(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
2014 年 1 月 16 日(16.01.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/010619 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/00 (2006.01) *C07K 1/13* (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/068829

(22) 国際出願日: 2013 年 7 月 10 日(10.07.2013)

(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 2012-157012 2012 年 7 月 12 日(12.07.2012) JP

(71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP). 国立大学法人岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 Okayama (JP).

(72) 発明者: ▲斉▼木 秀和 (SAIKI, Hidekazu); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 小関 英一 (OZEKI, Eiichi); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 瀧 真清 (TAKI, Masumi); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP). 宍戸 昌彦 (SISIDO, Masahiko); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目 1 番 1 号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP).

(74) 代理人: 岡田正広 (OKADA, Masahiro); 〒5400010 大阪府大阪市中央区材木町 1 番 6 号 第 12 新興ビル 10 階 岡田正広特許事務所 Osaka (JP).

(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR INTRODUCING FLUORINE INTO PEPTIDE OR PROTEIN

(54) 発明の名称 : ペプチド又はタンパク質へのフッ素導入法

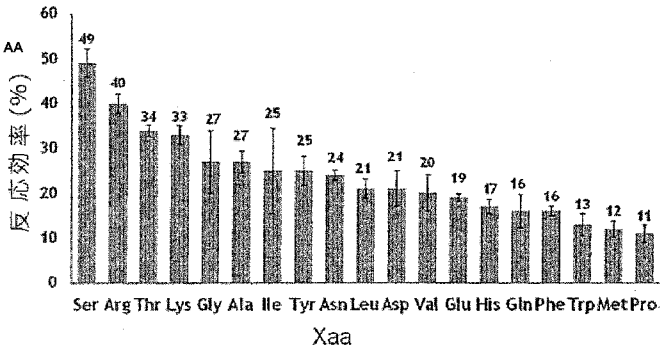


Fig. 2
AA Reaction efficiency

(57) **Abstract**: Provided is a method for introducing, by means of a chemoenzymatic process, a fluorine-containing amino acid into a peptide and a protein, the method having an introduction efficiency superior to conventional methods. The method for introducing fluorine into a peptide or a protein includes a step in which an activated peptide or protein is obtained by the addition, to the peptide or protein to which the fluorine is to be introduced, of an activating sequence that includes at least: a basic amino acid residue as an N-terminal amino acid residue; and, as an amino acid residue that is adjacent to the N-terminal amino acid residue, an amino acid residue that includes a hydroxyl group in the side chain, a hydrophilic amino acid residue that includes a positive charge in the side chain, or an amino acid residue that has a -H, -CH3, or -C(CH3)C2H5 side chain. The method also includes a step in which the fluorine-containing amino acid is introduced into the activated peptide or protein by means of a reagent solution that includes the fluorine-containing amino acid, tRNA, aminoacyl tRNA synthetase, and aminoacyl tRNA protein transferase.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2014/010619 A1

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)）

酵素化学的方法を用いて含フッ素アミノ酸をペプチドやタンパク質に導入する方法であって、従来の方法より導入効率に優れる方法を提供する。Ｎ末端アミノ酸残基として塩基性アミノ酸残基と、前記Ｎ末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基として、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、若しくは側鎖が－Ｈ、－ＣＨ$_3$又は－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$であるアミノ酸残基とを少なくとも有する活性化配列を、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に付加し、活性化ペプチド又はタンパク質を得る工程と、前記活性化ペプチド又はタンパク質に、フッ素含有アミノ酸、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を含む試薬溶液を用いて、前記フッ素含有アミノ酸を導入する工程とを含む、ペプチド又はタンパク質にフッ素を導入する方法。

明　細　書

発明の名称 ： ペプチド又はタンパク質へのフッ素導入法

技術分野

[0001] 本発明は、ＰＥＴ診断試薬、抗体型診断薬、及びペプチド型診断薬、並びにタンパク質型医薬品の体内分布測定に適用される技術に関する。より具体的には、本発明は、ペプチド又はタンパク質へのフッ素導入法、とりわけペプチド又はタンパク質の^{18}Ｆ標識法に関する。

背景技術

[0002] フッ素の放射性同位体^{18}Ｆ（半減期：１１０分）は、臨床分野ではＰＥＴプローブへの用途において最も有用な核種として知られている。

現在、^{18}Ｆ標識診断薬としてグルコース誘導体である[^{18}F]FDGががん診断に用いられている。この診断薬は、がん組織での高い糖代謝活性により、[^{18}F]FDGががん組織に集積することを利用したもので、がんの超早期診断や治療効果判定に用いられている。

特開２００９－１０６２６８号公報（特許文献１）には、フッ素含有アミノ酸であるFMT（フルオロメチル－Ｌ－チロシン）やFET（フルオロエチル－Ｌ－チロシン）を、酵素化学的手法によりone-potでペプチドやタンパク質のＮ末端に導入する方法（Ｎｅｘｔａ法）が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２００９－１０６２６８号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 糖代謝活性を利用する^{18}Ｆ標識診断薬は臨床的に使用されているが、がん診断によっては適用できないものもある。一方で、がん以外の疾病診断におけるＰＥＴの利用も大いに期待されている。このため、がんの超早期診断、脳神経疾患及び循環器系疾患診断に用いる、[^{18}F]FDG以外の放射性診断薬のため

のプローブが多数提案されてきた。しかし、それらの多種の新規プローブの合成のために、従来の自動合成装置をプローブごとに設計及び製作しなければならず、著しく非効率であった。この非効率さは、新規プローブの開発を妨げる原因となっていた。

[0005] なお、従来から^{18}FSFB（Ｎ－スクシンイミジル－４－[^{18}F]フルオロベンゾエート）が、ペプチド、タンパク質その他の高分子を^{18}F標識する試薬として広く用いられてきた。しかしながら、[^{18}F]SFBを用いてバッチ合成する場合、合成時間に１～１．５時間もの長い時間を必要とする。また、操作も煩雑である。このため、[^{18}F]SFBを用いた合成が可能な施設は一部に限られていた。さらに18F標識部位を選択的に指定できず、ペプチドやタンパク質の活性を損なう可能性があるため、18F標識可能なペプチド、タンパク質が限られていた。

[0006] 一方、^{18}F標識アミノ酸をペプチドやタンパク質に導入する方法は、標識されるペプチドやタンパク質の機能を損なわない点で好ましい。^{18}F標識アミノ酸の導入手法としては、ペプチド合成法、遺伝子工学的方法及び酵素化学的方法が挙げられる。しかしながら、ペプチド合成法ではアミノ酸１分子の導入に１日以上の時間がかかり、遺伝子工学的方法では手間が煩雑であり、酵素化学的方法では導入効率があまり良くないという問題があった。

[0007] そこで本発明の目的は、酵素化学的方法を用いて含フッ素アミノ酸をペプチドやタンパク質に導入する方法であって、従来の方法より導入効率に優れる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意検討の結果、^{18}Ｆ標識アミノ酸を導入すべきペプチド又はタンパク質に、あらかじめ特定の配列を付加させることで、^{18}Ｆ標識アミノ酸の導入効率が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下の発明を含む。

[0009] （１）

Ｎ末端アミノ酸残基として塩基性アミノ酸残基と、前記Ｎ末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基として、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側

鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、若しくは側鎖がーＨ、ーＣＨ$_3$、ーＣ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$又はーＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基とを少なくとも有する活性化配列を、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に付加し、活性化ペプチド又はタンパク質を得る工程と、

前記活性化ペプチド又はタンパク質に、フッ素含有アミノ酸、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を含む試薬溶液を用いて、前記フッ素含有アミノ酸を導入する工程とを含む、ペプチド又はタンパク質にフッ素を導入する方法。

[0010] 本発明において「ペプチド」とは、２個以上のアミノ酸を含有するアミノ酸配列を有するものをいう。また、本発明において「タンパク質」とは、分子量５，０００以上のペプチドをいう。さらに、本発明におけるタンパク質は、例えば生体内で産生されたものである場合には、生体内で何らかの機能・活性を示し得るペプチドである。

本発明における「アミノ酸」には、αー、βー、γーアミノ酸が含まれる。

本発明において「活性化」とは、ペプチド又はタンパク質において所望のフッ素含有アミノ酸導入効率を達成するための活性を取得することをいう。

本発明においては、「フッ素を導入する」ことはフッ素含有アミノ酸を導入することによって行うため、本明細書において、「フッ素導入」はフッ素含有アミノ酸の導入と同じ意味で用いる。

[0011] （２）

前記フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端残基が塩基性アミノ酸残基でない、（１）の方法。

（３）

前記フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端から２番目のアミノ酸残基が、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、及び側鎖がーＨ、ーＣＨ$_3$、ーＣ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$及びーＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基のいずれでもない、（２）の方法。

[0012] （４）

前記水酸基を有するアミノ酸が、セリン又はトレオニンである、（１）～（３）のいずれかの方法。

（５）

前記正電荷を有する親水性アミノ酸残基が、リジン又はアルギニンである、（１）～（４）のいずれかの方法。

（６）

前記活性化配列における前記２番目のアミノ酸残基が、グリシン、アラニン、イソロイシン、チロシン又はアスパラギンである、（１）～（３）のいずれかの方法。

[0013] （７）

前記活性化配列が、スペーサ基を含む、（１）～（６）のいずれかの方法。

（８）

前記スペーサ基がペプチドである、（７）の方法。

（９）

前記スペーサ基が炭素数２～６のアルキレンオキシド含有基である、（７）の方法。

（１０）

前記塩基性アミノ酸残基がリジン残基又はアルギニン残基である、（１）～（９）のいずれかの方法。

[0014] （１１）

前記フッ素含有アミノ酸が、２－アミノ－３－（４－[^{18}Ｆ]フルオロメトキシフェニル）プロピオン酸及び／又は２－アミノ－３－［４－（２－[^{18}Ｆ]フルオロエトキシ）フェニル］プロピオン酸である、（１）～（１０）のいずれかの方法。

[0015] （１２）

Ｎ末端アミノ酸残基として塩基性アミノ酸残基と、前記Ｎ末端アミノ酸残

基に隣接するアミノ酸残基として、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、若しくは側鎖が－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$又は－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基とを少なくとも有する活性化配列を有する活性化剤、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を少なくとも含む、（１）～（１１）のいずれかの方法に用いるペプチド又はタンパク質のフッ素導入キット。

[0016] （１３）

（１）～（１１）の方法又は（１２）のキットを用いる、フッ素が導入されたペプチド又はタンパク質を製造する方法。

発明の効果

[0017] 本発明により、酵素化学的方法を用いて含フッ素アミノ酸をペプチドやタンパク質に導入する方法であって、Ｎ末端から2番目のアミノ酸を規定していない従来の方法より導入効率に優れる方法が可能になる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]実験例１において、配列番号１のペプチド１（Lys-Ser-Cys(C_2H_5)-Aka）とその重水素置換体であるペプチド２（Lys-Ser-Cys(C_2D_5)-Aka）との質量分析におけるイオン化効率が同等であることを示すマススペクトルである。横軸はMass[m/z]である。図１においては、便宜的に、ペプチド１を[Lys-Xaa-Cys(C_2H_5)-Aka]、ペプチド２を[Lys-Xaa-Cys(C_2D_5)-Aka]と表記している。

[図2]実験例２～２０において、ペプチド１、及びペプチド１におけるＮ末端から2番目のアミノ酸Serをセリン及びシステイン以外の１８種の天然アミノ酸残基にそれぞれ変更した各ペプチド３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７[Lys-Xaa-Cys(C_2H_5)-Aka]へのフッ素含有アミノ酸導入効率を調べた結果である。

発明を実施するための形態

[0019] ［１．フッ素を導入すべきタンパク質又はペプチド］

フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質は、天然のアミノ酸配列を有

するもの及び非天然のアミノ酸配列を有するものを問わない。天然のアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質は、例えば種々の生物の生体内からの単離により得られるものでありうる。あるいは、遺伝子工学的手法や有機合成などの公知の手法を用いて人工的に産生されたものでありうる。非天然のアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質も、遺伝子工学的手法や有機合成などの公知の手法を用いて人工的に産生されたものでありうる。

[0020] フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質の配列に特に制限はないが、本発明においては、当該ペプチド又はタンパク質のＮ末端アミノ酸残基、又はＮ末端アミノ酸残基及びＮ末端に隣接するアミノ酸残基（すなわちＮ末端から２番目のアミノ酸残基）が以下の特定のアミノ酸残基でないことが好ましい。具体的には、Ｎ末端アミノ残基は塩基性アミノ酸（例えばリジン残基やアルギニン残基）でないことが好ましい。さらに、２番目のアミノ酸残基は、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基（例えばセリン、トレオニン、チロシン）、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基（例えばアルギニン、リジン）、及び側鎖が－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$及び－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基（例えばグリシン、アラニン、イソロイシン、アスパラギン）のいずれでもないことが好ましい。

[0021] しかしながら、本発明は、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端アミノ酸残基、又はＮ末端アミノ酸残基及び２番目のアミノ酸残基が上記特定のアミノ酸残基である態様を特別除外するものではない。このような態様のより具体的な例としては、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端から２番目のアミノ酸残基が、後に詳述する活性化配列のＮ末端から２番目のアミノ酸残基よりも、フッ素導入反応の活性化効率が低いものである場合が挙げられる。このような場合、活性化配列の付加によりフッ素導入効率を向上させることができる。

[0022] ［２．活性化配列］

フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質は、フッ素導入前に、活性化配列が付加されることによって、活性化ペプチド又はタンパク質に変換され

る。

活性化配列は、特定の２アミノ酸残基からなるペプチド配列を少なくとも含む。特定の２アミノ酸残基は、それぞれ、天然アミノ酸に由来する残基であってもよいし、非天然アミノ酸に由来する残基であってもよい。

活性化配列のＮ末端アミノ酸残基は、塩基性アミノ酸である。具体的には、リジン残基やアルギニン残基が挙げられる。

[0023] また、活性化配列のＮ末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基（すなわちＮ末端から２番目のアミノ酸残基）としては、以下が挙げられる。

・側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基（水酸基は、通常の水酸基及びフェノール性水酸基を含む）

・側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基

・側鎖が－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$又は－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基

これらのアミノ酸残基のうち、フッ素導入反応の活性化効率の高さに鑑みると、側鎖に（フェノール性水酸基でない）通常の水酸基を有するアミノ酸残基、及び側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基がより好ましい。

[0024] 側鎖に水酸基を有するアミノ酸の例としては、セリン、トレオニン及びチロシン等が挙げられる。側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸の例としては、リジン及びアルギニン等が挙げられる。側鎖が－Ｈであるアミノ酸の例としてはグリシン、側鎖が－ＣＨ$_3$であるアミノ酸の例としてはアラニン、側鎖が－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$であるアミノ酸の例としてはイソロイシン、側鎖が－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸の例としてはアスパラギンが挙げられる。

[0025] ２番目のアミノ残基が天然のα－アミノ酸のものである場合、活性化効率の高さは、おおよそ、セリン、アルギニン、トレオニン、リジン、グリシン、アラニン、イソロイシン、チロシン及びアスパラギンの順であることが本発明者らによって確認されている。

[0026] 活性化配列は、２番目のアミノ酸残基に結合したスペーサ基を含むことができる。スペーサ基は、後述のフッ素含有アミノ酸導入工程で用いられる酵

素の基質結合ポケットに好ましく適合する構造を活性化配列に与えることができる。

[0027] スペーサ基は、ペプチド鎖であってもよいし、それ以外の構造であってもよい。ペプチド以外の構造の一例としては２価の有機基が挙げられる。２価の有機基としては、アルキレンオキシド含有基が挙げられる。アルキレンオキシド含有基におけるアルキレンオキシドとしては、炭素数２～６のアルキレンオキシドであってよく、好ましくは、エチレンオキシドやプロピレンオキシドである。２価の有機基は、これらを繰り返し単位とするポリアルキレンオキシド含有基であってよい。また、スペーサ基には、本発明と組み合わされる種々の測定法や検出法等に応じて、当業者によって適宜、同位体標識や蛍光標識等がなされていてもよい。

[0028] ［３．活性化配列の付加］

活性化配列は、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に付加される。好ましくは、活性化配列は、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端に付加される。これにより、活性化されたペプチド又はタンパク質を得る。

[0029] 活性化配列がＮ末端アミノ酸残基及びそれに隣接するアミノ酸残基（Ｎ末端から２番目のアミノ酸残基）のみからなる場合は、当該２番目のアミノ酸残基が、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に結合する。活性化配列がスペーサ基を有する場合は、スペーサ基が、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に結合する。

[0030] 活性化配列を付加する手法は、活性化配列とフッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質との結合様式に応じ、当業者が適宜選択することができる。

例えば、当該結合様式がペプチド結合である場合は、通常のペプチド合成法を用いることができる。より具体的には、ペプチド固相合成法などがある。表面をアミノ基で修飾した直径0.1㎜程度のポリスチレン高分子ゲルのビーズなどを固相として用い、ここから脱水反応によって１つずつアミノ酸鎖を伸長していく。目的とするペプチドの配列が出来上がったら固相表面から切

り出し、目的の物質を得る。また、タンパク質のＮ末を任意の配列にするためには、大腸菌を用いたタンパク合成の段階で、操作した遺伝子を使用し任意の配列に組み替えることが可能である。

結合様式がペプチド結合でない場合（ＰＥＧ鎖の場合等）は、対象となるリンカーの末端に活性エステル基（コハク酸イミド）等を用い、ペプチド・タンパク質のＮ末端のアミノ酸と反応させる方法で導入する。

[0031] ［４．フッ素を有するアミノ酸］

フッ素を有するアミノ酸は、アミノ酸の基本骨格（同一分子内にアミノ基とカルボキシル基とを有する構造）にフッ素が導入された分子である。例えば、基本骨格としての天然又は非天然アミノ酸に、フッ素置換によって、あるいはフッ素含有基による標識によってフッ素が導入された分子が挙げられる。フッ素の核種は問わないが、特に放射性同位体^{18}Ｆは、ＰＥＴプローブへの用途において有用である点で好ましい。

[0032] フッ素を有するアミノ酸は、適宜、フッ素以外の標識や修飾をさらに有していることを許容する。標識の例としては、安定同位体標識や蛍光標識等が挙げられる。この場合、安定同位体による質量値や蛍光標識によるシグナルに基づいて測定や検出を行うことができる。修飾の例としては、酵素基質、抗原性物質による修飾等が挙げられる。この場合、酵素化学的手法又は酵素免疫科学的手法に基づいて検出や精製を行うことができる。

[0033] フッ素を有するアミノ酸の具体例としては、以下が挙げられる。

・２－アミノ－３－（２，３，４，５，６－ペンタフルオロフェニル）プロピオン酸

（すなわちペンタフルオロフェニルアラニン）

・２－アミノ－３－（４－フルオロメトキシフェニル）プロピオン酸

（すなわちフルオロメチルチロシン）

・２－アミノ－３－［４－（２－フルオロエトキシ）フェニル］プロピオン酸

（すなわちフルオロエチルチロシン）

[0034] この中でも、本発明においては、２－アミノ－３－（４－フルオロメトキシフェニル）プロピオン酸、及び２－アミノ－３－［４－（２－フルオロエトキシ）フェニル］プロピオン酸が好ましく、それらの放射性同位体標識体である２－アミノ－３－（４－[18]Ｆ]フルオロメトキシフェニル）プロピオン酸、２－アミノ－３－［４－（２－[18]Ｆ]フルオロエトキシ）フェニル］プロピオン酸がより好ましい。フッ素を有するアミノ酸は、後述のアミノアシルtRNA合成酵素及びアミノアシルtRNAタンパク質転移酵素に応じて適宜選択される。

[0035] ［５．フッ素を有するアミノ酸の導入］

活性化されたペプチド又はタンパク質に、フッ素を有するアミノ酸が導入される。この際、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ａａＲＳ）及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を含む試薬溶液が用いられる。

[0036] ｔＲＮＡは、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素によるアミノアシル化でアミノアシルｔＲＮＡへ変換されることができ、且つアミノアシルｔＲＮＡのアミノアシル基がアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素によりペプチド又はタンパク質に転移されることができるものであればよく、天然物及び非天然物を問わない。従って、ｔＲＮＡの構造としてクローバーリーフ二次構造を有しているか否かは限定されず、その大きさも限定されない。ｔＲＮＡは、公知の方法に従って当業者が適宜合成することにより、あるいは、市販のものを購入することにより用意することができる。

具体的なｔＲＮＡの例としては、ｔＲＮＡ[Phe]やｔＲＮＡ[Leu]等が挙げられる。

[0037] アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素（ａａＲＳ）は、一般的にはリボソームでの遺伝暗号の翻訳における基質となるアミノアシルｔＲＮＡの合成を担う酵素である。ａａＲＳとしては、野生型及び変異型を問わない。ａａＲＳは、公知の方法（例えば遺伝子工学的手法）に従って当業者が適宜合成することにより、あるいは、市販のものを購入することにより用意することができる。

[0038] 野生型ａａＲＳとしては、タンパク質を合成するのに使われる２０種のア

ミノ酸それぞれに対する基質特異性を有する２０種が存在し、例えば、リジンに対応するａａＲＳはリジルｔＲＮＡ合成酵素と呼ばれる。本発明においては、導入すべきフッ素含有アミノ酸におけるアミノ酸基本骨格に対応する（すなわちアミノ酸基本骨格に対し基質特異性を有する）ａａＲＳを用いることができる。

[0039] 変異型ａａＲＳとしては、フッ素不含アミノ酸に対する基質特異性よりも、フッ素含有アミノ酸に対する基質特異性の方が高くなるような変異が生じているａａＲＳ変異体が用いられる。例えば、フェニルアラニンに対する基質特異性よりも、フルオロメチルチロシンやフルオロエチルチロシンに対する基質特異性の方が高い、大腸菌由来フェニルアラニルtRNA合成酵素変異体（Ala294→Gly）（Chembiochem, 2002, 02-03, 235-237）を用いることができる。

[0040] アミノアシルｔＲＮＡタンパク質合成転移酵素は、ｔＲＮＡの３’末端に付加されたアミノ酸をタンパク質のアミノ末端（Ｎ末端）へ転移し、遺伝暗号を介することなくペプチド結合形成反応を触媒する酵素である。アミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素としては、野生型であってもよいし、野生型と同様の機能を有する変異型であってもよい。アミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素は、公知の方法（例えば遺伝子工学的手法）に従って当業者が適宜合成することにより、あるいは、市販のものを購入することにより用意することができる。

[0041] アミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素の具体例として、ロイシル／フェニルアラニルｔＲＮＡタンパク質転移酵素（Ｌ／Ｆ転移酵素）を用いることができる。Ｌ／Ｆ転移酵素は大腸菌由来であり、ｔＲＮＡに結合しているフェニルアラニンや、ロイシン、メチオニンなどの疎水性アミノ酸を、Ｎ末端にリジンやアルギニンを有するペプチド又はタンパク質に転移させる反応を触媒する酵素である。

[0042] 試薬溶液中には、フッ素含有アミノ酸の導入反応に好適な緩衝液、塩類、還元剤、ポリアミン、及びエネルギー源等を適宜含ませることができる。緩

衝液としては、例えばＨｅｐｅｓ緩衝液、Ｔｒｉｓ－酢酸等が挙げられる。塩類としては、マグネシウム塩、カリウム塩等が挙げられる。還元剤としては、ＤＴＴ（ジチオトレイトール）等が挙げられる。ポリアミンとしては、スペルミジン等が挙げられる。エネルギー源としては、アデノシン三リン酸等が挙げられる。より具体的な例を挙げると、終濃度での組成が、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　Ｓｐｅｒｍｉｄｉｎｅ、５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ７．６）であるＡ液と、終濃度での組成が２．５ｍＭ　ＡＴＰ、２０ｍＭ　ＫＣｌ、２ｍＭ　ＤＴＴであるＢ液とを混合して用いることができる。

[0043] 試薬溶液と活性化ペプチド又はタンパク質との混合液中における各成分の濃度は、任意に設定することができる。

例えば、混合液中における活性化ペプチド又はタンパク質とｔＲＮＡとのモル比は、３０：１～１：１、さらに好ましくは１０：１～４：１である。本発明においては、ｔＲＮＡは系中で再利用されるため、使用量は少量でよい。混合液中における活性化ペプチド又はタンパク質とアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素とのモル比は、１００：１～２：１、さらに好ましくは５０：１～２０：１である。混合液中における活性化ペプチド又はタンパク質とフッ素含有アミノ酸とのモル比は、１００：１～１：１０００、より好ましくは２５：１～１：４００、さらに好ましくは１：１～１：１２０である。フッ素含有アミノ酸は、活性化ペプチド又はタンパク質に比べて少量でも導入されることが可能である一方、活性化ペプチド又はタンパク質に比べて過剰量であっても反応系を阻害することはないと考えられる。従って、放射性同位体フッ素含有アミノ酸のように貴重なフッ素含有アミノ酸を使用する場合は、活性化ペプチド又はタンパク質に対してフッ素含有アミノ酸の使用量を少量に抑えることができ、反対に活性化ペプチド又はタンパク質の方がより貴重である場合は、フッ素含有アミノ酸に対して活性化ペプチド又はタンパク質の使用量を少量に抑えることができる。

[0044] 温度およびｐＨなどの反応条件は、使用する酵素などに応じて任意の条件

を選択できる。反応温度は、好ましくは０℃～５０℃、さらに好ましくは４℃～３７℃である。反応ｐＨは、好ましくは６～９、さらに好ましくは７～８である。反応時間は、好ましくは１０分以上であり、さらに好ましくは１５分～１２０分である。

[0045] フッ素を有するアミノ酸の導入においては、活性化ペプチド又はタンパク質と、導入すべきフッ素含有アミノ酸、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素、及びアミノアシルtRNAタンパク質転移酵素を含む試薬溶液とが混合された反応液を調製する。各成分は一度に混合されてもよいし、任意の順番で混合されてもよい。また、フッ素含有アミノ酸は１種又は複数種を用いることができる。

反応液がインキュベーション（例えば３７℃、６０分間）に供されることよりフッ素含有アミノ酸導入反応が進行する。

反応の停止は、例えばTFA（トリフルオロ酢酸）水溶液を混合することにより行うことができる。

反応停止後は、濃縮脱塩処理によりフッ素含有アミノ酸が導入されたペプチド又はタンパク質を目的物として回収する。例えばZipTip処理により濃縮脱塩処理することにより、精製された目的物を精製することができる。

[0046] ［６．ペプチド又はタンパク質のフッ素導入キット］

本発明のキットは、上述のペプチド又はタンパク質にフッ素を導入する方法に使用することができるものであり、アイテムとして、少なくとも、上記の活性化配列を有する活性化剤、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素、及びアミノアシルtRNAタンパク質転移酵素を含む。各アイテムは、それぞれ別々の容器中に存在する状態で提供されてもよいし、例えば、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素、及びアミノアシルtRNAタンパク質転移酵素が１個の容器中に共存する状態で提供されてもよい。

好ましくは、フッ素含有アミノ酸が１種又は複数種含まれる。また、上述の緩衝液、塩類、還元剤、ポリアミン、及びエネルギー源等が含まれていてもよい。

実施例

[0047] 以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

[0048] ［実験例１］

ペプチド１：Lys-Ser-Cys(C_2H_5)-Aka （配列番号１；Lys-Ser-Cys-Ala）を用意した。

２番目のアミノ酸残基はセリン残基であり、３番目のアミノ酸残基はシステインにエチル基が導入されたものであり、４番目のアミノ酸残基は蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基である。アミノ酸残基システインへのエチル基の導入は、エチルブロマイドを用いて行うことができる。また、上記ペプチド１：Lys-Ser-Cys(C_2H_5)-Akaにおける “Aka”は、蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基を便宜的に表したものである。

[0049] 別途、ペプチド１の重水素置換体であるペプチド２：Lys-Ser-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２；Lys-Ser-Cys-Ala）を用意した。

２番目のアミノ酸残基はセリン残基であり、３番目のアミノ酸残基はシステインにＤ５エチル基が導入されたものであり、４番目のアミノ酸残基は蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基である。アミノ酸残基システインへのＤ５エチル基の導入は、Ｄ５エチルブロマイドを用いて行うことができる。また、上記ペプチド２：Lys-Ser-Cys(C_2D_5) -Akaにおける “Aka”は、蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基を便宜的に表したものである。

[0050] ペプチド１とペプチド２とを当量混合し、MALDI-TOF-MSを用いて質量分析を行った。得られたマススペクトルを図１に示す。図１に示されるように、ペプチド１とペプチド２とのピーク（m/z 628.58, 633.61）は、５．０３Ｄａの質量差をもって同じ強度で検出された。つまり、ペプチド１とペプチド２とのイオン化効率が同じであることを確認した。図１においては、便宜的に、ペプチド１を[Lys-Xaa-Cys(C_2H_5)-Aka]、ペプチド２を[Lys-Xaa-Cys(C_2D_5)-Aka]と表記している。ペプチド中のシステイン残基を安定同位体によって標識しておくと、ＮＥＸＴＡ反応効率をＭＳにて定量する際に、内部標準物質

として使用することができる（重原子標識法）。

[0051] ［実験例２］

ペプチド１に含フッ素アミノ酸を導入した。具体的には、ペプチド１について、下記の組成を有する反応溶液（濃度はいずれも終濃度を表す。）を調製し、37 ℃、６０分間インキュベートした。

[0052] ＜反応溶液組成＞

Ａ液（終濃度での組成が、１０ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、１ｍＭ　Ｓｐｅｒｍｉｄｉｎｅ、５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ　７．６））の１０倍希釈液と、Ｂ液（終濃度での組成が、２．５ｍＭ　ＡＴＰ、２０ｍＭ　ＫＣｌ、２ｍＭ　ＤＴＴ）の１０倍希釈液との混合液中、以下の成分を含む。

[0053] ペプチド１（Lys-Ser-Cys(C_2H_5)-Aka）　７．３μＭ

Ｅ．Ｃｏｌｉ由来フェニルアラニンｔＲＮＡ（ｔＲＮＡ^{Phe}）　８．０μＭ

フェニルアラニルｔＲＮＡ合成酵素（ＰｈｅＲＳ）変異体（aA294G）　０．６６μＭ

[^{18}Ｆ]フルオロメチルーＬーチロシン（ｆｅＴｙｒ）　１．０ｍＭ

０．２０μＭロイシル／フェニルアラニルｔＲＮＡタンパク質転移酵素　３．８ｎＭ

[0054] 反応溶液に終濃度が３％になるようにトリフルオロ酢酸水溶液を投入し、ZipTip処理を行った。回収物に、使用したペプチド１と同量のペプチド２（ペプチド１におけるXaaとペプチド２におけるXaaとは同じアミノ酸残基（セリン残基）である。）を混合し、得られた混合物をMALDI-TOF-MSを用いて質量分析した。ペプチド２のピーク強度に対する、ペプチド２の強度とペプチド１（すなわち上記反応の未反応物）の強度との差の比を反応効率として求めた。その結果を図２に示す。反応効率は４９％であった。

[0055] ［実験例３～２０］

ペプチド１における２番目のアミノ酸残基（セリン残基）を、セリン残基及びシステイン残基以外の１８種の天然アミノ酸残基にそれぞれ変更した各ペプチド[Lys-Xaa-Cys(C_2H_5)-Aka]を用意した。ここで、”Xaa” は、便宜的に、セリン残基及びシステイン残基以外の１８種の天然アミノ酸残基を表している。

ペプチド３：Lys-Ala-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号３；Lys-Ala-Cys-Ala)

ペプチド５：Lys-Asp-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号５；Lys-Asp-Cys-Ala)

ペプチド７：Lys-Glu-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号７；Lys-Glu-Cys-Ala)

ペプチド９：Lys-Phe-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号９；Lys-Phe-Cys-Ala)

ペプチド１１：Lys-Gly-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号１１；Lys-Gly-Cys-Ala)

ペプチド１３：Lys-His-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号１３；Lys-His-Cys-Ala)

ペプチド１５：Lys-Ile-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号１５；Lys-Ile-Cys-Ala)

ペプチド１７：Lys-Lys-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号１７；Lys-Lys-Cys-Ala)

ペプチド１９：Lys-Leu-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号１９；Lys-Leu-Cys-Ala)

ペプチド２１：Lys-Met-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号２１；Lys-Met-Cys-Ala)

ペプチド２３：Lys-Asn-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号２３；Lys-Asn-Cys-Ala)

ペプチド２５：Lys-Pro-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号２５；Lys-Pro-Cys-Ala)

ペプチド２７：Lys-Gln-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号２７；Lys-Gln-Cys-Ala)

ペプチド２９：Lys-Arg-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号２９；Lys-Arg-Cys-Ala)

ペプチド３１：Lys-Thr-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号３１；Lys-Thr-Cys-Ala)

ペプチド３３：Lys-Val-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号３３；Lys-Val-Cys-Ala)

ペプチド３５：Lys-Trp-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号３５；Lys-Trp-Cys-Ala)

ペプチド３７：Lys-Tyr-Cys(C_2H_5)-Aka（配列番号３７；Lys-Tyr-Cys-Ala)

３番目のアミノ酸残基はシステインにエチル基が導入されたものであり、４番目のアミノ酸残基は蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基である。

[0056] 別途、ペプチド２における２番目のアミノ酸残基（セリン残基）を、セリン残基及びシステイン残基以外の１８種の天然アミノ酸残基にそれぞれ変更した各ペプチド[Lys-Xaa-Cys(C_2D_5)-Aka]を用意した。ここで、”Xaa” は、

便宜的に、セリン残基及びシステイン残基以外の１８種の天然アミノ酸残基を表している。

ペプチド４：Lys-Ala-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号４；Lys-Ala-Cys-Ala)

ペプチド６：Lys-Asp-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号６；Lys-Asp-Cys-Ala)

ペプチド８：Lys-Glu-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号８；Lys-Glu-Cys-Ala)

ペプチド１０：Lys-Phe-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号１０；Lys-Phe-Cys-Ala)

ペプチド１２：Lys-Gly-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号１２；Lys-Gly-Cys-Ala)

ペプチド１４：Lys-His-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号１４；Lys-His-Cys-Ala)

ペプチド１６：Lys-Ile-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号１６；Lys-Ile-Cys-Ala)

ペプチド１８：Lys-Lys-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号１８；Lys-Lys-Cys-Ala)

ペプチド２０：Lys-Leu-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２０；Lys-Leu-Cys-Ala)

ペプチド２２：Lys-Met-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２２；Lys-Met-Cys-Ala)

ペプチド２４：Lys-Asn-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２４；Lys-Asn-Cys-Ala)

ペプチド２６：Lys-Pro-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２６；Lys-Pro-Cys-Ala)

ペプチド２８：Lys-Gln-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号２８；Lys-Gln-Cys-Ala)

ペプチド３０：Lys-Arg-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号３０；Lys-Arg-Cys-Ala)

ペプチド３２：Lys-Thr-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号３２；Lys-Thr-Cys-Ala)

ペプチド３４：Lys-Val-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号３４；Lys-Val-Cys-Ala)

ペプチド３６：Lys-Trp-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号３６；Lys-Trp-Cys-Ala)

ペプチド３８：Lys-Tyr-Cys(C_2D_5)-Aka（配列番号３８；Lys-Tyr-Cys-Ala)

３番目のアミノ酸残基はシステインにＤ５エチル基が導入されたものであり、４番目のアミノ酸残基は蛍光基アクリドン骨格を有するアラニン残基である。

[0057] 上記の実験例２と同様にして、ペプチド１，２の代わりに、２番目のアミノ酸残基”Xaa”が互いに同じアミノ酸残基であるペプチド３，４； ペプチド５，６； ペプチド７，８； ペプチド９，１０； ペプチド１１，１２； ペプチド１３，１４； ペプチド１５，１６； ペプチド１７，１８； ペプチド１９，２０； ペプチド２１，２２； ペプチド２３，２４；

ペプチド２５，２６； ペプチド２７，２８； ペプチド２９，３０； ペプチド３１，３２； ペプチド３３，３４； ペプチド３５，３６； ペプチド３７，３８をそれぞれ用いて、重水素置換されていない各ペプチド３，５，７，９，１１，１３，１５，１７，１９，２１，２３，２５，２７，２９，３１，３３，３５，３７への含フッ素アミノ酸の導入の反応効率を求めた。それらの結果を図２に示す。

[0058] 図２に示されるように、”Xaa”がセリンやスレオニンである場合に高い反応効率が示された。また、ヒスチジン、フェニルアラニン及びトリプトファンのように疎水性の高い側鎖を有するアミノ酸である場合は反応効率が１３～１７％と低いが、疎水性の側鎖を有するアミノ酸の中でも水酸基を含むチロシンの場合は反応効率が２５％と比較的高い。このことから、”Xaa”が側鎖に水酸基を含む場合（特に好ましくは通常の水酸基を含む場合）に高い反応効率が達成される傾向が確認された。

[0059] さらに、”Xaa”が負電荷を持つアスパラギン酸やグルタミン酸の場合は反応効率が１９～２１と低いが、正電荷を持つアルギニンやリジンの場合は反応効率が３３～４０％と高い（ヒスチジンも正電荷を持つが、上述のように疎水性が高いため反応効率は低い）。このことから、”Xaa”が親水性であり且つ正電荷を有する場合に高い反応効率が達成される傾向が確認された。

配列表フリーテキスト

[0060] 配列番号１～３８は、人工配列である。

請求の範囲

[請求項1] Ｎ末端アミノ酸残基として塩基性アミノ酸残基と、前記Ｎ末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基として、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、若しくは側鎖がＨ、－ＣＨ$_3$又は－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$であるアミノ酸残基とを少なくとも有する活性化配列を、フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質に付加し、活性化ペプチド又はタンパク質を得る工程と、

前記活性化ペプチド又はタンパク質に、フッ素含有アミノ酸、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を含む試薬溶液を用いて、前記フッ素含有アミノ酸を導入する工程とを含む、ペプチド又はタンパク質にフッ素を導入する方法。

[請求項2] 前記フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端残基が塩基性アミノ酸残基でない、請求項１の方法。

[請求項3] 前記フッ素を導入すべきペプチド又はタンパク質のＮ末端から２番目のアミノ酸残基が、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、及び側鎖がＨ、－ＣＨ$_3$、－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$及び－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基のいずれでもない、請求項２の方法。

[請求項4] 前記活性化配列における前記水酸基を有するアミノ酸が、セリン又はトレオニンである、請求項１～３のいずれかの方法。

[請求項5] 前記活性化配列における前記正電荷を有する親水性アミノ酸残基が、リジン又はアルギニンである、請求項１～４のいずれかの方法。

[請求項6] 前記活性化配列における前記２番目のアミノ酸残基が、グリシン、アラニン、イソロイシン、チロシン又はアスパラギンである、請求項１～３のいずれかの方法。

[請求項7] 前記活性化配列が、スペーサ基を含む、請求項１～６のいずれかの方法。

[請求項8] 前記スペーサ基がペプチドである、請求項７の方法。

[請求項9] 前記スペーサ基が炭素数２～６のアルキレンオキシド含有基である、請求項７の方法。

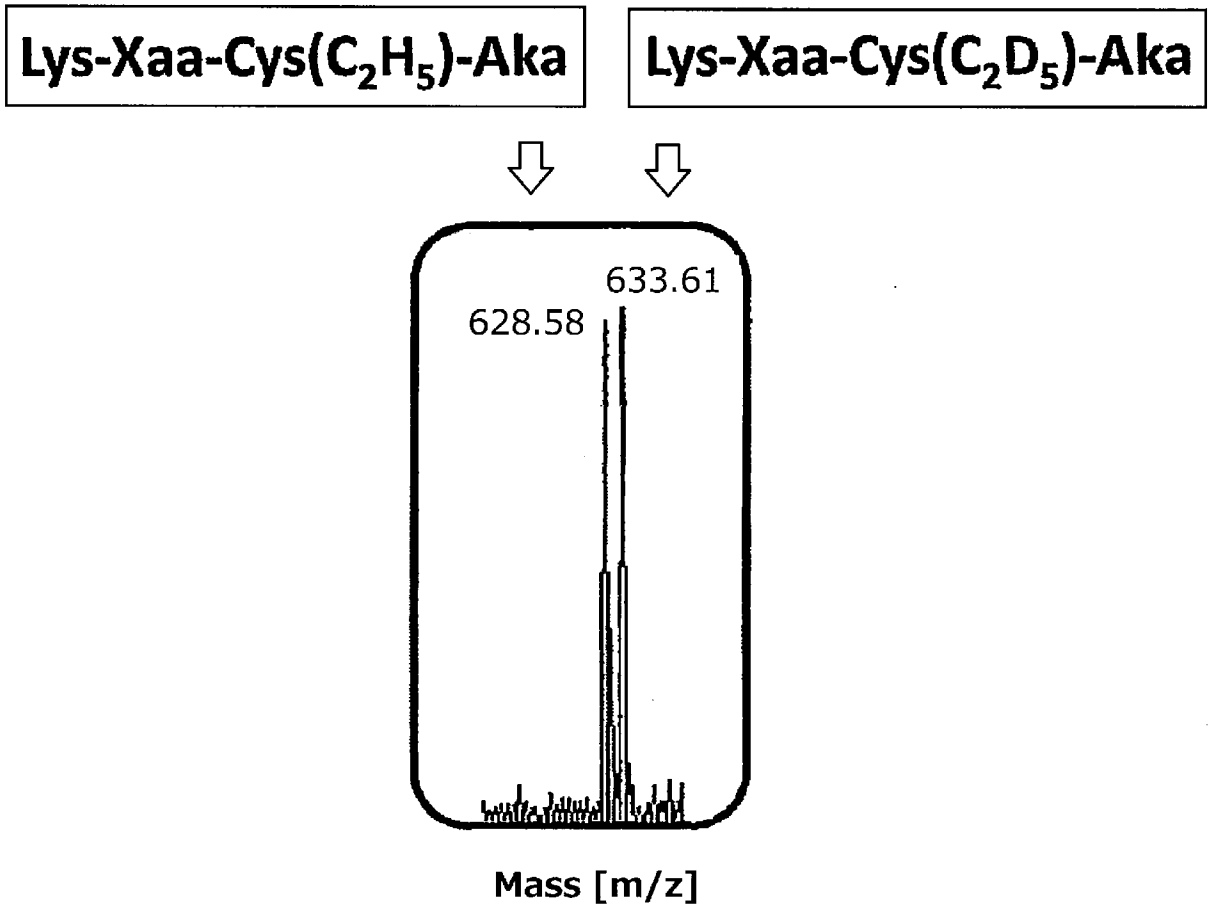
[請求項10] 前記塩基性アミノ酸残基がリジン残基又はアルギニン残基である、請求項１～９のいずれかの方法。

[請求項11] 前記フッ素含有アミノ酸が、２－アミノ－３－（４－[^{18}Ｆ]フルオロメトキシフェニル）プロピオン酸及び／又は２－アミノ－３－［４－（２－[^{18}Ｆ]フルオロエトキシ）フェニル］プロピオン酸である、請求項１～１０のいずれかの方法。

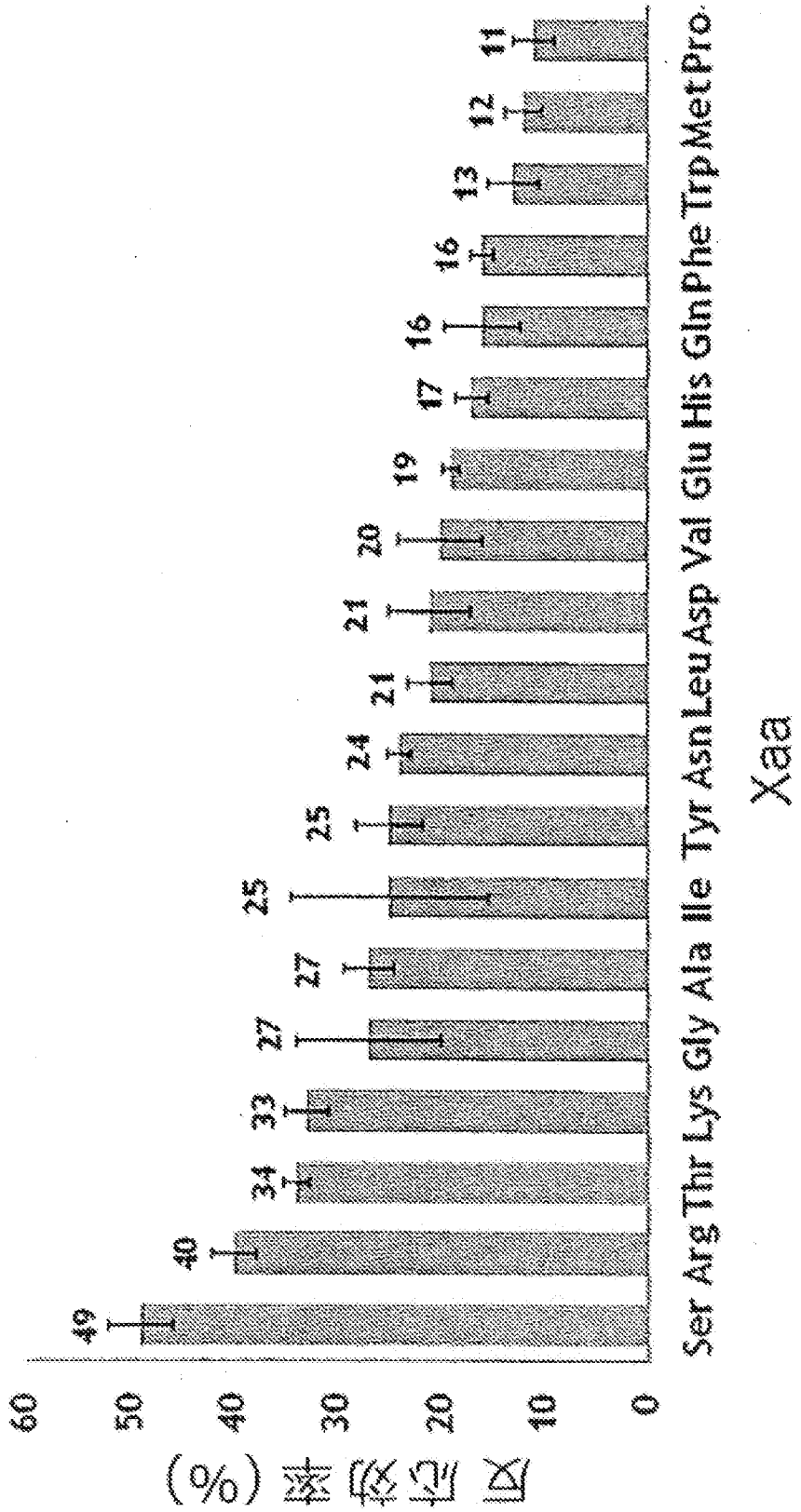
[請求項12] Ｎ末端アミノ酸残基として塩基性アミノ酸残基と、前記Ｎ末端アミノ酸残基に隣接するアミノ酸残基として、側鎖に水酸基を有するアミノ酸残基、側鎖に正電荷を有する親水性アミノ酸残基、若しくは側鎖が－Ｈ、－ＣＨ$_3$、－Ｃ（ＣＨ$_3$）Ｃ$_2$Ｈ$_5$又は－ＣＨ$_2$ＣＯＮＨ$_2$であるアミノ酸残基とを少なくとも有する活性化配列を有する活性化剤、ｔＲＮＡ、アミノアシルｔＲＮＡ合成酵素及びアミノアシルｔＲＮＡタンパク質転移酵素を少なくとも含む、請求項１～１１のいずれかの方法に用いるペプチド又はタンパク質のフッ素導入キット。

[請求項13] 請求項１～１１の方法又は請求項１２のキットを用いる、フッ素が導入されたペプチド又はタンパク質を製造する方法。

[図1]



[図2]


阻害率 (%)
60
50
40
30
20
10
0
49
40
34
33
27
27
25
27
25
24
21
21
20
19
17
16
16
13
12
11
Ser Arg Thr Lys Gly Ala Ile Tyr Asn Leu Asp Val Glu His Gln Phe Trp Met Pro
Xaa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/068829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P21/00(2006.01)i, *C07K1/06*(2006.01)n, *C07K1/13*(2006.01)n

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)
C12P21/00-21/02, C07K1/06, C07K1/13

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2009-106267 A (Okayama University), 21 May 2009 (21.05.2009), (Family: none)	1-8,10-11,13 9,12
X A	TAKI M. et.al., The NEXT-A(N-terminal EXtension with Transferase and ARS) reaction. Nucleic Acids Symp. Ser., 2009, vol.53, pp.37-38	1-8,10-11,13 9,12
A	TAKI M. et.al., Leucyl/phenylalanyl(L/F)-tRNA-protein transferase-mediated aminoacyl transfer of a nonnatural amino acid to the N-terminus of peptides and proteins and subsequent functionalization by bioorthogonal reactions. Biopolymers, 2007, vol.88, no.2, pp.263-271	1-13

☒ 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
30 September, 2013 (30.09.13)	08 October, 2013 (08.10.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/068829

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAKI M. et.al., Chemoenzymatic transfer of fluorescent non-natural amino acids to the N terminus of a protein/peptide. ChemBioChem, 2008, vol.9, no.5, pp.719-722	1-13
A	TAKI M. et.al., Leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase-mediated chemoenzymatic coupling of N-terminal Arg/Lys units in post-translationally processed proteins with non-natural amino acids. ChemBioChem, 2006, vol.7, no.11, pp.1676-1679	1-13
A	Hiroyuki KUROIWA et al., "Peptide Oyobi Tanpakushitsu no N-Mattan Tokuiteki na 18F Hyoshikiho no Kaihatsu", Journal of Japanese Biochemical Society, 2008, page 3P-1343	1-13
A	Hiroyuki KUROIWA et al., "L/F - Ten'i Koso ni yoru Positron Dansoho (PET) Riyo Kano na Amino-san Peptide N-Mattan eno Ten'i Sokudo", Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, page 3P-1187	1-13
P,X	Jun KAWAGUCHI et al., "NEXT-A Hanno ni Saiteki na Kishitsu Peptide no Tansaku", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yoshishu, 2013 Mar., vol.93, no.3, page 895 [1 D5-13]	1-13
P,X	KAWAGUCHI J. et.al., Kinetic analysis of the leucyl/phenylalanyl -tRNA-protein transferase with acceptor peptides possessing different N-terminal penultimate residues. FEBS Open Bio, 2013 Jun., vol.3, pp.252-255	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６８８２９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P21/00(2006.01)i, C07K1/06(2006.01)n, C07K1/13(2006.01)n

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））

Int.Cl.　C12P21/00-21/02, C07K1/06, C07K1/13

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	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３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/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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
X	JP 2009-106267 A (国立大学法人 岡山大学) 2009.05.21. (ファミリーなし)	1-8, 10-11, 13
A		9, 12
X	TAKI M. et.al., The NEXT-A(N-terminal EXtension with Transferase and ARS) reaction.	1-8, 10-11, 13
A	Nucleic Acids Symp. Ser., 2009, vol.53, pp.37-38	9, 12

☑　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矛盾するものではなく、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
３０．０９．２０１３	０８．１０．２０１３

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９６４
戸来　幸男
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　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
A	TAKI M. et.al., Leucyl/phenylalanyl(L/F)-tRNA-protein transferase-mediated aminoacyl transfer of a nonnatural amino acid to the N-terminus of peptides and proteins and subsequent functionalization by bioorthogonal reactions. Biopolymers, 2007, vol.88, no.2, pp.263-271	1-13
A	TAKI M. et.al., Chemoenzymatic transfer of fluorescent non-natural amino acids to the N terminus of a protein/peptide. ChemBioChem, 2008, vol.9, no.5, pp.719-722	1-13
A	TAKI M. et.al., Leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase-mediated chemoenzymatic coupling of N-terminal Arg/Lys units in post-translationally processed proteins with non-natural amino acids. ChemBioChem, 2006, vol.7, no.11, pp.1676-1679	1-13
A	黒岩浩行 外，ペプチドおよび蛋白質のＮ末端特異的な１８Ｆ標識法の開発. 生化学，2008，p.3P-1343	1-13
A	黒岩浩行 外，Ｌ/Ｆ－転移酵素によるポジトロン断層法（ＰＥＴ）利用可能なアミノ酸のペプチドＮ末端への転移速度. 生化学，2010，p.3P-1187	1-13
P, X	川口淳 外，ＮＥＸＴ－Ａ反応に最適な基質ペプチドの探索. 日本化学会講演要旨集，2013 Mar.，vol.93，no.3，p.895[1 D5-13]	1-13
P, X	KAWAGUCHI J. et.al., Kinetic analysis of the leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase with acceptor peptides possessing different N-terminal penultimate residues. FEBS Open Bio, 2013 Jun., vol.3, pp.252-255	1-13