(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2009-500025
(P2009-500025A)
(43)公表日　平成21年1月8日(2009.1.8)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	C	4B064

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 14 頁）

(21)出願番号	特願2008-519849 (P2008-519849)
(86)(22)出願日	平成18年7月4日 (2006.7.4)
(85)翻訳文提出日	平成20年2月1日 (2008.2.1)
(86)国際出願番号	PCT/EP2006/006503
(87)国際公開番号	WO2007/003410
(87)国際公開日	平成19年1月11日 (2007.1.11)
(31)優先権主張番号	05014471.6
(32)優先日	平成17年7月4日 (2005.7.4)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　390040420
マックス－プランク－ゲゼルシャフト・ツア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシャフテン・エー・ファオ
Ｍａｘ－Ｐｌａｎｃｋ－Ｇｅｓｅｌｌｓｃｈａｆｔ　ｚｕｒ　Ｆｏｅｒｄｅｒｕｎｇ　ｄｅｒ　Ｗｉｓｓｅｎｓｃｈａｆｔｅｎ　ｅ．Ｖ．
ドイツ連邦共和国　ベルリン　（番地なし）
Ｂｅｒｌｉｎ，　Ｇｅｒｍａｎｙ
(74)代理人　100061815
弁理士　矢野　敏雄
(74)代理人　100094798
弁理士　山崎　利臣

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｉｎｖｉｔｒｏタンパク質合成の精度を改善するためのＬｅｐＡの使用

(57)【要約】
本発明は、in vitroでタンパク質を合成するための方法、系、組成物およびキットに関し、その際、タンパク質合成の精度を改善するために、タンパク質合成をリボソーム因子LepAの存在下で実施する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
翻訳系により、in vitroでタンパク質を合成するための方法において、タンパク質合成を、リボソーム因子ＬｅｐＡの存在下で実施することを特徴とする、翻訳系により、in vitroでタンパク質を合成するための方法。
【請求項２】
翻訳系が、（ａ）タンパク質をコードする翻訳可能なＲＮＡ;および（ｂ）細胞翻訳装置の成分を含む細胞不含の調製物を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
翻訳系が、原核細胞系である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
細胞不含の調製物が細胞エクストラクト、特に細胞ライセートである、請求項１から３までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
細胞エクストラクトが、原核細胞、特にＥ．Ｃｏｌｉ細胞由来のエクストラクトである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
系が、結合した転写／翻訳系である、請求項１から３までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
転写／翻訳系が、（ａ１）発現制御配列に対して操作的に結合された合成すべきタンパク質をコードする核酸；（ａ２）核酸から翻訳可能なＲＮＡを製造する能力を有するポリメラーゼおよび（ｂ）細胞翻訳装置の成分を含有する細胞不含の調整物を含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
発現制御配列が、異種プロモーター、たとえばＴ７または関連するプロモーターであり、かつ、ポリメラーゼが異種ポリメラーゼ、たとえばＴ７　ＲＮＡポリメラーゼまたは関連するＲＮＡポリメラーゼであるか、あるいは、発現制御配列が、固有の細胞性プロモーターであり、かつ、ポリメラーゼが、固有の細胞ＤＮＡ－依存型ポリメラーゼである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
合成を、原核細胞ＬｅｐＡの存在下で実施する、請求項１から８までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
ＬｅｐＡが、Ｅ．Ｃｏｌｉ由来である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
ＬｅｐＡが、系中に存在する７０Ｓリボソームサブユニットに対して、約０．０５：１～約０．６：１のモル比で存在する、請求項１から１０までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
添加されたリボソーム因子ＬｅｐＡを含む、ｉｎ vitro翻訳系。
【請求項１３】
（ａ）発現制御配列に対して操作的に結合した合成すべきタンパク質をコードする翻訳可能なＲＮＡ；（ｂ）細胞翻訳装置の成分を含む細胞不含の調製物、および（ｃ）添加されたリボソーム因子ＬｅｐＡを含有する、請求項１２に記載の系。
【請求項１４】
結合した転写／翻訳系である、請求項１２または１３に記載の系。
【請求項１５】
添加されたリボソーム因子ＬｅｐＡを含む、タンパク質のin vitro合成のための試薬組成物またはキット。

【請求項１６】
タンパク質合成の精度を高めるための、リボソーム因子ＬｅｐＡの使用。
【請求項１７】
in vitro系における、請求項１６に記載の使用。
【請求項１８】
in vitroの結合した転写／翻訳系における、請求項１６または１７に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、in vitroタンパク質合成のための方法、系、組成物に関し、その際、タンパク質合成は、タンパク質合成の精度を顕著に改善するために、リボソーム因子ＬｅｐＡの存在下で実施される。
【０００２】
タンパク質のin vitro合成のための系は、商業的に提供されており、かつタンパク質の構造的および機能的研究のための重要なツールである。これらの系の利用例は、in vivoでの発現が難しいであろう毒性タンパク質の合成、培養が困難であろう有機体由来の異種タンパク質を発現させて、結晶化するか、および／または、機能的研究を実施するため、重水素化されたタンパク質の合成、ＮＭＲ構造決定のための溶液中への^{13}Ｃおよび^{15}Ｎの組み込み、人工的アミノ酸、たとえばセレノメチオニンの、結晶化または医薬適用のための特定タンパク質部位での組み込み等を含む。
【０００３】
タンパク質合成のための最も包括的かつ効率的なin vitro系は、バクテリア細胞サイセートを含む結合した転写／翻訳系であり、この場合、この系は、たとえば、Ｔ７ポリメラーゼおよびＴ７プロモーター下で遺伝子を包含するプラスミド、たとえば、Roche RTS 100 E. coli HY Kit、Roche RTS 500 E. coli HY Kit、Promega TNT Quick 結合した転写／翻訳系ならびに環状ＤＮＡのためのPromega E. Coli T7 S30エクストラクト系等である。その際、Ｔ７転写プログラム翻訳装置は、ライセート１ｍｌ当たり７ｍｇまでの合成タンパク質収量に達する。
【０００４】
近年入手可能な系の主な欠点は、タンパク質の製造における低い精度であり、すなわち、特異なタンパク質の活性画分が、得られるタンパク質の全タンパク質画分の３０％と低く、それ故、後の分子分析のためのこれらのタンパク質生成物の使用を危うくする。驚くべきことに、リボソーム因子ＬｅｐＡの添加によって、タンパク質収量に多大な影響を及ぼすことなく、約１００％まで合成タンパク質の精度を改善する。
【０００５】
したがって、本発明の第一の態様は、翻訳系、特に細菌翻訳系によるin vitroでのタンパク質合成の方法に関し、その際、タンパク質合成が、リボソーム因子ＬｅｐＡの存在下で実施される。
【０００６】
本発明の他の態様は、リボソーム因子ＬｅｐＡを含むin vitro 翻訳系に関する。
【０００７】
さらに本発明の他の態様は、リボゾーム因子ＬｅｐＡを含むタンパク質のin vitro合成のための試薬組成物またはキットに関する。
【０００８】
さらに本発明の他の態様は、タンパク質合成の精度を高めるための、リボソーム因子ＬｅｐＡの使用である。
【０００９】
ＬｅｐＡは、Ｇ－タンパク質として同定され、かつ生物学上知られている最も保存的なタンパク質の一つである(Genebank Swiss-Prot:大腸菌由来のＬｅｐＡ: Entry name LEPA_ECO57; Primary accession number 60787; Genebank UniProt/TrEMBLヒト由来のＬｅｐ

Ａオルソログス:Entry name Q5XKM8JHUMAN; primary accession number Q5XKM8; protein name:5 FLJ 13220)。ＥＦ－Ｔｕに関して(古細菌および真核細菌EF1A中)、ＬｅｐＡは、４８～８５％のアミノ酸同一性を有するよく知られた２番目に最も保存的なタンパク質である（Caldon et al., 2001）。配列の比較は、これが５個のドメインから成ることを示し、その最初の４個は、それぞれ伸長因子ＥＦ－Ｇのドメイン１～３および５に相当する。さらに、ＬｅｐＡは、任意の公知のタンパク質との配列相同性のない高く保存的なＣ－末端ドメインを有する。

【００１０】

本発明の実施例において示されるように、ＬｅｐＡは、特にin vitro 翻訳系において、タンパク質合成の精度を改善することが可能なリボソーム因子である。

【００１１】

翻訳系は、任意の標準的な細胞不含の翻訳系、たとえば細菌系であり、この場合、これは、ＬｅｐＡにより補われる。系は、（ａ）合成されるべきタンパク質をコードする翻訳可能なＲＮＡおよび（ｂ）細胞翻訳装置の成分を含有する細胞不含の調製物を含む。好ましくは、系は、結合した転写／翻訳系である。転写／翻訳系は、好ましくは（ａ１）発現制御配列と操作的に結合する合成すべきタンパク質をコードするテンプレート核酸、（ａ２）核酸（ａ１）から翻訳可能なＲＮＡを製造する能力を有するポリメラーゼおよび（ｂ）を含み、これによって、翻訳可能なＲＮＡを転写によって得ることができる。系は、原核細胞系または真核細胞系であってもよく、好ましくは原核細胞系である。

【００１２】

系は、合成すべきタンパク質をコードする翻訳可能なＲＮＡおよびＲＮＡを翻訳することが可能な細胞翻訳装置の成分を含む。好ましくは、この系はさらに、翻訳可能なＲＮＡを、たとえば転写または複製によって得ることが可能なテンプレート核酸を含む。好ましい実施態様において、テンプレート核酸は、ＤＮＡ－分子、たとえば発現制御配列に操作的に結合された合成すべきタンパク質をコードするプラスミドである。核酸は、核酸を転写する能力を有するＤＮＡ－依存型ＲＮＡポリメラーゼにより発現される。一方で、核酸は、ＲＮＡ－依存型ＲＮＡポリメラーゼまたはレプリカーゼによって複製されてもよいＲＮＡであってもよい。翻訳可能なＲＮＡは、原核または真核細胞の翻訳シグナルを包含し、この場合、これは、系中に存在する翻訳装置の成分によって認識される。

【００１３】

好ましい実施態様において、翻訳制御配列は、異種プロモーター、たとえばＴ７または関連するプロモーター、たとえばＳＰ６プロモーターであり、かつポリメラーゼは、異種ポリメラーゼ、たとえばＴ７　ＲＮＡポリメラーゼまたは関連するポリメラーゼ、たとえばＳＰ６　ＲＮＡ－ポリメラーゼである。

【００１４】

二者択一的に、プロモーターは、固有の細胞プロモーターであってもよく、かつポリメラーゼは、固有の細胞ＤＮＡ－依存型ＲＮＡポリメラーゼであってもよい。

【００１５】

in vitro 系における細胞翻訳装置の成分は、好ましくは、翻訳－コンピテント細胞エクトラクトによって提供される。細胞エクストラクトは、好ましくは細胞ライセート、より好ましくは原核細胞、たとえばＥ．Ｃｏｌｉまたは他の細菌性グラム陰性原核細胞またはグラム陽性原核細胞、たとえばＢ．subtilis細胞由来のエクストラクトまたはライセートである。

【００１６】

前記成分に加えて、系は、翻訳および場合によっては転写または複製のために必要とされる通常の成分を含有していてもよく、たとえばＲＮＡ合成のためのリボヌクレオチド、タンパク質合成のためのアミノ酸、適した生物学的エネルギー源、たとえばＡＴＰ、アセチルホスフェート、ホスホエノルピルベートおよびピルベートキナーゼならびに同様の系である。

【００１７】

転写／翻訳系を補うために使用されるリボソーム因子ＬｅｐＡは、原核または真核細胞（たとえばミトコンドリア）ＬｅｐＡ、好ましくは原核細胞ＬｅｐＡであり、たとえばＥ．Ｃｏｌｉ由来のＬｅｐＡタンパク質であってもよい。ＬｅｐＡタンパク質は、好ましくは、系に対して同種成分として添加される。これは、固有の細胞または組み換えの過剰生産細胞から精製された単離されたタンパク質として添加されてもよいか、あるいは、部分的に精製された細胞画分として添加してもよい。さらに本発明は、機能的ＬｅｐＡフラグメントまたは変異体、たとえば、エラー防止においてなおも活性のリボソーム依存型ＧＴＰアーゼ活性を有するＬｅｐＡフラグメントまたは変異体の使用を包含する。さらに本発明は、突然変異により改変された伸長因子ＥＦ－ＧおよびＬｅｐＡ活性を示すＥＦ－Ｇのフラグメントを包含する。

【００１８】

合成中のＬｅｐＡの量は広範囲で可変であってもよく、これにより、タンパク質合成の効率を顕著に減少させることなく、タンパク質合成の精度における有利な効果が得られる。たとえば、原核細胞系において、ＬｅｐＡは、系中に存在する７０Ｓリボソームサブユニットの量に対して約０．０５：１～約０．６：１、好ましくは約０．１：１～約０．５：１、最も好ましくは約０．３：１～約０．４：１のモル比で添加する。

【００１９】

本発明の方法、系および試薬キットは、in vivoでの毒性タンパク質の合成、培養が困難な有機体由来のタンパク質発現、あるいは、同位元素および／または人工的アミノ酸を含有するタンパク質の発現に特に適している。

【００２０】

さらに、本発明は、以下の例および図面によってさらに詳細に説明することができる。

【００２１】

図面の説明

図１：種々の条件下でのＢＬ２１株のＥ．Ｃｏｌｉ細胞のための成長曲線、この場合、この条件は、右側で、曲線と同じカラーコードで示す。矢印は、誘導物質ＩＰＴＧの添加を示す。

【００２２】

図２：ＥＦ－Ｇ（黒塗り四角で示す）およびＬｅｐＡ（黒塗り菱形で示す）のリボソーム依存型ＧＴＰアーゼ。それぞれの因子の濃度は一定に０．２μＭに保持した。

【００２３】

図３：種々のリボソーム状態のピューロマイシン反応。＋：Ｐ－ｔＲＮＡのペプチジル残基が、ペプチジルトランスフェラーゼ中心のＡサイトにおいてピューロマイシンマイシンに移行している；－：ピューロマイシンに対する移行は生じていない。

【００２４】

図４：ＬｅｐＡは逆転座を誘導する（ｒｅ－ＴＬ）。青色の線は、逆ＤＮＡ転写であり、この場合、これは、転座（第３スポット）前のリボソームの位置を示し、第４スポットでは、転座反応により３個のヌクレオチドの位置はより短くなる。最後のスポットは、後転座状態に対してＬｅｐＡ添加した後の逆転座を示す。

【００２５】

図５：Ａは、天然ゲル中での蛍光バンドにより示された活性ＧＦＰの合成を示す。Ｂは、ＳＤＳゲル中のＧＦＰバンドのスキャニングから誘導された全合成を青色の線で示す。ピンクの線は、天然ゲル（Ａ）中のＧＦＰの蛍光バンドから誘導された量を示し、緑色のバンドは、合成されたＧＦＰの活性画分を示す。Ｂは、ＬｅｐＡの増加した量の存在下でのルシフェラーゼの活性画分であり、Ｃは、ＧＦＰ（左）およびルシフェラーゼ（右）の活性画分上でのＬｅｐＡ効果を比較した（ピンク、LepA:70S=0.3:1）。

【００２６】

例

Ｅ．Ｃｏｌｉ染色体からＬｅｐＡ遺伝子を取り出し、かつプラスミドｐＥＴ１４ｂ中でクローニングし、この場合、これは、Ｔ７プロモーターの制御下であって、かつＨｉｓ$_6$

－ｔａｇをタンパク質のＮ－末端に添加した。最初に、Ｅ．Ｃｏｌｉ細胞BL21(DE3)physSの成長におけるＬｅｐＡの過剰発現の効果を、製造元の教示(Novagen)にしたがって測定した。図１は、ＬｅｐＡ発現の誘発がなくても、成長は専ら延長されたｌａｇ相後に開始され、かつ、コントロール株と比較して早期に静止相に入ることを示す。これは、Ｅ．Ｃｏｌｉ発現株中において、Ｔ７ポリメラーゼが漏出性ＬａｃＺプロモーターの制御下にあることにより予測され、したがって、ＩＰＴＧ誘発なしでプラスミドからのＬｅｐＡの発現が可能である。成長抑制効果はＬｅｐＡ発現のＩＰＴＧ誘発後にはより激しい。

【００２７】

成長はより低い細胞密度において停止し、この場合、これは、ＬｅｐＡの過剰発現が細胞に対して致命的であることを証明する。次にＬｅｐＡタンパク質を、発現誘発後に単離し、かつ、溶解可能なタンパク質を、固有の条件下でNi^{2+}カラムを介して精製し、その後に種々の機能的アッセイ中で試験した。最初の機能的分析は、{Dasmahapatra, 1981 #14727}にしたがうＬｅｐＡの考えられるリボソーム依存型ＧＴＰアーゼ活性の試験であり、この場合、これは、{Dinos, 2004 #14684}中で記載されたバッファー系を含む。ＬｅｐＡが、ＥＦ－Ｇ遺伝子からの進化的子孫（a evolutionary offspring）であろうことから、ＬｅｐＡＧＴＰアーゼ活性と最も強いリボソーム依存型ＧＴＰアーゼ活性の一つを有することが知られているＥＦ－Ｇのその活性とを比較した。図２は、ＬｅｐＡがリボソーム依存型ＧＴＰアーゼ活性を有するのみならず、またその活性がＥＦ－Ｇのものに少なくとも匹敵する強さであることを示した。リボソームと結合した場合にのみ、ＬｅｐＡがオキサゾリジノンと架橋する(see Colca et al., 2003)というMankinらによる間接的証拠を除き、我々のデータは、ＬｅｐＡが実際にリボソーム因子であることについての最初の強力な証拠を提供する。コントロール試験は、ＬｅｐＡが、リボソーム上でＥＦ－GのようにｔRNA_2・ｍＲＮＡ複合体を転座することができないことを示す。

【００２８】

次の試験は驚異的であり、かつ、ＬｅｐＡの機能の最初の示唆を与えるものである：ペプチジルｔＲＮＡの類似体はＰサイトに存在し、かつ隣接するＥおよびＡサイトには存在せず（リボソーム機能的状態はＰｉ状態と呼称され、その際、ｉは開始である）、ＬｅｐＡは、{Dinos, 2004 #14684}に記載されたバッファー系において、ピューロマイシン反応に何ら影響せず({Bommer, 1996 #11801}による)、すなわち、ＬｅｐＡは、ＰサイトｔＲＮＡのアミノアシル部分の、ペプチジルトランスフェラーゼ中心のリボソームＡサイト中で結合する抗生物質ピューロマイシンへの移行を妨げるものではない。対照的に、後転座状態においては、ＬｅｐＡは、ピューロマイシン反応を阻害する（図３）。

【００２９】

より複雑なジペプチド分析（たとえば、Marquez et al., 2004参照）を用いて、これらの発見が確認される。この結果に関する専ら考えられる説明は、ＬｅｐＡが、いわゆる「逆転座」を誘発することであり、これによってｔＲＮＡｓが、ＰおよびＥサイトからＡおよびＰサイトに戻り、それによって、ＡサイトｔＲＮＡがピューロマイシンの結合部位を占めることから、ピューロマイシン反応が妨げられる。

【００３０】

この解釈の直接的な試験は、種々のリボソーム機能状態を用いての、リボソームに対するｍＲＮＡの位置におけるＬｅｐＡの効果の測定である。この方法は、「フットプリンティングアッセイ（footprinting assay）」と呼称され、{Connell, 2002 #13483}に記載された逆転写を用いる。このアッセイは、リボソームのｍＲＮＡ下流における固定点から、リボソームへの距離（ｍＲＮＡに対して補完的なＤＮＡプライマーにより定められる）を測定する。リボソームが転座する場合には、その距離は短くなり、それというのもｍＲＮＡがリボソーム中に動き（５’方向）、その一方でリボソームが逆転座する場合には、距離は増加する。これは、図４に例証されている。ＬｅｐＡを後転座状態でリボソームに添加する場合には、この距離は長くなる（Ｅ）。したがって、ＬｅｐＡは、すべての他の公知の転座因子と比較して明らかに独特の機能を有しており、それというのも逆転座を誘発するためである。

【００３１】
この驚異的な逆転座活性の機能とはなにか。図５Ｂには、考えられる答えが提供されている。これは、結合した転写／翻訳系中でのＧＦＰ合成におけるＬｅｐＡの効果を示す。Ｘ軸の０において、１００％の値（青色の線）は、ＳＤＳゲル電気泳動のＧＦＰバンド強度から誘導された全合成を示す。また、ピンクの点は、Ｘ軸の０において、図５Ａ中に示された固有のゲル電気泳動で測定された合成ＧＦＰの活性量を示す（活性画分は、{Dinos, 2004 #14684}により測定された）。試験において、合成ＧＦＰの活性画分は、ＬｅｐＡ不含下で約５０％である（緑の線）。７０Ｓに対して０．２：１のモル比でのＬｅｐＡの添加は、約２０％の全収量のわずかな減少を示すが、活性画分の増加は～１００％までである。さらなるＬｅｐＡの添加は、タンパク質合成を比例して阻害し、最終的には完全に遮断する（リボソーム当たり＞１　ＬｅｐＡ）。

【００３２】
このin vitroでの結果は、in vivoで観察された致死的効果に一致する（図１参照）。特に興味深く／重要であるのは、タンパク質合成の減少中におけるすべてのポイントで、合成されたＧＦＰは１００％活性であることである（図５Ｂ中、緑の線）。

【００３３】
要約および考察
結果は、（ｉ）Ｇ－タンパク質ＬｅｐＡが、少なくともＥＦ－Ｇに匹敵する強さのリボソーム依存型ＧＴＰアーゼを含むリボソーム因子であることを証明した。ＥＦ－Ｇに対する構造的関連性にもかかわらず、これは、ｔＲＮＡ$_2$・ｍＲＮＡ複合体を転座することはできない。実際に、ＬｅｐＡは逆反応、すなわち、逆転座を誘発し、この場合、これは、逆転座を防止する「ドアストップ」として作用するであろうＥＦ－ＧドメインＩＶの欠失におそらく関連する。ＬｅｐＡは、近年の結合した翻訳系の最も重要な欠点、すなわち、近年の系の精度の欠点を排除する：不活性画分は、全体として合成されたタンパク質の７０％の大きさであってもよい。

【００３４】
ＬｅｐＡの適した量の添加によって全合成はわずかに減少するが、しかしながら、活性画分はほぼ１００％に増加する。これは、合成タンパク質の構造が、結晶化を介してか、あるいは、ＮＭＲのために同位元素、たとえば^{13}Ｃまたは^{15}Ｎで合成タンパク質を標識した後に測定されるべき場合には重要である。同様に、合成タンパク質の画分の分析は、観察下においてタンパク質の不活性画分の大きさによって極めて困難となる。これらの欠点は、本発明により解消された。

【００３５】
参考文献

【表１】

Andersen, G.R., Nissen, P. And Nyborg, J. 2003. Elongation factors in protein biosynthesis. Trends Biochem. Sci. 28:434-441.

Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang X., Canadien, V. Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., et al. 2005. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli.* Nature 433: 531-537.

Caldon, C.E., Yoong, P. and March, P.E. 2001. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. Mol. Microbiol. 41: 289-297.

Colca, J.R., McDonald, W.G., Waldon, D.J., Thomasco, L.M., Gadwood, R.C., Lund, E.T., Cavey, G.S., Mathews, W.R., Adams, L.D., Cecil, E.T. et al. 2003. Crosslinking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics. J. Biol. Chem. 278:21972-21979.

Marquez, V., Wilson, D.N., Tate, W.P., Triana-Alonso, F. and Nierhaus, K.H. 2004. Maintaining the ribosomal reading frame: The influence of the E site during translational regulation of release factor 2. Cell 118: 45-55.

Nierhaus, K.H. 1996. Protein synthesis – An elongation factor turn-on. Nature 379: 491-492.

【図面の簡単な説明】

【００３６】

【図１】種々の条件下でのＢＬ２１株のＥ．Ｃｏｌｉ細胞のための成長曲線を示す図

【図２】ＥＦ－Ｇ（黒塗り四角で示す）およびＬｅｐＡ（黒塗り菱形で示す）のリボソーム依存型ＧＴＰアーゼを示す図

【図３】種々のリボソーム状態のピューロマイシン反応を示す図

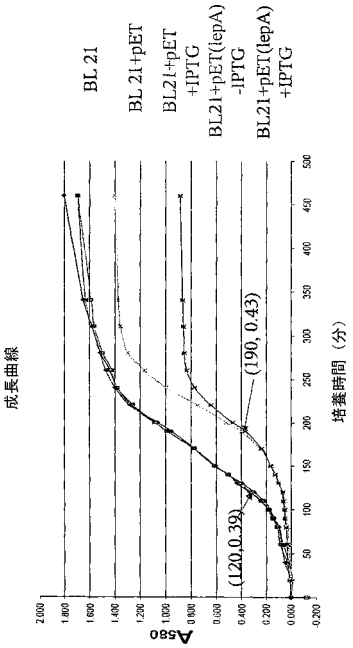
【図４】ＬｅｐＡによる逆転座の誘導（ｒｅ－ＴＬ）を示す図

【図５Ａ】ＬｅｐＡの存在下での活性ＧＦＰの合成を示す図

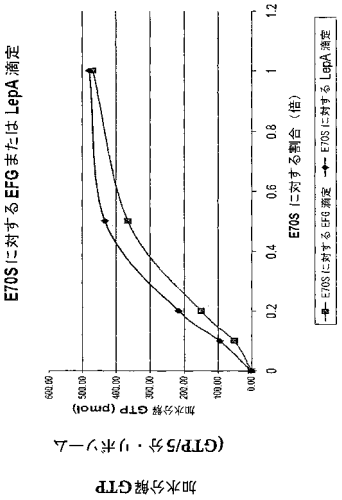
【図５Ｂ】ＬｅｐＡの存在下でのルシフェラーゼの活性画分を示す図

【図５Ｃ】ＧＦＰ（左）およびルシフェラーゼ（右）の活性画分上でのＬｅｐＡ効果を比較する図

【図１】



【図２】



【図３】

	LepA	Pi	Pre	Post
		EPA Pi	EPA PRE	EPA POST
	-	+	-	+
	+	+	-	-

Figure 3 (3/5)

【図４】

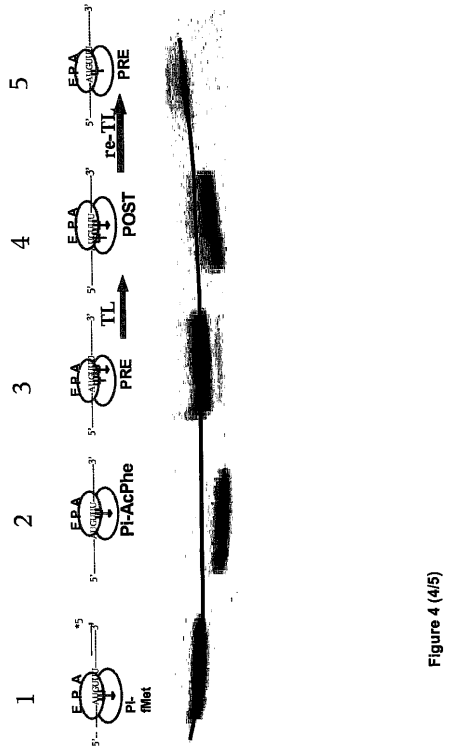
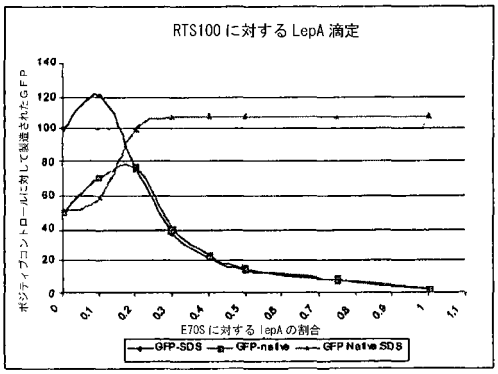
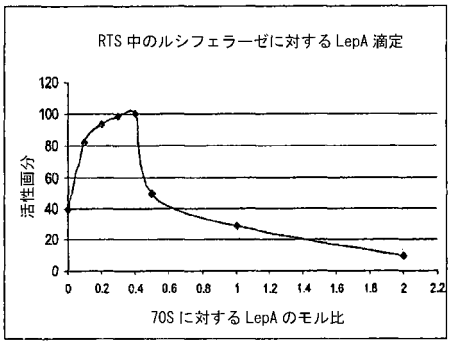


Figure 4 (4/5)

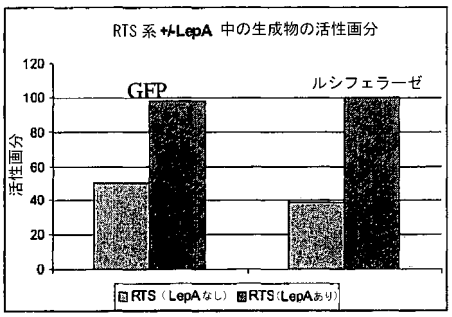
【図５Ａ】


RTS100 に対する LepA 滴定
ポジティブコントロールに対して製造されたGFP
140
120
100
80
60
40
20
0
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.1
E70S に対する lepA の割合
GFP-SDS
GFP-native
GFP Native SDS

【図５Ｂ】


RTS 中のルシフェラーゼに対する LepA 滴定
活性画分
120
100
80
60
40
20
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
2.2
70S に対する LepA のモル比

【図５Ｃ】


RTS 系 +/-LepA 中の生成物の活性画分
活性画分
120
100
80
60
40
20
0
GFP
ルシフェラーゼ
RTS（LepAなし）
RTS（LepAあり）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/006503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12P21/02 C12N15/00

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)
C12P C12N

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BETTON J-M: "RAPID TRANSLATION SYSTEM (RTS): A PROMISING ALTERNATIVE FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION" CURRENT PROTEIN AND PEPTIDE SCIENCE, BENTHAM SCIENCE PULBISHERS, NL, vol. 4, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 73-80, XP008038258 ISSN: 1389-2037 figures 3,4 page 73 - page 75; tables 1,2 -/--	1-11

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 September 2006	06/10/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bayer, Martin

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/006503

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARTIN G A ET AL: "HIGH-YIELD, IN VITRO PROTEIN EXPRESSION USING A CONTINUOUS-EXCHANGE, COUPLED TRANSCRIPTION/TRANSLATION SYSTEM" BIOTECHNIQUES, INFORMA LIFE SCIENCES PUBLISHING, WESTBOROUGH, MA, US, vol. 31, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 948-950,952, XP001153872 ISSN: 0736-6205 the whole document	1-11
X	WO 99/50436 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; BIRYUKOV, SERGEY VLADIMIROVICH; SIMONENKO, PET) 7 October 1999 (1999-10-07) examples 1,2	1-11
A	COLCA JERRY R ET AL: "Cross-linking in the living cell locates the site of action of oxazolidinone antibiotics." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 24, 13 June 2003 (2003-06-13), pages 21972-21979, XP002399244 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 21978 figures 4,5	1-18
A	EHRENBERG M ET AL: "DESIGN AND USE OF A FAST AND ACCURATE IN VITRO TRANSLATION SYSTEM" PRACTICAL APPROACH SERIES, OXFORD, GB, 1990, pages 101-129, XP001022132 ISSN: 0957-025X page 112 - page 113 page 123 - page 125 figure 5	1-18

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/006503

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9950436 A	07-10-1999	AT 327341 T	15-06-2006
		EP 1068348 A1	17-01-2001
		JP 3813817 B2	23-08-2006
		JP 2002509730 T	02-04-2002
		RU 2148649 C1	10-05-2000
		US 6518058 B1	11-02-2003

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

フロントページの続き

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

(74)代理人 100099483
弁理士 久野 琢也
(74)代理人 100110593
弁理士 杉本 博司
(74)代理人 100128679
弁理士 星 公弘
(74)代理人 100135633
弁理士 二宮 浩康
(74)代理人 100114890
弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
(74)代理人 230100044
弁護士 ラインハルト・アインゼル
(72)発明者 クヌート ハー ニーアハウス
ドイツ連邦共和国 ベルリン リュッツェルシュタイナー ヴェーク ２８
(72)発明者 ヤン チン
ドイツ連邦共和国 ベルリン リュッツェルシュタイナー ヴェーク ３０
(72)発明者 ダニエル エヌ ウィルソン
ドイツ連邦共和国 ベルリン ムスカウアー シュトラーセ １６

Ｆターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA12 FA02
4B064 AG01 CA21 CC24