

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成20年11月13日 (2008.11.13)

【公表番号】特表2008-513040(P2008-513040A)

【公表日】平成20年5月1日 (2008.5.1)

【年通号数】公開・登録公報2008-017

【出願番号】特願2007-533630(P2007-533630)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 0 7 K 14/245 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/25 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 15/00 Z C C A

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C 0 7 K 14/245

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/25

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 N 9/00

【手続補正書】

【提出日】平成20年9月22日 (2008.9.22)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

直交 tRNA (O - tRNA) 又はその修飾変異体と；

- アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、及びアゾベンジル - P h e から構成される群から選択される 1 種以上のアミノ酸を直交 tRNA もしくはその修飾変異体に優先的に負荷する直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O - R S)、又は O - tRNA もしくはその修飾変異体に o - メチルチロシンを優先的に負荷する配列番号 9 ~ 12 の配列を含む O - R S もしくはその修飾変異体を含む翻訳系。

## 【請求項 2】

翻訳系が細胞を含むか又は翻訳系が真正細菌細胞を含む請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 3】

O - t R N A が修飾ロイシル - O - t R N A であるか又は O - t R N A が修飾チロシル - O - t R N A である請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 4】

O - t R N A もしくはその修飾変異体、O - R S、又は O - t R N A とその修飾変異体の両者が大腸菌から誘導されるか又は M . j a n n a s c h i i から誘導される請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 5】

O - R S が配列番号 3 のアミノ酸配列をもつ野生型大腸菌 t R N A シンテターゼから誘導されるか；

O - R S が配列番号 4 のアミノ酸配列をもつ野生型 M . j a n n a s c h i i t R N A シンテターゼから誘導されるか；

O - R S が配列番号 3 のアミノ酸配列をもつ野生型大腸菌 t R N A シンテターゼから誘導され、O - R S が、( a ) アミノ酸 40 位に A l a、V a l、H i s、L e u、M e t、P h e、G l y、又は T r p、( b ) アミノ酸 41 位に A l a、M e t、P r o、T y r、G l u、T r p、S e r、又は T h r、( c ) アミノ酸 499 位に P r o、L e u、A l a、A r g、I l e、又は T r p、( d ) アミノ酸 527 位に V a l、L e u、M e t、A l a、P h e、C y s、又は T h r、及び ( e ) アミノ酸 537 位に G l y を含むアミノ酸配列をもつか；

O - R S が配列番号 4 のアミノ酸配列をもつ野生型 M . j a n n a s c h i i t R N A シンテターゼから誘導され、O - R S が、( a ) アミノ酸 32 位に G l y、( b ) アミノ酸 65 位に G l u、( c ) アミノ酸 108 位に A l a、( d ) アミノ酸 109 位に G l u、( e ) アミノ酸 158 位に G l y、及び ( f ) アミノ酸 162 位に H i s を含むアミノ酸配列をもつか；

O - R S が配列番号 5 ~ 17、及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含むか；

系が O - R S をコードするポリヌクレオチドを含み、O - R S が配列番号 5 ~ 17、及びその保存変異体から選択されるアミノ酸配列を含み、且つ / 又はポリヌクレオチドが配列番号 20 ~ 32 のヌクレオチド配列から選択されるか；又は

O - t R N A が配列番号 1 ~ 2 に記載のポリヌクレオチド配列を含むか又は前記配列によりコードされる請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 6】

第 1 の O - R S と少なくとも 1 個のセクターコドンを含む核酸を含み、前記セクターコドンが第 1 の O - t R N A により認識され、更に第 2 の O - R S と第 2 の O - t R N A を含み、第 2 の O - R S が第 1 のアミノ酸と異なる第 2 のアミノ酸で第 2 の O - t R N A を優先的にアミノアシル化し、第 2 の O - t R N A が第 1 の O - t R N A により認識されるセクターコドンと異なるセクターコドンを認識する請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 7】

O - t R N A 又はその修飾変異体がアンバーコードンの認識配列を含み、且つ / 又は翻訳系がアンバーコードンを含むターゲット核酸を含む請求項 1 に記載の翻訳系。

## 【請求項 8】

ターゲット核酸によりコードされる蛋白質を含み、蛋白質が光調節型アミノ酸を含み、且つ / 又は蛋白質がアゾベンジル - P h e もしくは o - ニトロベンジルシステインを含む請求項 7 に記載の翻訳系。

## 【請求項 9】

請求項 1 に記載の翻訳系により生産された蛋白質であって、蛋白質が非天然アミノ酸を含み、且つ / 又は非天然アミノ酸が - アミノカプリル酸、O - メチルチロシン、o - ニトロベンジルシステイン、もしくはアゾベンジル - P h e である蛋白質。

## 【請求項 10】

直交アミノアシル tRNA シンターゼ (O-RS) を含み、前記 O-RS が - アミノカプリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、もしくはアゾベンジル-Phe で O-tRNA を優先的にアミノアシル化するか、又は前記 O-RS が配列番号 9 ~ 12 の配列を含み、O-tRNA を o-メチルチロシンで優先的にアミノアシル化する組成物。

## 【請求項 11】

O-tRNA がロイシル-O-tRNA であるか；O-tRNA がチロシル-O-tRNA であるか；又は O-tRNA がアンバーセクターコドンを認識する請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

O-RS が配列番号 5 ~ 17 のアミノ酸配列又はその保存変異体を含むか；

O-RS が配列番号 5 ~ 8 及び 13 ~ 17 のいずれか 1 種の効率の少なくとも 50 % の効率で O-tRNA を優先的にアミノアシル化するか；

O-RS が大腸菌から誘導されるか；

O-RS が M. jannaschii から誘導されるか；

前記組成物が細胞を含み、前記細胞が該細胞で 1 種以上の核酸によりコードされる O-RS を有し、前記核酸が配列番号 20 ~ 32 又はその保存変異体から選択されるか；又は

前記組成物が酵母細胞を含み、前記酵母細胞が該酵母細胞で 1 種以上の核酸によりコードされる O-RS を有し、前記核酸が配列番号 20 ~ 32 又はその保存変異体から選択される請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

翻訳系を含む請求項 10 に記載の組成物であって、

前記組成物が細胞を含み、O-RS が前記細胞で 1 種以上の核酸によりコードされ、前記細胞が更に、直交 tRNA (O-tRNA) と、- アミノカプリル酸、O-メチルチロシン、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe の 1 種以上を含み、O-tRNA がセクターコドンを認識し、O-RS が - アミノカプリル酸、O-メチルチロシン、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe の 1 種で O-tRNA を優先的にアミノアシル化し；且つ / 又は

細胞が該当ポリペプチドをコードするターゲット核酸を含み、ターゲット核酸が O-tRNA により認識されるセクターコドンを含む組成物。

## 【請求項 14】

配列番号 5 ~ 17 のいずれか 1 種、又はその保存変異体をコードする核酸、且つ / 又は配列番号 20 ~ 32 から選択される核酸。

## 【請求項 15】

- アミノカプリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、もしくはアゾベンジル-Phe の 1 種以上を含む蛋白質、又は前記蛋白質を含む組成物。

## 【請求項 16】

- アミノカプリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe を直交 tRNA (O-tRNA) に負荷する活性直交アミノアシル tRNA シンターゼ (O-RS) の選択方法であって、

O-tRNA を含む細胞集団のメンバーに対して直交性の O-tRNA と；

集団の 1 個以上の細胞において - アミノカプリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe を O-tRNA に負荷する 1 個以上の活性 O-RS メンバーを含む複数の O-RS と；

選択マーカーをコードし、O-tRNA により認識される少なくとも 1 個のセクターコドンを含むポリヌクレオチドと；

- アミノカプリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe を併有する細胞の集団に選択を実施し、複数の RS を含まず且つ O-tRNA を含む対照細胞の抑圧効率に比較して選択マーカーの抑圧効率の増加により、活性 O-RS を含むターゲット細胞を集団から同定する段階と；

ターゲット細胞を選択することにより、活性 O - R S を選択する段階を含む前記方法。

【請求項 17】

- アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル - P h e 以外のアミノ酸を O - t R N A に負荷する非ターゲット O - R S を含む細胞を排除するように細胞を更に選択する請求項 16 に記載の方法であって、選択がポジティブ選択を含み、選択マーカがポジティブ選択マーカを含み；O - t R N A がロイシル - O - t R N A 又はチロシル - O - t R N A である方法。

【請求項 18】

請求項 16 に記載の方法により同定された直交アミノアシル t R N A シンテターゼ。

【請求項 19】

1 種以上の - アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル - P h e、光調節型セリン、光調節型セリンアナログ、フルオロフォア、スピン標識アミノ酸、又はダンシル側鎖を含むアミノ酸を 1 個以上の特定位置に組み込んだ蛋白質を細胞で生産する方法であって、

少なくとも 1 個のセクターコドンを含み、蛋白質をコードする核酸を含む細胞を適当な培地で増殖させる段階と；

- アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル - P h e、光調節型セリン、光調節型セリンアナログ、フルオロフォア、スピン標識アミノ酸、又はダンシル側鎖を含むアミノ酸を提供する段階を含み；

前記細胞が更に、

セクターコドン認識する直交 t R N A ( O - t R N A ) と；

- アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル - P h e、光調節型セリン、光調節型セリンアナログ、フルオロフォア、スピン標識アミノ酸、又はダンシル側鎖を含むアミノ酸で O - t R N A を優先的にアミノアシル化する直交アミノアシル t R N A シンテターゼ ( O - R S ) を含み；

更に、セクターコドンに応答して - アミノカプリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル - P h e、光調節型セリン、光調節型セリンアナログ、フルオロフォア、スピン標識アミノ酸、又はダンシル側鎖を含むアミノ酸を特定位置に組み込むことにより、蛋白質を生産する段階を含む前記方法。

【請求項 20】

O - R S が配列番号 5 ~ 17 に対応するアミノ酸配列、又はその保存変異体を含む請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

宿主細胞で機能する直交アミノアシル t R N A シンテターゼ ( O - R S ) の同定に有用なポリヌクレオチドメンバーのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドメンバーが、

( i ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列 ( その場合、前記ポリヌクレオチドメンバーは配列番号 4 の T y r <sup>3 2</sup>、L e u <sup>6 5</sup>、P h e <sup>1 0 8</sup>、G l n <sup>1 0 9</sup>、A s p <sup>1 5 8</sup> 及び L e u <sup>1 6 2</sup> をコードするコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含む ) ；又は

( i i ) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列以外の古細菌アミノアシル t R N A シンテターゼのアミノ酸配列 ( その場合、前記ポリヌクレオチドメンバーは対応するアミノ酸が配列番号 4 の T y r <sup>3 2</sup>、L e u <sup>6 5</sup>、P h e <sup>1 0 8</sup>、G l n <sup>1 0 9</sup>、A s p <sup>1 5 8</sup> 及び L e u <sup>1 6 2</sup> に空間的に対応するコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含む ) から選択されるアミノ酸配列の変異体をコードする前記ライブラリー。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチドが発現ベクターを含むか；前記 O - R S が直交 t R N A ( O - t R N A ) を非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化するか；前記 O - R S が ( i ) 配列番号 4 の 3 2、6 5、1 0 8、1 0 9、1 5 8 及び 1 6 2 位、又は ( i i ) 配列番号 4 の T y r <sup>3 2</sup>、L e u <sup>6 5</sup>、P h e <sup>1 0 8</sup>、G l n <sup>1 0 9</sup>、A s p <sup>1 5 8</sup> 及び L e u <sup>1 6 2</sup> に空間的に対応する位置以外の位置に 1 個以上の保存アミノ酸置換を含むか；又は前記宿

主細胞が大腸菌細胞である請求項 2 1 に記載のライブラリー。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の複数のライブラリーポリヌクレオチドメンバーを含む複数の細胞、又は前記古細菌アミノアシル tRNA シンテターゼが *Methanococcus jannaschii* アミノアシル tRNA シンテターゼであるか若しくは前記 *Methanococcus jannaschii* アミノアシル tRNA シンテターゼが *Methanococcus jannaschii* チロシル tRNA シンテターゼである請求項 2 1 に記載の複数のライブラリーポリヌクレオチドメンバーを含む複数の細胞。

【請求項 2 4】

a) (i) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の変異体をコードし、配列番号 4 の Tyr 32、Leu 65、Phe 108、Gln 109、Asp 158 及び Leu 162 をコードするコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含むポリヌクレオチドメンバーのライブラリーと；

(ii) 宿主細胞を提供する段階と；

b) 前記宿主細胞において直交 tRNA (O - tRNA) を非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドメンバーを前記ライブラリーから検出することにより、所望 O - RS を同定する段階を含む所望直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O - RS) の同定方法。

【請求項 2 5】

前記検出段階がクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ蛋白質を発現させ、クロラムフェニコールの存在下で細胞生存を検出することにより実施されるポジティブ選択を含むか、又は前記検出段階がバルナーゼ蛋白質を発現させることにより実施されるネガティブ選択を含む請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

宿主細胞で機能する直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O - RS) の同定に有用なポリヌクレオチドメンバーのライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドメンバーが、

(i) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列 (その場合、前記ポリヌクレオチドメンバーは配列番号 3 の Met<sup>40</sup>、Leu<sup>41</sup>、Tyr<sup>499</sup>、Tyr<sup>527</sup>、及び His<sup>537</sup> をコードするコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含む)；又は

(ii) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列以外の真正細菌アミノアシル tRNA シンテターゼのアミノ酸配列 (その場合、前記ポリヌクレオチドメンバーは対応するアミノ酸が配列番号 3 の Met<sup>40</sup>、Leu<sup>41</sup>、Tyr<sup>499</sup>、Tyr<sup>527</sup>、及び His<sup>537</sup> に空間的に対応するコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含む) から選択されるアミノ酸配列の変異体をコードする前記ライブラリー。

【請求項 2 7】

前記ポリヌクレオチドが発現ベクターを含むか；前記 O - RS が直交 tRNA (O - tRNA) を非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化するか；前記 O - RS が (i) 配列番号 3 の 40、41、499、527、及び 537 位、又は (ii) 配列番号 3 の Met<sup>40</sup>、Leu<sup>41</sup>、Tyr<sup>499</sup>、Tyr<sup>527</sup>、及び His<sup>537</sup> に空間的に対応する位置以外の位置に 1 個以上の保存アミノ酸を含むか；前記宿主細胞が *S. cerevisiae* 細胞であるか；前記真正細菌アミノアシル tRNA シンテターゼが大腸菌アミノアシル tRNA シンテターゼであるか；又は前記大腸菌アミノアシル tRNA シンテターゼが大腸菌ロイシル tRNA シンテターゼである請求項 2 6 に記載のライブラリー。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 に記載の複数のライブラリーポリヌクレオチドメンバーを含む複数の細胞。

【請求項 2 9】

a) (i) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の変異体をコードし、配列番号 3 の Met<sup>40</sup>、Leu<sup>41</sup>、Tyr<sup>499</sup>、Tyr<sup>527</sup>、及び His<sup>537</sup> をコードするコドンのランダム化ヌクレオチド位置を含むポリヌクレオチドメンバーのライブラリーと；

( i i ) 宿主細胞を提供する段階と；

b ) 前記宿主細胞において直交 tRNA ( O - tRNA ) を非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドメンバーを前記ライブラリーから検出することにより、所望 O - RS を同定する段階を含む所望直交アミノアシル tRNA シンテターゼ ( O - RS ) の同定方法。

【請求項 30】

前記検出段階が g a l 4 蛋白質を発現させ、ウラシルの不在下又はヒスチジンの不在下で且つアミノトリアゾールの存在下に細胞生存を検出することにより実施されるポジティブ選択を含む；又は前記検出段階がフルオロオロチン酸の存在下で u r a 3 蛋白質を発現させることにより実施されるネガティブ選択を含む請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

a ) アゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインに特異的な O - RS と O - tRNA の対を介してアゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインを蛋白質に組込む段階と；

b ) アゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインを光調節する光エネルギーの波長に蛋白質を暴露することにより、アゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインを含む蛋白質の活性を調節する段階を含む蛋白質の活性の調節方法。

【請求項 32】

a ) アゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインを組み込んだ蛋白質と；

b ) 蛋白質のアゾベンジル - P h e 又は o - ニトロベンジルシステインを光調節することにより、蛋白質の活性を調節する光源を含む蛋白質の活性の調節システム。