(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
2016 年 12 月 15 日(15.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/199801 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/067025

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 8 日(08.06.2016)

(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 2015-116992 2015 年 6 月 9 日(09.06.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 **(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関１－３－１ Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加藤　義雄**(KATO, Yoshio)**; 〒3058565 茨城県つくば市東１－１－１　中央第５　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 小島　直**(KOJIMA, Naoshi)**; 〒3058566 茨城県つくば市東１－１－１　中央第６　国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 奥山　尚一，外 **(OKUYAMA, Shoichi** et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町２丁目１３番５号赤坂エイトワンビル７階 Tokyo (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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, 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, 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)）

(54) **Title**: AMINO ACID-MODIFIED NUCLEIC ACID AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称 : アミノ酸修飾核酸とその利用

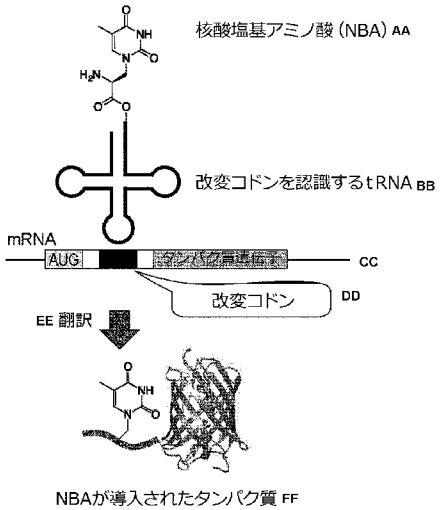


FIG. 1:
AA Nucleobase amino acid (NBA)
BB tRNA recognizing modified codon
CC Protein gene
DD Modified codon
EE Translation
FF Protein introduced with NBA

(57) Abstract: Provided is a method for synthesizing a protein, into which a nucleobase amino acid (NBA) is introduced at a desired position, that comprises: a step for preparing mRNA into which a modified codon is inserted at a desired position downstream of an initiation codon; and a step for translating the aforesaid mRNA into a protein in the presence of tRNA, said tRNA recognizing the modified codon and being acylated with the NBA. Also provided is a ribozyme that catalyzes the aminoacylation of tRNA and comprises two RNA molecules.

(57) 要約: 開始コドンの下流の所望の位置に改変コドンを挿入した mRNA を準備するステップと、前記改変コドンを認識する tRNA であって、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアシル化された tRNA の存在下で、前記 mRNA をタンパク質に翻訳するステップとを含む、所望の位置に NBA が導入されたタンパク質を合成する方法を提供する。また、tRNA のアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであって、２つの RNA 分子からなるリボザイムを提供する。

WO 2016/199801 A1

明　細　書

発明の名称 ： アミノ酸修飾核酸とその利用

技術分野

[0001] 本発明は、所望の位置に核酸塩基アミノ酸（NBA）が導入されたタンパク質を合成する方法およびタンパク質合成系に関する。

背景技術

[0002] 1990年代以降、種々の生物を対象としたゲノムプロジェクトが進められ、すでにヒトを含む多くの生物種について、そのゲノムの全塩基配列が解読されている。現在は、それらのゲノム解析の結果を利用し、個々の遺伝子にコードされたタンパク質の機能解析などのポストゲノム研究が盛んに行われている。特に、遺伝子改変動物を用いた研究は、特定の遺伝子が生体内でどのように機能しているかを個体レベルで解析する上で必須であり、また、遺伝子改変動物を疾患モデル動物として用いることにより新たな治療薬の開発などが可能であるため、重要な位置を占めている。そのため、遺伝子改変動物として、外部から特定の遺伝子を導入したトランスジェニック動物や、特定の内在遺伝子を破壊した遺伝子ノックアウト動物などが数多く開発されている。

[0003] 近年、様々な生物種において標的遺伝子をノックアウトする技術として、ゲノム編集が注目されている。ゲノム編集とは、DNA鎖の任意の標的配列を認識して切断することができる人工ヌクレアーゼ（例えばZFNやTALENなど）やRNA誘導型ヌクレアーゼ（例えばCRISPR/Casなど）を用いて、標的遺伝子の特定部位に変異を導入する技術である（非特許文献１）。ZFNやTALENなどの人工ヌクレアーゼは、標的配列を特異的に認識するDNA結合ドメインと、制限酵素FokIのDNA切断ドメインとを連結させたキメラタンパク質であるのに対し、CRISPR/Casシステムでは、ガイドRNA（gRNA）と呼ばれるRNA小分子が標的配列を認識し、RNA依存性DNAヌクレアーゼであるCas9がDNAを切断する。標的配列を特異的に認識するRNAの設計および合成は、タンパク質に比べて格段に容

易であるため、CRISPR/Casシステムは魅力的なゲノム編集ツールとなりつつある。

[0004] DNA配列を特異的に認識し、結合できる分子には、DNAやRNAの他に、ペプチド核酸（PNA）がある。PNAは、DNAやRNAと類似の性質を持つように人工的に作られた非天然の核酸類似体であり、DNAにおけるデオキシリボース－リン酸骨格が、ペプチド骨格によって置換された分子である。PNAには、例えば以下のような利点がある。（１）PNAは、DNAやRNAに存在するリン酸基による負電荷がなく、中性であるため、pHや塩濃度の影響を受けずにPNA/DNA二重鎖またはPNA/RNA二重鎖を安定的に形成することができる。（２）DNAやRNAよりもミスマッチにより生ずるTm値の減少が大きいため、塩基配列の認識特異性が極めて高い。（３）生体内に存在するヌクレアーゼやプロテアーゼに対する分解耐性が高いため、細胞内での使用に適している。そのため、現在までに、様々なペプチド骨格を有するPNAが開発されている（非特許文献２～７）。

[0005] 上述のPNAの利点に着目し、PNAを用いたゲノム編集も試みられている。例えば、東京大学の小宮山らは、標的遺伝子に特異的に結合するPNAとセリウムイオンをエレクトロポレーション法により細胞に導入し、標的遺伝子を破壊することに成功している（非特許文献８）。この方法では、標的部位に隣接するDNA二重鎖に対してPNAオリゴマーを割り込ませて標的部位のDNA二重鎖をほどき、一本鎖となった標的部位をセリウムイオンにより切断する。PNAは、塩基配列の認識特異性が極めて高いため、標的部位に特異的に挿入される。しかし、その一方で、セリウムイオンは、PNAの挿入により形成された一本鎖DNAだけでなく、それ以外の一本鎖DNAを切断してしまう可能性があり、結果として特異性に劣ることが問題となる。そのため、タンパク質からなるヌクレアーゼ部分と、PNAからなる標的DNA結合部分とを融合することができれば、任意の標的配列に対して高い特異性を有する人工ヌクレアーゼを容易に開発でき、有用なゲノム編集ツールとなり得るものと期待される。

[0006] しかしながら、これまでに作製されたPNAは、すべて化学合成によって作製されたものである。PNAオリゴマーの合成は、ペプチド合成と同様の固相合成

により、Boc、Cbz、Fmocなどにより保護されたモノマーを縮合し、脱保護を繰り返すことにより行う。そのため、固相合成の場合、１回の縮合反応の効率が90%だったとしても、10量体のオリゴマーの収率は35%程度にとどまってしまい、長鎖のPNAを効率よく作製することは極めて困難であるという問題がある。さらに、化学合成したPNAをタンパク質に融合させる場合にも、タンパク質の性状によっては、PNAと十分な融合ができない、または、過剰なPNAが融合してしまうなどの問題がある。PNAとタンパク質とを連続して化学合成する手法も考えられるが、ヌクレアーゼなどの酵素タンパク質は一般に100アミノ酸以上からなるため、上記のような固相合成法における反応効率の問題を考えれば、実用レベルでの合成はほぼ不可能である。そのため、PNA－タンパク質融合体を、化学合成以外の手法で合成できる手法を確立することが、ポストゲノム研究において大きなアドバンテージとなり得るものとして期待されている。

[0007] 一方、天然に存在するNBAまたはその類縁体として、ピューロマイシンやブラストサイジンなどが知られるが、これらはリボソームに結合することにより翻訳プロセスを阻害し、タンパク質合成を阻害することから、抗生物質として使用されている。そのため、NBAを構成単位とするPNAが導入されたタンパク質を、リボソーム翻訳系により合成することは困難であると従来考えられていた。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Gaj et al., Trends Biotechnol., Vol. 31, pp. 397-405 (2013)

非特許文献2：Nielsen et al., Science, Vol. 254, pp. 1497-1500 (1991)

非特許文献3：Garner et al., J. Am. Chem. Soc., Vol. 122, pp. 2405-2406 (2000)

非特許文献4：Roviello et al., Mol. BioSyst., Vol. 7, pp. 1073-1080 (2011)

非特許文献5：Ura et al., Science, Vol. 325, pp. 73-77, (2009)

非特許文献6：Diederichsen, Angew. Chem. Vol. 35, pp. 445-448 (1996)

非特許文献7：Yamazaki et al., Tetrahedron Lett., Vol. 38, pp. 8363-8366 (1997)

非特許文献8：Ito et al., Chem. Commun. Vol. 49, pp. 6764-6766, (2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、従来技術の諸問題を解消し、NBAを導入したタンパク質の合成方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、鋭意研究の結果、NBAでアシル化されたtRNAがリボソームに取り込まれ、NBAが導入されたタンパク質がリボソーム翻訳により合成されることを初めて確認した。NBAでアシル化されたtRNAが翻訳プロセスを阻害することなくリボソームに取り込まれ、NBAが導入されたタンパク質が合成されることは、従来からの想定を覆す驚くべき発見事項である。本発明者らは、この新規な発見に基づき、リボソーム翻訳系による、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質の合成方法を確立することに成功した。

[0011] すなわち、本発明は、一実施形態によれば、開始コドンの下流の所望の位置に改変コドンを挿入したmRNAを準備するステップと、前記改変コドンを認識するtRNAであって、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアシル化されたtRNAの存在下で、前記mRNAをタンパク質に翻訳するステップとを含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成する方法を提供するものである。

[0012] 前記方法は、tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムにより、前記NBAでアシル化されたtRNAを調製するステップをさらに含むことが好ましい。

[0013] また、本発明は、一実施形態によれば、（１）核酸塩基アミノ酸（NBA）と、（２）改変コドンを認識するtRNAと、（３）前記tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムとを含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質

を合成するための無細胞タンパク質合成系を提供するものである。

[0014] 前記リボザイムは、エンハンスドフレキシザイムであることが好ましい。

[0015] 前記リボザイムは、５’末端のリン酸基を有しないRNA分子からなることが好ましい。

[0016] 前記リボザイムは、２つのRNA分子からなることが好ましい。

[0017] 前記２つのRNA分子は、（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）および（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）であることが好ましい。

[0018] 前記改変コドンは、アンバーコドンであることが好ましい。

[0019] また、本発明は、一実施形態によれば、以下の２つのRNA分子：（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）および（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）からなる、または、前記（１）のRNA分子の３’末端および／もしくは前記（２）のRNA分子の５’末端において、１～３個の塩基が置換、欠失または付加された２つのRNA分子からなるリボザイムを提供するものである。

[0020] また、本発明は、一実施形態によれば、以下の２つのRNA分子：（３）GGAUCGAAAGAUUUCCGCAUCCCCG（配列番号７）および（４）CGGGUACAUGGCGUUAGGU（配列番号８）からなる、または、前記（３）のRNA分子の３’末端および／もしくは前記（４）のRNA分子の５’末端において、１～３個の塩基が置換、欠失または付加された２つのRNA分子からなるリボザイムを提供するものである。

[0021] 前記２つのRNA分子の５’末端および／または３’末端は、ビオチン化されていることが好ましい。

発明の効果

[0022] 本発明に係るタンパク質合成方法および無細胞タンパク質合成系は、所望の位置に核酸塩基アミノ酸（NBA）が導入されたタンパク質を容易かつ高効率に合成することを可能とする。

[0023] また、本発明に係るtRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムは、２つのRNA分子からなるため、容易かつ安価に化学合成により調製することができるため、有用である。さらに、本発明に係るtRNAのアミノアシル化反応

を触媒するリボザイムは、化学合成できるため、容易にビオチン化でき、これにより、アミノアシル化反応生成物の精製効率を改善できる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]所望の位置に核酸塩基アミノ酸（NBA）が導入されたタンパク質の翻訳合成方法を示す模式図である。

[図2]アラニル－チミンのシアノメチルエステル誘導体（AlaT-CME）の合成スキームを示す図である。

[図3]ホモアラニル－チミンのシアノメチルエステル誘導体（HalT-CME）の合成スキームを示す図である。

[図4]アミノアシル化されたtRNAの化学構造を示す図である。

[図5]核酸塩基アミノ酸（NBA）でアミノアシル化されたtRNAの化学構造を示す図である。

[図6]eFxによる、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアミノアシル化されたtRNAの生成を確認した図である。

[図7]eFxによる、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアミノアシル化されたtRNAの生成効率を比較したグラフである。

[図8]（ａ）全長eFxおよび（ｂ）スプリットeFxの模式図である。

[図9]スプリットeFxによるtRNAのアミノアシル化反応を確認した図である。

[図10]核酸塩基アミノ酸（NBA）が導入されたGFPの合成を確認した図である。

[図11]（ａ）全長dFxおよび（ｂ）スプリットdFxの模式図である。

[図12]スプリットdFxによるtRNAのアミノアシル化反応を確認した図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は本明細書中に説明した実施形態に限定されるものではない。

[0026] 本発明は、第一の実施形態によれば、開始コドンの下流の所望の位置に改変コドンを挿入したmRNAを準備するステップと、前記改変コドンを認識するtRNAであって、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアシル化されたtRNAの存在下で、

前記mRNAをタンパク質に翻訳するステップとを含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成する方法である。本実施形態のタンパク質合成方法の概略を図１に示す。

[0027] 本実施形態のタンパク質合成方法では、目的のタンパク質をコードするmRNAの所望の位置に改変コドンを挿入したものを調製して使用する。

[0028] 本実施形態における「mRNA」は、目的のタンパク質をコードする配列と、リボソームがタンパク質翻訳を開始するために必要な配列（例えば、シャイン・ダルガノ（SD）配列、コザック配列、内部リボソーム導入部位（IRES）など）を含む任意のものであってよい。また、目的のタンパク質は任意のものであってよいが、例えば、ヌクレアーゼ、リコンビナーゼ、インテグラーゼ、デアミナーゼ、メチルトランスフェラーゼ、スルフトランスフェラーゼ、グリコシラーゼなどであってよい。

[0029] 改変コドンを挿入したmRNAは、当該mRNAをコードするDNAに改変コドンを挿入したものを作製し、そのDNAをRNAポリメラーゼによりmRNAへと転写することによって調製することができる。改変コドンのDNAへの挿入は、例えばPCRなどの周知の遺伝子組換え技術により行うことができる。

[0030] 本実施形態における「改変コドン」には、自然界ではアミノ酸が割り当てられていないアンバーコドン、オーカーコドンまたはオパールコドンの３種類の終止コドン、４塩基コドンまたは５塩基コドン（Hosaka et al., Nucl. Acids Res., Vol. 29, pp. 3646-3651, 2001）、s-yやDs-Pxなどの非天然型塩基を用いた人工コドン（Hirao et al., Nat. Biotech., Vol. 20, pp. 177-182, 2002; 平尾, TCIメール, Vol. 148, pp. 2-15, 2010）などを使用することができる。あるいは、ロイシン、セリンまたはアルギニンはそれぞれ６種類のコドンによりコードされているため、それらのうちのいくつかを改変コドンに割り当てることもできる。また、上記から選択される複数の異なる改変コドンを組み合わせて使用することもでき（Rodrigez et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 103, pp. 8650-8655, 2006）、これにより、複数種類のNBAを目的のタンパク質に導入することが可能である。１または複数の改変

コドンは、mRNAの開始コドンの下流の、任意の１以上の位置に挿入されてよい。

[0031] 本実施形態における改変コドンには、終止コドンを用いることが好ましく、アンバーコドンを用いることが特に好ましい。通常であれば、アンバーコドンが翻訳終結因子であるRF1に認識されることにより、リボソームによるタンパク質翻訳が終結するが、アンバーコドンに対するアンチコドン（CUA）を持つtRNA（アンバーサプレッサーtRNA）をいずれかのアミノ酸によりアミノアシル化して人為的に添加することにより、アンバーコドンに対応する位置に前記アミノ酸が導入されて、下流の遺伝子も継続して翻訳される。すなわち、本実施形態のタンパク質合成方法では、核酸塩基アミノ酸（NBA）によりアミノアシル化されたアンバーサプレッサーtRNA用いることにより、アンバーコドンをNBAを規定するコドンに改変することができ、目的のタンパク質の所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成することが可能となる。

[0032] 次いで、前記改変コドンを認識するtRNAであって、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアシル化されたtRNAを準備する。

[0033] 本実施形態における「tRNA」には、任意の生物由来の天然tRNAを用いてもよいし、人工的な改変コドンに対するアンチコドンを持つように構築された改変tRNAを用いてもよい。改変tRNAは、上記改変コドンを挿入したmRNAと同様に、改変tRNAをコードするDNAを作製し、それをインビトロ転写することにより調製することができる。

[0034] 本実施形態における「核酸塩基アミノ酸（NBA）」には、核酸塩基を側鎖として有するアミノ酸であれば、任意のものを使用することができる。

[0035] 本実施形態のNBAを構成する核酸塩基としては、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、チミン（Ｔ）、ウラシル（Ｕ）、およびこれらの誘導体を使用することができる。核酸塩基の誘導体としては、例えば、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、７－デアザグアニン、４－チオウラシル、２－アミノプリン、ヒポキサンチン、８－オキソグアニンなどが挙げられる。本実施形態における好ましい核酸塩基は、チミン（Ｔ）

またはウラシル（Ｕ）である。

[0036] 本実施形態のNBAを構成するアミノ酸としては、２０種類の天然アミノ酸およびその誘導体を使用することができる。アミノ酸の誘導体としては、例えば、ホモアラニン、アラニン、ノルバリン、βアラニン、γアミノ酪酸、アミノエチルグリシン、アミノマロン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、などが挙げられる。本実施形態における好ましいアミノ酸は、アラニンまたはホモアラニンである。

[0037] 本実施形態におけるNBAは、従来公知の化学合成方法や、以下の実施例において記載する化学合成方法およびそれに準ずる化学合成方法により合成することができる。また、本実施形態におけるNBAは、セリンアセチルトランスフェラーゼやアセチルセリンスルフヒドリラーゼなどの酵素を用いて生合成することができる。

[0038] 本実施形態における「NBAでアシル化されたtRNA」の一般式を図４および図５（ａ）に示す。式中、R_1は、核酸塩基またはその誘導体であり、R_2は、RNAであり、nは、リンカーの原子数であり、１～１０の整数であり、好ましくは１～５の整数であり、特に好ましくは１～３の整数である。また、リンカーを構成する原子は、炭素、窒素、酸素、硫黄、リン、ホウ素などであってよく、好ましくは炭素または窒素である。

[0039] 本実施形態における「NBAでアシル化されたtRNA」は、天然アミノ酸でアシル化されたtRNAと同様に、tRNA中のリボースの２’－ＯＨまたは３’－ＯＨのいずれかがNBAによりアシル化されたものであってよい。図４は、３’－ＯＨがアミノアシル化されたtRNAを示す。

[0040] 本実施形態における「NBAでアシル化されたtRNA」は、従来公知の方法により調製することができ、例えば、tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであるフレキシザイムを用いる方法（Murakami et al., Nat. Meth., Vol. 3, pp. 357-359, 2006）、tRNAの１塩基欠失体または２塩基欠失体と、アミノアシル化されたRNAモノマーまたはRNAダイマーとを、リン酸ジエステル結合の形成を触媒する酵素（例えばRNAリガーゼなど）により縮合する方法

（Heckler et al., Biochemistry, Vol. 23, pp. 1468-1473, 1984；Noren et al., Science, Vol. 244, pp. 182-188, 1989）、アミノアシル化tRNA合成酵素の変異体を使用する方法（Wang et al., Science, Vol. 292, pp. 498-500, 2001）などが挙げられる。

[0041] 本実施形態におけるNBAでアシル化されたtRNAは、フレキシザイムを用いて調製することが好ましい。フレキシザイムは、tRNAの３’末端領域のみ認識し、アンチコドン領域、Dアーム領域、TΨC領域などとは相互作用しないため（Xiao et al., Nature, Vol. 454, pp. 358-361, 2008）、Dアーム領域やTΨC領域を欠失したtRNA（Martins & Schimmel, tRNA, ASM Press, Soll and RajBhandary (Eds.), pp, 349-370, 1995）を含む、より広範な生物種のtRNAの使用が可能となる。

[0042] フレキシザイムには、例えば、原型のフレキシザイム（Fx）の他、ジニトロベンジルフレキシザイム（dFx）、エンハンスドフレキシザイム（eFx）、アミノフレキシザイム（aFx）などがあり、本実施形態においてはそのいずれも使用できるが、好ましくはeFx（配列番号１）である。

[0043] フレキシザイムはリボザイムであるため、上記mRNAやtRNAと同様に、インビトロ転写により調製することも、化学合成により調製することもできる。Ｘ線結晶構造解析の結果から、フレキシザイムのアミノアシル化活性には、フレキシザイムの５’末端のリン酸基とマグネシウムイオンとの相互作用が重要であると考えられていたため（Xiao et al., Nature, Vol. 454, pp. 358-361, 2008; Suga et al., Met. Ion Life Sci., Vol. 9, pp. 175-196, 2011）、インビトロ転写による調製が好ましいと従来考えられていた。しかし、実際には、以下の実施例において確認したように、フレキシザイムは、その５’末端のリン酸基の有無によらず、アミノアシル化活性を有する。したがって、本実施形態におけるリボザイムは、化学合成により調製されることが好ましく、すなわち、５’末端のリン酸基を有しないRNA分子からなることが好ましい。

[0044] フレキシザイムを化学合成する場合には、フレキシザイムは、２つのRNA分

子からなるものであることが好ましい。フレキシザイムは約45塩基のRNAからなるが、これを約25塩基からなる第１のRNA分子と、約20塩基からなる第２のRNA分子とに分割して化学合成することにより、より高効率かつ安価に調製することが可能となる。

[0045] 例えば、eFxを２つのRNA分子に分割する場合には、eFxの22～24番目のシトシン（C22～C24）と29～31番目のグアニン（G29～G31）により形成される二本鎖構造が維持されるように、C24からG29までの間において切断することができる。この二本鎖構造はすべてのフレキシザイムに共通して存在しているため、dFxやaFxについても同様に、eFxのC24からG29までの間に対応する箇所において切断することにより分割することが可能である。

[0046] すなわち、本実施形態におけるフレキシザイムは、GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）からなる第１のRNA分子と、CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）からなる第２のRNA分子からなることが好ましい。

[0047] また、上記フレキシザイムには、フレキシザイムの上記二本鎖構造が保存されていることを限度として、第１のRNA分子の３’末端および／または第２のRNA分子の５’末端の１～数個の塩基が置換、欠失または付加されてよい。ここで、「１～数個」とは、好ましくは「１～３個」、「１または２個」、または「１個」である。また、第１のRNA分子の３’末端および／または第２のRNA分子の５’末端は、例えばビオチンなどの標識化合物により修飾されてもよい。

[0048] 次いで、NBAでアシル化されたtRNAの存在下で、改変コドンを挿入したmRNAをタンパク質に翻訳する。mRNAのタンパク質への翻訳は、インビトロにおける無細胞タンパク質合成系または生細胞によるタンパク質合成系により行うことができる。本実施形態のmRNAのタンパク質への翻訳は、無細胞タンパク質合成系により行うことが好ましい。

[0049] インビトロにおける無細胞タンパク質合成系による翻訳は、リボソームや翻訳因子などの翻訳に必要な各種因子を混合して再構築した無細胞タンパク質合成系に、アミノアシル化されたtRNAおよび改変コドンを挿入したmRNAを

添加することにより行うことができる（Shimizu et al., Nat. Biotech., Vol. 19, pp. 751-755, 2001）。無細胞タンパク質合成系は、従来公知の手法により、大腸菌などの原核細胞またはウサギ網状赤血球などの真核細胞の抽出液から調製することができる。また、無細胞タンパク質合成系はキットとしても市販されており、そのような市販のキットを使用してもよい。市販のキットとしては、例えばPURExpress（New England Biolab社製）などが挙げられる。

[0050] 改変コドンとしてアンバーコドンを用いる場合には、翻訳終結因子であるRF1を含まない無細胞タンパク質合成系、または、抗RF1抗体（Agafonov et al., FEBS Lett., Vol. 579, pp. 2156-2160, 2005）もしくはRF1に結合するアプタマー（Sando et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 17, pp. 1216-1220, 2007）を添加した無細胞タンパク質合成系を使用してもよい。これにより、mRNA上のアンバーコドンにリボソームが到達しても翻訳が終結することなく、かわりにNBAをタンパク質へと導入される効率を向上させることが可能である。

[0051] 改変コドンとして４塩基コドンを用いる場合には、リボソームとして、４塩基コドンを好むように改変されたリボソームであるRibo-Q（Neumann et al., Nature, Vol. 464, pp. 441-444, 2010）を添加した無細胞タンパク質合成系を使用してもよい。

[0052] ロイシン、セリンまたはアルギニンをコードするコドンの一部を改変コドンに割り当てる場合には、例えば、細胞抽出液を固相化プローブ法（Tsurui et al., Anal. Biochem., Vol. 221, pp. 166-172, 1994）により処理し、特定のtRNAを除去または単離して無細胞タンパク質合成系を調製してもよい。

[0053] 生細胞によるタンパク質合成系を用いて翻訳する場合には、例えばアフリカツメガエル卵母細胞や哺乳動物細胞などの生細胞に、アミノアシル化されたtRNAおよび改変コドンを挿入したmRNAをマイクロインジェクションにより注入またはリポフェクションにより導入することにより、目的のタンパク質を合成することができる（Nowak et al., Science, Vol. 268, pp. 439-44

2, 1995）。

[0054] 本発明は、第二の実施形態によれば、（１）核酸塩基アミノ酸（NBA）と、（２）改変コドンを認識するtRNAと、（３）tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムとを含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成するための無細胞タンパク質合成系である。

[0055] 本実施形態の「無細胞タンパク質合成系」は、リボソームや翻訳因子などの翻訳に必要な各種因子を混合して再構築した無細胞タンパク質合成溶液に、上記（１）～（３）を添加することにより調製することができる。本実施形態において「無細胞タンパク質合成溶液」とは、目的のタンパク質をコードする遺伝子のmRNAやDNAを加えることにより、当該タンパク質を合成することができる溶液を意味する。無細胞タンパク質合成溶液は、従来公知の手法により原核細胞または真核細胞の抽出液から調製したものであってもよいし、市販の無細胞タンパク質合成キットに含まれる無細胞タンパク質合成溶液を使用してもよい。

[0056] 本実施形態における「核酸塩基アミノ酸（NBA）」、「改変コドンを認識するtRNA」、「tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイム」および「改変コドンが挿入されたmRNA」は、第一の実施形態において定義したものと同様であり、上で記載したように調製することができる。

[0057] 本実施形態の無細胞タンパク質合成系では、第一の実施形態における方法と同様に、tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムにはエンハンスドフレキシザイム（eFx）を用いることが好ましく、GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）からなる第１のRNA分子とCGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）からなる第２のRNA分子からなるeFxを用いることが特に好ましい。上記フレキシザイムには、フレキシザイムの上記二本鎖構造が保存されていることを限度として、第１のRNA分子の３’末端および／または第２のRNA分子の５’末端の１～数個の塩基が置換、欠失または付加されてもよい。ここで、「１～数個」とは、好ましくは「１～３個」、「１または２個」、または「１個」である。また、RNA分子の５’末端および／または３’末端は、例えば

ビオチンなどの標識化合物により修飾されていてもよい。

[0058] 本実施形態の無細胞タンパク質合成系では、第一の実施形態における方法と同様に、改変コドンには、アンバーコドン、オーカーコドンまたはオパールコドンの３種類の終止コドンを使用できる他、４塩基コドンまたは５塩基コドン、非天然型塩基を用いた人工コドンなどを使用することができる。あるいは、ロイシン、セリンまたはアルギニンをコードするコドンのうちのいくつかを改変コドンに割り当てることもできる。本実施形態における改変コドンは、終止コドンが好ましく、アンバーコドンが特に好ましい。なお、上で記載したように、使用する改変コドンに応じて、無細胞タンパク質合成溶液の構成成分を適宜変更して最適化することができる。

[0059] 本実施形態の無細胞タンパク質合成系は、適宜追加の構成、例えば、発現ベクター、核酸、アミノ酸、エネルギー源、緩衝液、タンパク質合成に用いる容器、使用説明書などを組み合わせることにより、無細胞タンパク質合成キットとして提供することもできる。本実施形態の無細胞タンパク質合成系を無細胞タンパク質合成キットとして提供する場合には、（１）核酸塩基アミノ酸（NBA）、（２）改変コドンを認識するtRNA、および（３）前記tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムは、予め無細胞タンパク質合成溶液に添加された状態であってもよいし、使用時に上記（１）～（３）を無細胞タンパク質合成溶液に添加できるように準備されていてもよい。

[0060] 第一の実施形態におけるタンパク質合成方法および第二の実施形態における無細胞タンパク質合成系は、従来では合成が困難であった核酸塩基を有するタンパク質を、容易かつ高効率に合成することを可能とする。

[0061] 本発明は、第三の実施形態によれば、tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであって、以下の２つのRNA分子：（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）および（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）からなるリボザイムである。

[0062] また、本発明は、第四の実施形態によれば、tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであって、以下の２つのRNA分子：（３）GGAUCGAAAGAUUU

CCGCAUCCCCG（配列番号７）および（４）CGGGUACAUGGCGUUAGGU（配列番号８）からなるリボザイムである。

[0063] 第三および第四の実施形態のリボザイムには、上記特定の配列からなるものだけでなく、リボザイムの二次構造が保存されていることを限度として、第１のRNA分子（（１）または（３））の３’末端および／または第２のRNA分子（（２）または（４））の５’末端において、１～数個の塩基が置換、欠失または付加されてよい。ここで、「１～数個」とは、好ましくは「１～３個」、「１または２個」、または「１個」である。

[0064] 第三および第四の実施形態のリボザイムは、インビトロ転写により調製してもよいし、化学合成により調製してもよい。本実施形態におけるリボザイムは、短い２つのRNAにより構成されるため、化学合成によって容易かつ安価に調製することが可能であり、化学合成により調製することが好ましい。

[0065] 第三および第四の実施形態のリボザイムは、２つのRNA分子の５’末端および／または３’末端がビオチンなどの標識化合物により修飾されたものであることが好ましい。特に好ましくは、第１のRNA分子（（１）または（３））の３’末端および／または第２のRNA分子（（２）または（４））の５’末端がビオチン化される。ビオチン化は、従来公知の手法により行うことができる。

[0066] 本実施形態のリボザイムは、tRNAのアミノアシル化反応全般に使用することができ、NBAによるtRNAのアミノアシル化だけでなく、任意の天然または非天然アミノ酸によるtRNAのアミノアシル化に使用することができる。

[0067] 本実施形態のリボザイムは、化学合成によって容易かつ安価に調製することができるため、有用である。また、標識化合物の導入も容易であり、これにより、tRNAのアミノアシル化反応後の精製効率を改善できる。

実施例

[0068] 以下に実施例を挙げ、本発明についてさらに説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0069] ＜１．核酸塩基アミノ酸（NBA）の合成＞

以下に示す手順により、アラニル－チミン（AlaT）のシアノメチルエステル誘導体（化合物６）とホモアラニル－チミン（HalT）のシアノメチルエステル誘導体を得た。それぞれの合成スキームを図２および図３に示す。

[0070] ＜１－１．（Ｓ）－β－（１－チミニル）アラニン　シアノメチルエステル塩酸塩（AlaTシアノメチルエステル誘導体：化合物６）の合成＞

（１）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－β－（Ｎ３－ベンゾイル－１－チミニル）アラニン（化合物３）の合成

アルゴン雰囲気下、Ｎ３－ベンゾイルチミン（化合物２）（1.84 g, 8.0 mmol）をジメチルホルムアミド（80 mL）に溶解し、室温で攪拌しながらジアザビシクロウンデセン（DBU, 1.20 mL, 8.0 mmol）をゆっくり滴下した。反応液を室温で10分間攪拌した後、Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニルセリンβ-ラクトン（化合物１）（1.43 g, 7.64 mmol）のジメチルホルムアミド溶液（40 mL）をゆっくりと滴下した。反応液を室温でさらに2.5時間攪拌した後、酢酸（0.46 mL, 8.0 mmol）を加えた。反応液を減圧下濃縮し、残渣をトルエンで２回共沸した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：クロロホルム－エタノール）により精製して、標記化合物（化合物３）2.36 g（74%）を白色泡状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：13.17 (br s, 1 H, COOH), 8.02 (d, 2 H, Bz, J = 7.6 Hz), 7.79 (m, 1 H, Bz), 7.59-7.56 (m, 3 H, H-6, Bz), 7.26 (br d, 1 H, NH, J = 9.1 Hz), 4.42 (m, 1 H, CH), 4.31 (m, 1 H, CH_2a), 3.62 (m, 1 H, CH_2b), 1.80 (s, 3 H, CH_3), 1.37 (s, 9 H, t-Bu).

[0071] （２）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－β－（１－チミニル）アラニン（化合物４）の合成

化合物３（2.34 g, 5.60 mmol）をメタノール（40 mL）に溶解し、 28%アンモニア水（30 mL）を加えて密封し、室温で２時間撹拌した。反応液を濃縮した後、アセトニトリルと水の混合溶液（3:1, 60 mL）に溶解し、イオン交換樹脂（プロトンフォーム）により中和した。イオン交換樹脂を濾過により除いた後、溶液を減圧下濃縮した。得られた残渣をエーテル（50 mL）に懸濁

して濾取することで、標記化合物（化合物４）1.52 g（86%）を白色粉末状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：13.00 (br s, 1 H, COOH), 11.25 (s, 1 H, 3-NH), 7.31 (s, 1 H, H-6), 7.14 (d, 1 H, NH, J = 9.0 Hz), 4.31 (ddd, 1 H, CH, J = 4.8, 9.0, 10.2 Hz), 4.20 (dd, 1 H, CH_2a, J = 4.8, 13.7 Hz), 3.54 (dd, 1 H, CH_2b, J = 10.2, 13.7 Hz), 1.72 (s, 3 H, CH_3), 1.32 (s, 9 H, t-Bu).

[0072] （３）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－β－（１－チミニル）アラニン　シアノメチルエステル（化合物５）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物４（313 mg, 1.0 mmol）をアセトニトリル（15 mL）に溶解して氷冷し、トリエチルアミン（0.56 mL, 4.0 mmol）およびクロロアセトニトリル（0.25 mL, 4.0 mmol）を加えた。反応液を室温に戻した後、22時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣を酢酸エチル（70 mL）に溶解し、水（30 mL）で２回、飽和食塩水（30 mL）で１回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：クロロホルム－エタノール）により精製して標記化合物（化合物５）205 mg（58%）を白色固体状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：11.31 (s, 1 H, 3-NH), 7.50 (d, 1 H, NH, J = 8.6 Hz), 7.34 (s, 1 H, H-6), 5.05 (d, 1 H, CH_2aCN, J = 16.0 Hz), 5.01 (d, 1 H, CH_2bCN, J = 16.0 Hz), 4.47 (ddd, 1 H, CH, J = 5.2, 9.5, 8.6 Hz), 4.16 (dd, 1 H, CH_2a, J = 5.2, 13.8 Hz), 3.70 (dd, 1 H, CH_2b, J = 9.5, 13.8 Hz), 1.73 (s, 3 H, CH_3), 1.34 (s, 9 H, t-Bu).

[0073] （４）（Ｓ）－β－（１－チミニル）アラニン　シアノメチルエステル　塩酸塩（化合物６）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物５（200 mg, 0.57 mmol）をジクロロメタン（10 mL）に溶解して氷冷し、トリエチルシラン（0.46 mL, 2.9 mmol）およびトリフルオロ酢酸（0.64 mL, 8.6 mmol）を加えた。反応液を室温に戻して４時

間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣をトルエンで３回共沸した。続いて、残渣に塩酸／酢酸エチル溶液（1N, 5.0 mL）を加えて、減圧下溶液を濃縮する作業を５回繰り返し、トリフルオロ酢酸塩を塩酸塩へと交換した。得られた白色固体を0.5N塩酸水溶液（8.0 mL）に溶解し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（Waters社、Sep-Pac Vac C-18 10g、溶出溶媒：水－アセトニトリル）により精製し、凍結乾燥することで標記化合物（化合物６）129 mg（78%）を白色固体状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：11.42 (s, 1 H, 3-NH), 8.49 (br s, 3 H, NH3), 7.38 (d, 1 H, H-6, J = 1.2 Hz), 5.12 (s, 2 H, CNCH_2), 4.50 (dd, 1 H, CH, J = 5.8, 6.5 Hz), 4.11 (dd, 1 H, CH_2a, J = 5.8, 14.7 Hz), 4.05 (dd, 1 H, CH_2b, J = 6.5, 14.7 Hz), 1.75 (s, 3 H, CH_3).

[0074] ＜１－２．（Ｓ）－γ－（１－チミニル）ホモアラニン　シアノメチルエステル　塩酸塩（HalTシアノメチルエステル誘導体：化合物１３）の合成＞

（１）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－γ－ヒドロキシ－ホモアラニン　ベンジル　エステル（化合物８）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物７（1.94 g, 6.00 mmol）をテトラヒドロフラン（50 mL）に溶解して氷冷し、BH_3-THF/THF溶液（1.1 mol/L, 16.4 mL, 18.0 mmol）をゆっくり滴下した。反応液を室温に戻して２．５時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液（50 mL）を加えた後、酢酸エチル（100 mL）を加えて分液した。有機層を水（50 mL）および飽和食塩水（50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：ヘキサン－酢酸エチル）により精製して標記化合物（化合物８）1.38 g（74%）を白色固体状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：7.37-7.32 (m, 5 H, Ph), 7.23 (d, 1 H, NH, J = 7.7 Hz), 5.15 (d, 1 H, PhCH_2a, J = 12.7 Hz), 5.07 (d, 1 H, PhCH_2b, J = 12.7 Hz), 4.59 (t, 1 H, OH, J = 5.0 Hz), 4.14 (m, 1 H, CH), 3.46-3.38 (m, 2 H, CH_2OH), 1.81 (m, 1 H, CH_2a), 1.72 (m, 1 H, CH_2b), 1.37

（s, 9 H, t-Bu).

[0075] （２）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－γ－ブロモ－ホモアラニン　ベンジル　エステル（化合物９）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物８（890 mg, 2.88 mmol）をジクロロメタン（40 mL）に溶解して氷冷し、トリフェニルフォスフィン（980 mg, 3.74 mmol）とＮ－ブロモスクシンイミド（670 mg, 3.74 mmol）を同時に加えて、氷冷下で10分、室温に戻してさらに1.5時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL）を加えた後、クロロホルム（70 mL）を加えて分液した。有機層を水（50 mL）および飽和食塩水（50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：ヘキサン－酢酸エチル）により精製して標記化合物（化合物９）700 mg（65%）を白色結晶として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 7.41 (d, 1 H, NH, J = 8.0 Hz), 7.37-7.32 (m, 5 H, Ph), 5.16 (d, 1 H, $PhCH_2a$, J = 12.5 Hz), 5.10 (d, 1 H, $PhCH_2$ b, J = 12.5 Hz), 4.18 (m, 1 H, CH), 3.56 (m, 1 H, $BrCH_2a$), 3.49 (m, 1 H, $BrCH_2b$), 2.20-2.,12 (m, 2 H, CH_2), 1.37 (s, 9 H, t-Bu).

[0076] （３）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－γ－（Ｎ３－ベンゾイル－１－チミニル）ホモアラニン　ベンジル　エステル（化合物１０）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物９（610 mg, 1.64 mmol）とＮ３－ベンゾイルチミン（化合物２）（566 mg, 2.46 mmol）をジメチルホルムアミド（25 mL）に溶解し、炭酸カリウム粉末（340 mg, 2.46 mmol）およびヨウ化テトラブチルアンモニウム（59 mg, 0.16 mmol）を加え、80℃で30分加熱攪拌した。反応液を室温まで冷却した後、酢酸エチル（150 mL）を加え、有機層を水（50 mL）で４回、および飽和食塩水（50 mL）で１回洗浄し、硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：ヘキサン－酢酸エチル）により精製して標記化合物（化合物１０）726 mg（85%）を白色泡物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：7.94 (m, 2 H, Bz), 7.78 (m, 1 H, Bz), 7.68 (s, 1 H, H-6), 7.58 (m, 2 H, Bz), 7.45 (br d, 1 H, NH, J = 8.1 Hz), 7.36-7.32 (m, 5 H, Bn), 5.14 (d, 1 H, $PhCH_2$a, J = 12.6 Hz), 5.10 (d, 1 H, $PhCH_2$b, J = 12.6 Hz), 4.10 (m, 1 H, CH), 3.82 (m, 1 H, CH_2a), 3.76 (m, 1 H, CH_2b), 2.13 (m, 1 H, CH_2a), 1.96 (m, 1 H, CH_2b), 1.81 (s, 3 H, CH_3), 1.37 (s, 9 H, t-Bu).

[0077] （４）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－γ－（１－チミニル）ホモアラニン（化合物１１）の合成

化合物１０（720 mg, 1.38 mmol）をジオキサン－水の混合溶液（3:2, 30 mL）に溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液（6.9 mL）を加えて室温で20時間撹拌した。反応液をイオン交換樹脂（プロトンフォーム）により中和した後、イオン交換樹脂を濾過により除き、溶液を減圧下濃縮した。残渣をトルエンで３回共沸し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：クロロホルム－エタノール）により精製して標記化合物（化合物１１）441 mg（98%）を白色固体状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：12.64 (br s, 1 H, COOH), 11.23 (s, 1 H, 3-NH), 7.41 (s, 1 H, H-6), 7.19 (br d, 1 H, NH, J = 8.0 Hz), 3.87 (m, 1 H, CH), 3.70-3.63 (m, 2 H, CH_2), 2.02 (m, 1 H, CH_2a), 1.83 (m, 1 H, CH_2b), 1.73 (s, 3 H, CH_3), 1.39 (s, 9 H, t-Bu).

[0078] （５）（Ｓ）－Ｎ－ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－γ－（１－チミニル）ホモアラニン　シアノメチルエステル（化合物１２）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物１１（430 mg, 1.31 mmol）をアセトニトリル（20 mL）に溶解して氷冷し、トリエチルアミン（1.09 mL, 7.86 mmol）およびクロロアセトニトリル（0.25 mL, 3.93 mmol）を加えた。反応液を室温に戻した後、18時間撹拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣を酢酸エチル（100 mL）に溶解し、水（35 mL）で２回、飽和食塩水（35 mL）で１回洗浄し、有機層を硫酸ナトリウムにより乾燥した。溶液を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出溶媒：クロロホルム－エタ

ノール）により精製して標記化合物（化合物１２）266 mg（55%）を白色泡状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：11.23 (s, 1 H, 3-NH), 7.52 (br d, 1 H, NH, J = 7.8 Hz), 7.41 (s, 1 H, H-6), 5.00 (s, 2 H, CH_2CN), 4.06 (m, 1 H, CH), 3.69 (m, 2 H, CH_2), 2.06 (m, 1 H, CH_2a), 1.87 (m, 1 H, CH_2b), 1.74 (s, 3 H, CH_3), 1.40 (s, 9 H, t-Bu).

[0079] （６）（Ｓ）－γ－（１－チミニル）ホモアラニン　シアノメチルエステル塩酸塩（化合物１３）の合成

アルゴン雰囲気下、化合物１２（264 mg, 0.72 mmol）をジクロロメタン（8.0 mL）に溶解して氷冷し、トリエチルシラン（0.35 mL, 2.16 mmol）およびトリフルオロ酢酸（0.53 mL, 7.2 mmol）を加えた。反応液を室温に戻して３時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、残渣をトルエンで３回共沸した。続いて、残渣に塩酸の酢酸エチル溶液（1N, 5.0 mL）加えて、減圧下溶液を濃縮する作業を５回繰り返し、トリフルオロ酢酸塩を塩酸塩へと交換した。得られた白色固体を0.5N塩酸水溶液（8.0 mL）に溶解し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（Waters社、Sep-Pac Vac C-18 10g、溶出溶媒：水－アセトニトリル）により精製し、凍結乾燥することで標記化合物（化合物１３）133 mg（61%）を白色泡状物質として得た。

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ：11.32 (br s, 1 H, 3-NH), 8.50 (br s, 3 H, NH3), 7.48 (d, 1 H, H-6, J = 1.3 Hz), 5.16 (d, 1 H, CH_2aCN, J = 16.0 Hz), 5.12 (d, 1 H, CH_2bCN, J = 16.0 Hz), 4.22 (t, 1 H, CH, J = 6.7 Hz), 3.79 (m, 2 H, CH_2), 2.17 (m, 1 H, CH_2a), 2.06 (m, 1 H, CH_2b), 1.76 (s, 3 H, CH_3).

[0080] ＜２．NBAでアシル化されたtRNAの作製＞

上記１で合成したAlaTシアノメチルエステル誘導体（以下「AlaT-CME」と記載する）およびHalTシアノメチルエステル誘導体（以下「HalT-CME」と記載する）を用いて、アミノアシル化tRNAの調製を行った。アミノアシル化反応は、アミノアシル化反応を触媒するリボザイムにより行った。以下にその

手順および結果を詳述する。

[0081] ＜２－１．eFxおよびtRNAの調製＞

アミノアシル化反応を触媒するリボザイムには、エンハンスドフレキシザイムeFxを使用した。eFxは、フェニルアラニンのシアノメチルエステル誘導体（以下「Phe-CME」と記載する）を基質とし、３’末端にACCAまたはGCCAの配列を有するtRNAに対してフェニルアラニンを縮合するリボザイムである（Murakami et al., Nat. Meth., Vol. 3, pp. 357-359, 2006）。tRNAには、アンバーコドン（TAG）に対するアンチコドン（CUA）を持つ$tRNA_{CUA}$を使用した。なお、アミノアシル化反応の効率評価は、$tRNA_{CUA}$に代えて、tRNAアナログであるmicrohelix（以下「mihx」と記載する）を使用して行った。mihxは、アミノアシル化反応に際してeFxの３’末端（AGGU、下線）が作用するtRNAの３’末端部分のみを模倣したeFxのモデル基質であり、tRNAの３’末端配列（ACCA、下線）と同様の作用を有する３’末端配列（GCCA、下線）を有し、tRNAと同様にアミノアシル化される。

[0082] eFx（配列番号１）：

[化1]

GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCGAAAGGGGAUUAGCGUUAGGU

[0083] $tRNA_{CUA}$（配列番号２）：

[化2]

GGGAGAGUAGUUCAAUGGUAGAACGUCGGUCUcuaAAACCGAGCGUUGAGGGUUCGAUUCCUUUCUCUCCCACCA

（式中、cuaがアンバーコドンに対するアンチコドンである。）

[0084] mihx（配列番号３）：

[化3]

GGCUCUGUUCGCAGAGCCGCCA

[0085] eFx、$tRNA_{CUA}$およびmihxは、すべてインビトロ転写により合成した。250 nMの鋳型DNA、40 mMのTris（pH 8.0）、2 mMのスペルミジン、30 mMの$MgCl_2$、10 mMのジチオスレイトール、各25 mMのリボヌクレオチド三リン酸、および1 μg/mlのT7 RNAポリメラーゼを1 mLの水溶液に混合し、反応液を調製した（すべて最終濃度）。$tRNA_{CUA}$およびmihxの合成は、上記反応液に、最終濃度20mMのグアノシンモノリン酸を添加したものを使用した。37℃で３時間のインキュベーションの後、エタノール沈殿により反応液を濃縮後、6Mの尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を行った。泳動後のゲルから合成されたRNAのバンドを切り出し、TE緩衝液（10 mMのTris-HCl pH 8.0、1 mMのEDTA）により切り出したゲル片からRNAを溶出させ、エタノール沈殿によりRNAを精製した。精製後のRNAは精製水に溶解し、すべて250 μMとなるように調製した。

[0086] ＜２－２．フレキシザイムeFxによるtRNAのアミノアシル化＞

次いで、アミノアシル化反応を行った。

（１）AlaT-CMEを用いたmihxのアミノアシル化

25 μMのeFx、25 μMのmihx、50 mMのHEPES（pH 7.5）、600 mMの$MgCl_2$、および50 mMのAlaT-CMEを40 μLの水溶液中に混合した（すべて最終濃度）。氷上で1～12時間反応させた後、エタノール沈澱により精製し、mihxのAlaTによるアミノアシル化生成物（以下「mihx-AlaT」と記載する）を得た。精製したmihx-AlaTは、1 μLの10 mM 酢酸ナトリウム（pH 5.3）に溶解させた。

（２）HalT-CMEを用いたmihxのアミノアシル化

AlaT-CMEに代えてHalT-CMEを用いた以外は、上記（１）と同様にしてアミノアシル化反応を行い、mihxのHalTによるアミノアシル化生成物（以下「mihx-HalT」と記載する）を得た。

（３）Phe-CMEを用いたmihxのアミノアシル化（陽性対照）

AlaT-CMEに代えてPhe-CMEを用いた以外は、上記（１）と同様にしてアミノアシル化反応を行い、mihxのフェニルアラニン（Phe）によるアミノアシル化生成物（以下「mihx-Phe」と記載する）を得た。

[0087] mihx-AlaT、mihx-HalT、およびmihx-Pheを、酸性条件下におけるポリアクリルアミドゲル（6M尿素、20%アクリルアミド－ビスアクリルアミド、50 mM酢酸ナトリウム pH 5.3）および50 mM酢酸ナトリウム pH 5.3の緩衝液により電気泳動させた。泳動後のアクリルアミドゲルを臭化エチジウムにて染色後、GelDoc（BioRad社）を用いてRNAのバンドを撮影および定量化した。

[0088] 結果を図６および７に示す。図６は、電気泳動の結果である。各レーン上部の数字は、アミノアシル化反応の時間を示す。各レーン下部の数字は、未反応のmihxのバンド（白矢印）とアミノアシル化されたmihxのバンド（黒矢印）の比率から算出されたアミノアシル化効率を示す。mihx（白矢印）がアミノアシル化されると、分子量が増加することにより、バンドが上にシフトする（黒矢印）。なお、その上側に観察されるバンドは、eFxまたはその分解物によるものである。図７は、図６の結果から算出されたアミノアシル化効率をグラフ化したものである。これらの結果から、天然アミノ酸よりは効率が劣るものの、AlaTとHalTのいずれのNBAによっても、eFxによるtRNAのアミノアシル化が可能であることが示された。

[0089] ＜２－３．スプリットeFxによるtRNAのアミノアシル化＞

上記２－２において、インビトロ転写により調製したeFxに代えて、化学合成したeFxを用いた場合に同様のアミノアシル化反応が行えるかどうか試験した。全長eFxおよび以下の２つのRNA分子からなるeFx（以下「スプリットeFx」と記載する）を化学合成した。さらに、スプリットeFxについては、上流－スプリットeFxの３’末端および下流－スプリットeFxの５’末端をビオチン化した。

[0090] 上流－スプリットeFx（配列番号４）：

[化4]

GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG

[0091] 下流－スプリットeFx（配列番号５）：

[化5]

CGGGGAUUAGCGUUAGGU

[0092] 図８（ａ）に全長eFxの、図８（ｂ）にスプリットeFxの模式図を示す。なお、枠で囲まれた部分はmihxを示す。

[0093] 化学合成した全長eFxおよびスプリットeFxを用いた以外は、２－２（３）と同様にして、mihxのフェニルアラニン（Phe）によるアミノアシル化反応を行った。反応生成物を酸性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動させた後、臭化エチジウムで染色し、RNAのバンドを観察した。

[0094] 結果を図９に示す。インビトロ転写により合成したeFxを用いた場合（レーン１）と同様に、化学合成した全長eFxを用いた場合（レーン３、なお、図中、記号「＊」は、化学合成されたeFx（すなわち５’末端のリン酸基を有しない）の添加を示す）、および化学合成したスプリットeFxを用いた場合（レーン４）のいずれにおいても、mihxのPheによるアミノアシル化が確認された。これらの結果から、eFxの５’末端のリン酸基はアミノアシル化反応には必要なく、化学合成した全長eFxまたはスプリットeFxのいずれを用いても、インビトロ転写により合成したeFxと同様にアミノアシル化反応が行えることが示された。また、ストレプトアビジンビーズを用いて精製することにより、ビオチン化された化学合成したスプリットeFxを反応生成物から除去できることを確認した（レーン５）。

[0095] ＜２－４．スプリットdFxによるtRNAのアミノアシル化＞

eFx以外のフレキシザイムとして、ジニトロベンジルフレキシザイム（dFx

）についても、上流－スプリットdFx（GGAUCGAAAGAUUUCCGCAUCCCCG：配列番号７）および下流－スプリットdFx（CGGGUACAUGGCGUUAGGU：配列番号８）の２つのRNA分子からなるdFx（以下「スプリットdFx」と記載する）を化学合成し、アミノアシル化活性を試験した。図１１（ａ）に全長dFxの、図１１（ｂ）にスプリットdFxの模式図を示す。なお、枠で囲まれた部分はmihxを示す。

[0096] 全長dFxをインビトロ転写により、スプリットdFxを化学合成により、それぞれ調製した。全長eFxおよびスプリットeFxに代えて、全長dFx（配列番号９）およびスプリットdFxを用い、Phe-CMEに代えてフェニルアラニンのジニトロベンジルエステル誘導体（Phe-DBE）を用いた以外は、２－３と同様にして、mihxのフェニルアラニン（Phe）によるアミノアシル化反応を行った。

[0097] 結果を図１２に示す。各レーン下部の数字は、未反応のmihxのバンド（白矢印）とアミノアシル化されたmihxのバンド（黒矢印）の比率から算出されたアミノアシル化効率を示す。この結果から、スプリットdFx（レーン３）も全長dFx（レーン２）と同等の効率でアミノアシル化活性を有するものであることが示された。また、ストレプトアビジンビーズを用いて精製することにより、ビオチン化された化学合成したスプリットdFxを反応生成物から除去できることを確認した（レーン４）。

[0098] このように、フレキシザイムがその５’末端のリン酸基の有無によらずアミノアシル化活性を有し、フレキシザイムを２つのRNA分子に分割して容易かつ安価に化学合成により調製できることが初めて示された。さらに、２つのRNA分子からなるフレキシザイムは、化学合成により容易にビオチン修飾を導入することができ、これにより、アミノアシル化反応後の精製効率を改善できることが確認された。

[0099] ＜３．リボソームによるtRNA-NBAの取り込み＞

上記２－２（１）において、mihxに代えて$tRNA_{CUA}$を用いて、$tRNA_{CUA}$のAlaTまたはHal-Tによるアミノアシル化生成物（以下、それぞれ「tRNA-AlaT」、「tRNA-HalT」と記載する）を調製し、NBAでアシル化されたtRNAが、天然アミノ酸でアシル化された通常のtRNAと同様にリボソームに取り込まれるかどうか

を試験した。

[0100] ＜３－１．鋳型DNAの作成＞

緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子の上流にアンバーコドンを挿入した遺伝子（配列番号６）を作製した。以下に示すように、この遺伝子は、上流より、T7プロモーター（下線）、SD配列（二重下線）、開始コドン（一重線枠）、アンバーコドン（二重線枠）、HRV3Cプロテアーゼ切断配列（破線枠）、GFP遺伝子配列（一点鎖線枠）、およびオーカーコドン（網掛け枠）を含み、開始コドンとアンバーコドンの間に１個のグリシンのコドン、および、アンバーコドンとHRV3Cプロテアーゼ切断配列の間に２個のグリシンのコドンを含む。当該遺伝子の二本鎖DNAを鋳型DNAとして0.04 μg/μLの濃度となるように調製し、以下のリボソームによる翻訳反応に用いた。

[0101] [化6]

GTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAC ATG GGT tag GGCGGC CTT
GAAGTGCTCTTCCAAGGTCCT GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCC
ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
CCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGC
TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA
CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAAGGTCTATATC
ACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGACCCGCCACAACATCG
AGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGG
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACC
CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG TAA GAGCTCTGTG

[0102] ＜３－２．リボソームによる鋳型DNAの翻訳＞

PURExpressキット（New England Biolab社）に添付された4 μLのA液、3 μLのB液、1 μLの精製水、1 μLのtRNA-AlaTまたはtRNA-HalT溶液、および1 μlの0.04 μg/μlの鋳型DNAを混合して10 μLとし、翻訳反応を行った。上記のA液およびB液には、転写・翻訳・エネルギー再生に必要な翻訳開始因子

、翻訳伸長因子、翻訳終結因子、アミノアシル化tRNA合成酵素、T7 RNAポリメラーゼ、リボソーム、20種類の天然アミノ酸、大腸菌由来の全tRNA、デオキシリボヌクレオチド三リン酸などが含まれており、鋳型DNAと混合することにより目的タンパク質を合成することができる。37℃で3時間の反応後、384ウェルプレート（グライナー社）に9 μLの反応液を移し、合成されたGFPの蛍光をプレートリーダー（TECAN社）にて測定した。

[0103] 結果を図１０に示す。グラフは、左から順に、（１）鋳型DNAのみを添加（陰性対照）、（２）鋳型DNAおよびアミノアシル化されていない$tRNA_{CUA}$を添加（陰性対照）、（３）鋳型DNAおよびPheでアミノアシル化された$tRNA_{CUA}$を添加（陽性対照）、（４）鋳型DNAおよびtRNA-AlaTを添加、（５）鋳型DNAおよびtRNA-HalTを添加して反応を行った場合のGFP蛍光強度（（２）と比較した相対値）を示す。（４）および（５）のGFP蛍光強度は、陰性対照と比較して明らかに増加しており、すなわち、tRNA-AlaTおよびtRNA-HalTのいずれによってもサプレッションが起こり、AlaTまたはHalTが取り込まれたGFPが合成されたことが確認された。なお、（４）および（５）において（３）よりもGFP蛍光強度が低いのは、それぞれのアミノ酸によるtRNAのアミノアシル化効率の相違や、アミノアシル化されたtRNAのリボソームへの取り込み効率の相違などが複合的に影響したものと理解される。

[0104] 以上の結果から、リボソーム翻訳系により、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成できることが示された。

請求の範囲

[請求項1] 開始コドンの下流の所望の位置に改変コドンを挿入したmRNAを準備するステップと、

前記改変コドンを認識するtRNAであって、核酸塩基アミノ酸（NBA）でアシル化されたtRNAの存在下で、前記mRNAをタンパク質に翻訳するステップと

を含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成する方法。

[請求項2] tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムにより、前記NBAでアシル化されたtRNAを調製するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記リボザイムがエンハンスドフレキシザイムである、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 前記リボザイムが５’末端のリン酸基を有しないRNA分子からなる、請求項２または３に記載の方法。

[請求項5] 前記リボザイムが２つのRNA分子からなる、請求項２～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 前記リボザイムが以下の２つのRNA分子：

（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）、および

（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）

からなる、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記改変コドンがアンバーコドンである、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] （１）核酸塩基アミノ酸（NBA）と、

（２）改変コドンを認識するtRNAと、

（３）前記tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムと

を含む、所望の位置にNBAが導入されたタンパク質を合成するための無細胞タンパク質合成系。

[請求項9] 前記リボザイムがエンハンスドフレキシザイムである、請求項８に

記載の無細胞タンパク質合成系。

[請求項10] 前記リボザイムが５’末端のリン酸基を有しないRNA分子からなる、請求項８または９に記載の無細胞タンパク質合成系。

[請求項11] 前記リボザイムが２つのRNA分子からなる、請求項８～１０のいずれか１項に記載の無細胞タンパク質合成系。

[請求項12] 前記２つのRNA分子が、

（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）、および

（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）

である、請求項１１に記載の無細胞タンパク質合成系。

[請求項13] 前記改変コドンがアンバーコドンである、請求項８～１２のいずれか１項に記載の無細胞タンパク質合成系。

[請求項14] tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであって、以下の２つのRNA分子：

（１）GGAUCGAAAGAUUUCCGCGGCCCCG（配列番号４）、および

（２）CGGGGAUUAGCGUUAGGU（配列番号５）

からなるリボザイム、または、前記（１）のRNA分子の３’末端および／もしくは前記（２）のRNA分子の５’末端において、１～３個の塩基が置換、欠失または付加された２つのRNA分子からなるリボザイム。

[請求項15] tRNAのアミノアシル化反応を触媒するリボザイムであって、以下の２つのRNA分子：

（３）GGAUCGAAAGAUUUCCGCAUCCCCG（配列番号７）、および

（４）CGGGUACAUGGCGUUAGGU（配列番号８）

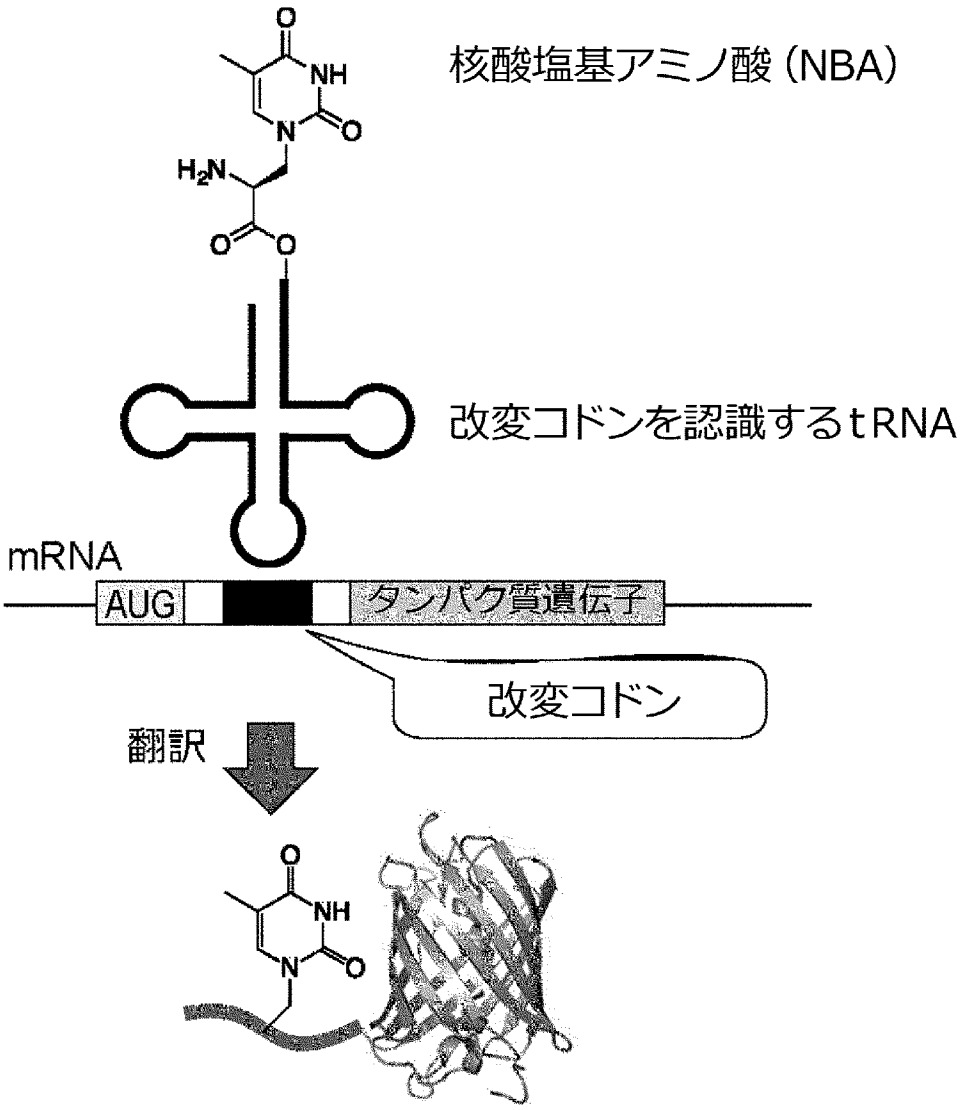
からなるリボザイム、または、前記（３）のRNA分子の３’末端および／もしくは前記（４）のRNA分子の５’末端において、１～３個の塩基が置換、欠失または付加された２つのRNA分子からなるリボザイム。

[請求項16] 前記２つのRNA分子の５’末端および／または３’末端がビオチン

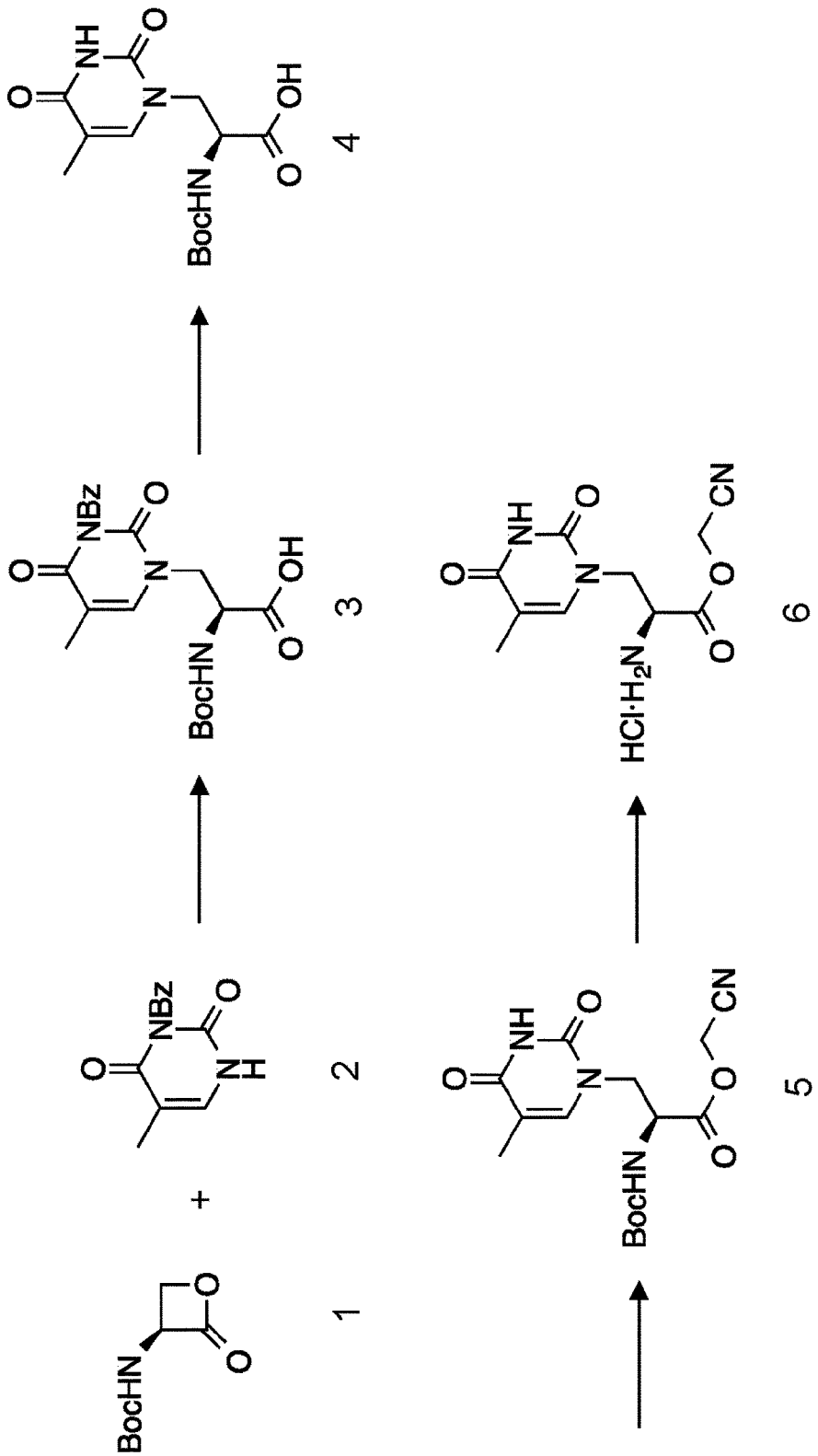
化されている、請求項１４または１５に記載のリボザイム。

WO 2016/199801 PCT/JP2016/067025

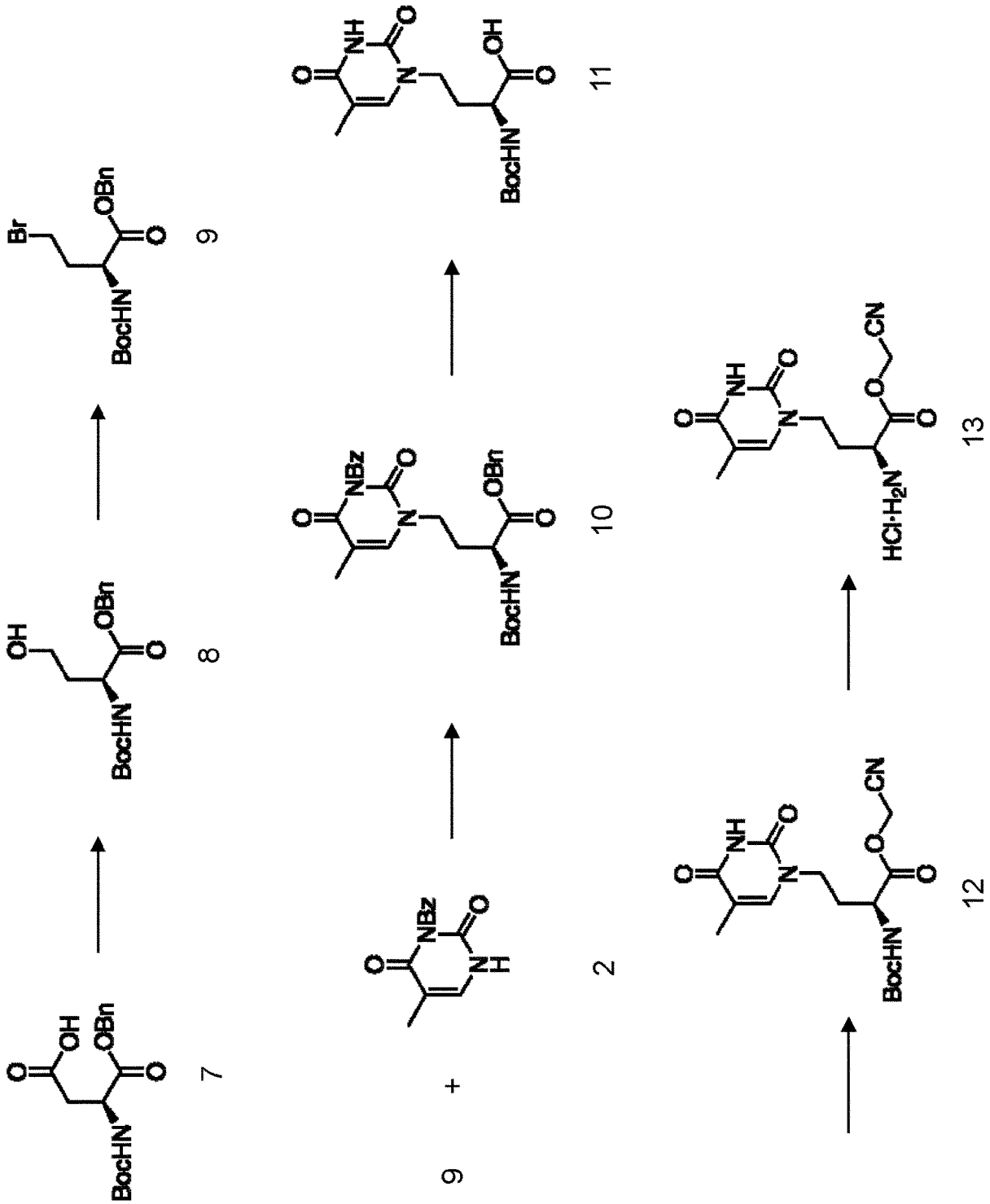
[図1]



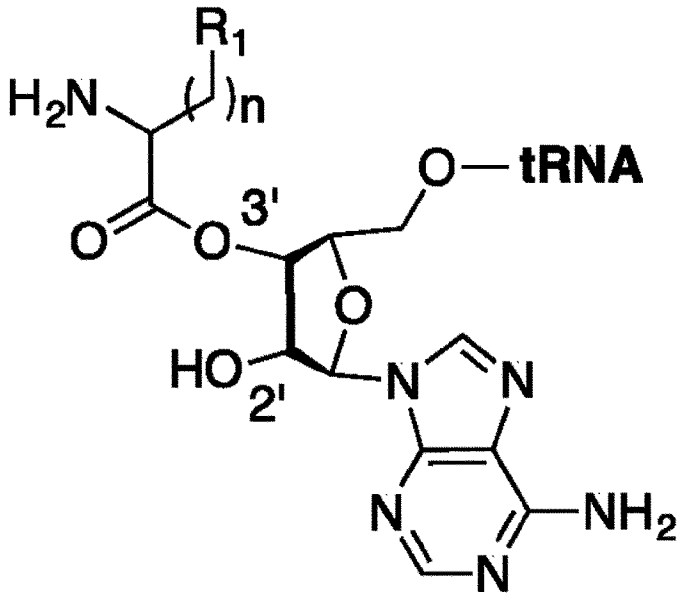
[図2]



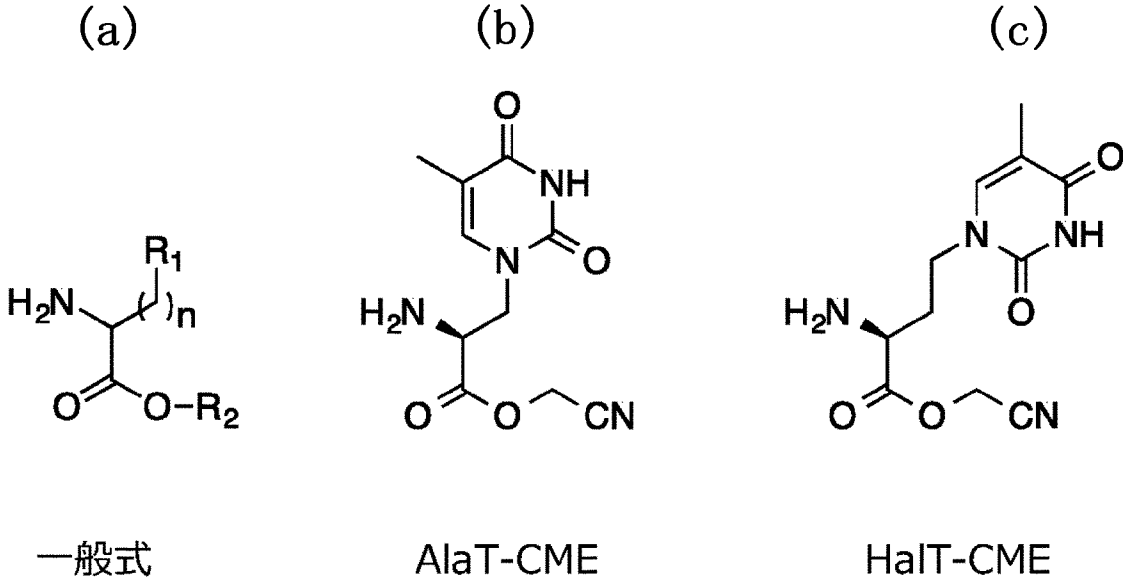
[図3]



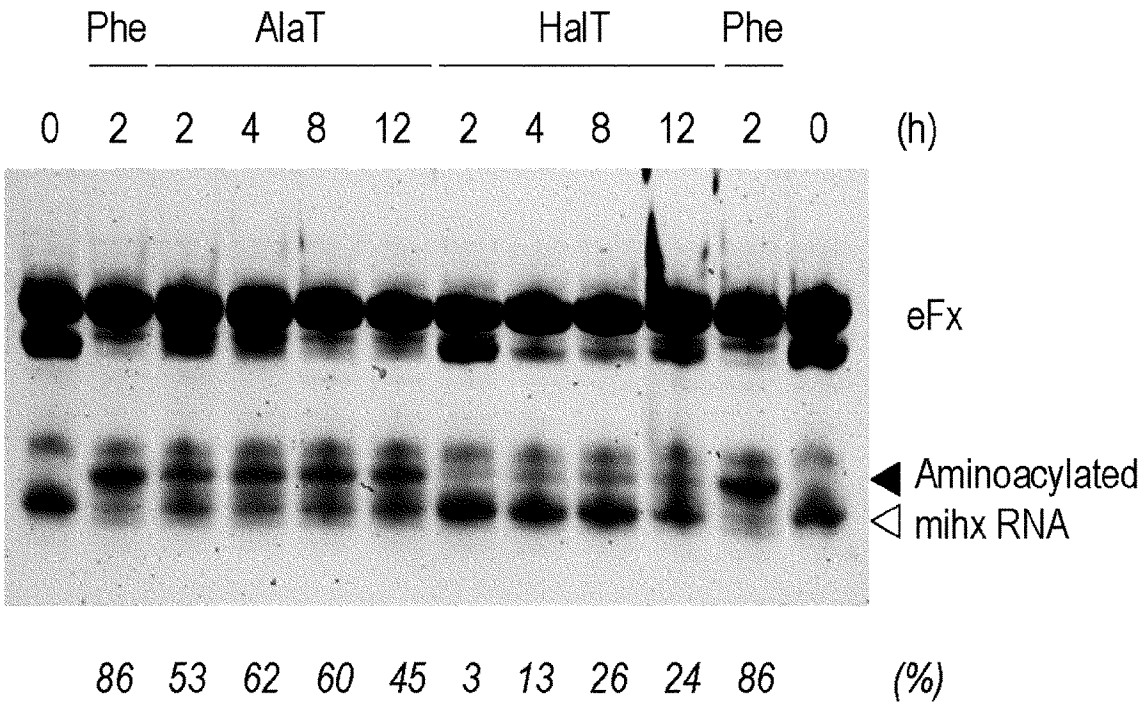
[図4]


R1
H2N
n
O
O
3'
O
tRNA
HO
2'
N
N
N
N
NH2

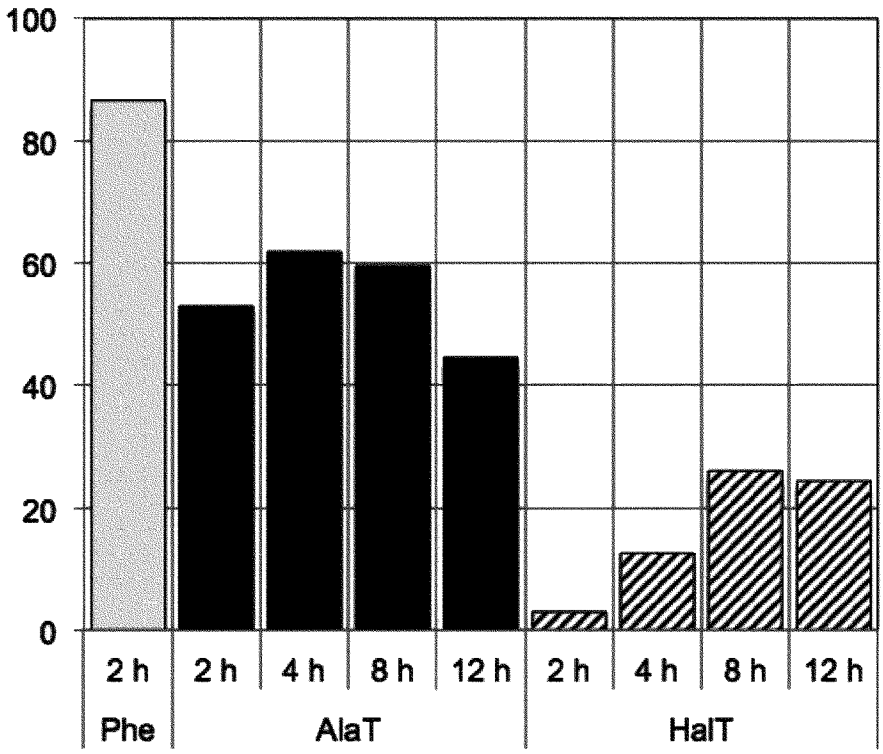
[図5]


(a)
(b)
(c)
R1
H2N
n
O
O-R2
O
NH
N
O
H2N
O
O
CN
O
N
NH
O
H2N
O
O
CN
一般式
AlaT-CME
HalT-CME

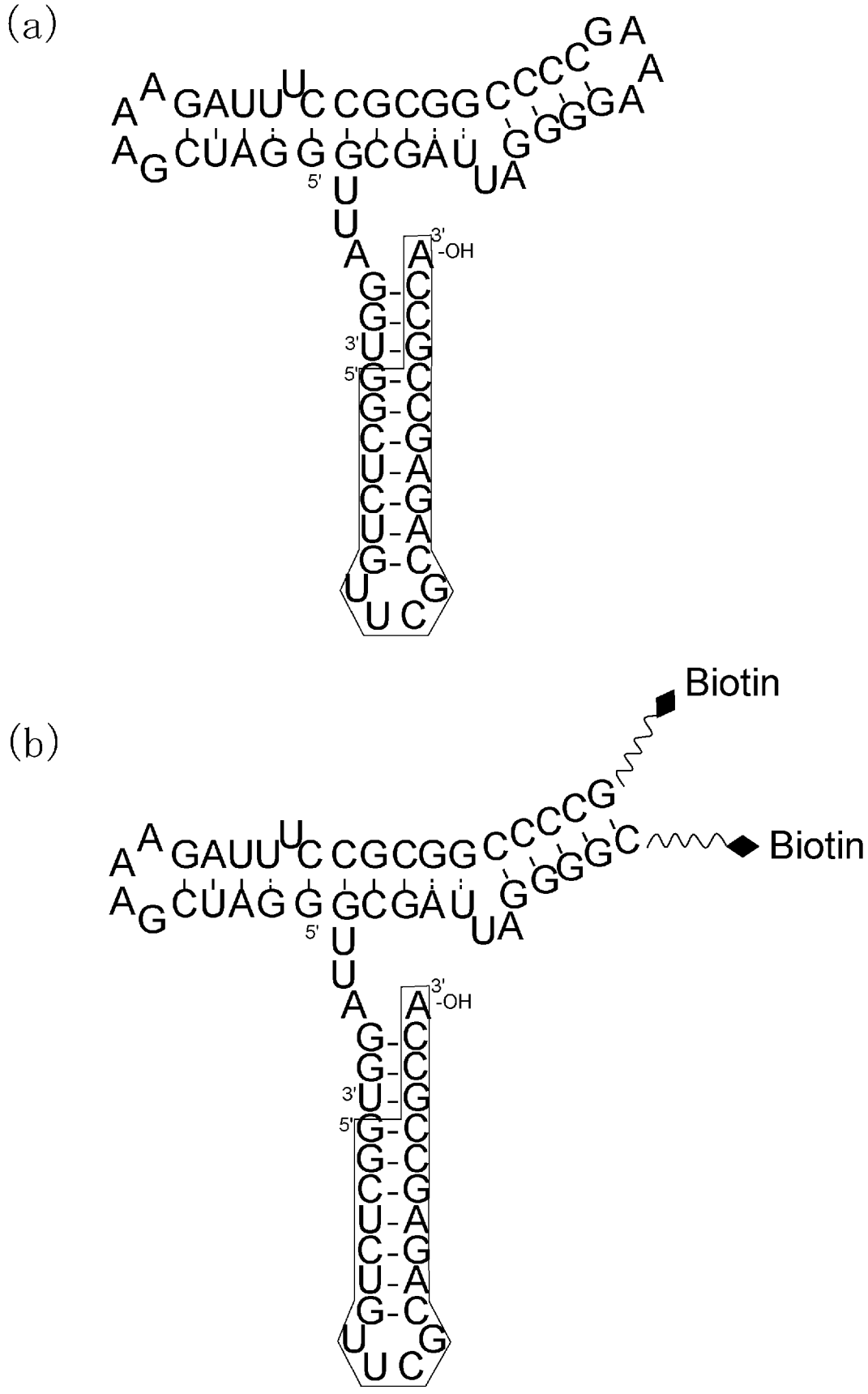
[図6]


Phe
AlaT
HalT
Phe
0 2 2 4 8 12 2 4 8 12 2 0 (h)
eFx
Aminoacylated
mihx RNA
86 53 62 60 45 3 13 26 24 86 (%)

[図7]

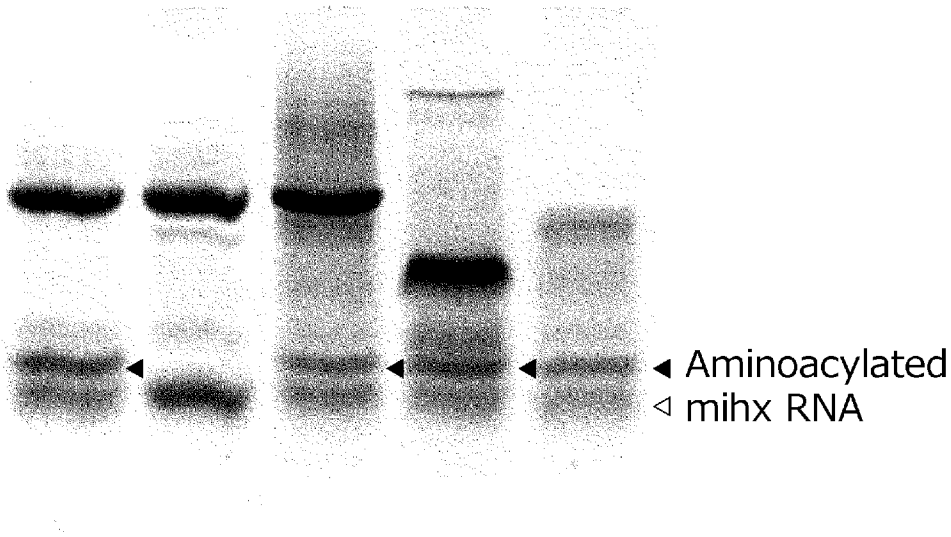

100
80
60
40
20
0
2 h
2 h
4 h
8 h
12 h
2 h
4 h
8 h
12 h
Phe
AlaT
HalT

[図8]

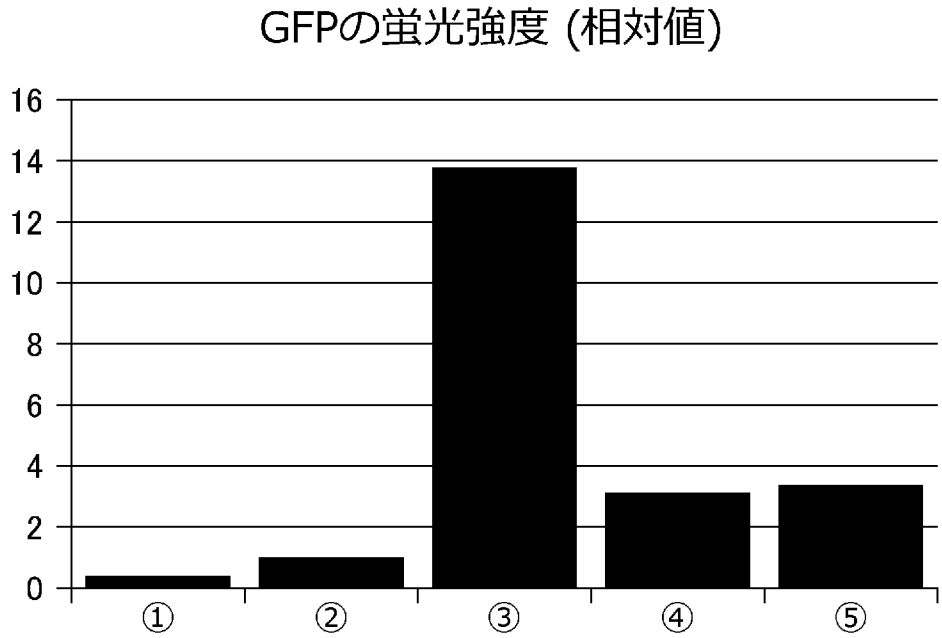


[図9]

Phe-CME	+	−	+	+	+
mihx	+	+	+	+	+
eFx (Full)	+	+	*	−	−
eFx ½ (up)	−	−	−	+	+
eFx ½ (dn)	−	−	−	+	+
StAv bead	−	−	−	−	+

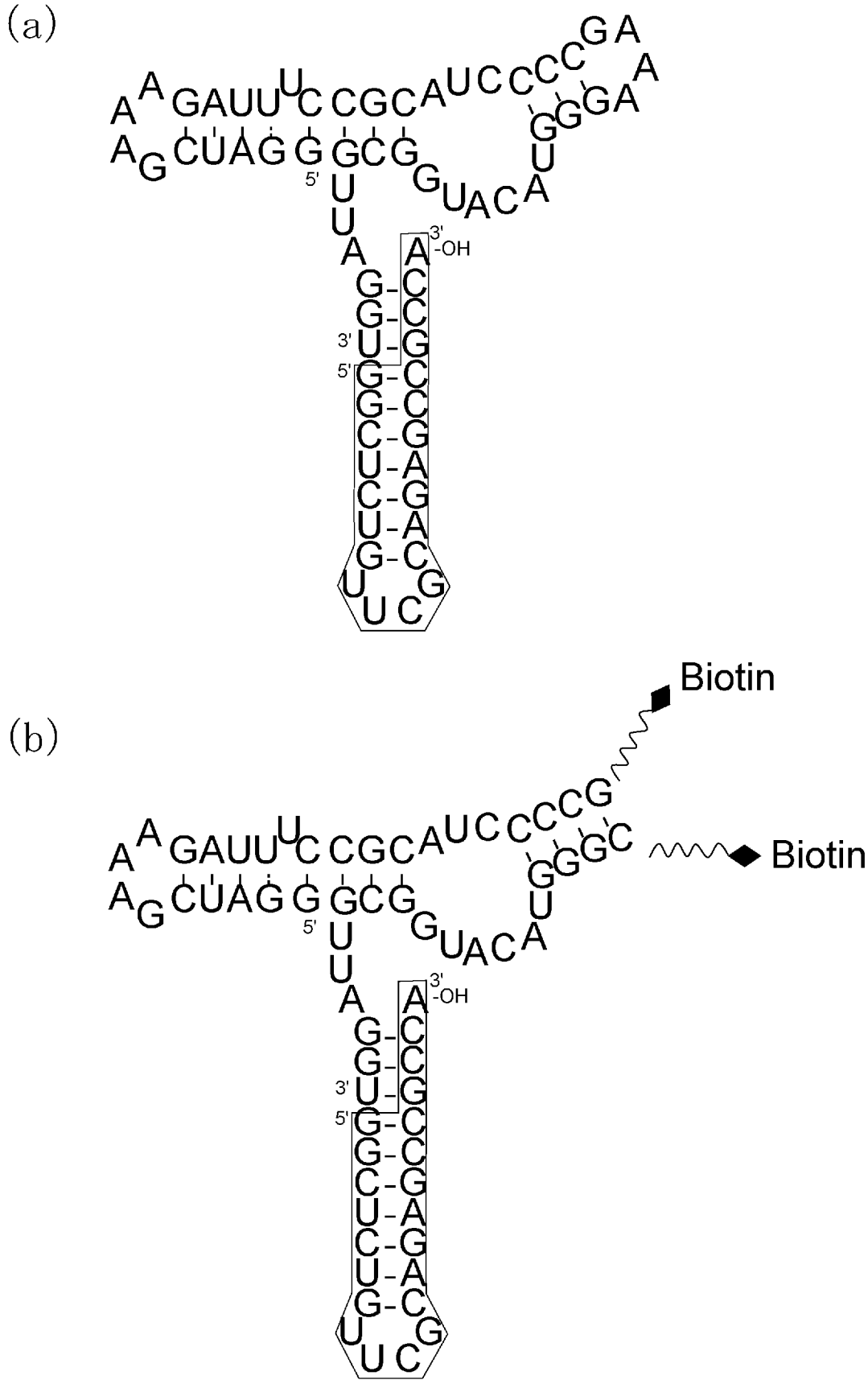


[図10]

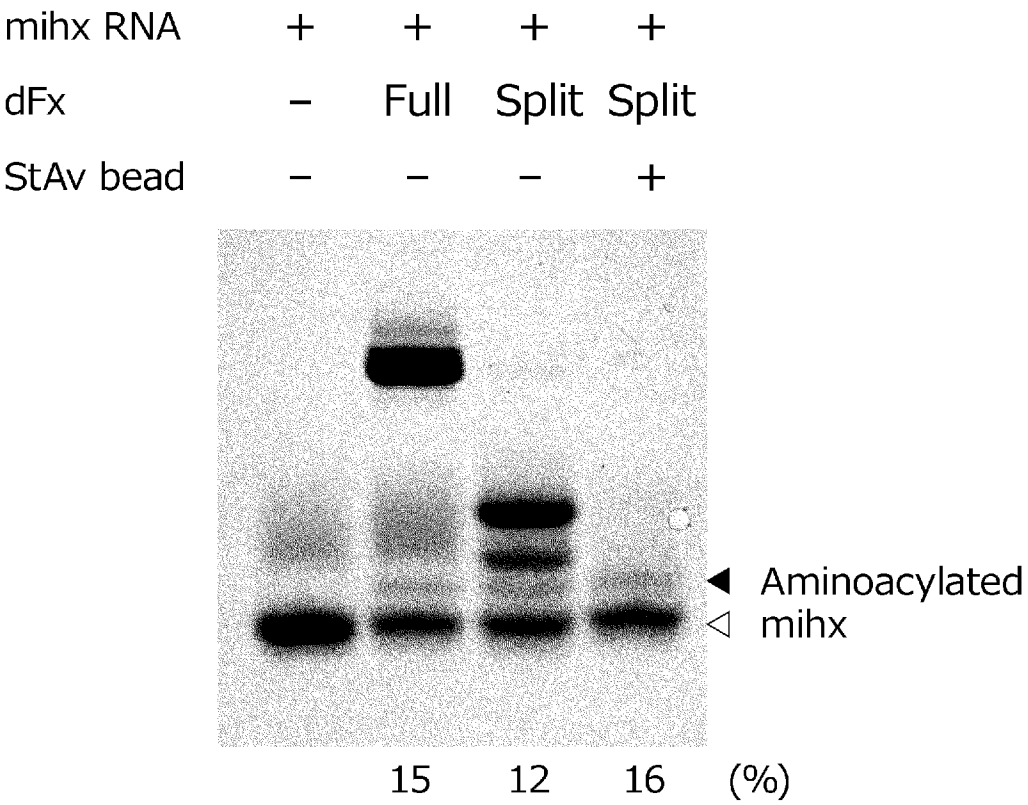


mDNA	vGFP-H	vGFP-H	vGFP-H	vGFP-H	vGFP-H
Codon	UAG	UAG	UAG	UAG	UAG
tRNA	−	+	+	+	+
Xaa	−	−	Phe	AlaT	HalT

[図11]



[図12]


mihx RNA + + + +
dFx − Full Split Split
StAv bead − − − +
◀ Aminoacylated
◁ mihx
15 12 16 (%)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/067025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N9/00*(2006.01)i

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)
C12N15/09, C12N9/00

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 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-504182 A (Anbrx, Inc.), 05 February 2009 (05.02.2009), claims 2, 8, 15; paragraphs [0010], [0022], [0025] to [0028], [0039] & WO 2007/021297 A1 claims 2, 8, 15; paragraphs [10], [22], [25] to [28], [39] & US 2008/0153745 A1 & US 2010/0087677 A1 & US 2013/0068108 A1 & EP 1937824 B1 & KR 10-2008-0036638 A & CN 101273140 A & CN 102703446 A	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
12 July 2016 (12.07.16)	19 July 2016 (19.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/067025

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-537984 A (The Scripps Research Institute), 24 December 2004 (24.12.2004), paragraphs [0131] to [0141] & WO 2002/086075 A2 paragraphs [0131] to [0141] & US 2003/0082575 A1 & US 2003/0108885 A1 & WO 2002/085923 A2 & EP 2128246 A1	1-13
Y	WANG L, et al., Addition of the keto functional group to the genetic code of Escherichia coli, Proc Natl Acad Sci USA, 2003.01.07, Vol.100, No.1, p.56-61, page 57, right column, 5th paragraph to page 58, left column, 1st paragraph	1-13
Y	Masahiko SHISHIDO, "An Approach towards Synthetic Micro-organism from Bio-Macromolecular Chemistry", Kobunshi, 2002, vol.51, pages 438 to 441, a whole article, particularly, page 439, left column, 2nd paragraph to page 440, left column, 1st paragraph	1-13
X Y	WO 2012/026566 A1 (The University of Tokyo), 01 March 2012 (01.03.2012), claims 1, 2, 14; SEQ ID NO:5 & US 2013/0217599 A1 claims 1, 2, 14; SEQ ID NO:5 & JP 2012-44925 A & EP 2610348 A1 & CN 103189522 A	14-16 1-13
X Y	WO 2007/066627 A1 (The University of Tokyo), 14 June 2007 (14.06.2007), paragraphs [0012] to [0013]; claim 7(a) & US 2009/0281280 A1 paragraphs [0014] to [0016]; claim 7(a) & JP 5119444 B2 & EP 1964916 A1	14-16 1-13
Y	WATANABE S, et al., Interactions Between Petides Containing Nucleobase Amino Acids and T7 Phages Displaying S. cerevisiae Proteins, Biopolymers, 2007, Vol.88, No.2, p.131-140, ISSN 1097-0282, page 132, left column, 2nd paragraph to right column, 1st paragraph	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６７０２５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N9/00(2006.01)i

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.　C12N15/09, C12N9/00

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

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	JP 2009-504182 A (アンブルックス，インコーポレイテッド) 2009.02.05, 請求項 2,8,15,[0010],[0022],[0025]-[0028],[0039] & WO 2007/021297 A1, Claim2,8,15,[10],[22],[25]-[28],[39] & US 2008/0153745 A1 & US 2010/0087677 A1 & US 2013/0068108 A1 & EP 1937824 B1 & KR 10-2008-0036638 A & CN 101273140 A & CN 102703446 A	1-13

☑　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
１２．０７．２０１６	１９．０７．２０１６

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　３６４４
伊藤　良子
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
Y	JP 2004-537984 A (ザ　スクリップス　リサーチ　インスティテュート) 2004.12.24, [0131]-[0141] & WO 2002/086075 A2, [0131]-[0141] & US 2003/0082575 A1 & US 2003/0108885 A1 & WO 2002/085923 A2 & EP 2128246 A1	1-13
Y	WANG L, et al., Addition of the keto functional group to the genetic code of Escherichia coli, Proc Natl Acad Sci USA, 2003.01.07, Vol.100, No.1, p.56-61, 第５７頁右欄第５段落～第５８頁左欄第１段落	1-13
Y	宍戸　昌彦, 合成生命体に向けたバイオ高分子化学からのアプローチ, 高分子, 2002, Vol.51, p.438-441, 全体、特に、第４３９頁左欄第２段落～第４４０頁左欄第１段落	1-13
X Y	WO 2012/026566 A1 (国立大学法人　東京大学) 2012.03.01, 請求項1,2,14,配列番号5 & US 2013/0217599 A1, Claim 1,2,14, SEQ ID NO. 5 & JP 2012-44925 A & EP 2610348 A1 & CN 103189522 A	14-16 1-13
X Y	WO 2007/066627 A1 (国立大学法人　東京大学) 2007.06.14, [0012]-[0013],請求項7(a) & US 2009/0281280 A1, [0014]-[0016],Claim 7(a) & JP 5119444 B2 & EP 1964916 A1	14-16 1-13
Y	WATANABE S, et al., Interactions Between Petides Containing Nucleobase Amino Acids and T7 Phages Displaying S. cerevisiae Proteins, Biopolymers, 2007, Vol.88, No.2, p.131-140, ISSN 1097-0282, 第１３２頁左欄第２段落～右欄第１段落	1-13