

【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22年4月22日(2010.4.22)

【公表番号】特表2009-529328(P2009-529328A)  
 【公表日】平成21年8月20日(2009.8.20)  
 【年通号数】公開・登録公報2009-033  
 【出願番号】特願2008-558393(P2008-558393)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/02 (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)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 P 21/02 C  
 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

【手続補正書】  
 【提出日】平成22年3月4日(2010.3.4)  
 【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】

核酸構築物を含む組成物であって、前記構築物が

(a) 大腸菌プロリン tRNA 遺伝子から誘導されるプロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列と、発現可能なヌクレオチド配列(ここで、前記プロモーター及びターミネーター配列はいずれも前記発現可能なヌクレオチド配列と機能的に連結されており、前記発現可能なヌクレオチド配列は前記プロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列に対して異種である)；

(b) 配列番号13のヌクレオチド配列をもつ改変型大腸菌 glnS プロモーターに対応するプロモーターヌクレオチド配列と、発現可能なヌクレオチド配列(ここで、前記改変型大腸菌 glnS プロモーターヌクレオチド配列は前記発現可能なヌクレオチド配列と機能的に連結されている)；

(c) 直交 tRNA (O-tRNA) をコードするヌクレオチド配列と、前記 O-tRNA を非天然アミノ酸で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) をコードするヌクレオチド配列；又は

(d) 複数の tRNA 遺伝子ヌクレオチド配列を含み、少なくとも1個の tRNA 遺伝子が天然 tRNA オペロンに由来する天然ポリヌクレオチドリンカーから誘導される異種ポリヌクレオチドリンカーにより少なくとも1個の隣接 tRNA 遺伝子から分離されているポリシストロン性オペロンを含む前記組成物。

【請求項2】

前記構築物が ( a ) 及び ( b ) の両者を含み、 ( a ) 及び ( b ) の前記発現可能なヌクレオチド配列が相互に異なるか、又は

前記構築物が ( a )、( b ) 及び ( c ) を含み、( a ) の前記発現可能なヌクレオチド配列が前記 O - tRNA をコードし、( b ) の前記発現可能なヌクレオチド配列が前記 O - RS をコードするか、又は

前記大腸菌プロリン tRNA 遺伝子が大腸菌 proK、proL 及び proM tRNA 遺伝子から選択されるか、又は

前記大腸菌プロリン tRNA プロモーター及びターミネーター配列が夫々配列番号 32 (プロモーター) 及び 33 (ターミネーター) に記載の大腸菌 proK のプロモーター及びターミネーター配列から誘導されるか、又は

( a ) の前記発現可能なヌクレオチド配列が複数の 1 種以上のヌクレオチド配列を含むポリシストロン性オペロンであるか、又は

( a ) の前記発現可能なヌクレオチド配列が tRNA をコードする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の組成物を含む宿主細胞。

【請求項 4】

( d ) の前記ポリシストロン性オペロンが複数の同一の異種ポリヌクレオチドリンカーを含むか、又は

( d ) の前記ポリシストロン性オペロンが複数の異種ポリヌクレオチドリンカーを含み、異種ポリヌクレオチドリンカーの少なくとも 2 個が相互に異なるか、又は

( d ) の前記異種ポリヌクレオチドリンカーが 5' 末端チミジンヌクレオチド、3' 末端アデノシンヌクレオチド、又は 5' 末端チミジンヌクレオチドと 3' 末端アデノシンヌクレオチドの両者を含むか、又は

( d ) の前記異種ポリヌクレオチドリンカーが valU と valX ; ileT と alaT ; serV と argV ; valV と valW ; glyT と thrT ; metT と leuW ; glnW と metU ; hisR と leuT ; glnU と glnW ; leuP と leuV ; glnV と glnX ; alaW と alaX ; ileU と alaU ; ileV と alaV ; metU と glnV ; glyW と cysT ; argX と hisR ; 及び argY と argZ から選択される内在大腸菌 tRNA 遺伝子間に位置する天然ポリヌクレオチドリンカーから誘導されるか、又は

( d ) の前記異種ポリヌクレオチドリンカーが配列番号 14 ( valU / valX リンカー ) 又は 15 ( ileT / alaT リンカー ) のヌクレオチド配列から誘導される請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

少なくとも 1 個の非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ該当ポリペプチドの発現用翻訳系であって、前記系が

( a ) 非天然アミノ酸と；

( b ) 直交 tRNA ( O - tRNA ) をコードするヌクレオチド配列と、前記 O - tRNA を前記非天然アミノ酸で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 ) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；

( c ) 前記該当ポリペプチドをコードし、前記 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であって、ポリヌクレオチドが発現されると、ポリヌクレオチドにおけるセクターコドンの位置がポリペプチドを生産するようにポリペプチドにおける非天然アミノ酸の特定位置を制御するように構成された前記ポリヌクレオチドを含む前記翻訳系。

【請求項 6】

前記核酸構築物が

( i ) 大腸菌プロリン tRNA 遺伝子から誘導されるプロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列 (ここで、前記プロモーター及びターミネーター配列はいずれも前記 O -

tRNAを含むか又はコードする前記ヌクレオチド配列と機能的に連結されており、前記O-tRNAは前記プロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列に対して異種である)；

(ii) 配列番号13のヌクレオチド配列をもつ改変型大腸菌glnSプロモーターに対応するヌクレオチド配列(ここで、前記改変型大腸菌glnSヌクレオチド配列は前記O-RSをコードする前記ヌクレオチド配列と機能的に連結されている)；並びに

(iii) 複数の前記O-tRNA遺伝子ヌクレオチド配列を含み、少なくとも1個のO-tRNA遺伝子が天然tRNAオペロンに由来する天然ポリヌクレオチドリナーから誘導される異種ポリヌクレオチドリナーにより少なくとも1個の隣接O-tRNA遺伝子から分離されているポリシストロン性オペロンの

少なくとも1種を含む請求項5に記載の翻訳系。

【請求項7】

前記大腸菌プロリンtRNA遺伝子が大腸菌proK、proL及びproM tRNA遺伝子から選択されるか、又は

前記大腸菌プロリンtRNAプロモーター及びターミネーター配列が夫々配列番号32(プロモーター)及び33(ターミネーター)に記載の大腸菌proKのプロモーター及びターミネーター配列から誘導されるか、又は

前記ポリシストロン性オペロンが複数の同一の異種ポリヌクレオチドリナーを含むか、又は

前記ポリシストロン性オペロンが複数の異種ポリヌクレオチドリナーを含み、異種ポリヌクレオチドリナーの少なくとも2個が相互に異なるか、又は

前記異種ポリヌクレオチドリナーが5'末端チミジンヌクレオチド、3'末端アデノシンヌクレオチド、又は5'末端チミジンヌクレオチドと3'末端アデノシンヌクレオチドの両者を含むか、又は

前記異種ポリヌクレオチドリナーがvalUとvalX；ileTとalaT；serVとargV；valVとvalW；glyTとthrT；metTとleuW；glnWとmetU；hisRとleuT；glnUとglnW；leuPとleuV；glnVとglnX；alaWとalaX；ileUとalaU；ileVとalaV；metUとglnV；glyWとcysT；argXとhisR；及びargYとargZから選択される内在大腸菌tRNA遺伝子間に位置する天然ポリヌクレオチドリナーから誘導されるか、又は

前記異種ポリヌクレオチドリナーが配列番号14(valU/valXリンカー)又は15(ileT/alaTリンカー)のヌクレオチド配列から誘導される請求項6に記載の翻訳系。

【請求項8】

前記O-tRNAが1種以上の古細菌tRNAから誘導されるか、又は

O-tRNAをコードする前記ヌクレオチド配列がO-tRNAをコードする複数のヌクレオチド配列を含むポリシストロン性オペロンであるか、又は

O-tRNAをコードする前記ヌクレオチド配列が配列番号1(MjtRNA-Tyr(CUA))のヌクレオチド配列を含むか、又は

O-tRNAをコードする前記ヌクレオチド配列が配列番号1(MjtRNA-Tyr(CUA))の複数のヌクレオチド配列を含むポリシストロン性オペロンであるか、又は

前記O-RSがMethanococcus jannaschiiアミノアシルtRNAシンターゼから誘導されるか、又は

前記O-RSがMethanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンターゼから誘導されるか、又は

前記O-RSが配列番号2に記載の野生型Methanococcus jannaschiiチロシルtRNAシンターゼ(野生型Mj-tRNA<sup>Tyr</sup>RS)のアミノ酸配列に対してアミノ酸286位又は286位に類似する位置にアスパラギン酸アルギニン置換をもつ請求項5に記載の翻訳系。

## 【請求項 9】

( a )、( b ) 及び ( c ) を含む宿主細胞を含む請求項 5 に記載の翻訳系。

## 【請求項 10】

前記宿主細胞が真正細菌宿主細胞であるか、又は  
前記宿主細胞が大腸菌細胞である請求項 9 に記載の翻訳系。

## 【請求項 11】

少なくとも 1 個の非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ該当ポリペプチドを宿主細胞で作製する方法であって、

- ( a ) ( i ) 非天然アミノ酸と；
- ( i i ) 直交 tRNA ( O - tRNA ) をコードするヌクレオチド配列と、前記 O - tRNA を前記非天然アミノ酸で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 ) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；
- ( i i i ) 前記該当ポリペプチドをコードし、前記 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み、セクターコドンの位置が該当ポリペプチドにおける非天然アミノ酸の特定位置に相関するポリヌクレオチドと；
- ( i v ) ( i )、( i i ) 及び ( i i i ) を含む宿主細胞を準備する段階と；
- ( b ) 前記宿主細胞を増殖させる段階と；
- ( c ) 前記宿主細胞で前記ポリペプチドの翻訳中に前記ポリペプチドの前記特定位置に前記非天然アミノ酸を組込むことにより、前記非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ前記該当ポリペプチドを作製する段階を含む前記方法。

## 【請求項 12】

少なくとも 1 個の非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ該当ポリペプチドを宿主細胞で作製する方法であって、

- ( a ) ( i ) 非天然アミノ酸と；
- ( i i ) 直交 tRNA ( O - tRNA ) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；
- ( i i i ) 前記 O - tRNA を前記非天然アミノ酸で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 ) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；
- ( i v ) 前記該当ポリペプチドをコードし、前記 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み、セクターコドンの位置が該当ポリペプチドにおける非天然アミノ酸の特定位置に相関するポリヌクレオチドと；
- ( v ) ( i )、( i i )、( i i i ) 及び ( i v ) を含む宿主細胞を準備し、
- ( i i ) 及び ( i i i ) の前記核酸構築物が
- ( I ) 大腸菌プロリン tRNA 遺伝子から誘導されるプロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列 ( ここで、前記プロモーター及びターミネーター配列はいずれも前記 O - tRNA をコードする前記ヌクレオチド配列と機能的に連結されており、前記 O - tRNA をコードする前記ヌクレオチド配列は前記プロモーター及びターミネーターヌクレオチド配列に対して異種である ) ；
- ( I I ) 配列番号 13 のヌクレオチド配列をもつ改変型大腸菌 glnS プロモーターに対応するヌクレオチド配列 ( ここで、前記改変型大腸菌 glnS ヌクレオチド配列は前記 O - RS をコードする前記ヌクレオチド配列と機能的に連結されている ) ；並びに
- ( I I I ) 複数の O - tRNA 遺伝子ヌクレオチド配列を含み、少なくとも 1 個の O - tRNA 遺伝子が天然 tRNA オペロンに由来する天然ポリヌクレオチドリンカーから誘導される異種ポリヌクレオチドリンカーにより少なくとも 1 個の隣接 O - tRNA 遺伝子から分離されているポリシストロン性オペロンの少なくとも 1 種を集合的に含むようにこれらを準備する段階と；
- ( b ) 前記宿主細胞を増殖させる段階と；
- ( c ) 前記宿主細胞で前記ポリペプチドの翻訳中に前記ポリペプチドの前記特定位置に前記非天然アミノ酸を組込むことにより、前記非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ前記該

当ポリペプチドを作製する段階を含む前記方法。

【請求項 13】

少なくとも 1 個の非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ該当ポリペプチドの発現用翻訳系の作製方法であって、

(a) 非天然アミノ酸と；

(b) 直交 tRNA (O-tRNA) をコードするヌクレオチド配列と、前記 O-tRNA を前記非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する直交アミノアシル tRNA シンターゼ (O-RS) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；

(c) 前記該当ポリペプチドをコードし、前記 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であって、ポリヌクレオチドが発現されると、ポリヌクレオチドにおけるセクターコドンの位置がポリペプチドを生産するようにポリペプチドにおける非天然アミノ酸の特定位置を制御するように構成された前記ポリヌクレオチドを準備する段階を含む前記方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 個の非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ該当ポリペプチドの作製方法であって、

(a) (i) 非天然アミノ酸と；

(ii) 直交 tRNA (O-tRNA) をコードするヌクレオチド配列と、前記 O-tRNA を前記非天然アミノ酸で優先的にアミノアシル化する直交アミノアシル tRNA シンターゼ (O-RS) をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物と；

(iii) 前記該当ポリペプチドをコードし、前記 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み、セクターコドンの位置が該当ポリペプチドにおける非天然アミノ酸の特定位置に相関するポリヌクレオチドと；

(iv) (i)、(ii) 及び (iii) を含む宿主細胞を含む翻訳系を準備する段階と；

(b) 前記宿主細胞を増殖させる段階と；

(c) 前記宿主細胞で前記ポリペプチドの翻訳中に前記ポリペプチドの前記特定位置に前記非天然アミノ酸を組込むことにより、前記非天然アミノ酸を特定位置に組込んだ前記該当ポリペプチドを作製する段階を含む前記方法。