＧが、ＣＣＧＵと塩基対を形成するＴステム上の塩基対は、図３ａとして示される。

[0013] Ｔループの塩基配列は、ループを形成する限り特に限定されないが、例えば、配列番号３で示される塩基配列が挙げられる。

ＵＵＣＧＡＡＵ （配列番号３）

配列番号３で示される塩基配列は、ｔＲＮＡにおけるＴループを形成し、Ｔステムを形成する$N_1N_2ＧＧN_3$及び$N_4ＣＣN_5$Ｕと結合する。

配列番号３で示される塩基配列が、Ｔステムと結合する際には、他の塩基を介して結合していてもよい。

配列番号３で示される塩基配列においては、１又は複数の塩基が置換、欠失又は挿入されていてもよい。

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

塩基が複数欠失されるとは、配列番号１の塩基配列のＴループを形成する

７個の塩基において、２個、３個、４個、５個、６個、７個の塩基が欠失されていてもよいことを意味し、１～４個の塩基が欠失されていてもよく、１～３個の塩基が欠失されていてもよく、１～２個の塩基が欠失されていてもよく、１個の塩基が欠失されていてもよい。

塩基が複数挿入されるとは、配列番号１の塩基配列のＴループを形成する７個の塩基において、１～４個の塩基が挿入されていてもよく、１～３個の塩基が挿入されていてもよく、１～２個の塩基が挿入されていてもよく、１個の塩基が挿入されていてもよい。

また、配列番号３で示される塩基配列においては、当該塩基配列と相同性が、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上であってよい。

[0014] 本発明のｔＲＮＡは、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有し、配列番号３で示される塩基配列を有するＴループをさらに有することが好ましい。なお、ここで、配列番号３で示される塩基配列は、１又は複数の塩基が置換、欠失又は挿入されていてもよく、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上の相同性を有する塩基配列であってもよい。

本発明のｔＲＮＡは、配列番号４で示される塩基配列を有するＴアームを有することが好ましく、配列番号１又は配列番号２で示される塩基配列を有するＴアームを有することがより好ましく、配列番号５又は配列番号６で示される塩基配列を有するＴアームを有することがさらに好ましい。

$N_1N_2GGN_3(N_6)_mN_4CCN_5U$　（配列番号４）

ＡＧＧＧＧ$(N_6)_m$ＣＣＣＣＵ　（配列番号１）

ＧＣＧＧＧ$(N_6)_m$ＣＣＣＧＵ　（配列番号２）

ＡＧＧＧＧＵＵＣＧＡＡＵＣＣＣＣＵ　（配列番号５）

ＧＣＧＧＧＵＵＣＧＡＡＵＣＣＣＧＵ　（配列番号６）

配列番号１、２及び４において、$N_1$～$N_5$は、前記と同義であり、$N_6$は、任意の塩基であり、ｍは、１以上の整数である。なお、$(N_6)_m$はＴループを構

成する塩基配列であることが好ましい。

また、配列番号４において、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$は、それぞれ、前述した好ましい塩基配列であってもよい。

配列番号１、２、４～６においては、１又は複数の塩基が置換、欠失又は挿入されていてもよく、好ましくは、Ｔループを構成する塩基配列において１又は複数の塩基が置換、欠失又は挿入されていてもよい。

配列番号１、２、４～６の塩基配列において、塩基が置換されるとは、配列番号１、２、４～６の塩基配列のＴアーム及びＴループを形成する塩基配列において、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個の塩基が欠失されていてもよいことを意味し、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個、１～２個の塩基が置換されていてもよく、１個の塩基が置換されていてもよい。

配列番号１、２、４～６の塩基配列において、塩基が欠失されるとは、配列番号１、２、４～６の塩基配列のＴアーム及びＴループを形成する塩基において、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個の塩基が欠失されていてもよいことを意味し、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個、１～２個の塩基が欠失されていてもよく、１個の塩基が欠失されていてもよい。

配列番号１、２、４～６の塩基配列において、塩基が挿入されるとは、配列番号１、２、４～６の塩基配列のＴアーム及びＴループを形成する塩基において、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個の塩基が挿入されていてもよいことを意味し、１～１０個、１～９個、１～８個、１～７個、１～６個、１～５個、１～４個、１～３個、１～２個の塩基が挿入されていてもよく、１個の塩基が挿入されていてもよい。

ただし、配列番号１、２、４～６の塩基配列において、１又は複数の塩基が置換、欠失又は挿入されている場合、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_3U$のＴアームの塩基配列については、置換、欠失又は挿入されていないことが好ましい。すなわち、Ｔループ部分における塩基配列において、置換、欠失又は挿

入であることが好適である。

[0015] 配列番号１、２及び４において、ｍは、（$N_6$）$_m$がＴループを形成し得る限り特に限定されないが、２、３、４、５、６、７、８、９、１０の整数であり得、５～９の整数であることが好ましく、６～８の整数であることがより好ましく、（$N_6$）$_m$は配列番号３で示される塩基配列であることがより好ましい。また、（$N_6$）$_m$は、配列番号３で示される塩基配列を含む配列であってもよい。例えば、（$N_6$）$_m$は（$N_7$）$_{m1}$ＵＵＣＧＡＡＵ（$N_8$）$_{m2}$であってもよい。ｍ１及びｍ２は、それぞれ独立して０～５の整数であり得、０～４、０～３、０～２、０～１、１又は０の整数であってもよい。$N_7$と$N_8$は、配列番号３で示される塩基配列が形成するＴループ構造を阻害しない限り、任意の塩基であってよく、配列番号３で示される塩基配列と一緒になって、Ｔループを形成してもよく、配列番号３で示される塩基配列は（$N_7$）$_{m1}$及び（$N_8$）$_{m2}$とは独立して、あるいは、一部の塩基と一緒になって、Ｔループを形成してもよい。

[0016] 本発明に用いられるｔＲＮＡにおいて、Ｔアーム以外の塩基配列については、野生型ｔＲＮＡに由来する配列であってもよく、大腸菌由来野生型ｔＲＮＡに由来する配列であってもよく、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの転写で調製した人工ｔＲＮＡであってもよい。

また、本発明におけるｔＲＮＡについては、ｔＲＮＡ$^{Pro1E1}$やｔＲＮＡ$^{Pro1E2}$の有するＤアームを有さない場合であってもよい。具体的には、本発明におけるｔＲＮＡは、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(CGG)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GAU)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GGU)}$又はｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GUG)}$として知られるｔＲＮＡのＤアームの塩基配列とは異なる塩基配列のＤアームを有していてよい。より具体的には、ＧＣＧＣ及びＣＧＣＧが対合するＤステムを有さないことが考えられ、一般化すると、配列番号１３４で示される塩基配列を含有するＲＮＡの有するＤアームを有さない場合であってよい。

$N_9N_{10}GCN_{11}N_{12}N_{13}N_{14}N_{15}N_{16}N_{17}N_{18}N_{19}GCN_{20}N_{21}$（配列番号１３４）

（配列番号１３４において、$N_9$～$N_{21}$は、それぞれ任意の塩基を示し、$N_{11}$～

$N_{19}$はＤループを形成し、$N_9N_{10}$ＧＣが、$N_{21}N_{20}$ＣＧと塩基対を形成する。）

本発明におけるｔＲＮＡについては、ｔＲＮＡ$^{GluE2(CGG)}$の有するＤアームを有さない場合であってもよい。具体的には、本発明におけるｔＲＮＡは、ｔＲＮＡ$^{GluE2(CGG)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GAU)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GGU)}$又はｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GUG)}$として知られるｔＲＮＡのＤアームの塩基配列とは異なる塩基配列のＤアームを有していてよい。より具体的には、ＧＣＧＣ及びＣＧＣＧが対合するＤステムを有さないことが考えられ、一般化すると、配列番号１３４で示される塩基配列を含有するＲＮＡの有するＤアームを有さない場合であってもよい。配列番号１３４の塩基配列は、

$N_9N_{10}$ＧＣＧＣＡＧＣＣＵＧＧＵＡＧＣＧＣ$N_{20}N_{21}$（配列番号１３５）

（配列番号１３５において、$N_9$、$N_{10}$、$N_{29}$及び$N_{21}$は、前記と同義であり、$N_9N_{10}$ＧＣが、$N_{21}N_{20}$ＣＧと塩基対を形成するＤステムである。）であってもよく、ＧＣＧＣＧＣＡＧＣＣＵＧＧＵＡＧＣＧＣＧＣ（配列番号１３６）であってもよい。

本発明のｔＲＮＡは、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(CGG)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GAU)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GGU)}$、ｔＲＮＡ$^{Pro1E2(GUG)}$及びｔＲＮＡ$^{GluE2(CGG)}$の有する塩基配列を有さなくてもよい。

これらのｔＲＮＡの塩基配列は、国際公開２０１９／０７７８８７号に開示されている。

[0017] 本発明において、翻訳系は、本発明のｔＲＮＡを含み、当該ｔＲＮＡを含むことにより、一般的には連続導入が難しいＮ－メチルアミノ酸が連続して結合するペプチドを合成することができる翻訳系となるが、より具体的には、２以上のＮ－メチルアミノ酸が連続して結合するペプチドを合成することができる翻訳系となる。また、同時に２種以上のＮ－メチルアミノ酸を、好ましくは、３種以上、４種以上、５種以上、６種以上、７種以上、８種以上、９種以上のＮ－メチルアミノ酸を割り当てたコドン表を用いた翻訳系でペプチドライブラリを調製することも可能である。

翻訳系には、本発明のｔＲＮＡを含む限り、特に限定されずに、無細胞翻

訳系で用いられる構成要素を含む。

翻訳系は、ＥＦ－Ｔｕタンパク質を含有することが好適である。また、従来公知の無細胞翻訳系において用いられる他の構成要素を含むことが好ましい。

本発明の翻訳系においては、本発明のｔＲＮＡを含み、タンパク質性アミノ酸をチャージするｔＲＮＡを含むことが好ましい。タンパク質性アミノ酸をチャージするｔＲＮＡは、天然型ｔＲＮＡであり、Ｔアームが天然に存在する天然型ｔＲＮＡのＴアームを有していることがより好ましい。中でも、タンパク質性アミノ酸がチャージされたｔＲＮＡとして天然型のチャージされたｔＲＮＡであることが好ましい。天然型のチャージされたｔＲＮＡとしては、天然の翻訳系に存在するｔＲＮＡであり得る。すなわち、チャージする前のｔＲＮＡにおいて、人工的な改変が加えられていないｔＲＮＡにアミノ酸がチャージされる場合、アミノ酸がチャージされたｔＲＮＡにおいて、天然型ｔＲＮＡのＴアームを有することになる。

タンパク質性アミノ酸がコドン表において再構成されない場合には、天然の翻訳系に存在する当該タンパク質性アミノ酸をチャージしたｔＲＮＡを用いてもよい。タンパク質性アミノ酸がコドン表において再構成される場合には、天然の翻訳系に存在するｔＲＮＡであって、割り当てられたコドンに対応するｔＲＮＡに当該タンパク質性アミノ酸をチャージしてもよい。

本明細書において、「チャージする」、「チャージされた」という用語は、「結合する」、「結合した」あるいは「連結する」、「連結した」と同義で用いられる。したがって、「タンパク質性アミノ酸をチャージするｔＲＮＡ」とは、タンパク質性アミノ酸がｔＲＮＡにアシル化されているｔＲＮＡであることを意味し、タンパク質性アミノ酸がｔＲＮＡに「アミノアシル化」されていることとも同義となる。

また、本発明の翻訳系では、本発明のｔＲＮＡを複数有していてもよく、複数含まれる本発明のｔＲＮＡは、チャージされるＮ－メチルアミノ酸が異なる場合（この場合、Ｎ－メチルアミノ酸に割り当てられたコドンが対応す

る）もあれば、Ｔアームが異なるｔＲＮＡを複数含んでいてもよい。

すなわち、配列番号４で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡから、複数のｔＲＮＡが選択された翻訳系であってもよく、配列番号４で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡが複数種である場合には、それらは、前述した好ましい塩基配列の中から選択される２種以上であってもよい。例えば、配列番号４で示される塩基配列において、Ｔアームの塩基配列$N_1$ $N_2$ＧＧ$N_3$及び$N_4$ＣＣ$N_5$Ｕの組合せとして、ｔＲＮＡとして２種が用いられる場合には、Ａ$N_2$ＧＧ$N_3$及び$N_4$ＣＣ$N_5$Ｕと、Ｇ$N_2$ＧＧ$N_3$及び$N_4$ＣＣ$N_5$Ｕとの組み合わせや、ＡＧＧＧ$N_3$及び$N_4$ＣＣＣＵと、ＧＣＧＧ$N_3$及び$N_4$ＣＣＧＵとの組み合わせが挙げられる。

より具体的には、本発明の翻訳系においては、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡ及び／又は配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡを含む翻訳系であってもよく、配列番号５で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡ及び／又は配列番号６で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡを含む翻訳系であってもよい。

本発明においては、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡとを含む翻訳系であってもよく、配列番号５で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号６で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡとを含む翻訳系であってもよい。また、本発明の翻訳系では、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡとを対比した場合に、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡの方が、ＥＦ－Ｔｕ親和性が高いため、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡに、ペプチドへの導入が難しいＮ－メチルアミノ酸をチャージさせることが好適である。

本発明の翻訳系としては、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮ

Ａとに、ＥＦ－Ｔｕ親和性を考慮して、適宜、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージしてもよい。

また、そもそも、本発明のＴステムを有するｔＲＮＡを用いなくても、Ｎ－メチルアミノ酸がアミノアシル化されたｔＲＮＡにおいて、ＥＦ－Ｔｕ親和性を有する場合については、Ｎ－メチルアミノ酸に対応するアミノ酸（例えば、Ｎ－メチルグリシンに対応するアミノ酸はグリシンである。）がチャージされている天然型ｔＲＮＡにチャージしてもよい。また、Ｎ－メチルグリシンが割り当てられたコドンに対応する天然型ｔＲＮＡにチャージしてもよい。そのようなＮ－メチルアミノ酸としては、Ｎ－メチルグリシンとＮ－メチルセリンが挙げられる。すなわち、Ｎ－メチルグリシンとＮ－メチルセリンについては、本発明のｔＲＮＡにチャージしてもよいが、本発明の翻訳系においては、本発明のｔＲＮＡにチャージされていなくても構わない。

[0018] 本発明においては、本発明の翻訳系とする際に、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CC N_5U$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡにＮ－メチルアミノ酸をチャージして本発明のＮ－メチルアミノ酸がチャージされたｔＲＮＡを準備する。

また、本発明においては、本発明における翻訳すなわち、ペプチドライブラリの製造方法やペプチドと該ペプチドをコードするｍＲＮＡとの複合体ライブラリの製造方法において、本発明のｔＲＮＡを含む翻訳系を準備する。当該翻訳系においては、ＥＦ－Ｔｕタンパク質を含むことが好適である。。

本発明においては、本発明のｔＲＮＡ又は翻訳系を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含み、当該無細胞翻訳系で翻訳する前には、本発明の翻訳系を準備する工程を含むことが好適である。

本発明の翻訳系を準備する工程としては、無細胞翻訳系で翻訳するための翻訳系を準備する。中でも、本発明においては、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前に$AGGGN_3$及び$N_4CCCU$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡ並びに$GCGGN_3$及び$N_4CCGU$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定することが好ましい。

Ｎ－メチルアミノ酸はｔＲＮＡにチャージすることで無細胞翻訳系による翻訳でペプチドのアミノ酸配列に取り込まれる。

翻訳の効率化のため、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージしたｔＲＮＡとＥＦ－Ｔｕとの親和性が他のアミノ酸（Ｎ－メチルアミノ酸を含む）をチャージしたｔＲＮＡにおけるＥＦ－Ｔｕとの親和性が等価であることが好ましい。

そこで、準備工程においては、ＥＦ－Ｔｕとの親和性を考慮して、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前にＡＧＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＣＵが対合するＴステムを有するｔＲＮＡ並びにＧＣＧＧＮ$_3$及びＮ$_4$ＣＣＧＵが対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定することが好ましい。

ＥＦ－Ｔｕとの親和性を考慮して用意されるアミノ酸（Ｎ－メチルアミノ酸を含む）がチャージされたｔＲＮＡは、ペプチドのアミノ酸配列に取り込まれる際の取り込み効率が同等であることが好ましい。

準備工程においては、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージするｔＲＮＡとして、ＡＧＧＧＧ（Ｎ$_4$）$_m$ＣＣＣＣＵ（配列番号１）を有するｔＲＮＡ及びＧＣＧＧ（Ｎ$_4$）$_m$ＣＣＣＧＵ（配列番号２）を有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡが選択されることが好ましい。

[0019] 配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡ、天然型ｔＲＮＡの選択に関しては、ＥＦ－Ｔｕ親和性が特定範囲になるような、ｔＲＮＡを選択することが好ましい。

ｔＲＮＡとＥＦ－Ｔｕとの親和性の指標として、ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ）が、－７．５～－１０の範囲内であることが好ましく、かかる範囲内で、上限値は、－８以下であることが好ましく、下限値が、－９．５以上であることが好ましく、－９以上であることがより好ましい。

ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ）が、－７．５～－１０の範囲内であることが好ましく、－８～－１０、－７．５～－９．５、－７．５～－９、－８～－９．５、－８～－９であってよい。

[0020] 本発明における翻訳系では、フレキシザイムを利用したコドンの再割当において、ＮＮＮとして適宜選択したコドンに対して、Ｎ－メチルアミノ酸を割り当てる。

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

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

[0021] 本発明における翻訳系では、フレキシザイムを利用し、ＮＮＮのすべてに任意のアミノ酸を再割当してもよく（Ｎは任意の塩基である。）、その場合、ｔＲＮＡをすべて人工のものとしてもよいが、天然型と人工型の組み合わせとしていてよい。この場合、翻訳系に加える各ＮＮＮに対応する伸長ｔＲＮＡは、全長の８５％以上又は９０％以上が同一の塩基配列からなるものであってもよく、アンチコドンを除いた配列のうち、ほとんど配列が同じである伸長ｔＲＮＡ群を用いることもできる。

本明細書において、アンチコドンループとは、ｔＲＮＡにおけるアンチコドンを含む一本鎖のループ部分を示す。アンチコドンループの配列は、コドン－アンチコドンの相互作用を相補するように、当業者が適宜決定することが可能である。

[0022] 本発明においては、ペプチドライブラリの各ペプチドをコードするｍＲＮＡを含み、各ｍＲＮＡが１又は複数の、好ましくは複数のＮ－メチルアミノ酸をコードするＮＮＮを含むｍＲＮＡライブラリを調製する工程と；

ＮＮＮのいずれかのコドンに対するアンチコドンを有し、該コドンに対応するＮ－メチルアミノ酸がチャージされたｔＲＮＡを加えた無細胞翻訳系で、ｍＲＮＡライブラリの各ｍＲＮＡを翻訳する工程と、を含む。ペプチドラ

イブラリの製造方法とすることができる。

かかる翻訳系として、上記した様に、本発明のＴステム乃至Ｔアームを有するｔＲＮＡを選択した翻訳系とすることが好ましい。

すなわち、無細胞翻訳系とする際に、天然型ｔＲＮＡと、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡと、配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡのいずれかのｔＲＮＡにＮ－メチルアミノ酸がチャージされていることが好ましい。タンパク質性アミノ酸は、天然型ｔＲＮＡにチャージされていてよく、翻訳系は、Ｎ－メチルアミノ酸がチャージされた配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡ及び／又はＮ－メチルアミノ酸がチャージされた配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡを含むことが好ましく、双方のｔＲＮＡを含むことがより好ましい。

[0023] 本発明においては、Ｎ－メチルアラニン、Ｎ－メチルグリシン、Ｎ－メチルセリンは、天然型ｔＲＮＡにチャージすることが好ましく、Ｎ－メチルアラニンは、本発明のｔＲＮＡにチャージしてもよく、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてもよく、配列番号５で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてもよい。

配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡか配列番号５で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてもよいＮ－メチルアミノ酸としては、Ｎ－メチルグリシン、Ｎ－メチルセリン以外のＮ－メチルアミノ酸が挙げられる。

非天然アミノ酸のＮ－メチル化体を本発明のｔＲＮＡにチャージしてもよい。

配列番号２で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡか配列番号６で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてもよいＮ－メチルアミノ酸としては、本発明のｔＲＮＡ以外のｔＲＮＡにチャージせず、配列番号１で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡか配列番号５で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてもよいＮ－

メチルアミノ酸が挙げられ、特に限定されるものではないが、中でもＮ－メチルバリンが挙げられる。

Ｎ－メチルバリン、Ｎ－メチルグリシン、Ｎ－メチルセリン以外のＮ－メチルアミノ酸については、配列番号１、２、５、６で示される塩基配列のＴアームを有するｔＲＮＡにチャージしてよい。そのようなＮ－メチルアミノ酸としては、図１ｄに記載するＮ－メチルアミノ酸が挙げられる。なお、$^{Ac}$ＫをＮ－メチルアミノ酸に代えてｔＲＮＡにチャージする場合も本発明の翻訳系で用いてよい。

[0024] 本発明において、ペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリの製造方法は、上述したペプチドライブラリの製造方法において、ｍＲＮＡライブラリを調製する際、各ｍＲＮＡのＯＲＦ（Ｏｐｅｎ　ｒｅａｄｉｎｇ　ｆｒａｍｅ）の下流領域にピューロマイシンを結合させることによって行われる。ピューロマイシンは、ペプチドや核酸で構成されるリンカーを介してｍＲＮＡに結合させてもよい。ｍＲＮＡのＯＲＦ下流領域にピューロマイシンを結合させることにより、ｍＲＮＡのＯＲＦを翻訳したリボソームがピューロマイシンを取り込み、ｍＲＮＡとペプチドの複合体が形成される。このようなペプチド－ｍＲＮＡ複合体は、遺伝子型と表現型を対応付けることができ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏディスプレイに応用できる。

[0025] 本発明においては、まず、Ｎ－メチルアミノ酸を割り当てるＮＮＮを選択し、ＮＮＮのアンチコドンをアンチコドンループ内に有し、Ｎ－メチルアミノ酸をコードするｔＲＮＡをフレキシザイム等を用いて調製する。

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

[0026] 本明細書において、「ＮＮＮ」は、アミノ酸を指定するコドンを意味し、コドンを形成する３つのＮは、それぞれ独立に、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）及びウラシル（Ｕ）から選択される。１つのｍＲＮＡには、Ｎ－メチルアミノ酸がコードされたＮＮＮが複数含まれていてよい

。

[0027] 本発明においては、Ｎ－メチルアミノ酸をコードしないＮＮＮには、任意のアミノ酸が再割当されていてもよいし、天然の遺伝暗号に基づいたコドンとアミノ酸との関係を用いてもよい。

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

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

[0028] [表1]

2文字目の塩基→

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

[0029] 各コドンに対する、天然の遺伝暗号表とは異なるアミノ酸の割り当ては、例えば、人工アミノアシル化ＲＮＡ触媒フレキシザイム（Ｆｌｅｘｉｚｙｍｅ）を利用したコドン再割当によって実現される。フレキシザイムによれば、任意のアンチコドンを有するｔＲＮＡに所望のアミノ酸を結合させることができるので、任意のコドンに任意のアミノ酸を割り当てることが可能となる。

[0030] 本明細書において、アミノ酸としては、タンパク質性アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含み、例えば、タンパク質性Ｌ－アミノ酸、

アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。

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

Ｎ－メチルアミノ酸以外の非タンパク質性アミノ酸が用いられていてもよく、非タンパク質性アミノ酸（ｎｏｎ－ｐｒｏｔｅｉｎｏｇｅｎｉｃ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄｓ）としては、タンパク質性アミノ酸以外の天然又は非天然のアミノ酸を意味する。

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

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

[0031] 本発明においては、ペプチドを１×１０$^{6}$種以上含むペプチドライブラリを製造することができる。

各ペプチドに含まれるＮＮＮでコードされるアミノ酸の数は、Ｎ－メチルアミノ酸が含まれる限り、特に限定されないが、例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１５個、２０個、３０個

等とすることができるが、１～１０個であってもよい。各ｍＲＮＡにおける非タンパク質性アミノ酸をコードするＮＮＮの位置は特に限定されず、本発明のｔＲＮＡを用いることで、非タンパク質性アミノ酸をコードするＮＮＮが連続して配置されるｍＲＮＡからも、タンパク質性アミノ酸のライブラリ合成と同程度で、非タンパク質性アミノ酸が連続して配置されたペプチドが翻訳される。

[0032] コドン再割当には、翻訳系の構成因子を目的に合わせて自由に取り除き、必要な成分だけを再構成してできる翻訳系を利用できる。例えば、特定のアミノ酸を除去した翻訳系を再構成すると、当該アミノ酸に対応するコドンが、いずれのアミノ酸もコードしない空きコドンになる。そこで、フレキシザイム等を利用して、その空きコドンに相補的なアンチコドンを有するｔＲＮＡに任意のアミノ酸を連結し、これを加えて翻訳を行うと、当該任意のアミノ酸がそのコドンでコードされることになり、除去したアミノ酸の代わりに当該任意のアミノ酸が導入されたペプチドが翻訳される。

[0033] 本明細書において「無細胞翻訳系」とは、細胞を含まない翻訳系をいい、無細胞翻訳系としては、例えば、大腸菌抽出液、小麦胚芽抽出液、ウサギ赤血球抽出液、昆虫細胞抽出液等を用いることができる。また、それぞれ精製したリボソームタンパク質、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ａａＲＳ）、リボソームＲＮＡ、アミノ酸、ｒＲＮＡ、ＧＴＰ、ＡＴＰ、翻訳開始因子（ＩＦ）、伸長因子（ＥＦ）、終結因子（ＲＦ）、およびリボソーム再生因子（ＲＲＦ）、ならびに翻訳に必要なその他の因子を再構成することで構築した、再構成型の無細胞翻訳系を用いても良い。

ＤＮＡからの転写を併せて行うためにＲＮＡポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系としてはロシュ・ダイアグノスティックス社のＲＴＳ－１００（登録商標）、再構成型翻訳系としてはＰＧＩ社のＰＵＲＥＳＹＳＴＥＭ（登録商標）やＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ社のＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓＲ Ｉｎ Ｖｉｔｒｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ等、小麦胚芽抽出液を用

いた系としてはゾイジーン社やセルフリーサイエンス社のもの等を使用できる。

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

無細胞翻訳系によれば、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる。

なお、本発明の無細胞翻訳系は、転写に必要な因子を加えて、翻訳のみならず転写に用いてもよい。

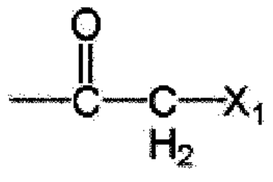
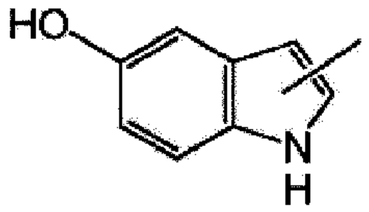
[0034] 本発明において得られるペプチドは、環状ペプチドであってもよく、例えば、下記表２に示す官能基１を有するアミノ酸と、対応する官能基２を有するアミノ酸が環状化した環状ペプチドとすることができる。

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

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

[0035]

[表2]

| | 官能基1 | 官能基2 |
|---|---|---|
| (A) |  (A－1) | HS— (A－2) |
| (B) | —C≡C—H (B－1) | $N_3$— (B－2) |
| (C) | —Ar—$CH_2NH_2$ (C－1) |  (C－2) |
| (D) | —C≡C—$CH_2$—$X_1$ (D－1) | HS— (D－2) |
| (E) | —Ar—$CH_2$—$X_1$ (E－1) | HS— (E－2) |

式中、$X_1$は脱離基であり、脱離基としては、例えば、Ｃｌ、Ｂｒ及びＩ等のハロゲン原子が挙げられ、Ａｒは置換基を有していてもよい芳香環である。

[0036] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophan、β-N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、δ-N-chloroacetyl-L-ornithine、ε-N-chloroacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

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

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

もよいことを意味し、また、Ｌ体とＤ体の任意の割合での混合物であってもよい。

[0037] （Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

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

[0038] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nature Chemical Biology 5, 888-890 (2009) ; Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009) ; Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008) ; Goto, Y. et al., ACS Chemical Biology 3, 120-129 (2008) ; Kawakami T. et al, Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)、及び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0039] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、及び2-amino-8-nonynoic acid等が挙げられる。

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

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

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

られる。

[0040] （Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、及び2-amino-8-azidooctanoic acid等が挙げられる。

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

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

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

[0041] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)、及び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0042] （Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)及び3-aminomethyltyrosine等が挙げられる。

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

（Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｃ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10,

1469-1472 (2009)及び国際公開第２００８／１１７８３３号に記載された方法等が挙げられる。

[0043] （Ｄ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic acid、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、及び2-amino-8-chloro-octynoic acid等が挙げられる。

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

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

[0044] （Ｅ－１）のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophane、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

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

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

[0045] 環形成アミノ酸としては、（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸との組み合わせが好ましく、脱離基でＨが置換されたＮ－アセチルトリプトファンとcysteineの組み合わせがより好ましく、N-haloacetyl-D-tyrosine又はN-haloacetyl-D-tryptophan、好適にはN-chloroacetyl-D-tyrosine又はN-chloroacetyl-D-tryptophanとcysteine(Cys)の組み合わせがさらに好ましい。

[0046] 本発明においては、ペプチドライブラリ又はペプチド－ｍＲＮＡ複合体ラ

イブラリも提供する。

本発明のｔＲＮＡを用いてペプチドライブラリを製造することで、Ｌ－アミノ酸からなるペプチドの発現レベルと同程度で、Ｎ－メチルアミノ酸を含むペプチドを合成できるため、従来のペプチドライブラリに比して、１つのペプチド内に、Ｎ－メチルアミノ酸の導入において多様性に富むペプチドライブラリとすることができる。

中でも、２以上のＮ－メチルアミノ酸を含むペプチドを含むライブラリとすることができる。

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

[0047] 本発明においては、本発明に係るｔＲＮＡを用いて製造されたペプチドライブラリを用いた、標的物質に結合するペプチドを同定するためのスクリーニング方法も提供する。

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

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

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

検出可能な標識としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、１２５Ｉ、１３１Ｉ、３５Ｓ、３Ｈ等の放射性物質、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン

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

[0048] ペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリの場合、ＴＲＡＰディスプレイ法を応用してスクリーニングを行うことができる。

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

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

[0049] 本明細書において引用されるすべての非特許文献及び参考文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

## 実施例

[0050] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

[0051] ｔＲＮＡ、フレキシザイム、ｍＤＮＡ、ｍＲＮＡの調製

表３に記載のオリゴヌクレオチドは全て、ユーロフィン（日本）から購入した。なお、表３中、Ｇ（Ｍｅ）は、２’－Ｏ－メチルグアノシンを意味する。本実施例で調製したｔＲＮＡ転写物の配列を表４に示した。ｔＲＮＡをコードする二本鎖ＤＮＡ鋳型を、プライマー伸長後にＰＣＲによって以下の

ようにして調製した：適当なＦｏｒｗａｒｄプライマー及びＲｅｖｅｒｓｅプライマー（各１μM、使用したプライマーについては表５を参照）を、１００μＬのＰＣＲ混合物（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９．０）、５０ｍＭ　ＫＣｌ、２．５ｍＭ　$MgCl_2$、各ｄＮＴＰ、０．１％（ｖ／ｖ）　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００及び４５ｎＭ　Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ）中で混合した。プライマー伸長は、変性（９５℃で１分）に続いて５サイクルのアニーリング（５０℃で１分）及び伸長（７２℃で１分）によって行った。得られた反応混合物１μＬを、各々の適切なＦｏｒｗａｒｄ及びＲｅｖｅｒｓｅプライマー（各０．５μM、使用したプライマーについては表５を参照）を含むＰＣＲ混合物１９９μＬで２００倍希釈し、１２サイクルの変性（９５℃で４０秒）、アニーリング（５０℃で４０秒）及び伸長（７２℃で４０秒）によってＰＣＲを行った。ＰＣＲ産物の増幅を、３％アガロースゲル電気泳動及びエチジウムブロマイド染色によって確認した。得られたＤＮＡをフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製し、次いで水２０μＬに溶解した。ｔＲＮＡの濃度は、１０倍希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。

転写反応は、２００μＬの転写混合物（４０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１ｍＭ　ｓｐｅｒｍｉｄｉｎｅ、０．０１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１０ｍＭ　ＤＴＴ、２２．５ｍＭ　$MgCl_2$、各ＮＴＰ、５ｍＭ　ＧＭＰ、２２．５ｍＭ　ＫＯＨ、１０％（ｖ／ｖ）ＤＮＡ鋳型及び１２０ｎＭ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ）を３７℃で一晩インキュベートすることによって行った。転写混合物を$MnCl_2$（１００ｍＭ、４μＬ）及びＲＱ１　ＲＮアーゼフリーＤＮアーゼ（１Ｕ／μＬ、１μＬ、Ｐｒｏｍｅｇａ）と混合し、３７℃で３０分間インキュベートした。得られたｔＲＮＡ転写物をイソプロパノールにより沈殿させ、水に溶解した。ｔＲＮＡ転写物を８％変性ＰＡＧＥ及びエタノール沈殿により精製し、次いで１０μＬの水に溶解した。

フレキシザイム（ｄＦｘおよびｅＦｘ）は、非特許文献１３及び参考文献

２に記載の方法に従って調製した。 ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA

ｍＲＮＡをコードする二本鎖ＤＮＡ鋳型（ｍＤＮＡ，ｍＲＮＡ配列については表６を参照）を、プライマー伸長およびＰＣＲにより調製した（用いたプライマーについては表７を参照）。得られたｍＤＮＡを、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製し、次いで１０μＬの水に溶解した。濃度は、対照として１００ｂｐのＱｕｉｃｋ－Ｌｏａｄ ＤＮＡ Ｌａｄｄｅｒｓ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）を用いた８％ＮＡＴＩＶＥ ＰＡＧＥ及びエチジウムブロマイド染色によって測定した。

ｍＲＮＡを以下のようにしてｉｎ ｖｉｔｒｏ転写により調製した：２００μＬ転写混合物（４０ｍＭ Ｔｒｉｓ･ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、１ｍＭスペルミジン、０．０１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、１０ｍＭ ＤＴＴ、３０ｍＭ $MgCl_2$、各ＮＴＰｓ５ｍＭ、３０ｍＭ ＫＯＨ、１０％（ｖ／ｖ）ＤＮＡ鋳型及び１２０ｎＭ Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼ）を３７℃で一晩インキュベートした。転写混合物を$MnCl_2$（１００ｍＭ、４μＬ）及びＲＱ１ ＲＮアーゼフリーＤＮアーゼ（１Ｕ／μＬ、１μＬ、Ｐｒｏｍｅｇａ）と混合し、３７℃で３０分間インキュベートした。得られたｍＲＮＡをイソプロパノールにより沈殿させ、水に溶解した。ｔＲＮＡ転写物を８％変性ＰＡＧＥ及びエタノール沈殿により精製し、次いで１０μＬの水に溶解した。ｍＲＮＡの濃度は、１０倍希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。

[0052]

[表3]

| Name | Sequence |
|---|---|
| O-197 | 5'-TAATACGACTCACTATAGCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGGGGACTGAAAATCCCCGTGTCC-3' |
| O-198 | 5'-GTGCCCGGACTCGGAATCGAACCAAGGACACGGGGATTTTCA-3' |
| O-199 | 5'-GGCGTAATACGACTCACTATAG-3' |
| O-200 | 5'-GG(Me)TGCCCGGACTCGG-3' |
| O-201 | 5'-TG(Me)GTGCCCGGACTCGG-3' |
| O-202 | 5'-GGCGTAATACGACTCACTATAGGTGGGGTTCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACTGTAAATCTGCCG-3' |
| O-203 | 5'-GGTGGTGGGGGAAGGATTCGAACCTTCGAAGTCTGTGACGGCAGATTTACAGTCTG-3' |
| O-204 | 5'-GG(Me)TGGTGGGGGAAGGAT-3' |
| O-205 | 5'-TG(Me)GTGGTGGGGGAAGGAT-3' |
| O-206 | 5'-GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGAGATGCCGGAGCGGCTGAACGGACCGGTCTCGAAAACCGGAG-3' |
| O-207 | 5'-GGCGGAGAGAGGGGGATTTGAACCCCCGGTAGAGTTGCCCCTACTCCGGTTTTCGAGACC-3' |
| O-208 | 5'-GG(Me)CGGAGAGAGGGGGA-3' |
| O-209 | 5'-TG(Me)GCGGAGAGAGGGGGA-3' |
| O-210 | 5'-GTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGG-3' |
| O-211 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGATTGTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-212 | 5'-GG(Me)CGGCTCTGCAATG-3' |
| O-213 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGATTGTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-214 | 5'-GG(Me)CGGCTCTGACTGG-3' |
| O-215 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGATTGTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-216 | 5'-GG(Me)CGGCTCTGAGGGG-3' |
| O-217 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGATTGTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-218 | 5'-GG(Me)CGGCTCTGACGGG-3' |
| O-219 | 5'-TG(Me)GCGGCTCTGCAATG-3' |
| O-220 | 5'-TG(Me)GCGGCTCTGACTGG-3' |
| O-221 | 5'-TG(Me)GCGGCTCTGAGGGG-3' |
| O-222 | 5'-TG(Me)GCGGCTCTGACGGG-3' |
| O-223 | 5'-GTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGAAGAACGGCGG-3' |
| O-224 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGATTTTCAGTCCGCCGTTCTTCCG-3' |
| O-225 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGATTTTCAGTCCGCCGTTCTTCCG-3' |
| O-226 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGATTTTCAGTCCGCCGTTCTTCCG-3' |
| O-227 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGATTTTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-228 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGATTTTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-229 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGATTTTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-230 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGATTTTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-231 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGATTTTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-232 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGAACCTCAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-233 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGAACCTCAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-234 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGAACCTCAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-235 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGAACCTCAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-236 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGAACCTGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-237 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGAACCTGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-238 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGAACCTGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-239 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGAACCTGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-240 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGATTATCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-241 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGATTATCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-242 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGATTATCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-243 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGATTATCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-244 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGAGTGTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-245 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGAGTGTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-246 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGAGTGTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-247 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGAGTGTGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-248 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGACTGCCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-249 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGACTGCCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-250 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGACTGCCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-251 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGACTGCCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-252 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACTGGACATACGGATTGCGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-253 | 5'-GCGGCTCTGACTGGACTCGAACCAGTGACATACGGATTGCGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-254 | 5'-GCGGCTCTGAGGGGACTCGAACCCCTGACATACGGATTGCGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-255 | 5'-GCGGCTCTGACGGGACTCGAACCCGCGACATACGGATTGCGAATCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-256 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACCGGACATACGGATTGTCAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-257 | 5'-GCGGCTCTGCAATGACTCGAACACCGGACATACGGATTTAGAGTCCGCCGTTCTACCG-3' |
| O-258 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGAAGAAGAAG-3' |
| O-259 | 5'-CGAAGCTTACTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGTAGACCTTCTTCTTCATGTTTTTCTC-3' |
| O-260 | 5'-CGAAGCTTACTTGTCGTC-3' |
| O-261 | 5'-GAGAAAAACATGAAGAAGAAGACAAATTTCGGTATCCGTGCCTCTGTCATGGA-3' |
| O-262 | 5'-GTCGTCCTTGTAGTCGTATGGATGGAGCAGTTGCCATTCCATGACAGAGGCACG-3' |
| O-263 | 5'-CGAAGCTTACTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTC-3' |
| O-264 | 5'-GAGAAAAACATGAAGAAGAAGCTCCATATGTTGGTCACAGAACTGTCTATCGCGCAAAA-3' |
| O-265 | 5'-GTCGTCCTTGTAGTCTGGGGCACGCACCCAACCGAAATTTTGCGCGATAGACAGT-3' |
| O-266 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGGACTACAAGGACGACGACGACAAG-3' |
| O-267 | 5'-CGAAGCTTACTTCTTCTTGATGAAGGCGACCAGGAGCTTGTCGTCGTCGTCCT-3' |
| O-268 | 5'-CGAAGCTTACTTCTTCTT-3' |

[0053]

[表4]

| tRNA | Anticodon | T-stem | tRNA sequence |
|---|---|---|---|
| Phe without 3'-A | GAA | - | 5'-GCCCGGAUAGCUCAGUCGGUAGAGCAGGGGACUGAAAAUCCCCGUGUCCUUGGUUCGAUUCCGAGUCCGGGCACC-3' |
| Tyr without 3'-A | GUA | - | 5'-GGUGGGGUUCCCGAGCGGCCAAAGGGAGCAGACUGUAAAUCUGCCGUCACAGACUUCGAAGGUUCGAAUCCUUCCCCCACC-3' |
| Ser without 3'-A | CGA | - | 5'-GGAGAGAUGCCGGAGCGGCUGAACGGACCGGUCUCUCGAAACCGGAGUAGGGGCAACUCUACCGGGGGUUCAAAUCCCCCUC-3' |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAC | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAC | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAC | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAC | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAA | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAA | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAA | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAA | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAA | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAA | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAA | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAA | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAG | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAG | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAG | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAG | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAG | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAG | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAG | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAG | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAU | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAU | No.2' | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAU | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAU | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAC | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAC | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAC | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CAC | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GGC | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GGC | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GGC | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GGC | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CGC | No.1 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CGC | No.2 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CGC | No.3 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | CGC | No.4 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |
| AsnE2 | GAC | No.0 | 5'-GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGCUGACUAUUCCGUAUGUCCAGUGUUCGAGUCACUGGGUUCGAUUCCCGUCGCCA-3' |

[0054]

[表5]

| tRNA | Anticodon | T-stem | Extension | | PCR | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Forward primer | Reverse primer | Forward primer | Reverse primer |
| Phe without 3'-A | GAA | Native | O-197 | O-198 | O-199 | O-200 |
| Phe | GAA | Native | O-197 | O-198 | O-199 | O-201 |
| Tyr without 3'-A | GUA | Native | O-202 | O-203 | O-199 | O-204 |
| Tyr | GUA | Native | O-202 | O-203 | O-199 | O-205 |
| Ser without 3'-A | CGA | Native | O-206 | O-207 | O-199 | O-208 |
| Ser | CGA | Native | O-206 | O-207 | O-199 | O-209 |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.1 | O-210 | O-211 | O-199 | O-212 |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.2 | O-210 | O-213 | O-199 | O-214 |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.3 | O-210 | O-215 | O-199 | O-216 |
| AsnE2 without 3'-A | GAC | No.4 | O-210 | O-217 | O-199 | O-218 |
| AsnE2 | GAC | No.1 | O-210 | O-211 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | GAC | No.2 | O-210 | O-210 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | GAC | No.3 | O-210 | O-212 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | GAC | No.4 | O-210 | O-214 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | GAA | No.1 | O-223 | O-224 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | GAA | No.2 | O-223 | O-225 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | GAA | No.3 | O-223 | O-226 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | GAA | No.4 | O-223 | O-227 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | CAA | No.1 | O-210 | O-228 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | CAA | No.2 | O-210 | O-229 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | CAA | No.3 | O-210 | O-230 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | CAA | No.4 | O-210 | O-231 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | GAG | No.1 | O-210 | O-232 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | GAG | No.2 | O-210 | O-233 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | GAG | No.3 | O-210 | O-234 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | GAG | No.4 | O-210 | O-235 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | CAG | No.1 | O-210 | O-236 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | CAG | No.2 | O-210 | O-237 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | CAG | No.3 | O-210 | O-238 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | CAG | No.4 | O-210 | O-239 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | GAU | No.1 | O-210 | O-240 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | GAU | No.2 | O-210 | O-241 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | GAU | No.3 | O-210 | O-242 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | GAU | No.4 | O-210 | O-243 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | CAC | No.1 | O-210 | O-244 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | CAC | No.2 | O-210 | O-245 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | CAC | No.3 | O-210 | O-246 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | CAC | No.4 | O-210 | O-247 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | GGC | No.1 | O-210 | O-248 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | GGC | No.2 | O-210 | O-249 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | GGC | No.3 | O-210 | O-250 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | GGC | No.4 | O-210 | O-251 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | CGC | No.1 | O-210 | O-252 | O-199 | O-219 |
| AsnE2 | CGC | No.2 | O-210 | O-253 | O-199 | O-220 |
| AsnE2 | CGC | No.3 | O-210 | O-254 | O-199 | O-221 |
| AsnE2 | CGC | No.4 | O-210 | O-255 | O-199 | O-222 |
| AsnE2 | GAC | No.0 | O-210 | O-256 | O-199 | O-219 |
| Non-functional | CUA | No.0 | O-210 | O-257 | O-199 | O-219 |

[0055]

[表6]

| Name | Corresponding mDNA | mRNA sequence |
|---|---|---|
| mRNA12 | mDNA12 | 5'-GGGCUUUAAUAAGGAGAAAACACAUGAAGAAGAAGGUCUACGACUACAAGGACGACGACAA GUAAGCUUCG-3' |
| mRNA13 | mDNA13 | 5'-GGGCUUUAAUAAGGAGAAAACACAUGAAGAAGAAGACAAAUUUCGGUAUCCGUGCCUCUGUCAU GGAAUGGCAACUGCUCCAUCCAUACGACUACAAGGACGACGACAAGUAAGCUUCG-3' |
| mRNA14 | mDNA14 | 5'-GGGCUUUAAUAAGGAGAAAACACAUGAAGAAGAAGGCUCCAUAUGUUGGUCACAGAAGCGUGCCCCAGACUACAAGGACGACGACAAGUAAGCUUCG-3' |

[0056]

[表7]

| Name | Corresponding mRNA | Extension | | 1st PCR | | 2nd PCR | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Forward primer | Reverse primer | Forward primer | Reverse primer | Forward primer | Reverse primer |
| mRNA12 | mDNA12 | O-258 | O-259 | O-199 | O-260 | - | - |
| mRNA13 | mDNA13 | O-261 | O-262 | O-258 | O-263 | O-199 | O-260 |
| mRNA14 | mDNA14 | O-264 | O-265 | O-258 | O-263 | O-199 | O-260 |

[0057] 表３に記載の塩基配列は、それぞれ順に、配列番号８～７８に該当する。

また、表４に記載の塩基配列は、それぞれ、配列番号７９～１２２に該当す

る。本発明のｔＲＮＡの塩基配列は、表４において、Ｎｏ．３又はＮｏ．４として記載される塩基配列を有していてもよい。

[0058] 屈曲体によるアミノアシルｔＲＮＡの合成

適切なエステル基（Ｐｈｅ－ＣＭＥ、Ｔｙｒ－ＣＭＥ、Ｓｅｒ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｇ－ＤＢＥ、Ｍｅ　Ｓ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ａ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｆ－ＣＭＥ、$^{Me}$Ｌ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｍ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｔ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｙ－ＣＭＥ、$^{Me}$Ｄ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｖ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｎ Ｉ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｙｍ－ＣＭＥ、$^{Me}$Ｎｖ－ＤＢＥ及び$^{Ac}$Ｋ－ＤＢＥ；ここで、ＣＭＥは、シアノメチルエステルを、ＤＢＥは、３，５－ジニトロベンジルエステルを意味する。）で活性化されたアミノ酸を、非特許文献１３及び１５並びに参考文献３に記載の方法に従って合成した。

アミノアシルｔＲＮＡを、以下のようにして調製した： ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA ４２μＭのｔＲＮＡと４２μＭのフレキシザイム（ＣＭＥ活性化アミノ酸についてはｅＦｘ、ＤＢＥ活性化アミノ酸についてはｄＦｘ）を含む１２μＬのＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ緩衝液（ｐＨ７．５、８３ｍＭ）を９５℃で２分間加熱し、５分間２５℃に冷却した。３Ｍ　ＭｇＣｌ$_2$（４μＬ）を添加し、混合物を２５℃で５分間インキュベートした。

反応は、２５ｍＭ　ＤＭＳＯ（４μＬ）中の活性化アミノ酸基質の添加によって開始し、氷上でアシル化（インキュベーション時間：Ｐｈｅ－ＣＭＥ、Ｔｙｒ－ＣＭＥ、$^{Me}$Ｇ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ａ－ＤＢＥ及び$^{Ac}$Ｋ－ＤＢＥについては２時間；Ｓｅｒ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｓ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｆ－ＣＭＥ、$^{Me}$Ｌ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｍ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｍ－ＤＢＥ及び$^{Me}$Ｙｍ－ＣＭＥについては６時間；$^{Me}$Ｔ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｄ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｖ－ＤＢＥ、$^{Me}$Ｖ－ＤＢＥ$^{Me}$Ｎ Ｉ－ＤＢＥ及び$^{Me}$Ｎｖ－ＤＢＥについては１０時間）のためにインキュベートした。アシル化後、反応を８０μＬの０．３Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）の添加により停止し、ＲＮＡをエタノール沈殿により沈殿させた。ペレットを０．１Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）を含む７０％エタノールで２回洗浄し、７０％エタノールで１回洗浄した。得られたアミノアシルｔＲＮＡを、翻訳溶液に添加する直前に１ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）に溶解した。

[0059] フレキシザイム触媒によるアミノアシル化の効率の測定

ｐＡＡ又はｎｐＡＡで予めチャージしたエタノール沈殿５０ｐｍｏｌ　ｔＲＮＡのペレットを、０．５２μＬの１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）に溶解し、酸性ＰＡＧＥ充填緩衝液（８３％（ｖ／ｖ）ホルムアミド、１５０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）及び１０ｍＭ　ＥＤＴＡ）５．０μＬと混合した。溶液を酸変性ポリアクリルアミドゲル（１２％（ｗ／ｖ）アクリルアミド／ビスアクリルアミド（１９：１）、８Ｍ尿素及び５０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２））に負荷し、３００Ｖ（約１０Ｖ／ｃｍ）で２０時間電気泳動を行った。ゲルを臭化エチジウムで染色し、Ｔｙｐｈｏｏｎ　ＦＬＡ　７０００（ＧＥヘルスケア）を用いて分析した。アミノアシル化効率は、アミノアシルｔＲＮＡ（Ａ）及び遊離ｔＲＮＡ（Ｔ）のバンド強度に基づいて計算され、（Ａ）／［（Ａ）＋（Ｔ）］として表した。

[0060] ｔＲＮＡの５′末端または３′末端の放射性標識

ｔＲＮＡの５′末端を、以下のようにして放射性標識した：４μＬの脱リン酸化反応混合物（１μＭ　ｔＲＮＡ、５０ｍＭ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ－Ｐｒｏｐａｎｅ－ＨＣｌ（ｐＨ６．０）、１ｍＭ　$MgCl_2$、０．１ｍＭ　$ZnCl_2$及び０．５Ｕ　アンタークティックホスファターゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ））を３７℃で３０分間インキュベートした後、７０℃で５分間インキュベートした。溶液（４μＬ）を、９．１μＬの水、２．０μＬの１０×緩衝液（７００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６）、１００ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　ＤＴＴ）、２．９μＬの１．７μＭ　［$\gamma$－$^{32}$Ｐ］－ＡＴＰ及び２．０μＬの１０Ｕ／μＬ　Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）と混合した。得られた２０μＬのキナーゼ反応混合物を３７℃で６０分間インキュベートした。$^{32}$Ｐ標識ｔＲＮＡ（４ｐｍｏｌ）を非標識ｔＲＮＡ（１２１ｐｍｏｌ）と混合した。ｔＲＮＡをフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製し、次いで１０μＬの水に溶解した。ｔＲＮＡの濃度は、５０倍希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。

ｔＲＮＡの３′末端を、以下のようにして放射性標識した：３′末端アデノシンを欠く７．５μＬの１６．７μＭ　ｔＲＮＡを８０℃で３分間インキュベートした後、氷上に１０分間置いた。２５μＬのＣＣＡ添加反応混合物（１２０ｍＭのＧｌｙ－ＮａＯＨ（ｐＨ９．０）、７５ｍＭ　$MgCl_2$、３０ｍＭ　ＤＴＴ、上記で調製した３′末端アデノシンを欠く５μＭのｔＲＮＡ、１０ｍＭ　非放射性標識ＡＴＰ、０．６７μＭ［$\alpha$－$^{32}$Ｐ］－ＡＴＰ及び２００ｎＭ　ＣＣＡ添加酵素）を３７℃で２０分間インキュベートした。ｔＲＮＡを、フェノール／クロロホルム抽出、Ｍｉｃｒｏ　Ｂｉｏ－Ｓｐｉｎ　３０カラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）及びエタノール沈殿により精製し、次いで５μＬの水に溶解した。ｔＲＮＡの濃度は１００倍希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。

[0061] ＥＦ－ＴｕとアミノアシルｔＲＮＡ間の親和性の定量

アミノアシルｔＲＮＡは、３′－放射性標識ｔＲＮＡ（１０％）と非放射性標識ｔＲＮＡ（９０％）の混合物を用いてアシル化反応を行った以外は、上記のように調製した。得られたアミノアシルｔＲＮＡペレットを、３．２μＬの１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）に溶解した。アミノアシルｔＲＮＡの濃度を、以下のようにして調整した：０．７μＬのアミノアシルｔＲＮＡ溶液を、６９．３μＬの１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）で１００倍希釈し、ｔＲＮＡ及びフレキシザイムの濃度を希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。アミノアシルｔＲＮＡの濃度は、ｔＲＮＡ濃度及びフレキシザイム触媒アシル化効率に基づいて算出した。アミノアシルｔＲＮＡの濃度を、適切な容量の１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）を加えることによって２．０μＭに調整した。使用の直前に、２．０μＭのアミノアシルｔＲＮＡ溶液を緩衝液Ａ（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ（ｐＨ７．６）、１００ｍＭ　ＫＯＡｃ、１２ｍＭ　$Mg(OAc)_2$、１ｍＭ　ＧＴＰ、１ｍＭ　ＤＴＴ、２０ｍＭクレアチンリン酸、２ｍＭスペルミジン、３ｍＭホスホエノールピルビン酸及び０．１μｇ／μＬウサギ筋肉由来ピルビン酸キナーゼ（Ｓｉｇｍａ）と混合することにより、アミノアシルｔＲＮＡの濃度を１００ｎ

Ｍに調整した。

ＥＦ－Ｔｕ溶液を緩衝液Ａ中で３７℃で３０分間インキュベートすることにより、ＧＤＰ結合形態で保存したＥＦ－ＴｕをＧＴＰ結合形態に変換した。通常１．５ｎＭ～２５μＭの範囲の異なる濃度のＥＦ－Ｔｕを含む各試料は、氷上で２倍の連続希釈により調製した。９．６μＬのＥＦ－Ｔｕ溶液を２．４μＬの１００ｎＭアミノアシルｔＲＮＡと混合し、氷上で２０分間インキュベートした。平衡結合条件下で、各溶液１０μＬを氷上で１ｍｇ／ｍＬ　ＲＮアーゼＡ（Ｓｉｇｍａ）１μＬと混合した。２０秒後、０．１ｍｇ／ｍＬの未分画酵母ｔＲＮＡを含む１０％（ｖ／ｖ）トリクロロ酢酸（ＴＣＡ）５０μＬを氷上に添加することにより反応をクエンチした。沈殿物をＢｉｏ－Ｄｏｔ精密濾過装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）に組み立てた０．４５μＭ孔径のニトロセルロース膜を用いて濾過し、５％（ｖ／ｖ）ＴＣＡ２００μＬで６回洗浄した。膜を９５％　（ｖ／ｖ）エタノールに５分間浸漬し、乾燥した膜をＴｙｐｈｏｏｎ　ＦＬＡ　７０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いたオートラジオグラフィーにより分析した。ＲＮアーゼＡによる２０秒の処理後に残るであろうアミノアシルｔＲＮＡ由来のバックグラウンドシグナルを補正するために、ＥＦ－Ｔｕなしを対照として並行して分析して、その放射活性を実験データから差し引いた。得られた放射活性を、２０、４、０．８及び０．１６ｎＭのｔＲＮＡを含む緩衝液Ａ中の較正アミノアシルｔＲＮＡ試料によって決定した変換係数を用いて、三元複合体の濃度に変換した。平衡解離定数は、ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈプログラム（Ｈｕｌｉｎｋｓ）を用いて結合データを次式（３）に適合させることによって決定した。

$K_D$式は次のように定義される。ａａｔＲＮＡ、ＥＦＴｕ及びａａｔＲＮＡ・ＥＦＴｕは、それぞれアミノアシルｔＲＮＡ、ＥＦ－Ｔｕ及びそれらの複合体を表す。

[0062] 式（１）

[数1]

$$K_D = \frac{[\mathrm{aatRNA}]_{eq} \times [\mathrm{EFTu}]_{eq}}{[\mathrm{aatRNA \cdot EFTu}]_{eq}}$$

[0063] 式（２）

[数2]

$$K_D = \frac{([\mathrm{aatRNA}]_{input} - [\mathrm{aatRNA \cdot EFTu}]_{eq}) \times ([\mathrm{EFTu}]_{input} - [\mathrm{aatRNA \cdot EFTu}]_{eq})}{[\mathrm{aatRNA \cdot EFTu}]_{eq}}$$

[0064] 式（３）

[数3]

$$[\mathrm{aatRNA \cdot EFTu}]_{eq} = \frac{\left([\mathrm{aatRNA}]_{input} + [\mathrm{EFTu}]_{input} + K_D - \sqrt{([\mathrm{aatRNA}]_{input} + [\mathrm{EFTu}]_{input} + K_D)^2 - 4 \times [\mathrm{aatRNA}]_{input} \times [\mathrm{EFTu}]_{input}}\right)}{2}$$

[0065] アミノアシルｔＲＮＡの濃度は多段階調製のため各実験でわずかに変動したので、$K_D$とアミノアシルｔＲＮＡ濃度は適合解析の変数として設定した。

[0066] ｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳

再構成した無細胞翻訳系（参考文献４）は、ＲＦ１を除く翻訳に必要なすべての成分を含んでいた。翻訳成分の濃度は、各図について特段の記載をしない限り、以下のように最適化されている（参考文献２）：５０　ｍＭ　ＨＥＰＥＳ－ＫＯＨ（ｐＨ７．６）、１００ｍＭ　ＫＯＡｃ、２ｍＭ　ＧＴＰ、２ｍＭ　ＡＴＰ、１ｍＭ　ＣＴＰ、１ｍＭ　ＵＴＰ、２０ｍＭ　クレアチンリン酸、１２－２０ｍＭ　Ｍｇ（ＯＡｃ）$_2$、２ｍＭ　スペルミジン、１ｍＭ　ＤＴＴ、１００μＭ　１０－ホルミル－５，６，７，８－テトラ葉酸、１．２μＭ　リボソーム、２．７μＭ　ＩＦ１、０．４μＭ　ＩＦ２、１．５μＭ　ＩＦ３、１０μＭ　ＥＦ－Ｔｕ、１０μＭ　ＥＦ－Ｔｓ、０．２６μＭ　ＥＦ－Ｇ、０．２５μＭ　ＲＦ２、０．１７μＭ　ＲＦ３、０．５μＭ　ＲＲＦ、０．６μＭ　ＭＴＦ、４μｇ／ｍＬ　クレアチンキナーゼ、３μｇ／ｍＬ　ミオキナーゼ、０．１μＭ　ピロホスファターゼ、０．１μＭ　ヌクレオチド二リン酸キナーゼ、０．１μＭ　Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、０．７３μＭ　ＡｌａＲＳ、０．０３μＭ　ＡｒｇＲＳ、０．３８μＭ　ＡｓｎＲＳ、０．１３μＭ　ＡｓｐＲＳ、０．０２μＭ　ＣｙｓＲＳ、０．０６μＭ　ＧｌｎＲＳ、０．２３μＭ　ＧｌｕＲＳ、０．０９μＭ　Ｇｌｙ

RS、0．02μM HisRS、0．4μM IleRS、0．04μM LeuRS、0．11μM LysRS、0．03μM MetRS、0．68μM PheRS、0．16μM ProRS、0．04μM SerRS、0．09μM ThrRS、0．03μM TrpRS、0．02μM TyrRS、0．02μM ValRS、1．5mg／mL native E．coli tRNA混合物（Roche）、200μM 各3－20のpAA、10－50μM 各npAAでチャージした$tRNA_{Asn}^{E2}$及び各0．25μM mDNA又は6．0μM mRNA。

翻訳産物は、トリシン－SDS－PAGEの後にMALDI－TOF－MS及び／又はオートラジオグラフィーにより分析した。MALDI－TOF－MS分析では、翻訳反応混合物1．0～10μLを37℃で3～120分間インキュベートした。反応後、混合物を同じ容量のFLAG精製緩衝液（100mM Tris－HCl（pH7．6）、300mM NaCl）で希釈した。発現したペプチドを、25℃で1時間インキュベートすることにより、抗FLAG M2アガロースビーズ（Sigma）上に固定化した。25μLの洗浄緩衝液（50mM Tris－HCl（pH7．6）、150mM NaCl）でビーズを洗浄した後、固定化ペプチドを15μLの0．2%TFAで溶出した。精製後、ペプチドをSPE C－チップ（日京テクノス）で脱塩し、マトリックス（R）－cyano－4－ヒドロキシケイ皮酸（Bruker Daltonics）で50%飽和した80%アセトニトリル、0．5%酢酸溶液1μLで溶出した。MALDI－TOF－MS測定は、反射／陽性モードのultraflextreme（Bruker Daltonics）を用いて行い、ペプチド較正標準II（Bruker Daltonics）及び／又はタンパク質較正標準I（Bruker Daltonics）で外部較正した。オートラジオグラフィー分析のために、200μMの非放射性のAspの代わりに50μM ［$^{14}$C］－Aspの存在下で翻訳反応を行った。翻訳生成物を15%トリシン－SDS－PAGE及びTyphoon FLA 7000（GE Healthcare

）を用いたオートラジオグラフィーによってＦＬＡＧ精製なしで分析した。ペプチド生成物の量は、レーンに存在する和強度（すなわち、未反応遊離Ａｓｐ及びペプチド生成物の和強度）に対するペプチド生成物の相対バンド強度に基づいて定量した。

ｍＲＮＡ１２～１４（図２、図４～図７及び図９）の翻訳のために、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡを調製する方法を以下のように変更した。まず、フレキシザイム触媒アシル化後のエタノール沈殿物を、３００μＬの０．３M酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）に溶解し、２回目のエタノール沈殿によって沈殿させた。この沈殿は、共沈したＭｇ塩を洗い流すために行われた。ペレットを、０．１M酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）を含む７０％エタノールで２回洗浄し、７０％エタノールで１回洗浄した。得られたアミノアシルｔＲＮＡを、翻訳溶液に添加する直前に１ｍM酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）に溶解した。アミノアシルｔＲＮＡの濃度を以下のようにして調整した：０．２５μＬのアミノアシルｔＲＮＡ溶液を１２５０μＬの１ｍM酢酸ナトリウム（ｐＨ５．２）で５０００倍希釈し、ｔＲＮＡ及びフレキシザイムの濃度を希釈溶液の$A_{260}$によって測定した。アミノアシルｔＲＮＡの濃度は、ｔＲＮＡ濃度及びフレキザイム触媒アシル化効率に基づいて算出した。

[0067] 多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡが十分な強度でＥＦ－Ｔｕに結合できないことを示す実験的証拠

最初に、標準的ｐＡＡ－ｔＲＮＡと$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性を比較した。対照として、３つの標準的ｐＡＡ－ｔＲＮＡ（Ｐｈｅ－ｔＲＮＡ$^{Phe}$、Ｔｙｒ－ｔＲＮＡ$^{Tyr}$及びＳｅｒ－ｔＲＮＡ$^{Ser}$）を人工アミノアシル化リボザイムであるフレキシザイム（非特許文献１３）の触媒により調製し、それらのＥＦ－Ｔｕ親和性をＲＮアーゼＡ保護アッセイにより定量した。以前に報告されたように、それらは－８～－９．４ｋｃａｌ／ｍｏｌの範囲で類似した親和性を示した（図２ａ）。観察されたアフィニティー値は、以前に報告された値（－９．５～－１０．５ｋｃａｌ／ｍｏｌ）（参考文献５）よりわずかに低かった。差異の原因は、緩衝液組成の差異又は本研究で用いたＥＦ

－ＴｕのＣ末端におけるＨｉｓ６タグの存在に起因すると考えられた。$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性を測定するために、１４種類の$^{Me}$ＡＡを直交ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$にチャージさせ、そのボディシークエンスを内因性ＡＡＲＳ（非特許文献１４、参考文献２及び６）によるアミノアシル化を、フレキシザイム触媒アミノアシル化によって避けるように操作した。標準的なｐＡＡ－ｔＲＮＡとは対照的に、多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$は、$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$、$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$及び$^{Me}$Ａ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を除いて、弱いＥＦ－Ｔｕ親和性の検出不可能なレベルを示した（図２ｂ）。チャージしたアミノ酸のα－アミノ基がＥＦ－Ｔｕ残基からなるポケットに収容されていることを考えると（図２ｃ）、Ｎ－メチ修飾は$^{Me}$ＡＡとポケットの間に立体障害を引き起こし、これによりＥＦ－Ｔｕ親和性が低下すると考えられる。$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$、$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$及び$^{Me}$Ａ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$Ｃの３つの例外は、それらの側鎖（－Ｈ、－ＣＨ３、および－ＯＨ基）をポケットに配置することによって立体障害を緩和する可能性がある。

次に、６種類の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いて、ＦＩＴ（Ｆｌｅｘｉｂｌｅ Ｉｎ ｖｉｔｒｏ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）システム（非特許文献１３－１６並びに参考文献２及び３）と呼ばれる改良ｉｎ ｖｉｔｒｏ翻訳システムを用いて、単一の$^{Me}$ＡＡを含むモデルペプチド（図２ｄ）のリボソーム合成を行った。このシステムは、フレキシザイムの触媒作用によりｎｐＡＡを予めチャージした合成ｔＲＮＡを補足した再構成大腸菌無細胞翻訳システム（参考文献４）に依拠している。ｍＲＮＡテンプレートは、抗ＦＬＡＧ Ｍ２アガロースによる精製後のＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによる翻訳精度を決定するように設計した。ＧＵＣコドンの遺伝コードは、ＦＩＴシステムから対応するＶａｌを除外し、代わりに$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$の１つを補足することによって再プログラムした。強いＥＦ－Ｔｕ親和性を示す$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$と$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いたとき、正しいペプチドがＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳの単一主要ピークとして観察された。一方、弱いＥＦ－Ｔｕ親和性を示す$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いた場合、$^{Me}$ＡＡの代わりにＬｅｕ又はＩＩ

ｅのいずれかを含む望ましくない副生成物が正しいペプチド生成物と共にＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳ中に検出された（図２ｄ）。例外として、$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$は検出可能なレベルのＥＦ－Ｔｕ親和性を示さなかったが、$^{Me}$Ｆについて単一の主要ピークが観察された。補足実験では、副生成物はＩＩｅがＦＩＴシステムで供給されたときのみ観察されるので、誤って取り込まれたアミノ酸はＬｅｕではなくＩＩｅであることが明らかになった（図７）。同様の弱いＥＦ－Ｔｕ親和性と翻訳不正確性は、本研究の一般性を確認するために検討した別のタイプのｎｐＡＡ、ε－Ｎ－アセチルリジン（$^{Ac}$Ｋ）で観察された（図２ｂ及び図２ｄ）。まとめると、本実験は、多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$のＥＦ－Ｔｕ親和性は、標準的なｐＡＡ－ｔＲＮＡの平均値よりもはるかに弱く、弱いＥＦ－Ｔｕ親和性は、しばしばリボソームポリペプチド合成の間の翻訳不正確さを引き起こすことを示した。

[0068] $^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性を強化する方法の開発

多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡが十分な強度でＥＦ－Ｔｕに結合できないという事実が発見されたことから、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性を強化する新しい方法を開発することが奨励された。ＥＦ－ＴｕとＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{Phe}$間の結合親和性は、そのＴステム配列に依存して変化することが報告されている（参考文献７）から、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性は、異なるＴステム配列を使用することによって変化し得るのではないかと、本発明者らは考えた。本思考に基づき、３つのＴステム配列（ＴステムＮｏ．１、Ｎｏ．３及びＮｏ．４）を選択した（図３ａ、参考文献７）。図３ａにおいて示す、当初のＴステムはＴステムＮｏ．２とした。以前の研究に基づき、本発明者らは、これら４つの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性は、Ｔステム数がＮｏ．１、２、４と増加するにつれて増加すると考察した。

Ｐｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いて、Ｔステム置換による親和性強化の実行可能性を確認した。Ｐｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$のＴステム配列を他のＴステム配列と置き換えると、ＥＦ－Ｔｕ親和性は予期した順序に従って変化した（図３ｂ）。$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$においても、Ｔステム配列

Ｎｏ．２、Ｎｏ．３及びＮｏ．４のＥＦ－Ｔｕ親和性に同様の変化が認められた（図３ｃ）。非チャージのｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いた対照実験により、これらのｔＲＮＡはアミノ酸をチャージしない限りＥＦ－Ｔｕに結合しないことが明らかになった（図８）。

翻訳精度及び効率におよぼすＥＦ－Ｔｕ親和性強化の効果をＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$及び$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$を用いて調べた。ｍＲＮＡテンプレートは、トリシン－ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Ｃ末端ＦＬＡＧペプチド領域における［$^{14}$Ｃ］－Ａｓｐのオートラジオグラフィー検出）によってペプチド発現レベルを決定するように設計され、解読の精度は抗ＦＬＡＧ　Ｍ２アガロースによる精製後にＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって評価した（図４ａ及び図４ｂ）。ＴステムＮｏ．１を用いた場合、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳにおいてＰｈｅと$^{Me}$Ｆの代わりにＩｌｅを含む副産物が観察されたが、比較的強力なＴステムを有するｔＲＮＡを使用すると、正しいペプチドのみが得られた（図４ａ及び図４ｂ）。Ｉｌｅを含まないＦＩＴ系を用いてＰｈｅ含有ペプチドの翻訳効率を定量すると、合成速度はＥＦ－Ｔｕ親和性が増加するにつれて減少した（図４ｃ）。合成速度の低下の原因は、（１）より強いＴステムを有するＰｈｅ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$がＥＦ－Ｔｕに優勢に結合し、正準ｐＡＡ－ｔＲＮＡの結合を妨げ、全長ペプチドの合成速度を低下させるか、あるいは（２）ＥＦ－Ｔｕと置換されたＴステムとの間のあまりに強い相互作用が、以前の研究で観察されたように、ＥＦ－ＴｕからリボソームへのアミノアシルｔＲＮＡの迅速な送達を妨げるかもしれないという仮説（参考文献８及び９）が原因であると考えられる。正確な理由を特定するためには、さらなる調査が必要である。$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$の場合、ＴステムＮｏ．２及びＮｏ．３の使用は、ＴステムＮｏ．１又はＮｏ．４（図４ｄ）と比較して、最速の合成速度を示した。このことは、ＴステムＮｏ．１が$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$には弱すぎることを示唆している。まとめると、本結果は、アミノアシルｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性は、Ｔステム置換戦略によって劇的に変化することができ、４つの候補から最良のＴステムを選択することによって翻訳の正確さ及び効

率を改善することができることを実証した。翻訳精度に及ぼすＥＦ－Ｔｕ親和性の影響を、他の４種類の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$及び$^{Ac}$Ｋ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$についても調べた（図９）。全例において、Ｔステム置換によりＥＦ－Ｔｕ親和性の強化が達成され、従って、翻訳精度は改善された。特に、$^{Me}$Ｌ及び$^{Ac}$Ｋの取り込みの場合、ＴステムＮｏ．２を使用したとき、副生成物が主ピークとして観察されたが、望ましくない副生成物は、ＴステムをＮｏ．４配列に置き換えることによって抑制された。他の８種類の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2}_{GAC}$についても、ＥＦ－Ｔｕ親和性強化が確認された（図１０）。

[0069] <u>$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡに対するＥＦ－Ｔｕ親和性チューニングを介した高次にＮ－メチル化されたペプチドの発現</u>

ＥＦ－Ｔｕ親和性チューニング戦略により改良されたＮ－メチルペプチド合成を実証するために、次に、６つの異なる$^{Me}$ＡＡを含む高次にＮ－メチル化されたペプチドを発現することを試みた。本実験では２つの改良を行った。まず、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性を、個々の$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡに適したＴステム配列を選択することにより、ｐＡＡ－ｔＲＮＡの範囲に調整した（図５ａ）。この条件下では、ＥＦ－ＴｕはすべてのｐＡＡ－ｔＲＮＡ及び$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡに同等の親和性をもって結合することができる。第二に、各$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの濃度を、フレキシザイム触媒アシル化効率（典型的には２０～５０％）に基づいて調整し、予めチャージした$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの濃度を１０μＭに調整した；一方、従来の方法では、$^{Me}$ＡＡで予めチャージした各ｔＲＮＡをアシル化効率を考慮せずに５０μＭ添加した（図５ｂ）。本実験では、１４のｐＡＡと共に６の$^{Me}$ＡＡからなるモデルペプチドをＦＩＴ系で発現させ、５つのｐＡＡ（Ｐｈｅ、Ｌｅｕ、ＩＩｅ、Ｖａｌ及びＡｌａ）を除外し、その代わりに、６つの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ（$^{Me}$Ｙ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{GAA}$、$^{Me}$Ａ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{GAU}$、$^{Me}$Ｆ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS3}_{GGC}$、$^{Me}$Ｖ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS1}_{GAC}$、$^{Me}$Ｇ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS5}_{CAG}$及び$^{Me}$Ｓ－ｔＲＮＡ$^{AsnE2TS5}_{GAG}$）を用いた（図５ｃ及び図５ｄ）。翻訳を従来のシステム（参考文献６）で行うと、$^{Me}$ＡＡの代わりにｐＡＡを含む所望のペプチドおよび種々の副産物の混合物を合成し、混合物の発現レベル

は合計で０．７μＭであった（図５ｅ及び図５ｆ）。他方、本研究で開発した最適化システムは、１．８μＭの発現レベルが改善された所望のペプチドのみを生み出した。この結果は、翻訳障害の原因が$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ親和性の不足に起因する可能性があり、親和性チューニング戦略はＮ－メチルペプチドの合成効率と精度を劇的に改善できることを示した。

次に、$^{Me}$ＡＡの種類をさらに９つに増やし、９の異なる$^{Me}$ＡＡｓと１４のｐＡＡからなる３２－ｍｅｒモデルペプチドＰ１４を発現させた（図６ａ－図６ｃ）。本実験では、非天然の側鎖を有する３種類の$^{Me}$ＡＡをレパートリーに加えた。２０のｐＡＡを用いた対照翻訳と比較して、９のＮ－メチル修飾を有するＰ１４ペプチドは、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによって確認されるように維持された翻訳精度を有する対照に対して３４％の効率で発現された（図６ｄ及び図６ｅ）。これらの結果は、ＥＦ－Ｔｕ親和性チューニング戦略が、同時に使用できる$^{Me}$ＡＡの種類を最大９まで劇的に拡大し、高度にＮ－メチル化されたペプチドを発現することを可能にすることを実証した。

[0070] 本実施例の結果において示したとおり、本発明により、多種類の$^{Me}$ＡＡを含む非標準ペプチドのリボソーム合成を達成する新しい方法を提供することができる。

最初に、本実施例において、ＥＦ－Ｔｕと多くの$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ間の結合親和性が弱いことを定量的に実証した（図２）。このことは、非効率的な$^{Me}$ＡＡ取込みの原因は$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡのリボソームへのＥＦ－Ｔｕ媒介送達の障害に起因するという我々の仮説を支持した。また、本実施例において、$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡの弱いＥＦ－Ｔｕ親和性が、Ｔステム置換戦略によって強化され得ることを示した（図３、図９及び図１０）。特に、ＥＦ－Ｔｕ結合親和性を強すぎる値に変化させると、対応するペプチドの合成効率が低下した（図４）。これは、ｐＡＡｓおよび蛍光ｎｐＡＡを調べた以前の報告と一致した（参考文献８及び９）。

ＥＦ－Ｔｕと各$^{Me}$ＡＡ－ｔＲＮＡ間の親和性の調整は、６の異なる$^{Me}$ＡＡを含むモデルペプチドの合成効率と精度を改善することに成功した（図５）。

さらに、開発した翻訳システムは、９種類もの異なるMeＡＡを含む高Ｎ－メチル化ペプチドの合成も達成した（図６）。これにより、同時に使用可能なMeＡＡの種類は３から９に拡大した（参考文献６及び１０）。特に、９種類のMeＡＡは、リボソームポリペプチド合成の不適合基質として報告されているMeＶを含む（参考文献３）。さらに、本実施例により達成された２４の構成ブロック（１５のｐＡＡｓ及び９のMeＡＡ）の多様性は、２３種（２０のｐＡＡｓ及び３のｎｐＡＡ）（参考文献１１及び１２）の以前の限界を克服した。これらの本実施例により示される事実は、高Ｎ－メチル化ペプチドの合成効率と精度の改善を明確に実証した。

ｎｐＡＡ取込みの非効率は、（１）対応するｎｐＡＡ－ｔＲＮＡのＥＦ－Ｔｕ媒介デリバリーの障害、（２）ｎｐＡＡが関与するゆっくりしたペプチジル転移反応、及び（３）出口トンネルを通るｎｐＡＡを含有する新生ポリペプチドの排出の障害に起因すると考えられる。従来技術においては、どのプロセスが非効率化に関する真の原因であるかは同定されていなかったが、本発明により、MeＡＡ－ｔＲＮＡの不十分なＥＦ－Ｔｕ親和性を調整することによって、Ｎ－メチル化ペプチドの合成効率と精度を劇的に改善することができることが示された。この事実は、同じ戦略が、MeＡＡと同様に、豊富な多様なｎｐＡＡの効率的な取り込みを促進できることを意味する。このような例は、本実施例においてAcＫについて実証されている（図９）。

本発明によるペプチド翻訳システムは、充分な精度と効率で高Ｎ－メチル化ペプチドライブラリを合成することを可能にする。このようなペプチドライブラリとペプチドスクリーニング技術との統合は、将来、望ましい薬理学的特性を有する実用的な非標準ペプチド薬剤の発見を促進することが期待される。

[0071] 参考文献１　Nissen, P. et al. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. Science 270, 1464-1472 (1995).

参考文献２　Goto, Y., Katoh, T. & Suga, H. Flexizymes for genetic cod

e reprogramming. Nat Protoc 6, 779-790, doi:10.1038/nprot.2011.331 (2011).

参考文献３　Kawakami, T., Murakami, H. & Suga, H. Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. Chem. Biol. 15, 32-42, doi:10.1016/j.chembiol.2007.12.008 (2008).

参考文献４　Shimizu, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. Nat. Biotechnol. 19, 751-755, doi:10.1038/90802 (2001).

参考文献５　LaRiviere, F. J., Wolfson, A. D. & Uhlenbeck, O. C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. Science 294, 165-168, doi:10.1126/science.1064242 (2001).

参考文献６　Yamagishi, Y. et al. Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. Chem. Biol. 18, 1562-1570, doi:10.1016/j.chembiol.2011.09.013 (2011).

参考文献７　Schrader, J. M., Chapman, S. J. & Uhlenbeck, O. C. Understanding the sequence specificity of tRNA binding to elongation factor Tu using tRNA mutagenesis. J. Mol. Biol. 386, 1255-1264 (2009).

参考文献８　Schrader, J. M., Chapman, S. J. & Uhlenbeck, O. C. Tuning the affinity of aminoacyl-tRNA to elongation factor Tu for optimal decoding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 5215-5220, doi:10.1073/pnas.1102128108 (2011).

参考文献９　Mittelstaet, J., Konevega, A. L. & Rodnina, M. V. A kinetic safety gate controlling the delivery of unnatural amino acids to the ribosome. J. Am. Chem. Soc. 135, 17031-17038, doi:10.1021/ja407511

q (2013).

参考文献１０　Subtelny, A. O., Hartman, M. C. & Szostak, J. W. Ribosomal synthesis of N-methyl peptides. J. Am. Chem. Soc. 130, 6131-6136, doi:10.1021/ja710016v (2008).

参考文献１１　Ohtsuki, T., Manabe, T. & Sisido, M. Multiple incorporation of non-natural amino acids into a single protein using tRNAs with non-standard structures. FEBS Lett. 579, 6769-6774, doi:10.1016/j.febslet.2005.11.010 (2005).

参考文献１２　Iwane, Y. et al. Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes. Nat Chem 8, 317-325, doi:10.1038/nchem.2446 (2016).

## 配列表フリーテキスト

[0072]　配列番号１、２及び４～６は、Ｔアームの塩基配列を示す。

配列番号３は、Ｔループの塩基配列を示す。

配列番号１２３～１２５は、表６に記載のｍＲＮＡの塩基配列を示す。

配列番号１２６～１２８は、図中で記載する翻訳される領域にあたるｍＲＮＡの塩基配列を示す。

配列番号１２９～１３３は、翻訳されたペプチドのアミノ酸配列を示す。

配列番号１３４～１３６は、Ｄアームの塩基配列を示す。

# 請求の範囲

[請求項1] $N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有する、Ｎ－メチルアミノ酸をコードするｔＲＮＡ。
（$N_1$はＧ又はＡであり、$N_2$及び$N_5$は一方がＧであり、他方がＣであり、$N_3$及び$N_4$は対合する任意のアミノ酸である。）

[請求項2] 請求項１に記載のｔＲＮＡ及びＥＦ－Ｔｕタンパク質を含む、翻訳系。

[請求項3] 請求項１に記載のｔＲＮＡ又は請求項２に記載の翻訳系を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドライブラリの製造方法。

[請求項4] 請求項１に記載のｔＲＮＡ又は請求項２に記載の翻訳系を用いて、無細胞翻訳系で翻訳する工程を含む、ペプチドと該ペプチドをコードするｍＲＮＡとの複合体ライブラリの製造方法。

[請求項5] 請求項１に記載のｔＲＮＡ又は請求項２に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前に$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、$N_1N_2GGN_3$及び$N_4CCN_5U$が対合するＴステムを有する以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、請求項３又は４に記載の製造方法。

[請求項6] 請求項１に記載のｔＲＮＡ又は請求項２に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前にＡＧＧＧ$N_3$及び$N_4CCCU$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡ並びにＧＣＧＧ$N_3$及び$N_4CCGU$が対合するＴステムを有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、請求項５に記載の製造方法。

[請求項7] 請求項１に記載のｔＲＮＡ又は請求項２に記載の翻訳系を準備する工程を含み、当該準備する工程において、Ｎ－メチルアミノ酸をチャージする前にＡＧＧＧＧ$(N_4)_m$ＣＣＣＣＵ（配列番号１）を有する

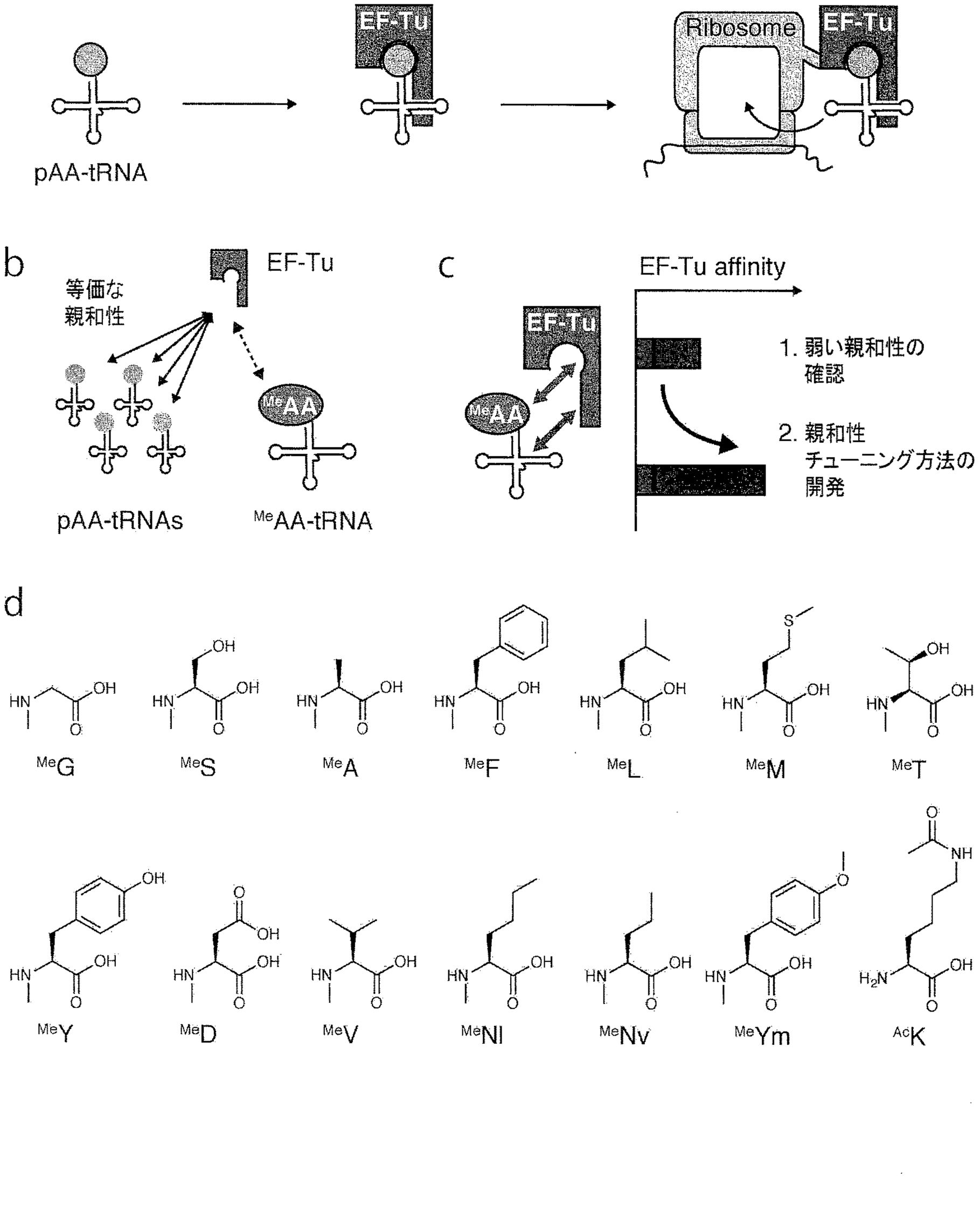
ｔＲＮＡ及びＧＣＧＧＧ（$N_4$）$_m$ＣＣＣＧＵ（配列番号２）を有するｔＲＮＡであるか、それら以外のｔＲＮＡにチャージすることを決定する、請求項５に記載の製造方法。

[請求項8] Ｎ－メチルアミノ酸をチャージしたｔＲＮＡとＥＦ－Ｔｕとの親和性として、ΔＧ（ｋｃａｌ／ｍｏｌ）が－７．５～－１０となるｔＲＮＡを選択して、Ｎ－メチルアミノ酸をｔＲＮＡにチャージする、請求項３～７のいずれか１項に記載の製造方法。

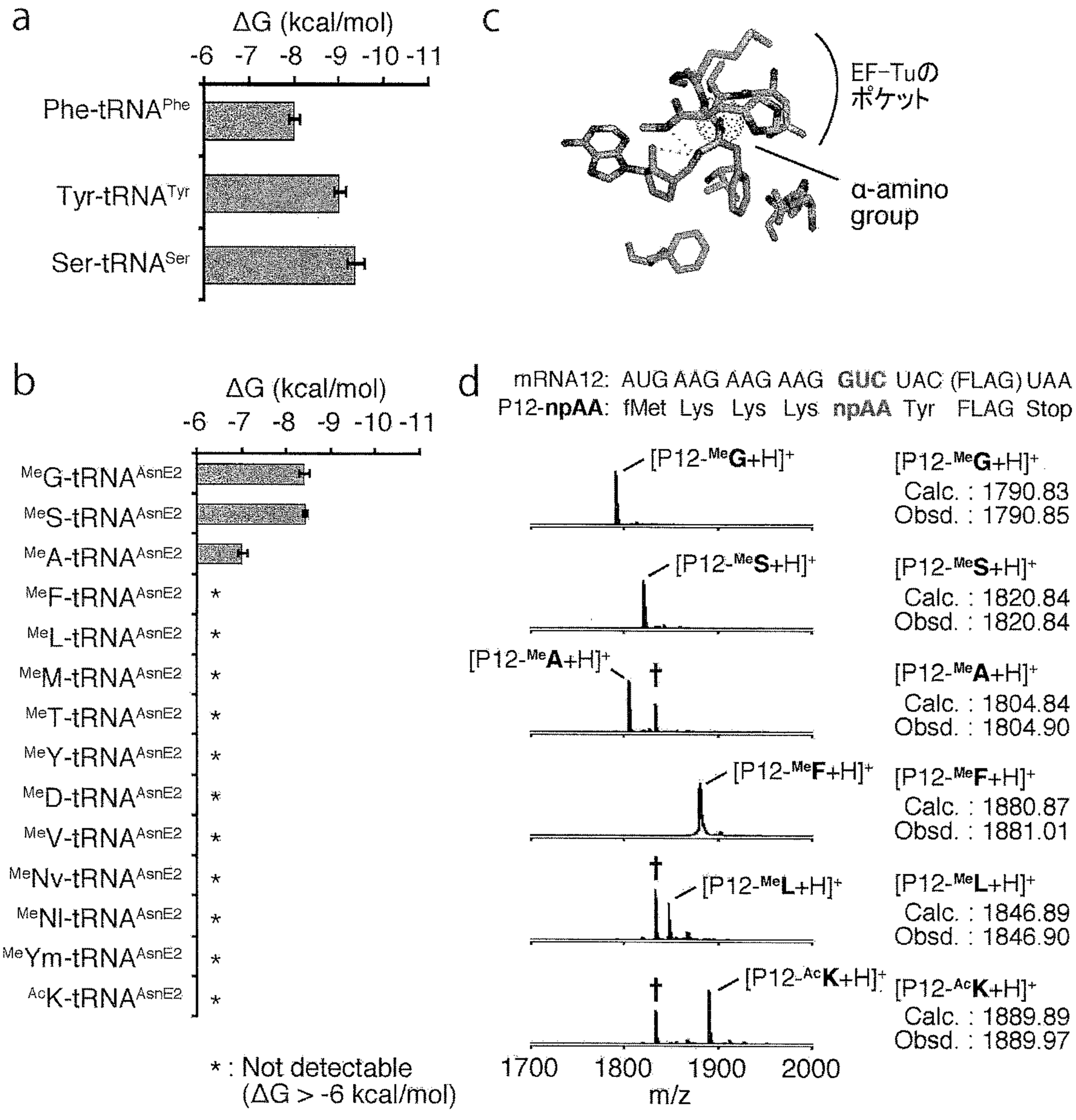
[請求項9] 請求項３、５～８のいずれか１項に記載の方法によって製造されるペプチドライブラリ又は請求項４～８のいずれか１項に記載の方法によって製造されるペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリ。

[請求項10] 同一ペプチド構造内に２以上のＮ－メチルアミノ酸を含むペプチドを含む、請求項９に記載のペプチドライブラリ又はペプチド－ｍＲＮＡ複合体ライブラリ。

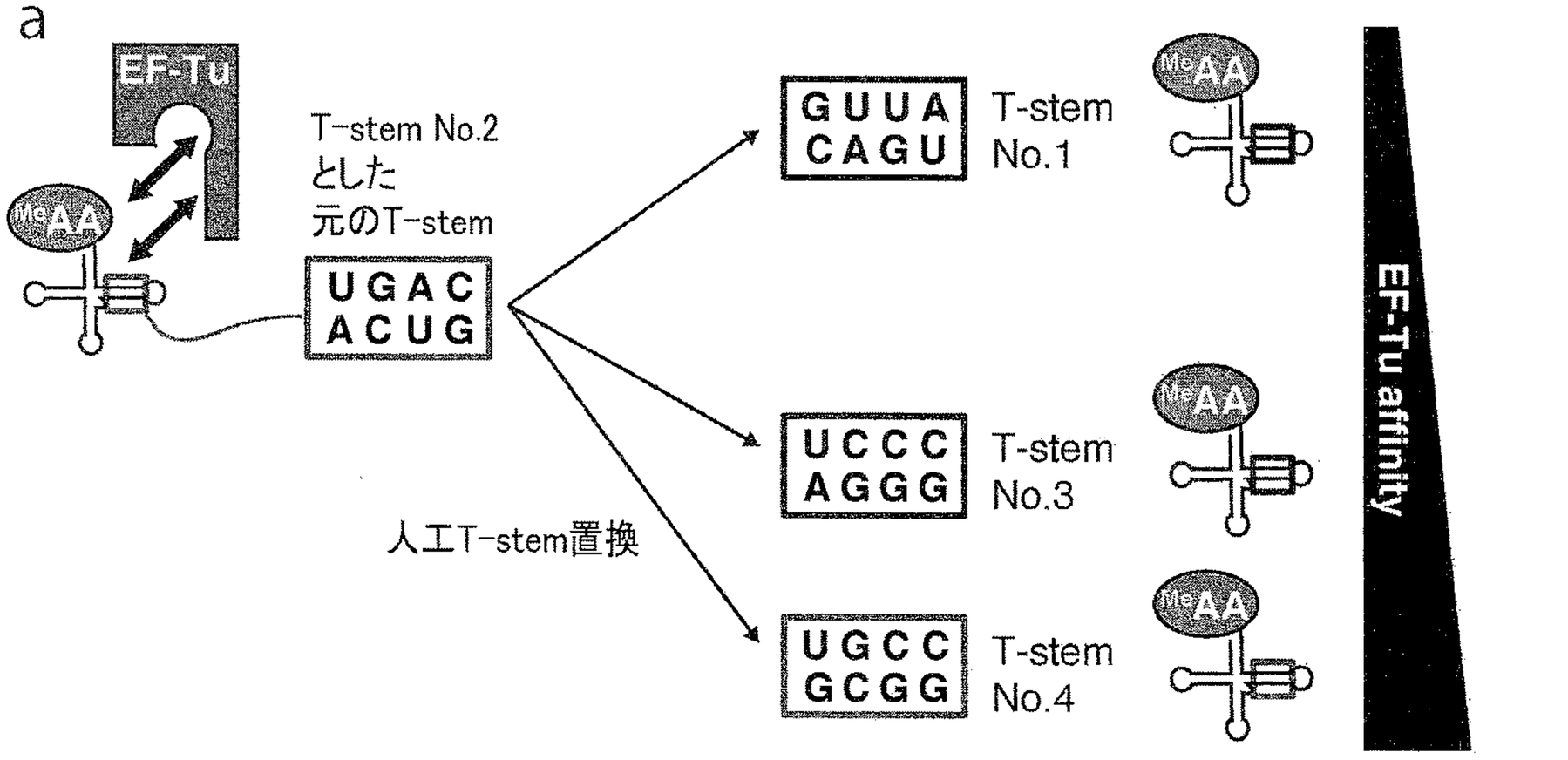
[図 1]

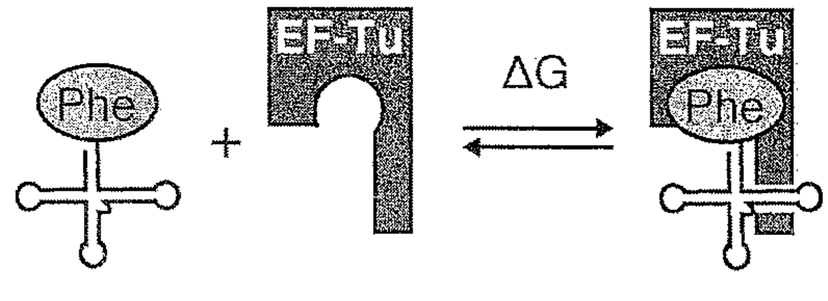

a
EF-Tu
Ribosome
EF-Tu
pAA-tRNA
b
EF-Tu
等価な
親和性
MeAA
pAA-tRNAs
MeAA-tRNA
c
EF-Tu affinity
EF-Tu
MeAA
1. 弱い親和性の
確認
2. 親和性
チューニング方法の
開発
d
MeG
MeS
MeA
MeF
MeL
MeM
MeT
MeY
MeD
MeV
MeNl
MeNv
MeYm
AcK

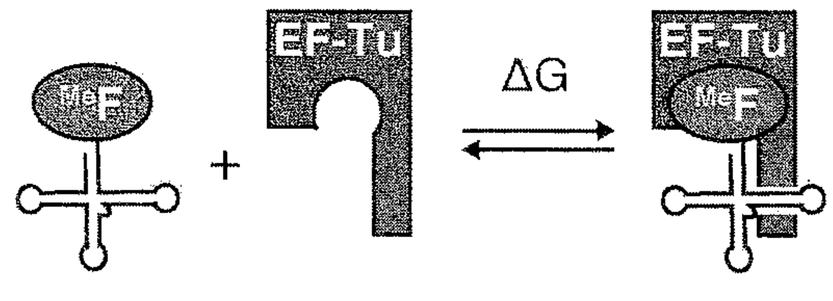
[図 2]

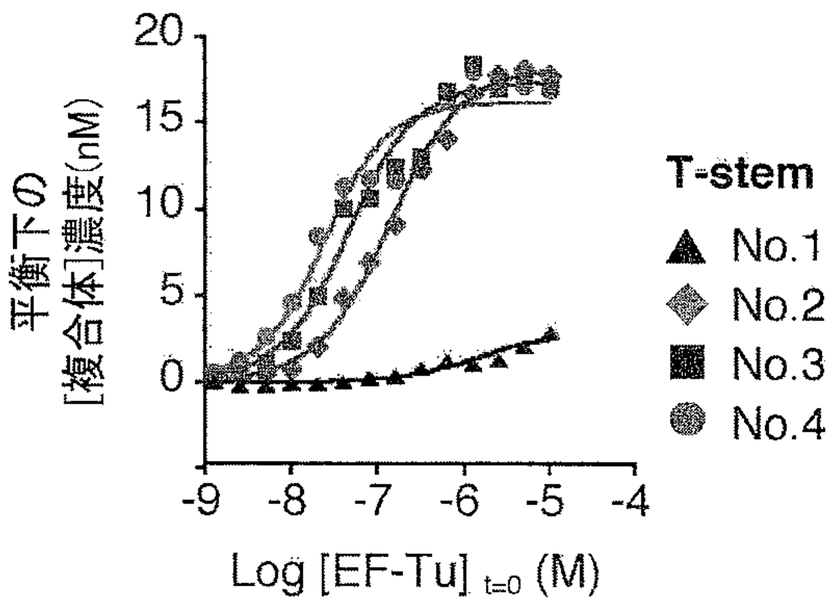

a
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
Phe-tRNA^Phe
Tyr-tRNA^Tyr
Ser-tRNA^Ser
b
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
MeG-tRNA^AsnE2
MeS-tRNA^AsnE2
MeA-tRNA^AsnE2
MeF-tRNA^AsnE2
MeL-tRNA^AsnE2
MeM-tRNA^AsnE2
MeT-tRNA^AsnE2
MeY-tRNA^AsnE2
MeD-tRNA^AsnE2
MeV-tRNA^AsnE2
MeNv-tRNA^AsnE2
MeNl-tRNA^AsnE2
MeYm-tRNA^AsnE2
AcK-tRNA^AsnE2
* : Not detectable
(ΔG > -6 kcal/mol)
c
EF-Tuの
ポケット
α-amino
group
d
mRNA12: AUG AAG AAG AAG GUC UAC (FLAG) UAA
P12-npAA: fMet Lys Lys Lys npAA Tyr FLAG Stop
[P12-MeG+H]+
[P12-MeG+H]+
Calc. : 1790.83
Obsd. : 1790.85
[P12-MeS+H]+
[P12-MeS+H]+
Calc. : 1820.84
Obsd. : 1820.84
[P12-MeA+H]+
[P12-MeA+H]+
Calc. : 1804.84
Obsd. : 1804.90
[P12-MeF+H]+
[P12-MeF+H]+
Calc. : 1880.87
Obsd. : 1881.01
[P12-MeL+H]+
[P12-MeL+H]+
Calc. : 1846.89
Obsd. : 1846.90
[P12-AcK+H]+
[P12-AcK+H]+
Calc. : 1889.89
Obsd. : 1889.97
1700 1800 1900 2000
m/z

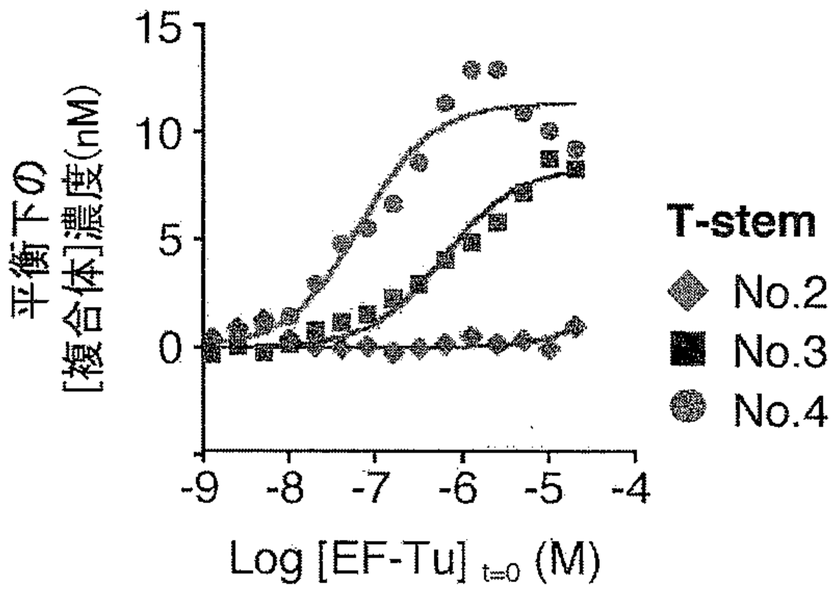
[図 3]

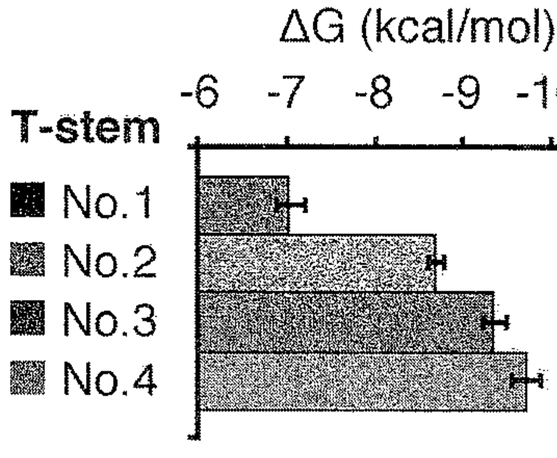


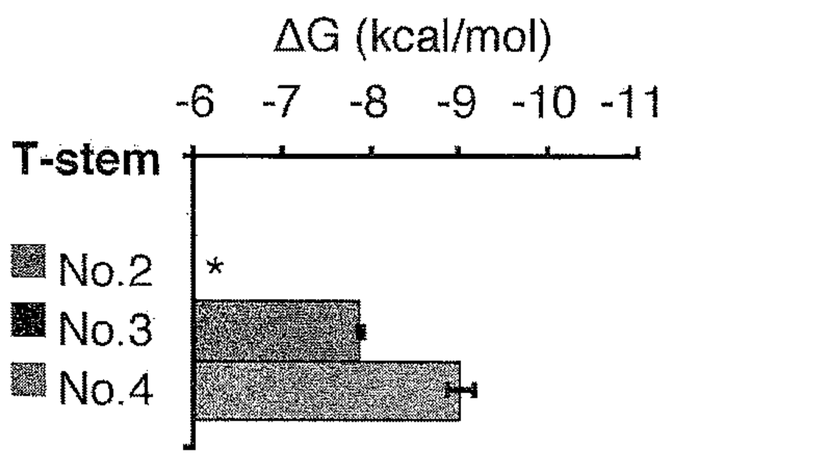



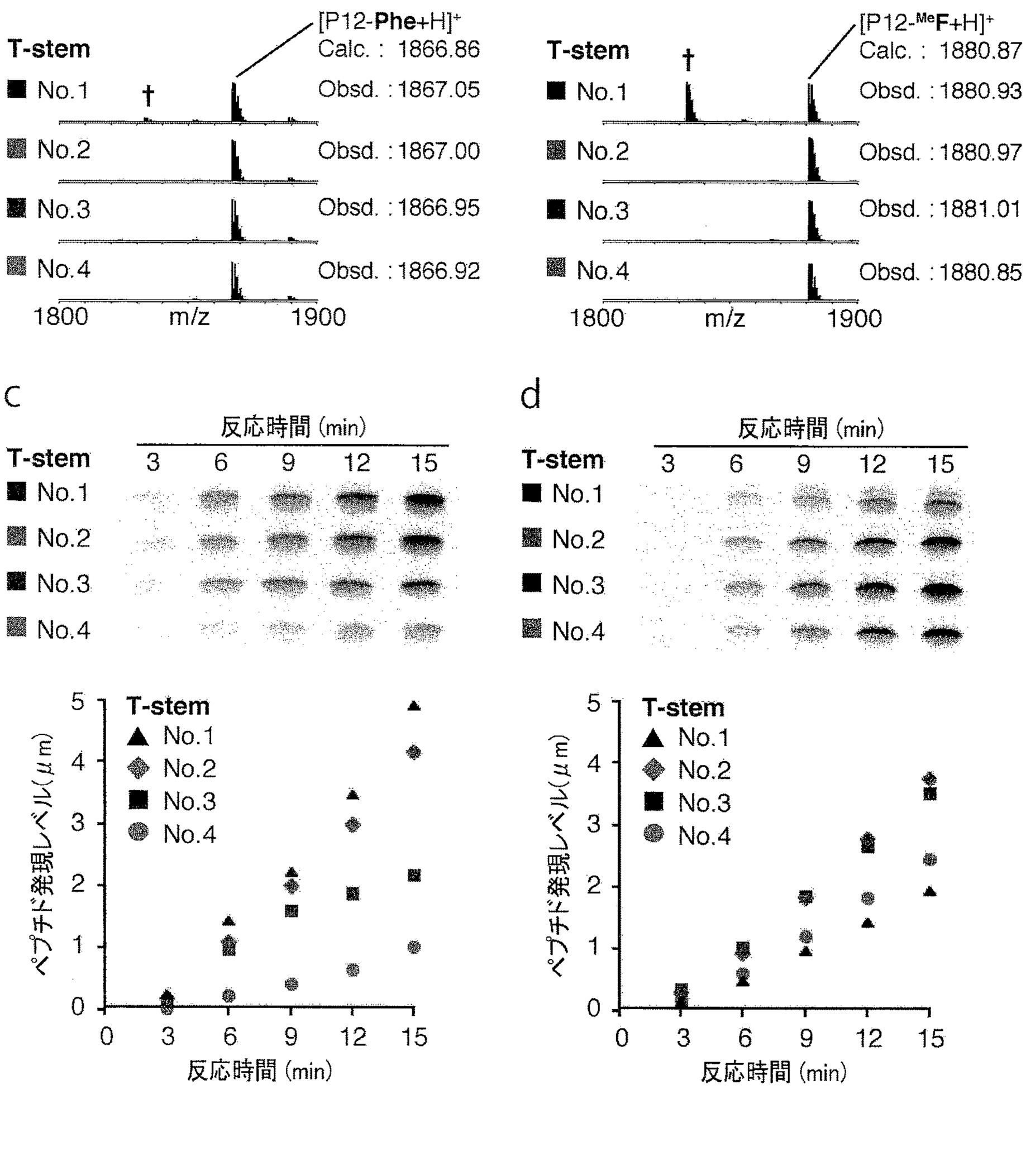



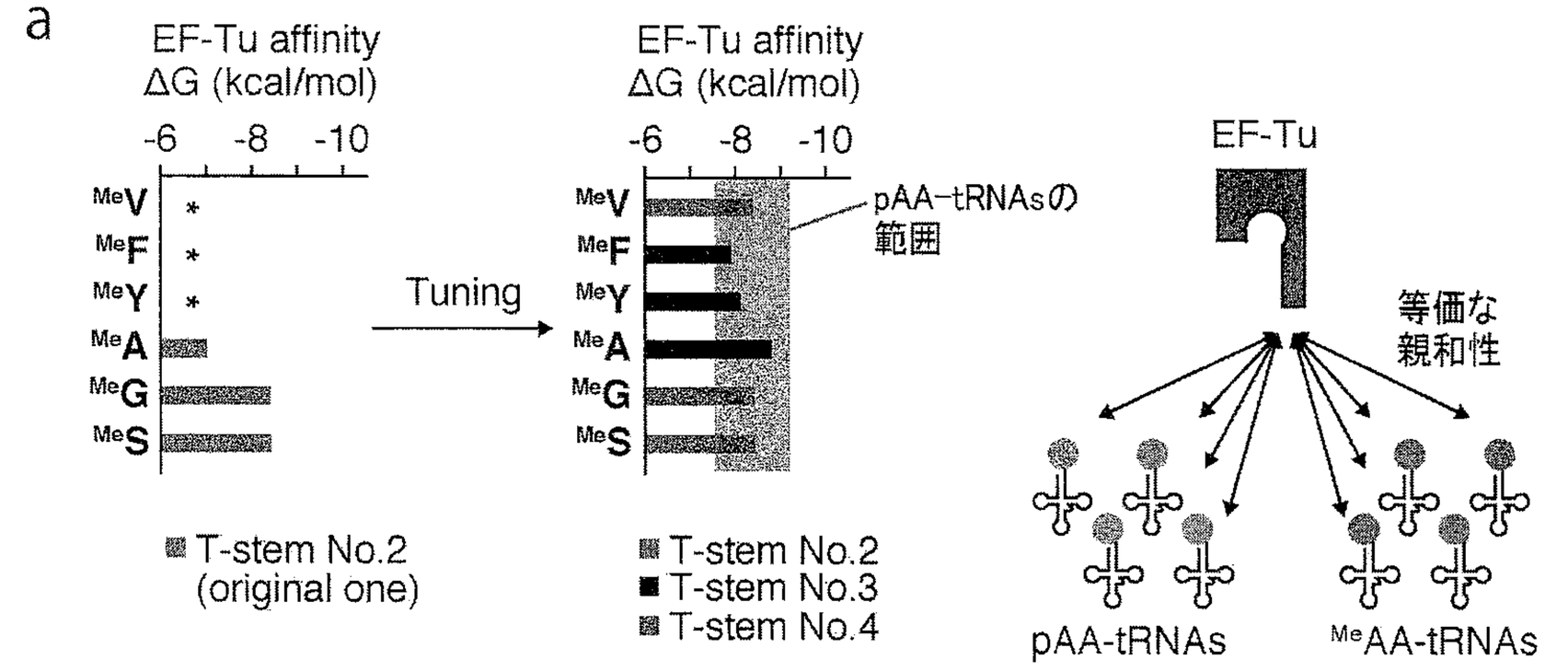



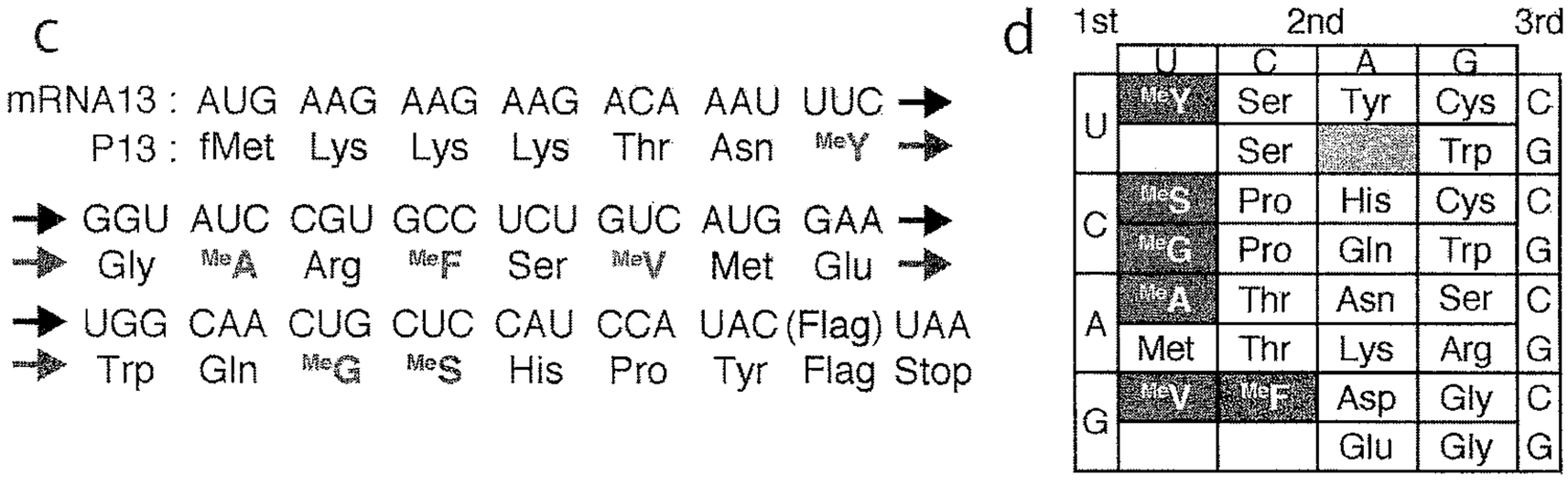

* : Not detectable
(ΔG > -6 kcal/mol)

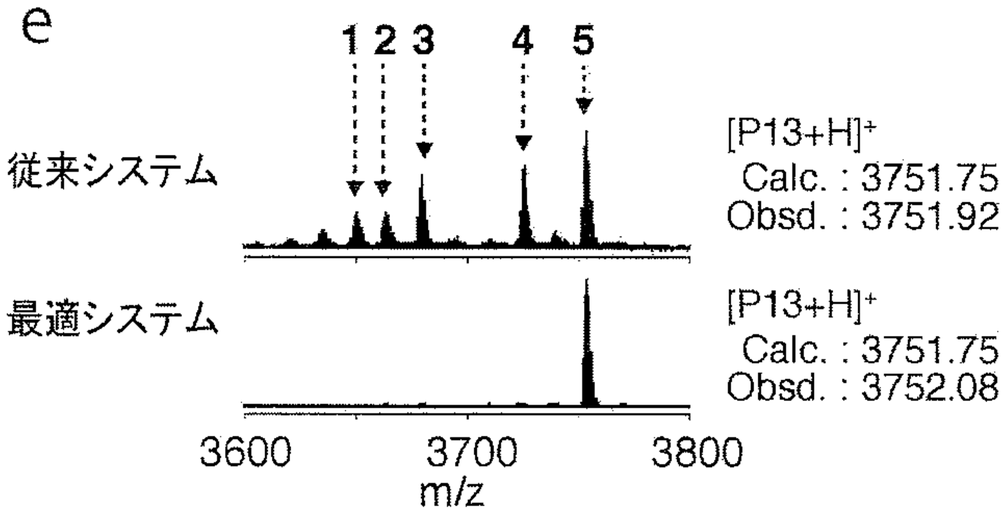
[図 4]


a
mRNA12: AUG AAG AAG AAG GUC UAC (FLAG) UAA
P12-Phe: fMet Lys Lys Lys Phe Tyr FLAG Stop
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
[P12-Phe+H]+
Calc. : 1866.86
Obsd. : 1867.05
Obsd. : 1867.00
Obsd. : 1866.95
Obsd. : 1866.92
1800
m/z
1900
b
mRNA12: AUG AAG AAG AAG GUC UAC (FLAG) UAA
P12-MeF: fMet Lys Lys Lys MeF Tyr FLAG Stop
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
[P12-MeF+H]+
Calc. : 1880.87
Obsd. : 1880.93
Obsd. : 1880.97
Obsd. : 1881.01
Obsd. : 1880.85
1800
m/z
1900
c
反応時間 (min)
T-stem
3
6
9
12
15
No.1
No.2
No.3
No.4
d
反応時間 (min)
T-stem
3
6
9
12
15
No.1
No.2
No.3
No.4
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
ペプチド発現レベル(μm)
0
1
2
3
4
5
0
3
6
9
12
15
反応時間 (min)
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
ペプチド発現レベル(μm)
0
1
2
3
4
5
0
3
6
9
12
15
反応時間 (min)

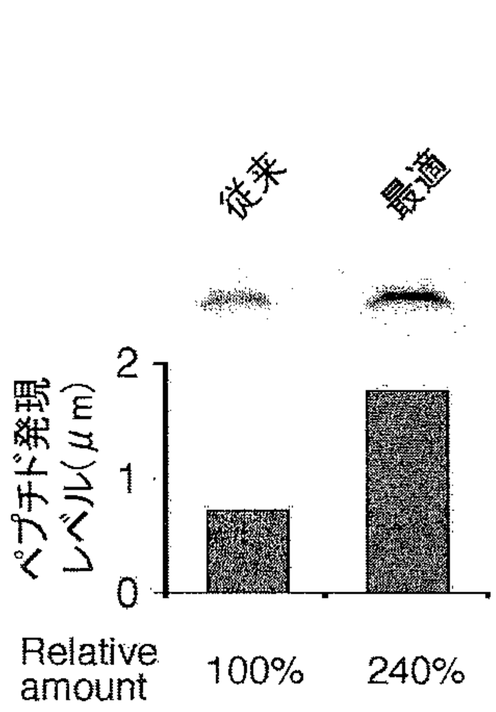
[図 5]



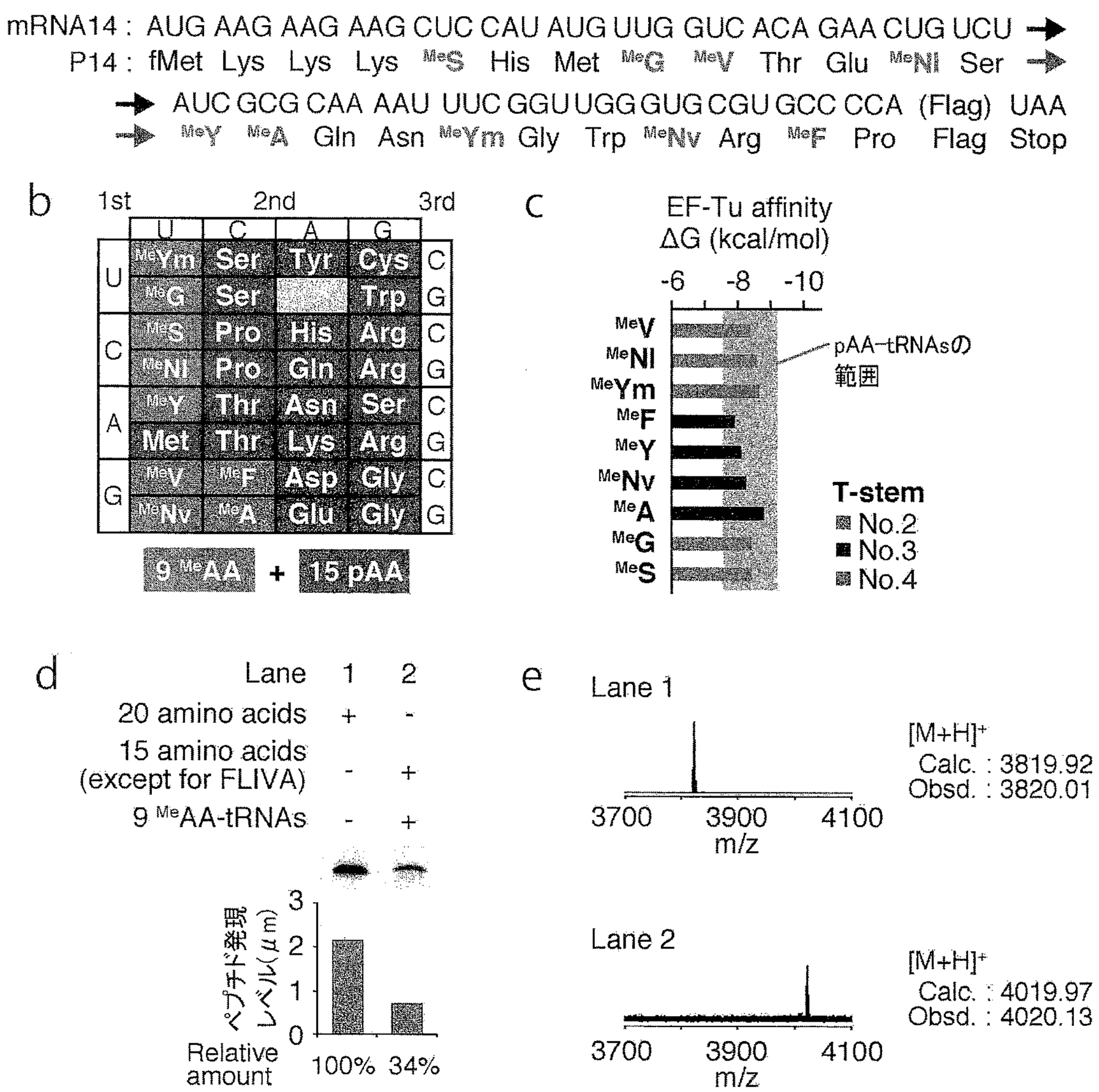



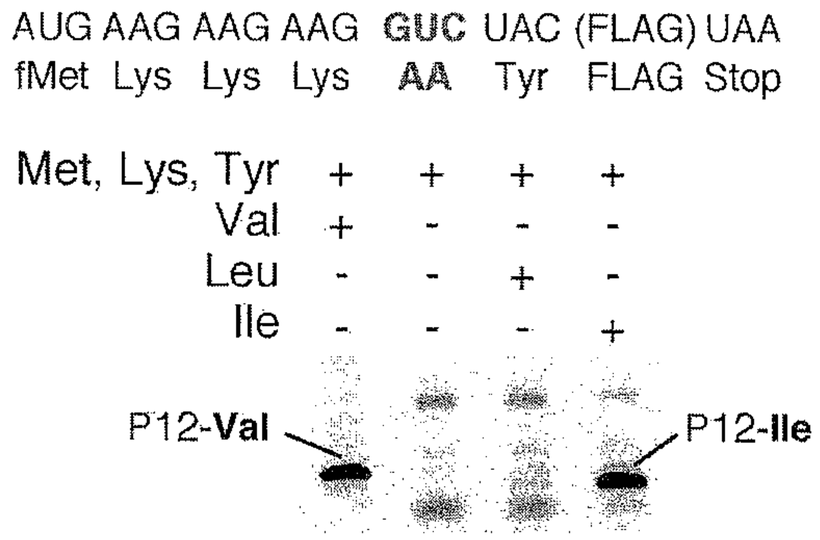

ピーク1. MeFの代わりにGly
2. MeYの代わりにSer又はMeFの代わりにAla
3. MeYの代わりにCys又はMeFの代わりにSer
4. MeAの代わりにGly
5. 所望のP13ペプチド



[図 6]



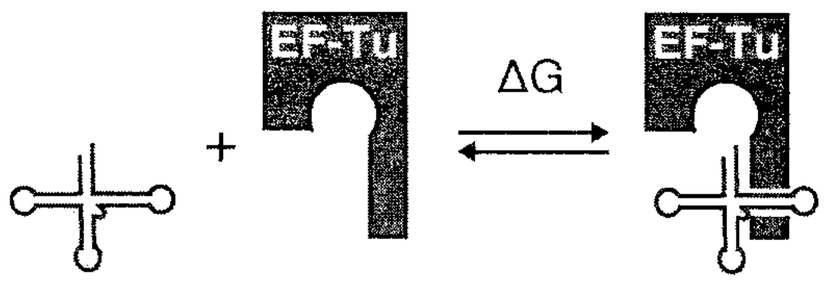

[図 7]

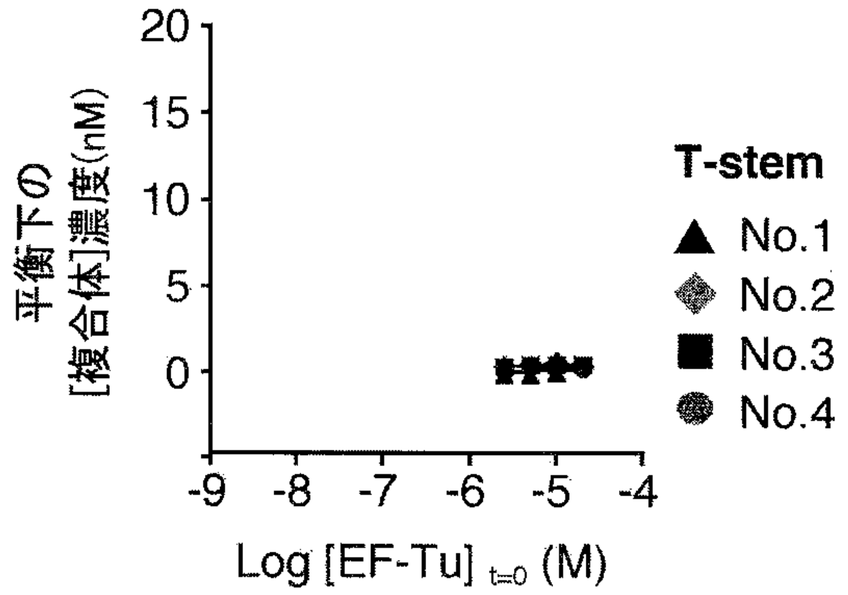



1st 2nd 3rd

| | U | C | A | G | |
|---|---|---|---|---|---|
| U | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | | Trp | G |
| C | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ile | Thr | Asn | Ser | C |
| | Met | Thr | Lys | Arg | G |
| G | | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

[図 8]

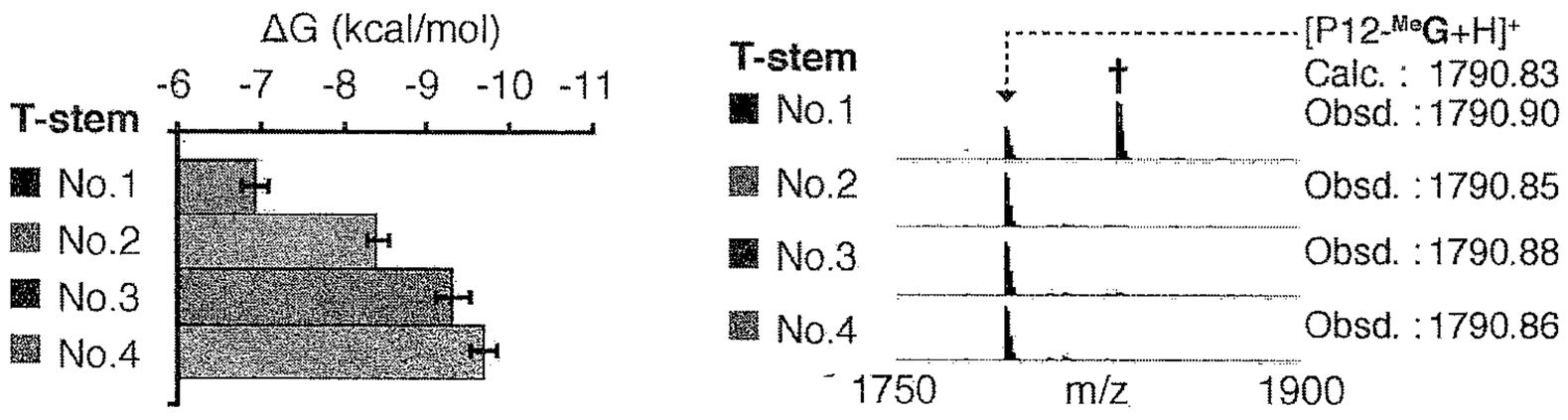

EF-Tu
ΔG
EF-Tu


平衡下の
[複合体]濃度(nM)
20
15
10
5
0
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Log [EF-Tu] t=0 (M)
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4

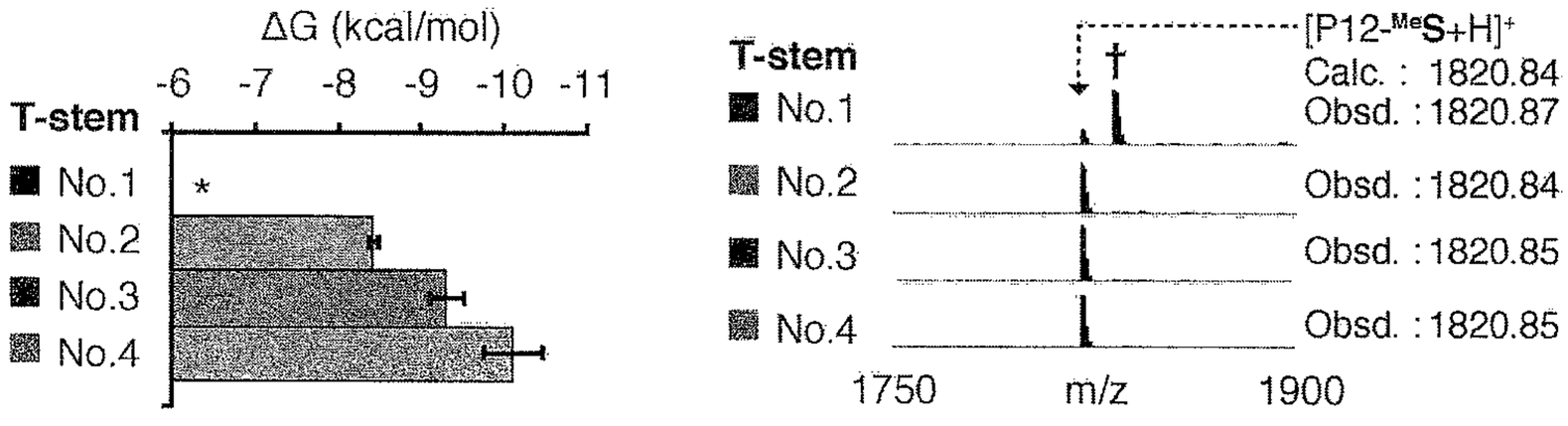
[図 9]

a mRNA12: AUG AAG AAG AAG **GUC** UAC (FLAG) UAA
P12-**npAA**: fMet Lys Lys Lys **npAA** Tyr FLAG Stop

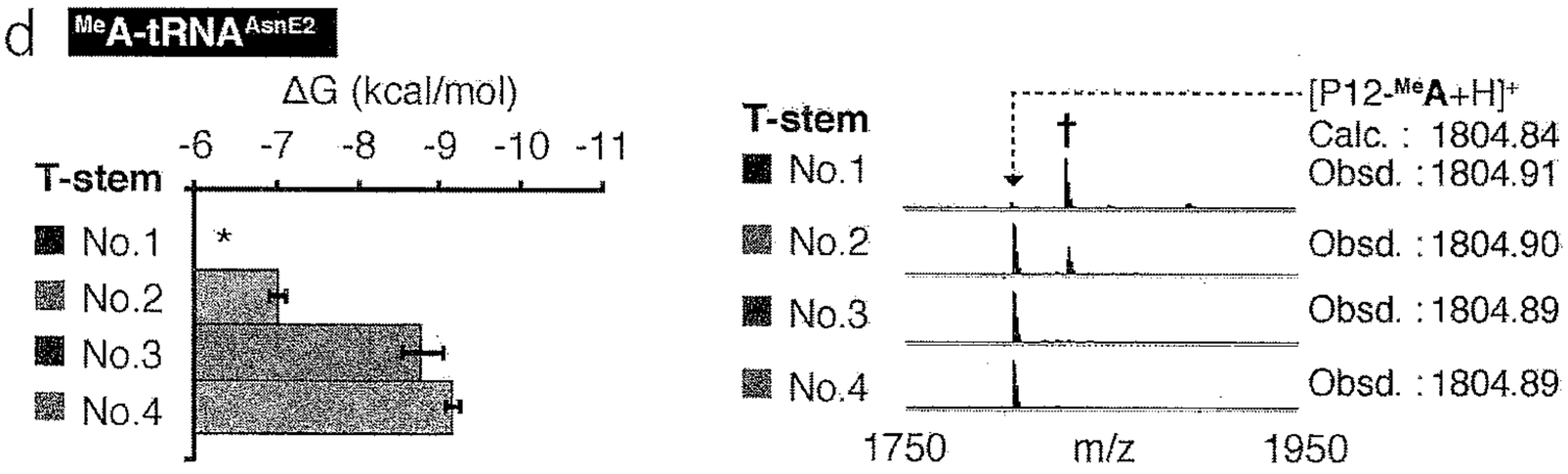
b **$^{Me}$G-tRNA$^{AsnE2}$**



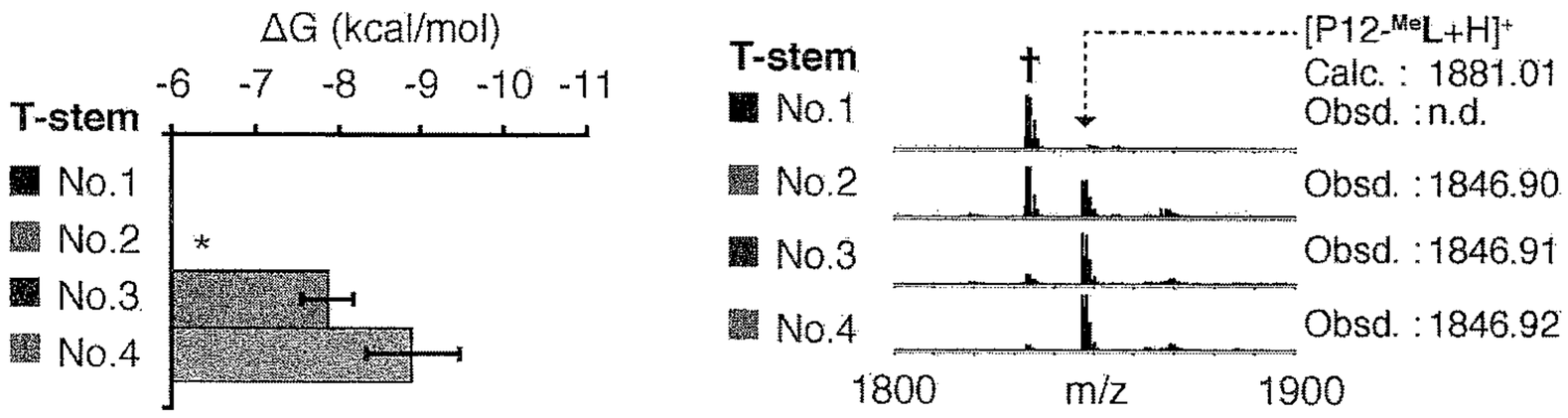

c **$^{Me}$S-tRNA$^{AsnE2}$**



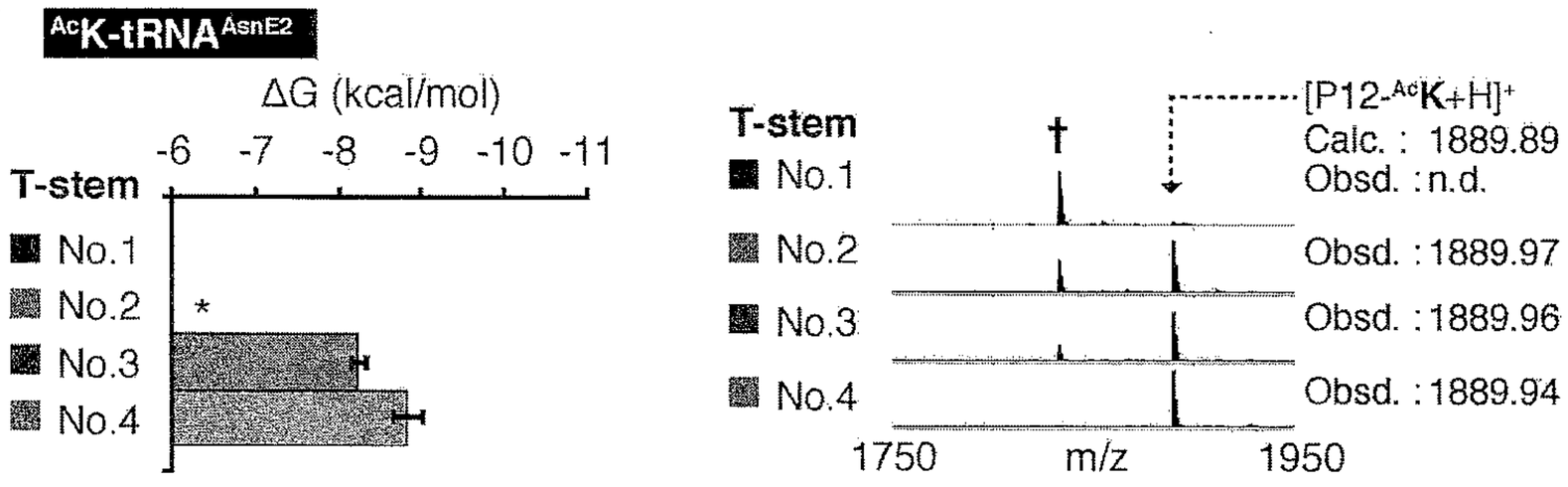

d **$^{Me}$A-tRNA$^{AsnE2}$**



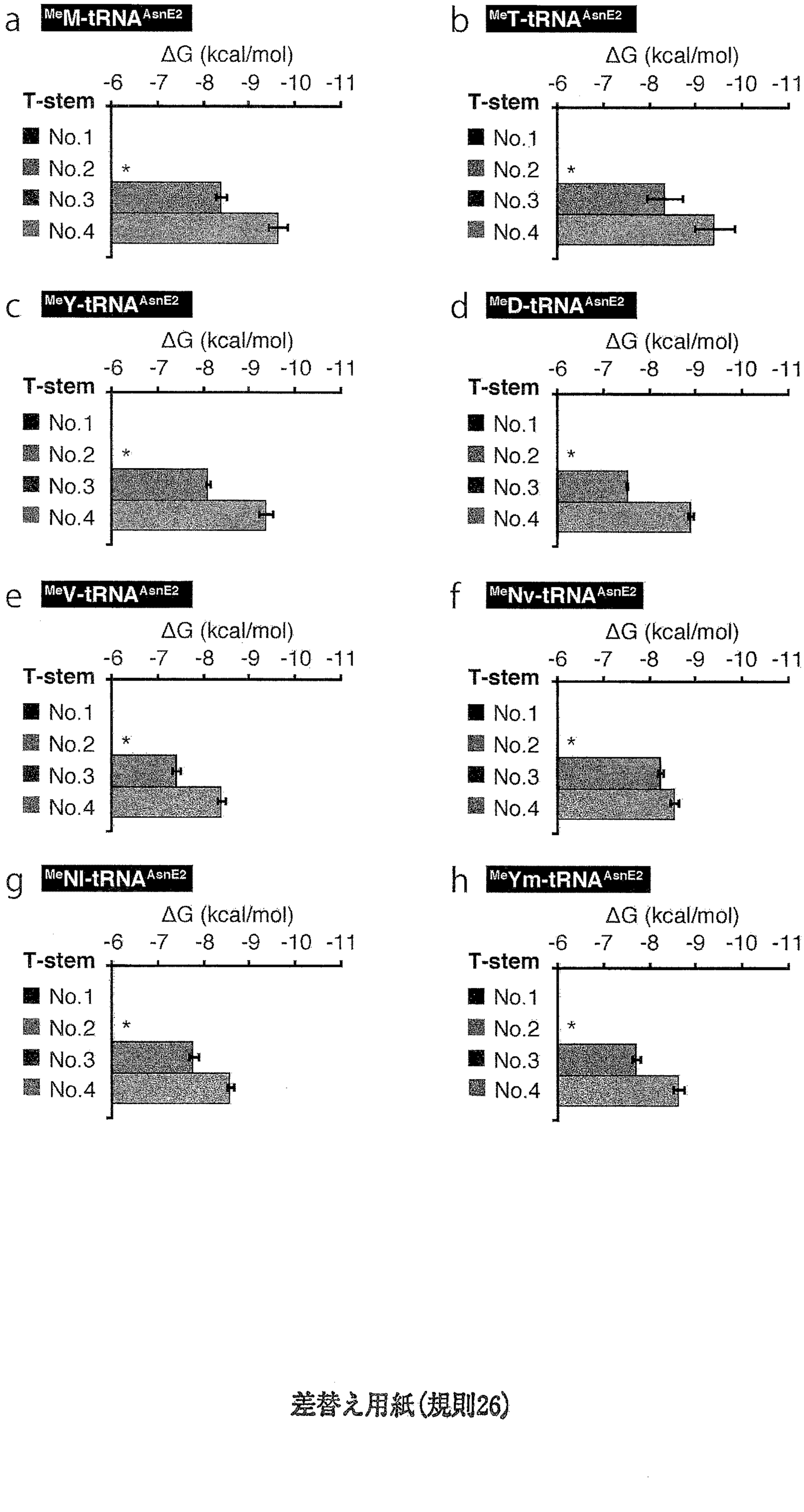

e **$^{Me}$L-tRNA$^{AsnE2}$**




f **$^{Ac}$K-tRNA$^{AsnE2}$**



[図 10]


a
MeM-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
b
MeT-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
c
MeY-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
d
MeD-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
e
MeV-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
f
MeNv-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
g
MeNl-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*
h
MeYm-tRNAAsnE2
ΔG (kcal/mol)
-6 -7 -8 -9 -10 -11
T-stem
No.1
No.2
No.3
No.4
*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/043289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K 1/00(2006.01)i; C07K 7/00(2006.01)i; C40B 40/08(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C12N15/11 Z ZNA; C12M1/00 A; C12P21/02 C; C40B40/08; C40B40/10; C07K1/00; C07K7/00
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)
C07K1/00; C07K7/00; C40B40/08; C40B40/10; C12M1/00; C12N15/11; C12P21/02

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

| | |
|---|---|
| Published examined utility model applications of Japan | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2021 |
| Registered utility model specifications of Japan | 1996-2021 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2021 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, Japio-GPG/FX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | KATOH, T., et al., "Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation.", Nucleic Acids Research, 2017, vol. 45, no. 22, pp. 12601-12610 page 12605, right column, paragraph [0003] to page 12606, left column, paragraph [0001], page 12609, left column, paragraph [0002], page 12609, right column, paragraph [0002], fig. 1, 4, 5, abstract | 1-10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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 |
|---|---|
| 15 January 2021 (15.01.2021) | 26 January 2021 (26.01.2021) |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| Japan Patent Office<br>3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,<br>Tokyo 100-8915, Japan | Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/JP2020/043289

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | KATOH, T., et al., "Ribosomal Incorporation of Consecutive ß-Amino Acids.", Journal of the American Chemical Society, 2018, vol. 140, pp. 12159-12167 page 12162, left column, paragraph [0003] to page 12163, left column, paragraph [0001], page 12165, right column, paragraph [0003], fig. 2, 4, abstract | 1-10 |
| A | WO 2012/033154 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 15 March 2012 (2012-03-15) entire text, all drawings | 1-10 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/043289

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| WO 2012/033154 A1 | 13 Mar. 2012 | US 2013/0178394 A1 entire text, all drawings<br>EP 2615455 A1 | |

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/043289

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 1/00(2006.01)i; C07K 7/00(2006.01)i; C40B 40/08(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C12N15/11 Z ZNA; C12M1/00 A; C12P21/02 C; C40B40/08; C40B40/10; C07K1/00; C07K7/00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K1/00; C07K7/00; C40B40/08; C40B40/10; C12M1/00; C12N15/11; C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|---|---|
| 日本国実用新案公報 | １９２２－１９９６年 |
| 日本国公開実用新案公報 | １９７１－２０２１年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２０２１年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２０２１年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, Japio-GPG/FX

C.　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー* | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求項の番号 |
|---|---|---|
| Y | KATOH, T., et al., Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation., Nucleic Acids Research, 2017, Vol.45, No.22, pp.12601-12610<br>第１２６０５頁右欄第３段落－第１２６０６頁左欄第１段落、第１２６０９頁左欄第２段落、第１２６０９頁右欄第２段落、図１、図４、図５、要約 | 1-10 |
| Y | KATOH, T., et al., Ribosomal Incorporation of Consecutive β-Amino Acids., Journal of the American Chemical Society, 2018, Vol.140, pp.12159-12167<br>第１２１６２頁左欄第３段落－第１２１６３頁左欄第１段落、第１２１６５頁右欄第３段落、図２、図４、要約 | 1-10 |
| A | WO 2012/033154 A1 (国立大学法人　東京大学) 15.03.2012 (2012-03-15)<br>全文、全図 | 1-10 |

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 |
|---|---|
| 15.01.2021 | 26.01.2021 |

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
福澤　洋光　4B 3963
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/043289

| 引用文献 | 公表日 | パテントファミリー文献 | 公表日 |
|---|---|---|---|
| WO 2012/033154 A1 | 15.03.2012 | US 2013/0178394 A1<br>全文、全図<br>EP 2615455 A1 | |

様式 PCT/ISA/210（パテントファミリー用別紙）（２０１５年１月）