

【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;

-アミノカブリル酸、O-ニトロベンジルシスティン、及びアゾベンジル-Phe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リltRNAシンテターゼ(O-RS)、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-RS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 RNA が修飾ロイシル - O - t RNA であるか又は O - t RNA が修飾チロシル - O - t RNA である請求項 1 に記載の翻訳系。

【請求項 4】

O - t RNA もしくはその修飾変異体、O - RS、又は O - t RNA 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 - RS が配列番号 3 のアミノ酸配列をもつ野生型大腸菌 t RNA シンテターゼから誘導されるか；

O - RS 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 RN A シンテターゼから誘導されるか；

O - RS が配列番号 3 のアミノ酸配列をもつ野生型大腸菌 t RNA シンテターゼから誘導され、O - RS 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 - RS 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 RN A シンテターゼから誘導され、O - RS 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 - RS 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 - RS をコードするポリヌクレオチドを含み、O - RS 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 RNA 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 - RS と少なくとも 1 個のセレクターコドンを含む核酸を含み、前記セレクターコドンが第 1 の O - t RNA により認識され、更に第 2 の O - RS と第 2 の O - t RNA を含み、第 2 の O - RS 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 RNA を優先的にアミノアシル化し、第 2 の O - t RNA が第 1 の O - t RNA により認識されるセレクターコドンと異なるセレ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 RNA 又はその修飾変異体がアンバーコドンの認識配列を含み、且つ / 又は翻訳系がアンバーコ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 - アミノカブリル酸、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 t RNA シンテターゼ (O - RS) を含み、前記 O - RS が - アミノカブリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、もしくはアゾベンジル - Ph e で O - t RNA 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 - t RNA 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 - t RNA がロイシル - O - t RNA であるか；O - t RNA がチロシル - O - t RNA であるか；又は O - t RNA がアンバーセレ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 - t RNA 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 t RNA (O - t RNA) と、 - アミノカブリル酸、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 - Ph e の 1 種以上を含み、O - t RNA がセレクターコドンを認識し、O - RS が - アミノカブリル酸、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 - Ph e の 1 種で O - t RNA 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 - t RNA により認識されるセレ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】

- アミノカブリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、もしくはアゾベンジル - Ph e 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】

- アミノカブリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル - Ph e を直交 t RNA (O - t RNA) に負荷する活性直交アミノアシル t RNA シンテターゼ (O - RS) の選択方法であって、
 O - t RNA を含む細胞集団のメンバーに対して直交性の O - t RNA と；
 集団の 1 個以上の細胞において - アミノカブリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル - Ph e を O - t RNA 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 - t RNA により認識される少なくとも 1 個のセレクターコドンを含むポリヌクレオチドと；
 - アミノカブリル酸、o - ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル - Ph e 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 - t RNA 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-RSを選択する段階を含む前記方法。

【請求項17】

- アミノカブリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、又はアゾベンジル-Phe以外のアミノ酸をO-tRNAに負荷する非ターゲットO-RSを含む細胞を排除するよう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、選択マーカーがポジティブ選択マーカーを含み；O-tRNAがロイシル-O-tRNA又はチロシル-O-tRNA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tRNAシンテターゼ。

【請求項19】

1種以上の - アミノカブリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル-Phe、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、スピノ標識アミノ酸、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個のセレ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；

- アミノカブリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル-Phe、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、スピノ標識アミノ酸、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、

セレクターコドンを認識する直交tRNA(O-tRNA)と；

- アミノカブリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル-Phe、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、スピノ標識アミノ酸、又はダンシル側鎖を含むアミノ酸でO-tRNAを優先的にアミノアシル化する直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)を含み；

更に、セレクターコドンに応答して - アミノカブリル酸、o-ニトロベンジルシステイン、アゾベンジル-Phe、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、スピノ標識アミノ酸、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-RS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Tyr³₂、Leu⁶₅、Phe¹₀⁸、Gln¹₀⁹、Asp¹₅⁸及びLeu¹₆²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4に記載のアミノ酸配列以外の古細菌アミノアシル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4のTyr³₂、Leu⁶₅、Phe¹₀⁸、Gln¹₀⁹、Asp¹₅⁸及びLeu¹₆²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-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4の32、65、108、109、158及び162位、又は(ii)配列番号4のTyr³₂、Leu⁶₅、Phe¹₀⁸、Gln¹₀⁹、Asp¹₅⁸及びLeu¹₆²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に記載のライプラリー。

【請求項2_3】

請求項2_1に記載の複数のライプ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プ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Tyr³²、Leu⁶⁵、Phe¹⁰⁸、Gln¹⁰⁹、Asp¹⁵⁸及びLeu¹⁶²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プラリーと；

(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プ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プラリーであって、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Met⁴⁰、Leu⁴¹、Tyr⁴⁹⁹、Tyr⁵²⁷、及びHis⁵³⁷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Met⁴⁰、Leu⁴¹、Tyr⁴⁹⁹、Tyr⁵²⁷、及びHis⁵³⁷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プラリー。

【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Met⁴⁰、Leu⁴¹、Tyr⁴⁹⁹、Tyr⁵²⁷、及びHis⁵³⁷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に記載のライプラリー。

【請求項2_8】

請求項2_6に記載の複数のライプ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Met⁴⁰、Leu⁴¹、Tyr⁴⁹⁹、Tyr⁵²⁷、及びHis⁵³⁷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プラリーと；

(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 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 - R S を同定する段階を含む所望直交アミノアシル t R N A シンテターゼ (O - R S) の同定方法。

【請求項 3 0】

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み；又は前記検出段階がフルオロオロチニ酸の存在下で u r a 3 蛋白質を発現され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 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

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 - R S と O - t R N A 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 3 2】

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。