

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-29621

(P2018-29621A)

(43) 公開日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 9
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21		4 B O 6 4
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A	4 B O 6 5
C O 7 K 14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47		4 H O 4 5
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C	
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 78 頁)				

(21) 出願番号	特願2017-229231 (P2017-229231)	(71) 出願人	511167135
(22) 出願日	平成29年11月29日 (2017.11.29)		ストロ バイオファーマ, インコーポレ
(62) 分割の表示	特願2015-536826 (P2015-536826)		イテッド
原出願日	平成25年10月8日 (2013.10.8)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(31) 優先権主張番号	61/713, 245		80, サウス サンフランシスコ, ユ
(32) 優先日	平成24年10月12日 (2012.10.12)		タ ストリート 310, スイート 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		50
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 改善された発現のための、細菌抽出物中の選択タンパク質のタンパク質分解不活性化

(57) 【要約】

【課題】改善された発現のための、細菌抽出物中の選択タンパク質のタンパク質分解不活性化を提供する。

【解決手段】本発明は、外膜タンパク質 T 1 (O m p T 1) プロテアーゼ切断部位を含むように改変される組換え標的タンパク質を提供する。前記 O m p T 1 切断部位は、切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合を含む。いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、その標的タンパク質の表面露出モチーフに O m p T 1 切断部位を導入するように改変される。O m p T 1 は、高効率で二塩基性残基間の基質を切断するので、ネイティブ表面露出モチーフは、p H 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。前記標的タンパク質は、例えば正常な細胞成長および／または生存に必要とされる必須タンパク質であることができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2012年10月12日に出願した米国特許出願第61/713,245号に対する優先権の利益を主張する。米国特許出願第61/713,245号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、無細胞合成技術に、および詳細には細菌抽出物中の選択タンパク質のタンパク質分解不活性化に関する。好ましい使用は、被定義アミノ酸残基に非ネイティブアミノ酸が組み込まれたポリペプチドの収量を増加させることである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

インビトロタンパク質合成のための細菌無細胞抽出物の使用には、従来のインビボタンパク質発現法に勝るいくつかの利点がある。無細胞システムは、細菌の代謝資源のすべてではないが大部分を1つのタンパク質の排他的生産に向けることができる。さらに、インビトロで細胞壁および膜成分がないことは、合成環境の制御を可能にするので、有利である。しかし、無細胞抽出物の効率は、タンパク質合成を阻害する細菌タンパク質によって、直接または間接的に減少され得る。したがって、タンパク質合成効率を低下させる望ましくないタンパク質の不活性化は、無細胞抽出物における望ましいタンパク質の収量を増加させるはずである。例えば、タンパク質合成効率を低下させるタンパク質の不活性化は、被定義アミノ酸残基に非ネイティブアミノ酸が組み込まれたポリペプチドの収量を増加させるはずである。非ネイティブアミノ酸 (nnA) のポリペプチドへの導入は、タンパク質の生物学的多様性および機能を増加させるのに有用である。被定義アミノ酸残基に nnA が組み込まれたポリペプチドを生産する1つの手法は、タンパク質翻訳中に nnA を新生ポリペプチドのアンバー (終止) コドンに組み込むための、tRNA を含有する nnA、アミノアシル化直交CUAの使用である。しかし、終止コドンを正常に認識し、翻訳を終結させるネイティブ細菌終結複合体によって、アンバーコドンへの nnA の組み込みは阻害され得る。放出因子1 (RF1) は、mRNA配列内のアンバーコドンを認識することにより翻訳の終結を助長する終結複合体タンパク質である。アンバー終止コドンの RF1 認識は、非ネイティブアミノ酸組み込み部位における未成熟短縮産物、およびしたがってタンパク質収量減少を促進し得る。それ故、RF1の活性の減弱は、組換えタンパク質への nnA 組み込み増加させるだろう。

【0004】

次の3つの方法でRF1活性を減弱させることによって nnA 組み込みを増加させることができることは、以前に証明されている：1) RF1の中和抗体不活性化、2) (RF2強化株における) RF1のゲノムノックアウト、および3) アフィニティークロマトグラフィーによる除去のためのタンパク質タグ (キチン結合ドメインおよびHisタグ) を含有するRF1を発現するように操作された株を使用するRF1の部位特異的除去。本開示は、RF1アミノ酸配列にタンパク質分解性切断部位を導入することによるRF1の新規不活性化方法を記載するものである。前記切断部位は、細菌細胞成長中はプロテアーゼが接近できないが、細菌細胞が溶解されて無細胞抽出物が生産されるとプロテアーゼによって切断される。したがって、アンバーコドンに nnA が組み込まれた完全長ポリペプチドの収量は、本明細書に記載する改変RF1変異体を発現する細菌細胞抽出物では増加される。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の簡単な概要

本発明は、外膜タンパク質 T 1 (Omp T 1) プロテアーゼ切断部位を含むように改変される組換え標的タンパク質を提供する。前記 Omp T 1 切断部位は、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含む。いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、その標的タンパク質の表面露出モチーフに Omp T 1 切断部位を導入するように改変される。Omp T 1 は、高効率で二塩基性残基間の基質を切断するので、ネイティブ表面露出モチーフは、pH 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。前記標的タンパク質は、例えば正常な細胞成長および／または生存に必要とされる必須タンパク質であることができる。

10

【0006】

いくつかの実施形態において、表面露出モチーフは、そのタンパク質のモチーフ領域が複合体を形成していないとき少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ の B 因子を有する。いくつかの実施形態において、表面露出モチーフは、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ の間の溶媒露出表面積合計を有する。いくつかの実施形態において、標的タンパク質は、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合が、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示すそのタンパク質の位置にあるように改変される。

【0007】

20

第一の態様において、本発明は、Omp T 1 と切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質とを両方とも発現する細菌細胞を提供する。いくつかの実施形態において、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合は、表面露出モチーフ内に位置し、そのネイティブモチーフは、pH 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。いくつかの実施形態では、前記細菌細胞は、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質を発現し、ここで、前記結合は、前記タンパク質が複合体を形成していないとき少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ の B 因子を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にある。いくつかの実施形態では、前記細菌細胞は、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質を発現し、ここで、前記結合は、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ との間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にある。1 つの実施形態では、前記細菌細胞は、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質を発現し、ここで、前記結合は、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にある。1 つの実施形態では、前記細菌細胞は、大腸菌である。

30

【0008】

いくつかの実施形態では、前記必須標的タンパク質は、RF 1、RF 2、RNAse、チオレドキシシンレダクターゼ、グルタレドキシシンレダクターゼ、グルタチオンレダクターゼ、アミノ酸分解酵素、ポリリン酸キナーゼ、または低温ショックタンパク質から選択される。

40

【0009】

第二の態様において、本発明は、インビトロ無細胞合成システムにおける改変必須標的タンパク質の有害な活性を低減させるための方法を提供し、この方法は、

i) 前記改変必須標的タンパク質を発現する Omp T 1 陽性細菌を培養するステップであって、前記タンパク質が、切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように改変され、該タンパク質が、pH 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されるものであるステップ；

i i) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

i i i) 前記必須標的タンパク質を、インタクトタンパク質を 50 % 低減させるために

50

十分な量のOmp T 1と接触させるステップ；

i v) 目的のタンパク質をコードする核酸テンプレートを前記抽出物に添加するステップ；および

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含む。

【0010】

本方法のいくつかの実施形態では、前記切断しやすいOmp t T 1ペプチド結合は、前記タンパク質が複合体を形成していないときに少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフ内に位置する。いくつかの実施形態では、前記切断しやすいOmp T 1ペプチド結合は、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ との間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内に位置する。いくつかの実施形態では、前記切断しやすいOmp T 1ペプチド結合は、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にある。

【0011】

本方法のいくつかの実施形態では、前記細菌の酸化的リン酸化システムは、細胞溶解後および目的のタンパク質の合成中に活性のままである。1つの実施形態では、前記無細胞合成システムは、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコードに配置する。

【0012】

第三の態様において、本発明は、外膜タンパク質T 1 (Omp T 1) によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(R F 1)であって、切断しやすいOmp T 1ペプチドが、野生型R F 1 (配列番号1) のアミノ酸287~304に対応するスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH 7. 0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、前記R F 1を提供する。いくつかの実施形態において、2つの隣接する塩基性アミノ酸は、アルギニンおよびリジンから独立して選択される。他の実施形態において、スイッチループ領域は、3つの隣接する塩基性アミノ酸を有するように改変される。いくつかの実施形態では、位置296のネイティブアスパラギンが前記3つの隣接する塩基性アミノ酸のうちの1つの代わりとなる。前記機能性、改変R F 1タンパク質は、野生型R F 1より速い速度でOmp T 1によって切断される。例えば、1つの実施形態において、改変タンパク質および野生型タンパク質が、Omp T 1を発現する細胞からの無細胞抽出物中に同様の濃度で存在するとき、Omp T 1による改変R F 1の切断活性は、 30°C で30分後、野生型R F 1 (配列番号1) の50%より大きい。

【0013】

いくつかの実施形態において、Omp T 1によって切断可能である機能性R F 1は、そのスイッチループ領域内にOmp T 1切断ペプチドを含有する。

【0014】

第四の態様において、本発明は、外膜タンパク質T 1 (Omp T 1) によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(R F 1) をコードする核酸を提供し、ここで、切断しやすいOmp T 1ペプチド結合が、野生型R F 1 (配列番号1) のアミノ酸287~304に対応するR F 1のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH 7. 0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。

【0015】

第五の態様において、本発明は、インビトロ無細胞合成システムにおいてアンバーコードでのR F 1競合を低減させるための方法を提供し、この方法は、

i) 外膜タンパク質T 1 (Omp T 1) によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(R F 1) を発現するOmp T 1陽性細菌を培養するステップ；

i i) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

i i i) 前記抽出物中の前記R F 1タンパク質を、インタクトR F 1タンパク質を50%低減させるために十分な量のOmp T 1と接触させるステップ；

i v) 目的のタンパク質をコードし、かつアンバーコドンを含む核酸テンプレートを、前記抽出物に添加するステップ；および

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含み、

前記 R F 1 タンパク質が、野生型 R F 1（配列番号 1）のアミノ酸 287～304 に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合を有し、および前記スイッチループ領域が、p H 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。

【0016】

本発明の 1 つの実施形態では、前記 O m p T 1 陽性細菌は、大腸菌由来である。いくつかの実施形態では、前記細菌の酸化的リン酸化システムは、細胞溶解後および前記目的のタンパク質の合成中に活性のままである。いくつかの実施形態では、前記無細胞合成システムは、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコドンに配置する。

【0017】

別の態様において、本発明は、無細胞合成システムを提供し、この無細胞合成システムは、単一反応混合物中に、

i) タンパク質をコードする核酸テンプレートを翻訳するために十分な細菌溶解物からの成分と、

i i) 目的のタンパク質をコードし、かつ少なくとも 1 つのアンバーコドンを有する、核酸テンプレートと、

i i i) 前記アンバーコドンに相補的な t R N A と、

i v) 外膜タンパク質 T 1（O m p T 1）によって切断可能な機能性放出因子 1（R F 1）タンパク質であって、切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合が、野生型 R F 1（配列番号 1）のアミノ酸 287～304 に対応する R F 1 のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、p H 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、R F 1 タンパク質とを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、前記無細胞合成システムの反応混合物は、非天然アミノ酸および対応するアミノ酸シンセターゼをさらに含み、前記シンセターゼが、前記アンバーコドンに相補的な t R N A に前記非天然アミノ酸をチャージすることができる。いくつかの実施形態では、前記無細胞合成システムは、活性酸化的リン酸化システムにより A T P を生成する。

【0019】

なお別の態様において、本発明は、無細胞合成システムにおいてタンパク質を発現させるための方法を提供し、この方法は、

i. 核酸テンプレートと細菌抽出物を、タンパク質合成を可能にする条件下であわせるステップであって、前記細菌抽出物が、野生型 R F 1（配列番号 1）のアミノ酸 287～303 に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合において O m p T 1 によって切断された R F 1 タンパク質を含み、前記スイッチループ領域が、p H 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されたものであるステップ；および

i i. 前記核酸テンプレートからタンパク質を発現させるステップを含む。

【0020】

別の態様において、本発明は、細菌細胞であって、O m p T 1 によって切断され得る機能性 R F 1 をコードするゲノムに組み込まれた配列を含む細菌細胞を提供する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目 1）

外膜タンパク質 T 1（O m p T 1）によって切断可能である機能性放出因子 1 タンパク質

10

20

30

40

50

(R F 1) であって、切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合が、野生型 R F 1 (配列番号 1) のアミノ酸 2 8 7 ~ 3 0 4 に対応するスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、p H 7 . 0 で正に荷電する 3 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、R F 1 タンパク質。

(項目 2)

前記 3 つの隣接する塩基性アミノ酸が、アルギニンおよびリジンを含む群から独立して選択される、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 3)

前記スイッチループ領域が、少なくとも 2 つのさらなる隣接する塩基性アミノ酸を有するように改変される、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

10

(項目 4)

位置 2 9 6 のネイティブアスパラギンが、前記 3 つの隣接する塩基性アミノ酸のうちの 1 つの代わりとなる、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 5)

前記改変タンパク質および野生型タンパク質が O m p T 1 を発現する細菌からの無細胞抽出物中に同様の濃度で存在するとき、O m p T 1 による切断活性が、3 0 ° C で 3 0 分後、野生型 R F 1 (配列番号 1) の 5 0 % より大きい、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 6)

前記スイッチループ領域が、

【化 9】

20

QQAEASTRRKLLGSGDRS (配列番号 5),

QQAEASTRRRLGSGDRS (配列番号 6),

QQAEASTRRKKLGSGDRS (配列番号 12),

QQAEASTRRKRLGSGDRS (配列番号 13),

QQAEASTRRKVLGSGDRS (配列番号 14),

QQAEASTRRRKLGSGDRS (配列番号 15),

QQAEASTRRRLGSGDRS (配列番号 16),

QQAEASTRRRVLGSGDRS (配列番号 17),

30

QQAEASTRRKKKGSGDRS (配列番号 18),

QQAEASTRRKKRGSGDRS (配列番号 19),

QQAEASTRRKRKGSGDRS (配列番号 20),

QQAEASTRRKRRGSGDRS (配列番号 21),

QQAEASTRRRRRGSGDRS (配列番号 22),

QQAEASTRRRKRGSGDRS (配列番号 23),

QQAEASTRRRRKGSGDRS (配列番号 24), および

QQAEASTRRRKKKGSGDRS (配列番号 25)

40

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 7)

外膜タンパク質 T 1 (O m p T 1) によって切断可能である機能性放出因子 1 タンパク質 (R F 1) であって、野生型 R F 1 (配列番号 1) のアミノ酸 2 8 7 ~ 3 0 4 に対応するスイッチループ領域が、

【化 1 0】

QARRGSTRRNLLGSGDRS (配列番号 26);

QQARRGTRRNLLGSGDRS (配列番号 27);

QQAARRGRRNLLGSGDRS (配列番号 28);

QQAEARRGRNLLGSGDRS (配列番号 29);

QQAEAAARRGNLLGSGDRS (配列番号 30);

QQAEASARRGLLGSGDRS (配列番号 31);

QQAEASTARRGLGSGDRS (配列番号 32);

QQAEASTRARRGGSGDRS (配列番号 33);

QQAEASTRRARRGSGDRS (配列番号 34);

QQAEASTRRNARRGGDRS (配列番号 35);

QQAEASTRRNLARRGDRS (配列番号 36);

QQAEASTRRNLLARRGRS (配列番号 37);

QQAEASTRRNLLGARRGS (配列番号 38);

QQAEASTRRNLLGSARRG (配列番号 39); および

QQAEASTRRNLLGSGARR (配列番号 40)

10

20

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、R F 1 タンパク質。

(項目 8)

前記スイッチループ領域が、

【化 1 1】

QQAWLAARRGRGGSGDRS (配列番号 41);

QQAEWLAARRGRGGSGDRS (配列番号 42);

QQAEAWLAARRGRGGDRS (配列番号 43);

QQWGGRWARKKGTIGDRS (配列番号 44);

QQAWGGRWARKKGTIDRS (配列番号 45); および

QQAEWGGRWARKKGTIRS (配列番号 46)

30

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 7 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 9)

前記スイッチループ領域が、

【化 1 2】

QQAEASTRRKRLGSGDRS (配列番号 13),

QQAEASTRRKRKGGSGDRS (配列番号 20),

QQAEASTRRKRRGGSGDRS (配列番号 21), および

QQAWLAARRGRGGSGDRS (配列番号 41)

40

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 7 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 10)

外膜タンパク質 T 1 (Omp T 1) と切断しやすい Omp T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であって、前記結合が、前記タンパク質が複合体を形成していないとき少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ の B 因子を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが

50

、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目11)

外膜タンパク質T1 (Omp T1)と切断しやすいOmp T1ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であって、前記結合が、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目12)

外膜タンパク質T1 (Omp T1)と切断しやすいOmp T1ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であって、前記結合が、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目13)

前記必須標的タンパク質が、RF1、RF2、RNase、プロテアーゼ、チオレドキシンレダクターゼ、グルタレドキシンレダクターゼ、グルタチオンレダクターゼ、アミノ酸分解酵素、ポリリン酸キナーゼ、および低温ショックタンパク質から成る群より選択される、項目10～12に記載の細菌細胞。

(項目14)

前記細菌細胞が大腸菌 (E. coli) である、項目10～12に記載の細菌細胞。

(項目15)

インビトロ無細胞合成システムにおける改変必須標的タンパク質の有害な活性を低減させるための方法であって、

i) 前記改変必須標的タンパク質を発現するOmp T1陽性細菌を培養するステップであって、前記タンパク質が、切断しやすいOmp t T1ペプチド結合を含むように改変され、該タンパク質が、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されるものであるステップ；

ii) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

iii) 前記必須標的タンパク質を、インタクトタンパク質を50%低減させるために十分な量のOmp T1と接触させるステップ；

iv) 目的のタンパク質をコードする核酸テンプレートを前記抽出物に添加するステップ；および

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含む方法。

(項目16)

前記切断しやすいOmp t T1ペプチド結合が、前記タンパク質が複合体を形成していないときに少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフ内に位置する、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記切断しやすいOmp t T1ペプチド結合が、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内に位置する、項目15に記載の方法。

(項目18)

前記切断しやすいOmp t T1ペプチド結合が、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にある、項目15に記載の方法。

(項目19)

前記Omp T1陽性細菌が、大腸菌である、項目15に記載の方法。

(項目20)

10

20

30

40

50

前記細菌の酸化的リン酸化システムが、細胞溶解後および前記目的のタンパク質の合成中に活性のままである、項目15に記載の方法。

(項目21)

前記無細胞合成システムが、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコードに配置する、項目15に記載の方法。

(項目22)

外膜タンパク質T1 (Omp T1) によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(RF1)をコードする核酸であって、切断しやすいOmp T1ペプチド結合が、野生型RF1 (配列番号1) のアミノ酸287~304に対応するRF1のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する3つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、核酸。

10

(項目23)

インビトロ無細胞合成システムにおいてアンバーコードでのRF1競合を低減させるための方法であって、

i) 外膜タンパク質T1 (Omp T1) によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(RF1)を発現するOmp T1陽性細菌を培養するステップ；

ii) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

iii) 前記抽出物中の前記RF1タンパク質を、インタクトRF1タンパク質を50%低減させるために十分な量のOmp T1と接触させるステップ；

iv) 目的のタンパク質をコードし、かつアンバーコードを含む核酸テンプレートを、前記抽出物に添加するステップ；および

20

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含む、

前記RF1タンパク質が、野生型RF1 (配列番号1) のアミノ酸287~304に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすいOmp T1ペプチド結合を有し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、方法。

(項目24)

前記Omp T1陽性細菌が、大腸菌由来である、項目23に記載の方法。

(項目25)

前記細菌の酸化的リン酸化システムが、細胞溶解後および前記目的のタンパク質の合成中に活性のままである、項目23に記載の方法。

30

(項目26)

前記無細胞合成システムが、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコードに配置する、項目23に記載の方法。

(項目27)

無細胞合成システムであって、単一反応混合物中に、

i) タンパク質をコードする核酸テンプレートを翻訳するために十分な細菌溶解物からの成分と、

ii) 目的のタンパク質をコードし、かつ少なくとも1つのアンバーコードを有する、核酸テンプレートと、

40

iii) 前記アンバーコードに相補的なtRNAと、

iv) 外膜タンパク質T1 (Omp T1) によって切断可能な機能性放出因子1 (RF1) タンパク質であって、切断しやすいOmp T1ペプチド結合が、野生型RF1 (配列番号1) のアミノ酸287~304に対応するRF1のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する3つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、RF1タンパク質とを含む、無細胞合成システム。

(項目28)

前記反応混合物が、非天然アミノ酸および対応するアミノ酸シンセターゼをさらに含み、

50

前記シンセターゼが、前記アンバーコドンに相補的な t R N A に前記非天然アミノ酸をチャージすることができる、項目 27 に記載の無細胞合成システム。

(項目 29)

前記システムが活性酸化的リン酸化システムにより A T P を生成する、項目 27 に記載の無細胞合成システム。

(項目 30)

無細胞合成システムにおいてタンパク質を発現させるための方法であって、

i. 核酸テンプレートと細菌抽出物を、タンパク質合成を可能にする条件下であわせるステップであって、前記細菌抽出物が、野生型 R F 1 (配列番号 1) のアミノ酸 287 ~ 303 に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合において O m p T 1 によって切断された R F 1 タンパク質を含み、前記スイッチループ領域が、p H 7. 0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されたものであるステップ; および

i i. 前記核酸テンプレートからタンパク質を発現させるステップを含む方法。

(項目 31)

細菌細胞であって、前記細菌細胞のゲノムに組み込まれた項目 1 または項目 7 に記載の機能性 R F 1 を含む細菌細胞。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図 1】図 1 は、O m p T 切断部位を含有する改変 R F 1 タンパク質変異体が、O m p T 活性のない無細胞抽出物に添加されたときに野生型 R F 1 活性を有することを示す。F c タンパク質の位置 S 378 (F c _ S 378 T A G) に導入されたアンバーコドンに非ネイティブアミノ酸を付加させたとき抑制を低減させる (連鎖終結を増加させる) 外因性 R F - 1 変異体の能力を判定した。図 1 (A) レーン 1 は、外因的に添加された R F 1 がない対照抽出物である。前記抽出物は、野生型 R F 1 を含有し、これは、アンバー抑制低減をもたらし、それによって短縮型 F c が生産される (ゲルにおける下方のバンド)。レーン 2 は、外因的に添加された野生型 (W T) R F 1 を含有する対照抽出物である。野生型 R F 1 の添加は、アンバー抑制のさらなる低減をもたらし、それによって相対的に多い短縮型 F c が生産される。レーン 3 ~ 7 は、本発明の異なる R F 1 変異体を含有する無細胞抽出物を示す。5 つすべての変異体が R F 1 活性を有する。図 1 (B) は、R F 1 変異体の相対活性を示し、ここでは、W T R F 1 が添加された活性を 100 パーセントに設定し、R F 1 添加なしをゼロパーセントに設定する。

【0022】

【図 2】図 2 は、改変 R F 1 変異体 (A 18) を発現するように操作された細菌株からの無細胞抽出物が、重鎖の様々な位置に n n A A が導入されたとき、野生型 R F 1 を発現する細菌株と比較して完全長 I g G の収量の実質的増加を生じさせることを示す。2 (A) 左パネル: インタクト O m p T および野生型 R F 1 を含有する、S B J Y 001 抽出物。2 (A) 右パネル: インタクト O m p T および R F 1 変異体 A 18 を含有する、S B H S 016 (株 16) 抽出物。完全長 (インタクト) I g G のバンド強度は、株 16 抽出物においてより強く、これは、短縮型タンパク質の減少とともに、n n A A の組み込みが実質的に増加されたことを示す。2 (B) は、重鎖の示されている位置に n n A A を含有するタンパク質の I g G 可溶性収量が、株 16 抽出物において実質的に増加されることを示し、これは、R F 1 変異体 A 18 の O m p T 切断の結果、短縮型重鎖がより少なくなることを示す。「R F 1 +」(R F 1 陽性) 抽出物は、O m p T によって切断されない株 001 からの R F 1 を指す。「R F 1 -」(R F 1 陰性) 抽出物は、O m p T 切断部位を含むように改変される、したがって O m p T 活性によって分解される、株 16 からの R F 1 を指す。

【0023】

【図 3】図 3 は、改変 R F 1 変異体 (A 18) を発現するように操作された細菌株か

10

20

30

40

50

らの無細胞抽出物が、重鎖の示されている位置での $n n A A$ の導入増加に対応してアンバー抑制の実質的増加を生じさせることを示す。3 (A) 左パネル：インタクト $O m p T$ および野生型 $R F 1$ を含有する、 $S B J Y 0 0 1$ 抽出物。3 (A) 右パネル：インタクト $O m p T$ および $R F 1$ 変異体 $A 1 8$ を含有する、 $S B H S 0 1 6$ (株 1 6) 抽出物。完全長 (インタクト) 重鎖 ($H c$) のバンド強度は、株 1 6 抽出物においてより強く、これは、短縮型タンパク質の減少とともに、 $n n A A$ の組み込みが実質的に増加されたことを示す。3 (B) は、重鎖の示されている位置に $n n A A$ を含有するタンパク質のアンバー抑制が、株 1 6 抽出物において実質的に増加されることを示し、これは、 $R F 1$ 変異体 $A 1 8$ の $O m p T$ 切断の結果、アンバー抑制が増加されることを示す。「 $R F 1 +$ 」($R F 1$ 陽性) 抽出物は、 $O m p T$ によって切断されない株 0 0 1 からの $R F 1$ を指す。「 $R F 1 -$ 」($R F 1$ 陰性) 抽出物は、 $O m p T$ 切断部位を含むように改変される、したがって $O m p T$ 活性によって分解される、株 1 6 からの $R F 1$ を指す。

10

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

「アミノアシル化」または「アミノアシル化する」は、化合物へのアミノアシル基の付加の結果である、 $t R N A$ にその妥当なアミノ酸が「チャージされる」(charge) 完全プロセスを指す。本発明に関する場合、アミノアシル化を受けるまたはアミノアシル化された $t R N A$ は、アミノ酸がチャージされたものであり、アミノアシル化を受けるまたはアミノアシル化されたアミノ酸は、 $t R N A$ 分子にチャージされるものである。

20

【0025】

「アミノアシル- $t R N A$ シンセターゼ」または「 $t R N A$ シンセターゼ」または「シンセターゼ」または「 $a a R S$ 」または「 $R S$ 」は、アミノ酸と $t R N A$ 分子間の共有結合を触媒する酵素を指す。これは、そのそれぞれのアミノ酸がエステル結合によって連結された $t R N A$ 分子である、「チャージされた」 $t R N A$ 分子をもたらす。

【0026】

「コドン」は、特定の天然起源アミノ酸、非ネイティブアミノ酸、または翻訳終止 (ポリペプチド連鎖終結) シグナルを特定する核酸テンプレート内の 3 連続ヌクレオチドの群を指す。遺伝子コードの縮重のため、アミノ酸は、1 個より多くのコドンによって特定されることがある。

30

【0027】

アンバーコドンは、殆どの生物においてポリペプチド翻訳を終結させるように作用する $R N A$ におけるポリペプチド連鎖終結配列 ($U A G$) ($D N A$ における $T A G$) である。アンバーコドンは、適切な $t R N A$ にその同族アミノアシル- $t R N A$ シンセターゼによってチャージされると、タンパク質新生アミノ酸ピロリジンもコードすることができる。

【0028】

「アンバーコドン $t R N A$ 」または「アンバーサプレッサー $t R N A$ 」または「アンバーアンチコドン $t R N A$ 」は、アンバーコドンに結合する $t R N A$ を指す。

【0029】

「隣接するアミノ酸」は、ポリペプチドのアミノ酸配列内で互いに直ぐ前または後にあるアミノ酸を指す。例えば、ポリペプチドの一次アミノ酸配列の位置 2 のアミノ酸は、位置 1 および 3 のアミノ酸に隣接している。「2 つの隣接する塩基性アミノ酸」は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列内の他方の塩基性アミノ酸の直ぐ前または後にある一方の塩基性アミノ酸を指す。例えば、 $R F 1$ アミノ酸配列の位置 2 9 5 の塩基性アミノ酸 $A r g$ (R) は、その $R F 1$ アミノ酸配列の位置 2 9 6 に導入された塩基性アミノ酸、例えば K または R 、に隣接することができる。

40

【0030】

「細菌由来無細胞抽出物」は、 $m R N A$ をポリペプチドに翻訳することができるインビトロ反応混合物の調製物を指す。前記混合物としては、リボソーム、 $A T P$ 、アミノ酸および $t R N A$ が挙げられる。それらは、溶解された細菌に直接由来することもあり、精製

50

された成分に由来することもあり、または両方の組み合わせに由来することもある。

【0031】

「塩基性アミノ酸」は、それらの pK_a より下の pH 値で極性でありおよび正電荷を有し、ならびに非常に親水性である。中性 pH での塩基性アミノ酸の例としては、アルギニン (Arg = R)、リジン (Lys = K) およびヒスチジン (His = H) が挙げられる。

【0032】

「無細胞合成システム」は、生物学的抽出物および／または被定義試薬を含む反応ミックス中のポリペプチドのインビトロ合成を指す。前記反応ミックスは、高分子の生産のためのテンプレート、例えば、DNA、mRNA など；合成すべき高分子のためのモノマー、例えば、アミノ酸、ヌクレオチドなど；ならびに補因子、酵素、およびその合成に不可欠である他の試薬、例えば、リボソーム、チャージされていない tRNA、非天然アミノ酸がチャージされた tRNA、ポリメラーゼ、転写因子などを含むことになる。

【0033】

用語「切断活性が野生型 RF1 の 50 % より大きい」は、特定条件下で野生型タンパク質の切断速度の 50 % より高い、本明細書に記載する改変タンパク質の切断速度を指す。例えば、前記切断速度は、OmpT1 を発現する細菌からの無細胞抽出物中に改変タンパク質および野生型タンパク質が同様の濃度（例えば、0.1 ~ 1.0 マイクロモルの濃度）で存在するとき、30 °C で 30 分後に野生型タンパク質の切断速度の 50 % より高いことができる。

【0034】

用語「有害な活性」は、無細胞抽出物におけるタンパク質合成中にタンパク質の収量を減少させる活性を指す。例えば、有害な活性は、無細胞合成システムにおいて細胞の転写および／または翻訳を阻害することができる。有害な活性としては、無細胞合成反応において生成されたジスルフィド結合タンパク質の効率的なタンパク質フォールディングに必要とされる GSSG の酵素的低減を挙げることができる。有害な活性としては、ポリペプチド伸長が、導入された終止コドンで時期尚早に終結されるような、放出因子による時期尚早の連鎖終結も挙げることができる。

【0035】

「標的タンパク質」は、プロテアーゼ切断部位を含むように改変されたタンパク質、または n n A A を含むように改変されるタンパク質である。「必須標的タンパク質」は、細胞、例えば細菌細胞または真核細胞、の正常な成長および／または生存に必要とされるタンパク質である。

【0036】

「機能性放出因子 1 (RF1) タンパク質」は、野生型または非改変 RF1 タンパク質と等しいまたは実質的に同様の活性を保持する RF1 を指す。機能性 RF1 活性は、例えば、改変 RF1 タンパク質を発現する細菌の成長速度を測定し、野生型または非改変 RF1 を発現する細菌の成長速度と比較することにより、試験することができる。OmpT 切断部位を含有するように改変された他のタンパク質の機能活性を、同様に、例えば、その改変タンパク質を発現する細菌の成長速度を測定し、野生型または非改変タンパク質を発現する細菌の成長速度と比較することにより、判定することができる。機能性 RF1 活性は、例えば、標的タンパク質をコードする mRNA の特定位置への n n A A の直交 tRNA 組み込みを低減させ、それによって時期尚早の連鎖終結の量を増加させる（すなわち、短縮型タンパク質の量を増加させる）改変 RF1 タンパク質の能力によって、試験することもできる。

【0037】

本発明に関して、用語「含むように改変された」は、タンパク質もしくはポリペプチド配列におけるアミノ酸の置換、付加または欠失、または改変タンパク質をコードする核酸配列における対応する置換、付加もしくは欠失を指す。改変タンパク質は、野生型タンパク質配列からの同数のアミノ酸を置き換えるアミノ酸置換、野生型配列に付加されたアミ

10

20

30

40

50

ノ酸、または野生型配列から欠失されたアミノ酸を含むことができる。例えば、野生型アミノ酸（単数または複数）をアミノ酸配列の対応する位置で置き換える塩基性アミノ酸を含むようにタンパク質を改変することができる。OmpT切断配列などの既知プロテアーゼ切断配列であるアミノ酸配列を含むようにタンパク質を改変することもできる。

【0038】

「非天然」または「非ネイティブ」アミノ酸は、すべてのタンパク質についての構成要素である20の天然起源アミノ酸の1つではないアミノ酸であって、それにもかかわらず、それらをタンパク質に組み込むように生物学的に操作することが可能なアミノ酸を指す。非ネイティブアミノ酸は、20の天然起源アミノ酸の1つのD-ペプチドエナンチオマーまたは任意の翻訳後修飾を含んでよい。多種多様な非ネイティブアミノ酸を本発明の方法において使用することができる。非ネイティブアミノ酸は、非ネイティブアミノ酸の所望の特性、例えば、非ネイティブアミノ酸の機能、例えば、タンパク質の生物学的特性、例えば毒性、生体内分布または半減期、構造的特性、分光特性、化学および／または光化学特性、触媒特性の改変、他の分子と（共有結合的にまたは非共有結合的に）反応する能力などに基づいて選択することができる。本発明の方法において使用することができる非ネイティブアミノ酸としては、チロシンアミノ酸の非ネイティブ類似体；グルタミンアミノ酸の非ネイティブアナログ；フェニルアラニンアミノ酸の非ネイティブアナログ；セリンアミノ酸の非ネイティブアナログ；トレオニンアミノ酸の非ネイティブアナログ；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環式、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケトもしくはアミノ置換アミノ酸、またはこれらの任意の組み合わせ；光励起性架橋剤を伴うアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；新規官能基を有するアミノ酸；別の分子と共有結合的にまたは非共有結合的に相互作用するアミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；光ケージドおよび／または光異性化性アミノ酸；ビオチンまたはビオチンアナログ含有アミノ酸；グリコシル化または炭水化物修飾アミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコールまたはポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学的に切断可能なまたは光切断性アミノ酸；伸長側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含有するアミノ酸；糖置換アミノ酸、例えば、糖置換セリンなど；炭素結合糖含有アミノ酸、例えば、糖置換セリンなど；炭素結合糖含有アミノ酸；レドックス活性アミノ酸； α -ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸含有アミノ酸； α , α -二置換アミノ酸； β -アミノ酸；プロリン（proline）以外の環状アミノ酸などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

「核酸テンプレート」は、ポリペプチドが翻訳されることになるDNAまたはRNAポリヌクレオチドを含む。DNA核酸テンプレートが、先ず、RNAに転写されなければならないこと、およびそのRNAが、ポリペプチドに翻訳されることは、当業者には理解されるであろう。インビボでもインビトロでもDNAをRNAに転写することができる。DNAテンプレートのインビトロ転写方法は、当該技術分野において周知である。いくつかの実施形態では、DNAテンプレートを同時インビトロ転写・翻訳に付す。

【0040】

「外膜タンパク質T1」（OmpT1）は、表面膜セリンプロテアーゼであり、グラム陰性菌のompTinファミリーに属する。OmpT1が抗微生物ペプチドを切断すること、ヒトプラスミノゲンを活性化すること、およびいくつかの異種組換えタンパク質を分解することは、公知である。OmpT1およびそのホモログは、二塩基性残基間の合成基質を高い触媒効率で切断する。二塩基性残基を含有する配列の切断は、抗生物質ペプチドおよびコリシンの不活性化、トランスでの細菌膜タンパク質のタンパク質分解、および大腸菌（E. coli）発現組換えタンパク質の分解に重要であることが証明されている。本発明に関して、OmpT1は、細胞の外膜上にある点、およびそれ故、インタクト細菌細胞内に位置する潜在的基質タンパク質と接触していない点で、ある一定の利点を有する。

【0041】

用語「細菌の酸化リン酸化システムが活性のままである」は、タンパク質合成中に活性酸化リン酸化を示す細菌溶解物を指す。例えば、細菌溶解物は、ATPシンターゼ酵素と酸素の還元とを用いてATPを生成することができる。当該技術分野において公知の他の翻訳システムもタンパク質合成中に活性酸化リン酸化を用いることは、理解されるであろう。酸化リン酸化の活性化は、特異的阻害剤、例えば電子伝達系阻害剤、を使用する経路の阻害によって実証することができる。

【0042】

「翻訳」は、RNAテンプレートが、天然および／または非ネイティブアミノ酸を含有するポリペプチドに変換されるプロセスであり、当該技術分野において周知である。翻訳は、リボソームが、RNAテンプレートに、一般にはそのFMe tコドン（例えば、AUG）に結合する開始段階、チャージされたtRNA分子のアンチコドンがRNAテンプレートのコドンと対合される伸長段階を含み、この伸長段階は、リボソームが下方のRNAテンプレートに移動すると繰り返される。各tRNAアンチコドンがその対応するコドンと対合されると、各tRNA分子にチャージされるアミノ酸のアミノ基は、ペプチド結合によって前のアミノ酸のカルボキシル基に供給結合で連結される。一般に、翻訳は、リボソームが翻訳終止コドンに遭遇し、かくしてリボソームからのポリペプチドの連鎖伸長および放出を終わらせる終結段階も含む。しかし、本明細書に記載する方法において、RNAテンプレートは、nnAAがチャージされたtRNAのアンチコドンCUAによって認識されるアンバー終止コドンUAGを有するORFを含むことができる。したがって、本方法において、アンバーコドンは、翻訳を終結させるように必ずしも機能しない。

【0043】

「翻訳システム」は、インビトロでmRNAをポリペプチドに翻訳することができる成分の混合物を指す。翻訳システムは、無細胞抽出物、再構成された細胞溶解物、またはインビトロでmRNAをポリペプチドに翻訳することができる成分の精製された混合物であることができる。例えば、本明細書に記載する方法で使用される無細胞抽出物または細胞溶解物は、大腸菌（*Escherichia coli*（*E. coli*））から得ることができる。翻訳システムは、精製され再構成されたインビトロ翻訳システムも含むことができる。本明細書に記載する方法は、タンパク質合成中に活性酸化リン酸化を示す翻訳システムも利用することができる。例えば、翻訳システムは、ATPシンターゼ酵素を使用してATPを生成することができる。翻訳システムは、少なくとも1つの核酸テンプレートも含むことができる。その翻訳システムを用いて、核酸テンプレートをタンパク質に同時に転写・翻訳することができる。

【0044】

「再構成リボソーム翻訳システム」は、Tanら、Methods 36、279-290（2005）およびForsterら、米国特許第6,977,150号明細書（これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に援用されている）に記載されているような、mRNAなどの核酸分子をインビトロ翻訳することができる精製された成分の混合物を指す。

【0045】

「切断しやすいOmpT1ペプチド結合」は、OmpT1による切断され得るペプチド結合である。

【0046】

「表面露出モチーフ」は、タンパク質分子の外側に存在するドメインである。表面露出モチーフは、例えばOmpT1などのセリンプロテアーゼによる、タンパク質分解性切断に、一般に、より利用されやすい。表面露出モチーフをいくつかの方法で定義できることは、当業者には理解されるだろう。例えば、表面露出モチーフには、二次構造、例えば、 α ヘリックスまたは β シートがない。さらに表面露出モチーフは、同種タンパク質配列間においてさえ、有意な量のアミノ酸配列相同性を共有しないことが多い。しかし、当業者は、ピモール分子モデリングソフトウェア（pymolwiki.org/index、

php/Get_Areaでインターネットを参照されたい)に組み込まれているGet_Areaアルゴリズムを用いて、目的のタンパク質の領域についての相対露出表面積を算出することができる。

【0047】

「少なくとも50 Å²のB因子を有する表面露出モチーフ」は、その表面露出モチーフにおける個々の原子の移動度を指す。表面露出モチーフにおける原子は、タンパク質のコアにおける原子より大きい移動度を有することができる。B因子は、一般に、タンパク質などの構造の異なる部分の相対振動運動を示す。低いB因子を有する原子は、秩序立ったタンパク質の部分の属し、したがって比較的に低い移動度を有する。大きいB因子を有する原子は、一般に、比較的柔軟性のあるタンパク質の部分に属し、したがって、比較的高い移動度を有する。B因子が高いほど、タンパク質構造内の個々の原子の位置誤差が観察される可能性が高い。例えば、40と60の間のB因子は、1.0オングストロームまでの位置誤差を観察できることを示唆する。60より大きいB因子は、原子がその観察位置の1.0オングストローム以内にない可能性が高いことを示唆する。(例えば、wiki.cmbi.ru.nl/index.php/B-factorでインターネットを参照されたい)。B因子は、

【数1】

$$B_i = 8\pi^2 U_i^2$$

のように算出され、式中の U_i^2 は、原子iの平均二乗変位量である。このB因子から、

【数2】

$$\exp\left(-B_i \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}\right)$$

によってフーリエ変換への原子iの寄与に対する重み因子が得られる。

Uが増加するにつれて、Bは、増加し、散乱への原子の寄与は減少される。例えば、pldserver1.biochem.queensu.ca/~rlc/work/teaching/definitions.shtmlでインターネットを参照されたい。B因子は、Å²の単位で測定される。

【0048】

用語「ラマチャンドラプロット」は、タンパク質構造内の各アミノ酸残基についての主鎖二面角Ψ(プサイ)対φ(ファイ)を視覚化するための方法を指す。ファイおよびプサイ角度の算出方法は、例えば、Lovell, S. C. ら、Proteins: Structure, Function, and Genetics、50:437-450(2003)、およびChen, V. B. ら、MolProbability: all-atom structure validation for macromolecular crystallography、Acta Crystallographica D 66:12-21(2010)に記載されている。上の参考文献を参照することによりラマチャンドラプロットにおけるファイおよびプサイ角度を決定することができ、または、便宜上、インターネット上の自由に利用できるソフトウェアプログラムを使用することができる。例えば、座標ファイルまたはPDBファイルをkinemage.biochem.duke.eduのMOLPROBITYサーバーにアップロードすることができる(Chen, V. B. ら、上掲を参照されたい)。あるいは、インターネット上のboscoh.com/ramaplotで利用できるRamachandran Plot Explorerを使用することができる。

【0049】

用語「溶媒露出表面積合計」(SASA)は、溶媒が接触可能であるタンパク質またはポリペプチドの表面積を指す。溶媒露出表面積は、平方オングストロームの単位で記載す

10

20

30

40

50

ることができ、ShrakeおよびRupley (Shrake, A; Rupley, J A. (1973)、「Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin」、J Mol Biol 79 (2) : 351-71)によって開発された「ローリングボール」アルゴリズムを用いて算出することができる。溶媒露出表面積は、Fraczkiewicz, R. およびBraun, W.、「Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules」、J. Comp. Chem.、19:319-333 (1998)に記載されているように算出することもできる。便宜上、インターネット上の自由に利用できるソフトウェアプログラムを用いて溶媒露出表面積合計を算出することができる。例えば、University of Texas Medical Branchウェブサイトcurie.utmb.edu/getarea.htmlにおいて見つけられるソフトウェアルーチンGETAREAを使用して、PDB (タンパク質データベース)形式で原子座標を入力し、水プローブの所望の半径 (パラメータ: 水プローブの半径=1.4)を指定することによって、Fraczkiewicz, R. およびBraun, W. (同上)に記載されているように、タンパク質分子の溶媒露出表面積 (溶媒和エネルギー)を算出することができる。

10

【0050】

用語「スイッチループ領域」は、RF1のドメイン3および4を連結する表面露出モチーフであって、ペプチジル-tRNAエステル結合と接触しているドメイン3のGGQモチーフを50Sサブユニットのペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC)内に配置する堅い結合を形成するモチーフを指す。終結複合体による終止コドンの認識は、ドメイン3をPTC内に指向させる、スイッチループ領域の転位配座を安定化させる。スイッチループの転位は、ヘリックス α 7の再配向および拡張をもたらし、その結果、GGQモチーフはPTCにドッキングする。Korostelev, A.ら、「Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1」、EMBO Journal (2010) 29、2577-2585を参照されたい。RF1のスイッチループ領域は、配列番号1のアミノ酸287から304に対応し、次のアミノ酸配列を含む: 287-QQAEASTRRNLLGSGDRS-304 (配列番号4)。

20

30

【0051】

「野生型」タンパク質は、ネイティブまたは天然起源タンパク質のアミノ酸配列および/または機能活性を有する非改変タンパク質である。例えば、野生型RF1タンパク質は、配列番号1の配列を有することができる。「対照タンパク質」は、野生型タンパク質または予め改変されているタンパク質であり得る。

【0052】

「ネイティブアミノ酸」は、遺伝子コードによってコードされた1つ以上の天然起源アミノ酸を指す。「内因性ネイティブアミノ酸」は、溶解物を生成するために使用された宿主細胞によって生産されたネイティブアミノ酸を指す。

40

【0053】

「非ネイティブアミノ酸」(「nnAA」)は、式 $\text{NH}_3 - (\text{CR}) - \text{COOH}$ を有する化学構造を指し、この式中のRは、天然アミノ酸を定義する20の最も一般的な置換基のいずれでもない。

【0054】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列に関して、用語「同一の」または「同一性」パーセントは、Altschulら (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)およびAltschulら (Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997)にそれぞれ記載されているBLASTおよびPSI-BLASTアルゴリズムを用いて測定されるような、比較ウィンドウ、または指定領域、にわた

50

って比較し、最大対応のためにアラインしたとき、同じであるか、または同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定百分率（例えば、特定領域にわたって60%同一性、場合によっては65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%同一性）を有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.govでインターネットを参照されたい)を通して公的に利用することができる。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインしたときに何らかの正の値の閾スコアTにマッチするかまたは前記スコアTを満たすクエリ配列中の長さWの短いワードを特定することにより高スコアリング配列対(HSP)を最初に同定することを含む。Tは、隣接ワードスコア閾値(neighborhood word score threshold)と呼ばれる(Altschulら、上掲)。これらの最初の隣接ワードヒットは、これらを含むより長いHSPを見つけるための検索開始のシードとしての役割を果たす。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増加させることができる限界まで各配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、例えば、ヌクレオチド配列については、パラメーターM(マッチする残基の対についてのリワードスコア;常に>0)およびN(ミスマッチ残基についてのペナルティスコア;常に<0)を使用して算出される。アミノ酸配列については、スコアリング行列を使用して累積スコアが算出される。各方向のワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ落ちると;累積スコアが、1つ以上の負のスコアを有する残基アラインメントの累積に起因して、0以下になると;またはいずれかの配列の末端に達すると、中断される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を左右する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、デフォルトとして、11のワード長(W)、期待値(E)または10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列用のBLASTPプログラムは、デフォルトとして、3のワード長、10の期待値(E)、および50のBLOSUM62スコアリング行列(HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915、1989を参照されたい)アラインメント(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。

【0055】

「配列同一性の百分率」は、比較ウィンドウにわたって最適にアラインされた2配列を比較することによって決定され、ここで、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2配列の最適なアラインメントについて基準配列(付加または欠失を含まない)と比較して付加または欠失(すなわちギャップ)を含むことがある。前記百分率は、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列内に現れる位置の数を決定してマッチ位置数を得、そのマッチ位置数を、比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、その結果に100をかけて配列同一性の百分率を得ることによって算出される。

【0056】

本明細書において用いる場合の「比較ウィンドウ」は、20から600、通常約50から約200、より通常は約100から約150から成る群より選択される連続する位置の数のいずれか1つのセグメントへの言及を含み、ここで、配列と、同じ連続位置数の基準配列とを、それら2配列を最適にアラインした後に比較してよい。比較のための配列アラインメントの方法は、当該技術分野において周知である。

【0057】

BLASTアルゴリズムは、2配列間の類似性の統計分析も行う(例えば、KarlinおよびAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87、1993を参照されたい)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの尺度は、最小和確率(P(N))であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のマッチが偶然に起こる確率の指標になる。例えば、核酸は、試験核酸と基準核酸の比較での最小和確率が、約0.2未満、典型的には約0.01未満、およ

びさらに典型的には約 0.001 未満である場合、基準配列に類似していると思なされる。

【0058】

配列同一性の百分率をポリペプチドへの言及の際に用いるとき、別様に同一でない 1 つ以上の残基位置は、保存的アミノ酸置換が異なると認識され、保存的置換では、第 1 のアミノ酸残基で、類似した化学特性、例えば、類似した電荷または疎水性または親水性を有する別のアミノ酸残基が、置換され、したがって、第 1 のアミノ酸は、そのポリペプチドの機能特性を変化させない。ポリペプチド配列が、保存的置換の点で異なる場合、配列同一性パーセントを上方修正して、置換の保存的性質を補正することができる。かかる修正は、周知の方法、例えば、保存的置換を完全ミスマッチではなく部分ミスマッチとしてスコアリングし、それによって配列同一性百分率を増加させる方法を用いて行うことができる。したがって、例えば、同一アミノ酸に 1 のスコアが与えられ、非保存的置換に 0 のスコアが与えられると、保存的置換にはゼロと 1 の間のスコアが与えられる。保存的置換のスコアリングは、Pearson ら (Meth. Mol. Biol. 24: 307-331, 1994) に記載されているアルゴリズムを用いて算出することができる。配列の単純目視および手動アラインメントによってアラインメントを行うこともできる。

10

【0059】

特定のポリヌクレオチド配列に関して用いるときの用語「保存的改変変異」は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする異なるポリヌクレオチド配列を指し、またはポリヌクレオチドがアミノ酸配列をコードしない場合には本質的に同一の配列を指す。遺伝子コードの縮重のため、多数の機能的に同一のポリヌクレオチドが、任意の所与のポリペプチドをコードする。例えば、コドン CGU、CGC、CGA、CGG、AGA、および AGG はすべて、アミノ酸アルギニンをコードする。したがって、アルギニンがコドンによって特定されるすべての位置において、コドンを、コードされたポリペプチドを改変することなく、記載の対応するコドンのいずれかに改変することができる。かかるヌクレオチド配列変異は、「サイレント変異」であり、これは「保存的改変変異」の一種と見なすことができる。それ故、タンパク質変異体 (protein variant) をコードすると本明細書に開示する各ポリヌクレオチド配列が、あらゆる可能なサイレント変異も記述することは分かるであろう。元来メチオニンのための唯一のコドンである AUG、および元来トリプトファンのための唯一のコドンである UUG を除き、ポリヌクレオチド中の各コドンを、標準的技法によって機能的に同一の分子を生じさせるように改変することができることも分かるであろう。したがって、コードされたポリペプチドの配列を変化させないポリヌクレオチドの各サイレント変異が暗黙のうちに本明細書に記載されている。

20

30

【0060】

さらに、コードされた配列中の単一のアミノ酸または小率のアミノ酸 (典型的には 10 % 未満、および一般に 1 % 未満) を改変、付加または欠失させる個々の置換、欠失または付加は、改変が化学的に類似したアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらすことを条件に、保存的改変変異と見なすことができることは分かるであろう。機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的アミノ酸置換は当該技術分野において周知であり、それらは以下の 6 群を含み、これらの群の各々が、互いに保存的置換基と思なされるアミノ酸を含有する：

40

【0061】

1) アラニン (Ala、A)、セリン (Ser、S)、トレオニン (Thr、T)；

【0062】

2) アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)；

【0063】

3) アスパラギン (Asn、N)、グルタミン (Gln、Q)；

【0064】

4) アルギニン (Arg、R)、リジン (Lys、K)

【0065】

5) イソロイシン (Ile、I)、ロイシン (Leu、L)、メチオニン (Met、M

50

）、バリン（Val、V）；および

【0066】

6）フェニルアラニン（Phe、F）、チロシン（Tyr、Y）、トリプトファン（Trp、W）。

【0067】

2つ以上のアミノ酸配列または2つ以上のヌクレオチド配列は、それらのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列が、所与の比較ウィンドウにわたって互いにまたは基準配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の配列同一性を共有する場合、「実質的に類似している」と見なされる。2つ以上のタンパク質も、それらがそのアミノ酸配列に機能的に類似したアミノ酸を与える保存的アミノ酸置換を含む場合、実質的に類似していると思なされる。

10

【0068】

「プロモーター」は、転写開始点から上流または下流に位置する核酸テンプレート内の配列要素を指す。プロモーター配列は、RNAポリメラーゼおよび転写を開始させる他のタンパク質の認識および結合に参与する。プロモーターの例としては、T7、SP6およびT3バクテリオファージプロモーターが挙げられる。

【0069】

「5'非翻訳領域」は、核酸テンプレート内のオープンリーディングフレームの上流または5'に位置する核酸配列を指す。RNAの場合、5'非翻訳領域は、核酸テンプレート内に存在する翻訳開始コドンより前にある。DNAの場合、5'非翻訳領域は、RNAに転写されるおよび翻訳開始コドンの5'に位置する核酸配列を指す。DNAの場合、翻訳開始コドンは、典型的にATGであり、RNAの場合、翻訳開始コドンは、典型的にAUGである。

20

【0070】

「一次アミノ酸配列」は、ペプチド結合によって互いに連結されてポリペプチドになるアミノ酸残基の順序を指す。アミノ酸残基の順序は、一般に、ポリペプチドのアミノ末端で開始し、そのポリペプチドのカルボキシ末端に進んで行くように参照される。一次アミノ酸配列は、核酸テンプレート内のRNAコドンのヌクレオチド配列によって決定される。

【0071】

「オープンリーディングフレーム」は、目的のポリペプチドに翻訳される核酸テンプレートのヌクレオチド配列を指す。本明細書において用いる場合、オープンリーディングフレーム（ORF）は、nnAAがチャージされたtRNAに結合する被定義アミノ酸残基に対応する少なくとも1つのコドンを含むことができる。前記少なくとも1つのコドンは、アンバーコドンであることができる。

30

【0072】

「イソ受容センスtRNA」は、同じアミノ酸の代替コドンに結合する異なるtRNA種を指す。

【0073】

「tRNA」または「転移RNA」は、翻訳中にリボソームのタンパク質合成部位で成長ポリペプチド鎖に特定のアミノ酸を転移させる小RNA分子を指す。tRNAは、対応するmRNAコドンに対合する3塩基コドンを含む。遺伝子コードの縮重の結果として、アミノ酸は、複数のtRNAと会合することができるが、各タイプのtRNA分子は、1つのタイプのアミノ酸としか会合することができない。

40

【0074】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、交換可能に用いており、ペプチド結合によって連結された2つ以上のアミノ酸を含む化合物を指す。タンパク質は、1つ以上のポリペプチド鎖を含むことができる。

【0075】

用語「タンパク質が複合体を形成していないとき」は、溶液中のタンパク質の構造、ま

50

たは溶液中のタンパク質の構造の一部分、領域もしくはドメインを指し、別の分子、例えばタンパク質、リガンド、酵素基質または阻害剤複合体、リボソーム、結合抗体または抗体断片、RNAおよびDNAとの複合体の一部であるときのタンパク質の構造、または前記タンパク質の構造の一部分、領域もしくはドメインを指さない。この用語は、溶液中にあるタンパク質ドメイン、例えば表面露出モチーフを含むアミノ酸、の構造も指す。

【0076】

本明細書において用いる場合、任意の量を改変するときの用語「約」は、例えばタンパク質合成またはX線結晶学実験において、当業者が典型的に遭遇する量の変動を指す。例えば、用語「約」は、所与の分析法についての測定の際に遭遇する、バッチまたは試料内およびバッチまたは試料間両方の、通常の変動を指す。したがって、用語約は、測定値の1〜10%の変動、例えば5%または10%変動を含むことができる。本明細書に開示する量は、用語「約」によって改変されているまたは改変されていない量を含む、それらの量と等価である。

【0077】

発明の詳細な説明

概論

本発明は、Omp T 1により切断され得るOmp T 1プロテアーゼ切断部位を含むように組換え改変される標的タンパク質を提供する。前記Omp T 1切断部位は、切断しやすいOmp T 1ペプチド結合を含む。1つの実施形態において、前記標的タンパク質は、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される。いくつかの実施形態では、前記標的タンパク質は、その標的タンパク質の表面露出モチーフにOmp T 1切断部位を導入するように改変される。いくつかの実施形態において、前記切断しやすいOmp T 1ペプチド結合は、そのタンパク質または表面露出モチーフが複合体を形成していない（すなわち、溶液中で遊離している、および／または他の分子を構成する高分子構造の一部でない）ときに少なくとも50 Å²のB因子を有する表面露出モチーフ内に位置する。いくつかの実施形態において、前記切断しやすいOmp T 1ペプチド結合は、約25 Å²と約225 Å²の間の溶媒露出表面積合計（SASA）を有する表面露出モチーフ内に位置する。いくつかの実施形態において、前記標的タンパク質は、前記切断しやすいOmp T 1ペプチド結合が、ラマチャンドラプロット（Ramachandran Plot）において0°から−180°のファイ角度または0°から+180°のプサイ角度を示すタンパク質の位置にあるように改変される。

【0078】

当業者には理解されるように、上記実施形態は、目的のタンパク質ドメイン（単数または複数）についての構造情報を必要とする。しかし、表面ループは、多くの場合、無秩序であり、したがって、目的の標的タンパク質についての結晶構造を入手できないこともある。それ故、いくつかの実施形態では、類似した構造を使用して相同モデルを作成して、構造情報不在下で、約25 Å²と約225 Å²の間SASA、またはラマチャンドラプロット（Ramachandran Plot）における0°から−180°のファイ角度もしくは0°から+180°のプサイ角度を予測することができる。

【0079】

本発明は、Omp T 1と組換え改変された標的タンパク質の両方を発現する細菌細胞をさらに提供する。いくつかの実施形態において、前記組換え改変された標的タンパク質は、必須タンパク質、例えば、正常な細胞成長および／または生存に必要とされるタンパク質である。

【0080】

本明細書に記載する標的タンパク質は、インビトロ無細胞合成システムにおいて有害な活性を有するので、選択される。例えば、標的タンパク質は、目的のタンパク質をコードする核酸テンプレートの転写および／または翻訳を阻害することができる。したがって、本発明は、インビトロ無細胞合成システムにおける改変必須標的タンパク質の有害な活性を、前記標的タンパク質をOmp T 1プロテアーゼで不活性化することによって低減させ

る方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記方法は、前記改変必須標的タンパク質を発現するOmpT1陽性細菌を培養するステップであって、前記標的タンパク質が、切断しやすいOmpT1ペプチド結合を含むOmpT1切断部位を表面露出モチーフ内に含むように改変されるものであるステップ；前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；前記改変された必須標的タンパク質を、インタクト標的タンパク質の量を50%低減させるために十分な量のOmpT1と接触させるステップ；目的のタンパク質をコードする核酸テンプレートを前記抽出物に添加するステップ；および前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含む。前記方法は、標的タンパク質が細胞成長および／または生存に重要であり得るときには細胞成長中に改変標的タンパク質とOmpT1プロテアーゼの空間的分離をうまく利用するが、細菌細胞を破壊し、溶解して無細胞抽出物を生じさせるときには標的細胞をOmpT1によって切断する。

10

【0081】

前記方法のいくつかの実施形態において、切断しやすいOmpT1ペプチド結合は、そのタンパク質または表面露出モチーフが複合体を形成していないときに少なくとも50Å²のB因子を有する表面露出モチーフ内に位置する。例えば、表面露出モチーフは、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190もしくは200Å²またはそれ以上のB因子を有することができ、または約50Å²と約200Å²の間、約50Å²と約150Å²の間、約50Å²と約100Å²の間、約60Å²と約200Å²の間、約60Å²と約150Å²の間、もしくは約60Å²と約100Å²の間の範囲であることができる。前記方法のいくつかの実施形態において、切断しやすいOmpT1ペプチド結合は、約25Å²と約225Å²の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内に位置する。例えば、いくつかの実施形態において、前記溶媒露出表面積合計は、約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、または225Å²（ここで、用語「約」は、前記値の各々を修飾する）である。前記方法の1つの実施形態において、切断しやすいOmpT1ペプチド結合は、ラマチャンドラプロットにおいて0°から-180°のファイ角度または0°から+180°のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にある。上に記載したように、構造情報の不在下で、類似した構造を使用して相同モデルを作成して、約25Å²と約225Å²の間SASA、またはラマチャンドラプロットにおける0°から-180°のファイ角度もしくは0°から+180°のプサイ角度を予測することができる。

20

30

【0082】

上で言及した目的のタンパク質は、アミノ酸配列の定義された場所に非ネイティブアミノ酸（nnAA）を組み込むように操作されるタンパク質を含む。nnAAのタンパク質への導入は、好ましい特性を有するタンパク質をもたらすことができる。nnAAを目的のタンパク質またはポリペプチドに導入するための1つの方法は、タンパク質翻訳中に新生ポリペプチド鎖にnnAAを導入するためにアンバー（終止）コドンを確認するアミノアシル化直交tRNAを使用する。しかし、nnAAがそこに導入されたタンパク質の収量は、mRNA配列内の終結または終止コドンを確認することにより翻訳の終結を助長する翻訳終結複合体のタンパク質によって減少され得る。放出因子1（RF1）は、前記終結複合体の一部であり、UAG（アンバー）終止コドンを確認する。アンバーコドンのRF1認識は、nnAA組み込み部位での時期尚早の連鎖終結を促進することができ、これは、所望のタンパク質の収量を低減させる。本明細書に記載する方法は、細菌細胞溶解物中のRF1の機能活性を減少させることによりこの問題を解決する。したがって、いくつかの実施形態において、必須標的タンパク質は、RF1である。RF1の機能活性は、OmpT1プロテアーゼ切断部位をRF1に導入することによって減少される。OmpT1は、インタクト細菌の外側細胞膜上に位置する酵素である。したがって、改変RF1は、

40

50

インタクト細胞ではOmp T 1の基質として利用できない。細菌膜が、例えば細菌溶解物の場合のように破壊されると、Omp T 1酵素は、導入された切断部位で改変RF 1と接触してそれを切断することができ、それによってRF 1の機能活性を低下させることができる。前記方法は、UGA終止コドンを認識する翻訳終結複合体中にある他の放出因子、例えばRF 2、に応用することができる。前記方法は、インビトロ翻訳中にmRNAを分解するタンパク質、例えばRNase酵素にも応用することができる。さらに、前記方法は、一般に、目的のタンパク質の転写および／または翻訳を阻害する細菌抽出物中のいずれのタンパク質にも応用することができる。

【0083】

一般法

別段の定義がない限り、本明細書において用いるすべての専門および科学用語は、本発明が属する技術分野の通常の当業者が一般に理解している意味を有する。実施者は、当該技術の定義および用語については、特に、Green, M. R. および Sambrook, J. 編、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2012)、ならびに Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology (別冊99)、John Wiley & Sons, New York (2012)に導かれ、前記参考文献は参照により本明細書に援用されている。標準的方法は、Binder et al., SchonおよびWesthof (2005) Handbook of RNA Biochemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Germanyにも出ており、前記参考文献には、RNA操作および分析のための詳細な方法が記載されており、前記参考文献は、参照により本明細書に援用されている。組換え核酸を生成するための適切な分子技術の例、および多くのクローニング実習による当業者への指導に十分な説示は、Green, M. R. および Sambrook, J.、(同上) ; Ausubel, F. M. ら、(同上) ; BergerおよびKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology (第152巻 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1987) ; ならびに PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, San Diego, Calif. 1990) において見つけられ、前記参考文献は、参照により本明細書に援用されている。

【0084】

タンパク質精製、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離および結晶化のための方法は、Coliganら (2000) Current Protocols in Protein Science、第1巻、John Wiley and Sons, Inc., New Yorkに記載されている。無細胞合成のための方法は、SpirinおよびSwartz (2008) Cell-free Protein Synthesis, Wiley-VCH, Weinheim, Germanyに記載されている。無細胞合成を用いて非天然アミノ酸をタンパク質に組み込む方法は、Shimizuら (2006) FEBS Journal、273、4133-4140に記載されている。

【0085】

PCR増幅法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, Calif., 1990に記載されている。増幅反応は、典型的に、増幅すべきDNA、熱安定性DNAポリメラーゼ、2つのオリゴヌクレオチドプライマー、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、反応バッファーおよびマグネシウムを含む。典型的に、望ましい熱サイクル数は、1と25の間である。プライマー設計およびPCR条件の最適化のための方法は、当該技術分野において周知であり、標準的な分子生物学テキスト、例えばAusu

10

20

30

40

50

belら、Short Protocols in Molecular Biology、第5版、Wiley、2002、およびInnisら、PCR Protocols、Academic Press、1990において見つけることができる。コンピュータプログラムは、要求される特異性および最適な増幅特性を有するプライマーの設計に有用である（例えば、Oligo Version 5.0 (National Biosciences)）。いくつかの実施形態において、PCRプライマーは、ベクター内の特定の制限酵素部位への増幅DNA断片の挿入を助長するために、制限エンドヌクレアーゼのための認識部位をさらに含有することがある。制限部位をPCRプライマーの5'末端に付加させるべき場合、酵素によるさらに効率的な切断を可能にするために少数（例えば、2または3）の余分な5'塩基を含めることが好ましい。いくつかの実施形態において、PCRプライマーは、後続のインビトロ転写を可能にするためにRNAポリメラーゼプロモーター部位、例えば、T7またはSP6も含有することがある。インビトロ転写のための方法は、当業者に周知である（例えば、Van Gelderら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87:1663-1667, 1990; Eberwineら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:3010-3014, 1992を参照されたい）。

10

【0086】

Omp T1切断可能タンパク質

本発明は、Omp T1などのタンパク質分解酵素によって切断および不活性化され得る標的タンパク質を提供する。プロテアーゼによって切断されるために、タンパク質分解性切断部位をタンパク質に導入するように、タンパク質を改変する。いくつかの実施形態において、改変標的タンパク質に導入される切断部位は、切断しやすいOmp T1ペプチド結合であり、その切断しやすいOmp T1を標的タンパク質の表面露出モチーフに導入する。Omp T1によって認識される切断部位は、2つの隣接する塩基性残基を含む。したがって、本明細書に記載する標的タンパク質は、pH 7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性残基を含むように改変される。

20

【0087】

少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフ内にOmp T1切断部位を導入するためのタンパク質の改変

いくつかの実施形態では、標的タンパク質またはモチーフ領域のアミノ酸配列が複合体を形成していないときに少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフに切断しやすいOmp T1ペプチド結合を導入するように、標的タンパク質を改変する。少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフの場所は、いくつかの方法で決定することができる。各原子についてのB因子は、結晶学タンパク質データバンク(PDB)ファイルに与えられている。表面露出モチーフのB因子は、ピモール分子モデリングソフトウェアに組み込まれているGetAreaアルゴリズムを用いて算出することができる(pymolwiki.org/index.php/Get_Areaでインターネットを参照されたい)。あるいは、タンパク質のX線結晶構造を入手できないが、そのタンパク質のNMR構造を入手できる場合、ランダムコイルインデックス(RCI)を大きいB因子の代わりに使用してもよい(Berjanskii, M. V. ら、Application of the random coil index to studying protein flexibility, J Biomol NMR. 2008 Jan; 40(1):31-48. Epub 2007 Nov 6を参照されたい)。

30

40

【0088】

少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ のB因子を有する表面露出モチーフにOmp T1切断部位を導入するように標的タンパク質を改変するために、そのタンパク質のX線結晶構造からのB因子をアミノ酸配列にマッピングし、その配列を、大きいB因子を有する部位（単数または複数）に切断しやすいOmp T1ペプチド結合を含むように組換え改変する。その後、組換え改変された標的タンパク質を、Omp T1を含有する細胞抽出物中でのそのタンパク質の分解について試験することができる。いくつかの実施形態において、B因子は、少な

50

くとも50、60、70、80、90または100 Å²である。いくつかの実施形態において、B因子は、約50 Å²と約200 Å²の間、または約50 Å²と約150 Å²の間、または約50 Å²と120 Å²の間である。本明細書に記載する範囲は、終点間のすべての値を含むと解される。

【0089】

約25 Å²と約225 Å²の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内にOmpT1切断部位を導入するためのタンパク質の改変

いくつかの実施形態では、約25 Å²と約225 Å²の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフに切断しやすいOmpT1ペプチド結合を導入するように、標的タンパク質を改変する。約25 Å²と約225 Å²の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフの場所は、当該技術分野において公知の方法を用いて決定することができる。例えば、Fraczkiwicz, R. および Braun, W.、「Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules」、J. Comp. Chem.、19、319-333 (1998)に記載されているように、ソフトウェアルーチンGETAREAを使用して交差原子の溶媒露出頂点の位置を突き止めることができる。したがって、GETAREAソフトウェアを使用して、University of Texas Medical Branchウェブサイトcurie.utmb.edu/getarea.htmlでインターネットに提供されている形式(パラメータ:水プロブの半径=1.4)を用いて原子座標をPDB(タンパク質データベース)形式で入力し、水プロブの所望の半径を指定し、そして所望のアウトプットレベルを指定することによって、タンパク質分子の溶媒露出表面積(溶媒和エネルギー)を算出することができる。溶媒露出表面積合計を決定するための他の方法は、Eisenberg, D. および McLachlan, A. D. (1986) Nature、319、199; Markley, J. L. ら (1998) Pure & Appl. Chem.、70、117; ならびに Wesson, L. および Eisenberg, D. (1992) Protein Sci.、1、227に記載されている。

【0090】

ラマチャンドランプロット(Ramachadran Plot)において0°から-180°のファイ角度または0°から+180°のブサイ角度を示すタンパク質の位置にOmpT1切断部位を導入するためのタンパク質の改変

いくつかの実施形態では、ラマチャンドランプロット(Ramachadran Plot)において0°から-180°のファイ角度または0°から+180°のブサイ角度を示すタンパク質の位置に切断しやすいOmpT1ペプチド結合を導入するように、標的タンパク質を改変する。ラマチャンドランプロット(Ramachadran Plot)において0°から-180°のファイ角度または0°から+180°のブサイ角度を示す前記タンパク質中の位置の場所は、当該技術分野において公知の方法を用いて決定することができる。ファイおよびブサイ角度を算出するための方法は、例えば、Lovell, S. C. ら、Proteins: Structure, Function, and Genetics、50:437-450 (2003)に記載されている。座標ファイルまたはPDBファイルをインターネット上のkinemage.biochem.duke.eduのMOLPROBITYサーバーにアップロードすることによって、ラマチャンドランプロットにおけるファイおよびブサイ角度を決定することができる(Chen, V. B. ら、(2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica D66:12-21を参照されたい)。あるいは、インターネット上のboscoh.com/ramaplotで利用できるRamachandran Plot Explorerを使用することができる。

10

20

30

40

50

【0091】

本明細書に記載する改変タンパク質は、無細胞合成システムにおいてタンパク質の生産を阻害することができるので選択される。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載する改変タンパク質は、細菌無細胞抽出物における完全長タンパク質の生産を減少させる。例えば、タンパク質RF1およびRF2は、mRNAにおける終止コドンを認識してポリペプチド鎖の翻訳を終結させる終結複合体の一部である。本明細書に記載の無細胞翻訳システムを使用してタンパク質に非ネイティブアミノ酸を組み込むとき、翻訳の時期尚早の終結は、望ましくない。終結複合体による終止コドンの認識を低減させることで、nnaを含むタンパク質の収量を増加させることができる。したがって、いくつかの実施形態では、RF1および／またはRF2タンパク質、またはそれらの機能ホモログが複合体を形成していないときに少なくとも50 Å²のB因子を有する表面露出モチーフ内にOmpT1切断部位を含有するように、RF1および／またはRF2タンパク質、またはそれらの機能ホモログを改変する。いくつかの実施形態では、約25 Å²と約225 Å²の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内にOmpT1切断部位を含有するように、RF1および／またはRF2タンパク質、またはそれらの機能ホモログを改変する。いくつかの実施形態では、ラマチャンドラプロット(Ramachandran Plot)において0°から-180°のファイ角度または0°から+180°のプサイ角度を示すタンパク質の位置にOmpT1切断部位を含有するように、RF1および／またはRF2タンパク質、またはそれらの機能ホモログを改変する。いくつかの実施形態において、前記機能性改変タンパク質は、RF1(配列番号1)またはRF2(配列番号2)と実質的に同様である。

10

20

【0092】

RF1タンパク質は、大腸菌からのRF1野生型原型タンパク質(配列番号1)、ならびに多型変異および組換えにより生じさせた突然変異タンパク質も含む。RF1タンパク質は、野生型と実質的に同じ生物活性また機能的能力(例えば、いずれかの少なくとも80%)を有するものと定義され、原型タンパク質RF1との少なくとも60%、70%、80%、90%もしくは95%の配列同一性を有し、および／または原型タンパク質配列番号1に対して産生されたポリクローナル抗体に結合する。

【0093】

ポリクローナル抗体へのRF1タンパク質の結合に関して、RF1タンパク質は、指定イムノアッセイ条件下でバックグラウンドの少なくとも2倍の特異性で特定抗体に結合することになり、ここでの抗体は、その試料中に存在する他のタンパク質に有意な量で実質的に結合しない。例えば、RF1(配列番号1)に対して産生されたポリクローナル抗体、またはそれらのアイソフォームもしくは部分を、RF1と特異的免疫反応性であり、かつRF1の多型変異体を除いて他のタンパク質とは特異的免疫反応性でないポリクローナル抗体しか得られないように、選択することができる。特定のタンパク質と特異的免疫反応性の抗体を選択するために様々なイムノアッセイ形式を用いてよい。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的免疫反応性の抗体を選択するために常例的に用いられる(例えば、特異的免疫性を判定するために用いることができるイムノアッセイ形式および条件の説明については、HarlowおよびLane, Antibodies, A Laboratory Manual(1988)を参照されたい)。典型的に、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であることになり、およびより典型的にはバックグラウンドの10倍より大きく100倍までであることになる。

30

40

【0094】

実施例に記載するように、表面露出モチーフ内に機能性OmpT1切断部位を導入するようにRF1を首尾よく改変した。しかし、推定二塩基性OmpT1切断部位のRF1への導入は、OmpT1によって効率的に切断され得るタンパク質を必ずしももたらさなかった。例えば、単一アミノ酸置換M74R、E76K、E84K、A85R、E87R、E108R、T293RおよびS304Kを、RF1のループ領域内の既存のArgまた

50

はLysのそばに導入し、それによって二塩基性切断部位を生じさせた。しかし、これらの変異体は、RF1変異体がOmpT陽性細胞抽出物において発現されると、効率的に切断されなかった。それ故、本発明は、RF1などのタンパク質を、そのタンパク質がOmpT1などのプロテアーゼによって切断され得るように改変することができるという予想外の結果を提供する。

【0095】

当業者には理解されるであろうが、導入された切断部位は、OmpT1の機能性ホモログもしくは断片に由来するOmpT1様酵素活性またはOmpT1様活性を有するように改変されるタンパク質に由来するOmpT1様酵素活性を有する酵素によって切断され得る。

【0096】

OmpT1による非改変タンパク質の切断

本明細書に記載するタンパク質は、内因性OmpT1プロテアーゼ切断部位を含有することもできる。例えば、いくつかの実施形態において、非改変または野生型タンパク質は、OmpT1によって切断可能である切断しやすいOmpT1ペプチド結合を含む二塩基性アミノ酸配列を含有する。OmpT1によるタンパク質の切断は、精製タンパク質を、OmpT1を発現する細菌無細胞抽出物とともにインキュベートし、その場合の切断量と、OmpT1を発現しない無細胞抽出物において検出された切断量とを比較することによって試験することができる。いくつかの実施形態において、内因性OmpT1切断部位を含有する非改変タンパク質は、正常な細胞成長または機能に不可欠であるまたは必要とされるが、無細胞抽出物中のタンパク質の翻訳を阻害する。したがって、本発明は、タンパク質が、細胞成長中に機能性であるが、OmpT1を発現する細胞抽出物中では不活性化されるように不活性化のタイミングを制御することができる、OmpT1での切断による非改変タンパク質の選択的不活性化方法を提供する。

【0097】

テンプレート

本発明のタンパク質を生産するために、核酸テンプレートが必要である。本発明のテンプレートを使用して、切断しやすいOmpT1切断部位を含むように改変されたタンパク質を生産することができる。本発明のテンプレートを使用して、無細胞システムにおいて発現される目的のタンパク質を生産することもできる。無細胞タンパク質合成のためのテンプレートは、mRNAまたはDNAのいずれかであることができる。前記テンプレートは、目的の任意の特定の遺伝子についての配列を含むことができ、完全長ポリペプチドをコードすることもあり、またはその任意の長さの断片をコードすることもある。タンパク質合成テンプレートとして役立つ核酸は、場合によっては天然源から誘導され、またはそれらは、合成品または組換え体であることができる。例えば、DNAは、組換えDNA、例えば、プラスミド、ウイルスなどであることができる。

【0098】

1つの実施形態において、DNAテンプレートは、OmpT1切断部位を含む標的タンパク質をコードするORFを含む。例えば、ORFは、正常な細胞成長および生存に必要とされる改変標的タンパク質をコードすることができるが、その活性は、無細胞抽出物におけるタンパク質の収量を直接または間接的に減少させる。したがって、ORFは、終結複合体のタンパク質成分、例えばRF1もしくはRF2またはそれらの改変変異体、をコードすることがある。ORFは、RNAテンプレートを分解するRNaseをコードすることもある。

【0099】

別の実施形態において、DNAテンプレートは、非ネイティブアミノ酸を含むように改変される目的のタンパク質をコードするORFを含む。したがって、ORFは、アミノ酸配列の被定義位置にnnAAを含む、生物学的重要性を有するいずれのタンパク質をコードしてもよい。目的のかかるタンパク質の非限定的な例としては、抗体、ホルモン、サイトカインおよびウイルスタンパク質が挙げられる。本発明は、非ネイティブアミノ酸の組

み込みのためにセンスコドンを使用し、当該技術分野において一般に見いだされるような直交成分の必要を避ける。これらの実施形態において、ORFは、少なくとも1つのイソ受容センスコドンを含む。ORFは、非ネイティブアミノ酸がチャージされたtRNAを認識する被定義アミノ酸残基に対応する1つのコドンを含み、いくつかの実施形態において、ORFは、非ネイティブアミノ酸がチャージされたtRNAを結合するアンバーコドン(UAG)を含む。他の実施形態において、前記テンプレートは、非ネイティブアミノ酸を目的のタンパク質に組み込むために選択するか否かにかかわらず、完全な機能性のタンパク質を翻訳することができる。

【0100】

目的のORFを含むDNAテンプレートを、少なくとも1つのプロモーターに、ならびに限定ではないがレプレッサー、アクチベーター、転写および翻訳エンハンサー、DNA結合タンパク質などを含む1つ以上の他の調節配列に、作動可能に連結することになる。ここでの使用に適する量のDNAテンプレートは、周知のクロニングベクターおよび宿主におけるDNAの増幅によって、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって生産することができる。

【0101】

DNAテンプレートは、発現されたタンパク質の単離および精製に有用なアミノ酸配列、例えばクロマトグラフィー媒体に高親和性で結合するポリアミノ酸タグ、をコードする核酸配列にインフレームで連結されたORFを含み、さらに含むことができる。前記ポリアミノ酸タグをORFの5'末端または3'末端に配置して、発現されるタンパク質にアミノ末端またはカルボキシル末端タグをそれぞれもたらすことができる。1つの実施形態では、ポリヒスチジンタグをコードする配列にインフレームでORFを連結させる。

【0102】

1つの実施形態は、細菌溶解物を使用する。所望のタンパク質エンコーディングDNAをプロモーター配列および細菌リボソーム結合部位(シャイン・ダルガノ配列)の両方に作動可能に連結させることにより、細菌発現のためのDNAテンプレートを構築することができる。本発明の無細胞転写-翻訳方法においてDNAテンプレートとともに使用するのに適するプロモーターとしては、その細菌抽出物が由来する細菌においてインビボ転写を促進することができる任意のDNA配列が挙げられる。宿主細胞内での転写を効率的に開始させることができるプロモーターが好ましい。所望のタンパク質をコードするDNA、ならびに所望のプロモーターおよびシャイン・ダルガノ(SD)配列を含有するDNAを、当該技術分野において公知の様々な方法によって調製することができる。あるいは、所望のDNA配列を既存のクローンから得ることができ、または入手できない場合は、DNAライブラリーをスクリーニングし、ライブラリークローンから所望のDNA配列を構築することができる。

【0103】

目的のタンパク質をコードするRNAテンプレートは、細菌リボソーム結合部位(SD配列)を有するmRNAであって、反応混合物中のリボソームがかかるmRNAに結合し、かかるmRNAを翻訳することができるように前記SD配列が所望の遺伝子のコーディング配列に作動可能に連結されているものであるmRNAを発現するように構築されたベクターで形質転換された組換え宿主細胞から、適便に生産することができる。したがって、前記ベクターは、RNAテンプレート合成に使用される特定の宿主細胞においてDNAの転写を促進することができる任意のプロモーターを担持する。

【0104】

細菌から分解されていないRNAを抽出することは困難であるので、より高等な真核細胞培養物がRNAテンプレートの生産には好ましい。原則的には、脊椎動物細胞培養物と無脊椎動物細胞培養物の両方を含む、任意のより高等な真核細胞培養物が実行可能である。RNAテンプレートは、宿主細胞培養物から抽出された全細胞RNA画分の中から適便に単離することができる。全細胞RNAは、当該技術分野において公知の任意の方法によって宿主細胞培養物から単離することができる。RNAテンプレートを、真核宿主細胞に

よって認識されるポリアデニル化シグナルをその3'末端に含有するように設計すると、細胞mRNAの大部分とともに所望のRNAテンプレートを単離することができる。かくしてその宿主細胞は、ポリアデニレート（ポリ（A））テールを有するRNAテンプレートを生産することになる。ポリアデニル化mRNAは、当該技術分野において公知の任意の方法を用いてオリゴデオキシチミジレート（オリゴ（dT））-セルロースカラムでのアフィニティークロマトグラフィーによって大量の細胞RNAから分離することができる。所望のタンパク質をコードするmRNAのサイズが既知である場合、mRNA調製物を、そのRNAのアガロースゲル電気泳動によって、特定のサイズのmRNA分子についてさらに精製することができる。

【0105】

10

OmpT1切断部位を有する改変タンパク質の発現

核酸テンプレートを生産したら、そのテンプレートを使用して、細胞においてOmpT1切断部位を含む組換え標的タンパク質を発現させるか、または無細胞翻訳システムにおいて改変組換え標的タンパク質を合成する。例えば、テンプレートを溶解分解物に、そのテンプレートのタンパク質への翻訳に十分な条件下で、添加することができる。前記細胞溶解物は、細菌細胞または真核細胞からのものであることができる。その後、発現されたタンパク質を、下で説明するように、当該技術分野において公知の方法を用いて精製することができる。

【0106】

20

活性について試験するためのタンパク質の精製

OmpT1切断部位を含有するタンパク質を、当該技術分野において標準的であるように精製することができる。本発明のタンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸または塩基抽出、カラムクロマトグラフィー、アフィニティークラムクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などをはじめとする（しかしこれらに限定されない）方法によって回収および精製することができる。例えば、N末端ヒスチジンタグを含むタンパク質を、金属イオン、例えばニッケルおよびコバルト、を含有するアフィニティー媒体を使用して精製することができる。その後、そのアフィニティー媒体を洗浄して未結合のタンパク質を除去し、結合したタンパク質を溶離し、回収する。いくつかの実施形態では、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）を使用して、ポリヒスチジンタグ付きタンパク質を精製する。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）または高い純度が望まれる他の適する方法を用いて、改変タンパク質を精製することができる。好ましい精製方法を実施例1に提供する。

30

【0107】

精製後、OmpT1切断部位を含有するタンパク質は、関連ポリペプチドの所望の高次構造とは異なる高次構造を有し得る。したがって、精製されタンパク質を、好ましいタンパク質高次構造をもたらす条件に付すことができる。様々な精製／タンパク質フォールディング方法が当該技術分野において公知である、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology 第182号: Guide to Protein Purification (Academic Press, Inc. N. Y. 1990); Bollagら、Protein Methods、第2版 (Wiley-Liss, N. Y. 1996)。一般に、発現されたポリペプチドを変性させ、還元し、そしてその後、それらのポリペプチドを好ましい高次構造に再びフォールディングさせることが望ましいこともある。例えば、グアニジン、尿素、DTT、DTEおよび／またはシャペロンを目的の翻訳産物に付加させることができる。タンパク質の還元、変性および再生方法は、当業者には周知である。例えば、Debinskiら、J. Biol. Chem. 268: 14065-70 (1993); Buchnerら、Anal. Biochem. 205: 263-70 (1992)を参照されたい。

40

【0108】

50

Omp T 1 切断部位を有する改変タンパク質の機能性生物活性の確認

本明細書に記載する改変タンパク質の所望の使用によっては、改変タンパク質が、改変されていない野生型タンパク質に匹敵する生物活性を有することが重要であり得る。例えば、改変すべきタンパク質が、細菌の正常な成長に重要である場合、細胞を溶解して翻訳のための無細胞溶解物を生じさせるまで、タンパク質の正常な活性レベルを保持することが望ましい。したがって、本発明の方法は、ネイティブまたは野生型タンパク質に匹敵する生物活性を有するOmp T 1 切断部位を含有する改変タンパク質を提供する。野生型の活性レベルまたは野生型に匹敵する活性レベルを保持する改変タンパク質を本明細書では機能性タンパク質と呼ぶ。機能アッセイで活性レベルを判定することによってタンパク質の比活性を判定してもよい。あるいは、非機能アッセイ、例えば免疫染色、E L I S A、クマシー (c o o m a s i e) または銀染色ゲルでの定量などで、存在するタンパク質の量を定量し、生物活性タンパク質の全タンパク質に対する比を決定することによって、タンパク質の比活性を判定してもよい。一般に、かくして定義される比活性が、野生型タンパク質の少なくとも約50%であるか、または野生型タンパク質のものに比べて少なくとも約60%、約70%、約80%、約90%以上である場合、改変タンパク質は、野生型タンパク質に匹敵する。例えば、S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (C o l d S p r i n g H a r b o r P r e s s、C o l d S p r i n g H a r b o r、N. Y. 1989) を参照されたい。

10

【0109】

20

改変タンパク質の機能活性を様々な方法で試験することができる。例えば、改変タンパク質を発現する細菌の成長速度を、野生型、対照または非改変タンパク質を発現する細菌の成長速度と比較することができる。改変タンパク質の機能活性を、mRNAテンプレート内の終止コドンで翻訳を終結させるその改変タンパク質の能力を判定することによって試験することもできる。翻訳の終結は短縮型タンパク質をもたらすので、実施例において説明し、図1に示すように、短縮型タンパク質と完全長タンパク質の量を測定し、短縮型タンパク質の完全長タンパク質に対する比を野生型タンパク質から得られるものと比較することによって、改変タンパク質の相対活性を定量することができる。改変タンパク質は、短縮型タンパク質の完全長タンパク質に対する比が、野生型タンパク質を用いる短縮型タンパク質の完全長タンパク質に対する比に比べて少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%以上である場合、野生型タンパク質に匹敵する活性を有する。

30

【0110】

改変タンパク質がOmp T 1 によって切断可能であることの確認

改変タンパク質が、野生型または非改変タンパク質に匹敵する生物活性を有すると判定されたら、それらの改変タンパク質を試験して、それらがOmp T 1 によって切断されることを判定する。本発明の改変タンパク質がOmp T 1 によって切断されることを試験するための1つの方法は、機能性Omp T 1 を含有する無細胞抽出物に、Omp T 1 切断部位を含有する組換えタンパク質を添加することである。改変タンパク質が、Omp T 1 によって切断される場合、それは、ゲル電気泳動 (例えば、S D S - P A G E) 中にインタクトタンパク質より低い見かけの分子量で泳動することになる。改変タンパク質は、その改変タンパク質への放射性標識の組み込みに適する条件下で翻訳反応に¹⁴Cなどの放射性標識を含めることによって検出することができる。放射性標識タンパク質の泳動は、例えばゲルのオートラジオグラフで、視覚化することができる。Omp T 1 による改変タンパク質の切断を、ウェスタンブロット分析によって、例えば、ゲルからタンパク質を固体支持体に転写し、インタクトおよび切断されたタンパク質に結合する抗体とその支持体を接触させ、検出可能な標識を使用して結合抗体を視覚化することによって、検出することもできる。

40

【0111】

Omp T 1 による切断活性は、Omp T 1 による改変タンパク質の切断の量または速度を非改変タンパク質のものと比較することによって判定することができる。例えば、Om

50

p T 1 による改変タンパク質の切断速度は、特定条件下で野生型タンパク質の切断速度の 50 % より高いことができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載する改変タンパク質の切断速度は、その改変タンパク質および野生型タンパク質が、O m p T 1 を発現する細菌からの無細胞抽出物中に同様の濃度（例えば、0.1 ~ 1.0 マイクロモルの濃度）で存在するとき、30 °C で 30 分後、野生型タンパク質の切断速度の 50 % より高い。いくつかの実施形態において、前記改変タンパク質が、O m p T 1 を発現する細菌からの無細胞抽出物中に 0.1 ~ 1.0 マイクロモルの濃度で存在するとき、30 °C で 60 分後、前記改変タンパク質の 90 % より多くが O m p T 1 によって切断される。

【0112】

本明細書に記載する改変タンパク質に導入される O m p T 切断部位が、O m p T 様酵素活性を有するいずれのタンパク質またはポリペプチドによっても切断可能であることは、理解されるであろう。必要なのは、O m p T 1 様酵素が、O m p T 切断部位を含有するように改変されたタンパク質を切断できることだけである。例えば、O m p T 様タンパク質分解活性は、野生型もしくはネイティブ O m p T 1、またはその機能性ホモログもしくは断片によって提供され得る。O m p T 様活性は、O m p T 1 と実質的に同一または実質的に同様であるタンパク質によっても提供され得る。例えば、O m p T 様活性を有するタンパク質は、O m p T 1 との少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % の配列同一性を有することができる。いくつかの実施形態において、O m p T 様活性を有するタンパク質は、配列番号 3 と少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % 同一である。いくつかの実施形態において、O m p T 1 活性を有するタンパク質は、O m p T 1 に結合するポリクローナル抗体およびその変異体によって特異的に結合される。O m p T 1 に結合するポリクローナル抗体およびそれらの機能性変異体の選択は、R F 1 を結合するポリクローナル抗体を選択するために本明細書に記載するように行うことができる。

【0113】

O m p T 1 切断可能タンパク質での細菌の形質転換

改変された必須標的タンパク質が、上記のように、野生型機能を保持するとおよび O m p T 1 によって切断されやすいと判定されたら、それらの改変タンパク質をコードする核酸を細菌に形質転換させる。細菌ゲノムへの核酸の組み込みに適する条件下で細菌を核酸で形質転換させることができる。例えば、実施例において説明するようなオリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換を用いて、本明細書に記載する O m p T 1 切断部位をコードする配列を有するオリゴヌクレオチドで細菌を形質転換させることができる。細菌ゲノム内への所望の突然変異の組み込みは、例えば、実施例において説明するようなミスマッチ増幅突然変異アッセイ（MAMA）PCR を用いて、形質転換コロニーをスクリーニングすることによって、判定することができる。

【0114】

無細胞翻訳システムにおけるタンパク質の収量を増加させるための O m p T 1 切断可能タンパク質の使用

O m p T 1 切断部位を有する改変標的タンパク質は、活性 O m p T 1 プロテアーゼを含有する細菌細胞抽出物において発現されたとき、効率的に分解される。本発明の様々な使用の中でも、O m p T 1 によって切断可能であるように改変される阻害タンパク質の注意深い選択は、無細胞合成システムの生産性を向上させることができる。例えば、1 つの好ましい使用では、O m p T 1 による選択標的タンパク質の切断は、無細胞抽出物において非ネイティブアミノ酸を含む完全長タンパク質の翻訳効率を向上させることができる。一定の実施形態では、非ネイティブアミノ酸を、mRNA テンプレートに導入されたアンバーコドンに組み込む。上で説明したように、アンバーコドンへの非ネイティブアミノ酸の組み込みは、終結複合体タンパク質、例えば R F 1 および R F 2、によって阻害され得る。したがって、特に望ましい実施形態において、O m p T 1 による R F 1 および／または R F 2 の切断および不活性化は、非ネイティブアミノ酸をアンバーコドンに組み込むように操作されたタンパク質の収量を増加させることができる。

【0115】

非ネイティブアミノ酸

上で説明したように、1つの好ましい使用では、Omp T 1による改変標的タンパク質の分解は、無細胞合成システムにおける非ネイティブアミノ酸を含むタンパク質の収量を増加させる。本発明において使用する非ネイティブアミノ酸は、典型的に、アミノ酸の1つ以上の化学改変誘導体または類似体を含み、それらの化学構造は、式 $\text{NH}_3 - (\text{CR}) - \text{COOH}$ を有し、この式中のRは、天然アミノ酸を定義する20のカノニカル置換基のいずれでもない。適する非ネイティブアミノ酸誘導体は、ベンダー、例えば、Bachem Inc. (カリフォルニア州トランス) ; Genzyme Pharmaceuticals (マサチューセッツ州ケンブリッジ) ; Senn Chemicals (スイス国ディールスドルフ) ; Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) ; Synthetec, Inc (オレゴン州オールバニー) から市販されている。好ましくは、非ネイティブアミノ酸としては、グリシン、チロシン、グルタミン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、ロイシン、メチオニン、リジン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、バリン、イソロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、ヒスチジンの誘導体および／または類似体、ならびにβアミノ酸およびホモログ、BOC保護アミノ酸、ならびにFMOC保護アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0116】

まだ市販されていない非ネイティブアミノ酸誘導体、アナログおよびミメティックの生成をいくつかの方法で遂行することができる。例えば、1つの方法は、当該技術分野において公知の有機化学法を用いる目的の非ネイティブアミノ酸の合成であるが、もう1つの方法は、当該技術分野において公知の化学的酵素的合成法の使用である。例えば、Kamphuisら, Ann. N. Y. Acad. Sci., 672:510-527, 1992; Ager DJおよびFotheringham IG, Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 4:800-807, 2001;ならびにWeinerら, Chem. Soc. Rev., 39:1656-1691, 2010; Asymmetric Syntheses of Unnatural Amino Acids and Hydroxyethylene Peptide Isosteres, Wieslaw M. Kazmier ski編, Peptidomimetics Protocols, Vol. 23, 1998;ならびにUnnatural Amino Acids, Kumar G. GadamasettiおよびTamim Braish編, Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry, Vol. 2, 2008を参照されたい。

20

30

【0117】

例えば、Wieslaw M. Kazmier ski編、Peptidomimetics Protocols、第23巻、1998; Wang Lら、Chemistry and Biology、16:323-336、2009;ならびにWang F、Robbins S、Guo J、Shen WおよびSchultz PG.、PLoS One、5:e9354、2010に記載されているような、多くの手順およびプロトコルを、非ネイティブアミノ酸の合成に利用できることは、当業者には分かるであろう。

【0118】

非ネイティブアミノ酸は、非ネイティブL-およびD-αアミノ酸を含むことがある。L-αアミノ酸は、当該技術分野において公知の方法、例えば、これに限定されないが、アルキンとイミノ酢酸エチルの水素化コンジュゲーションのロジウム触媒C-C結合形成による水素媒介還元カップリング(Kongら、J. Am. Chem. Soc.、127:11269-11276、2005)によって、化学合成することができる。あるいは、代謝工学による半合成生産を利用することができる。例えば、発酵手順を用いて、再操作されたシステイン生合成経路を内部に持つ大腸菌からの非ネイティブアミノ酸を合成することができる。(Maier TH、Nature、21:422-427、2003を参照されたい)。αアミノ酸のラセミ混合物を、(Zuendら、Nature、461:968-970(2009)に記載されているような)不斉ストレッカー合成を用いて、または(Taylorら、Trends Biotechnol.、16:412-

40

50

419、1998において見つけることができるような)大規模合成のためのトランスアミナーゼ酵素を使用して、生産することができる。環状エーテル求電子試薬でのグリシン由来 Schiff 塩基またはニトロアセテートのアルキル化、続いて酸誘導開環、そして NH_4OH 中での環化によって二環式第三級 α アミノ酸を生産してもよい (Strachan ら、J. Org. Chem.、71:9909-9911 (2006) を参照されたい)。

【0119】

非ネイティブアミノ酸は、 β アミノ酸をさらに含むことがあり、 β アミノ酸は、代謝に対して著しく安定性であり、遅い微生物分解を示し、ならびにプロテアーゼおよびペプチダーゼに対して本質的に安定性である。 β アミノ酸の合成の例は、Tan CYK および Weaver DF、Tetrahedron、58:7449-7461、2002 に記載されている。

10

【0120】

場合によっては、非ネイティブアミノ酸は、tert-ブトキシカルボニル (Boc) 保護または (9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル (Fmoc) 保護アミノ酸を含む (しかしこれらに限定されない)、固相ペプチド合成に一般に使用される化学修飾アミノ酸を含む。例えば、ロイシン、メチオニン、トレオニン、トリプトファンおよびプロリンの Boc 誘導体は、Saladino ら、J. Org. Chem.、64:8468-8474、1999 に記載されているような選択的 3, 3-ジメチルジオキシラン側鎖酸化によって生産することができる。 α アミノ酸の Fmoc 誘導体は、ニトロ酢酸エチルのアルキル化および誘導体への変換によって合成することができる (Fu ら、J. Org. Chem.、66:7118-7124、2001 を参照されたい)。

20

【0121】

本発明において使用することができる非ネイティブアミノ酸は、20のカノニカルアミノ酸置換基の非ネイティブ類似体または誘導体を、これらに限定されないが、含むことがある。様々な非ネイティブアミノ酸の合成が、当該技術分野において公知の一連の化学的および化学的酵素的方法を必要とすることがあることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの実施形態では、各非ネイティブアミノ酸の特定の誘導体に特異的な当該技術分野において公知の手順に従って、非ネイティブアミノ酸を合成してもよい。Sycheva ら、Microbiology、76:712-718、2007 には、非ネイティブアミノ酸ノバリンおよびノルロイシンを合成するための手順が記載されている。実用的立体選択的合成によってジアリル化プロリン誘導体を生産することができる (Belvisi ら、Tetrahedron、57:6463-6473、2001 を参照されたい)。例えば、トリプトファン誘導体は、Janczuk ら、Tetrahedron Lett.、43:4271-4274、2002 に記載されているように、インド (indo) のイッテルビウムトリフレート触媒求電子置換によって合成することができ、および 5-アリールトリプトファン誘導体の合成は、Wang ら、Tetrahedron、58:3101-3110、2002 に詳述されている。非ネイティブセリンアナログは、第1級アルコキシラジカルの β -開裂によって生産することができる (Boto ら、J. Org. Chem.、72:7260-7269、2007 を参照されたい)。あるいは、フェニルセリン合成のための手順が、Koskinen ら、Tetrahedron Lett.、36:5619-5622、1995 に記載されている。L-フェニルグリシンの合成のための手順は、Cho ら、Biotechnol. Bioprocess. Eng.、11:299-305、2006 に記載されている。そして D-4-ヒドロキシフェニルグリシンの化学的酵素的合成方法は、Yu ら、Folia Microbiol (Praha)、54:509-15; 2009 に記載されている。2-ナフチルアラニンまたは Boc 保護 2-ナフチルアラニンの生産の非限定的な例は、Boaz ら、Org. Process Res. Dev.、9:472-478; 2005 に詳述されている。ヨード-L-チロシンおよび p-ベンゾイル-L-フェニルアラニンの合成は、Hino N、Nat. Protoc.、1:2957-2962、2007 に詳述されている。

30

40

50

【0122】

チャージされた tRNA (charged tRNA)

本明細書に記載する非ネイティブアミノ酸を所望のポリペプチドに組み込むために、上で説明した nna がイソ受容センスまたはアンバーコドン tRNA にチャージされる必要がある。本明細書において用いる場合の tRNA にチャージされる反応は、所望のイソ受容センスコドンまたはアンバーコドン tRNA を目的のそれらのそれぞれのアミノ酸でアミノアシル化させるインビトロ tRNA アミノアシル化反応を指す。tRNA にチャージする反応は、チャージする反応混合物、イソ受容体センス tRNA、を含み、本発明において使用する場合、天然アミノ酸を含むこともあり、または非ネイティブアミノ酸を含むこともある。tRNA にチャージする反応を、無細胞翻訳反応と同じ反応でインサイチュウで行うことができ、または別の反応で行うことができ、この場合は、その後、そのチャージされた tRNA を無細胞翻訳反応に加える。

10

【0123】

tRNA にチャージする反応において使用されることになる tRNA 分子は、適切な 5' および 3' プライマーの存在下での PCR による増幅後に選ばれた任意の tRNA のための合成 DNA テンプレートから合成することができる。T7 プロモーター配列を含有する、得られた二本鎖 DNA テンプレートを、その後、T7 RNA ポリメラーゼを使用してインビトロで転写して tRNA 分子を生産し、その後、それを tRNA にチャージする反応に加える。

20

【0124】

tRNA にチャージする反応は、タンパク質合成反応とは別の所望のアミノ酸でセンスコドンまたはアンバーコドン tRNA 分子をアミノアシル化する任意の反応であることができる。この反応は、抽出物、人工反応混合物、または両方の組み合わせで行うことができる。適する tRNA アミノアシル化反応条件は、当業者には周知である。典型的に、tRNA アミノアシル化を、6.5 から 8.5 の範囲の pH 値を有する生理的バッファー、0.5 ~ 10 mM 高エネルギーリン酸 (例えば、ATP)、5 ~ 200 mM MgCl₂、20 ~ 200 mM KCl 中で行う。好ましくは、前記反応を、還元剤 (例えば、0 ~ 10 mM ジチオトレイトール) の存在下で行う。アミノアシル-tRNA シンセターゼを外因的に添加する場合、そのシンセターゼの濃度は、典型的には 1 ~ 100 nM である。これらの条件、例えば、tRNA アミノアシル化を最適化 (予備選択されたアミノ酸に対する高い特異性、高収率、および最低架橋反応) するように変更することができることは、当業者には容易に分かるであろう。

30

【0125】

本発明の他の実施形態では、アミノアシル-tRNA シンセターゼによってイソ受容またはアンバー tRNA にチャージされる。tRNA にチャージする反応は、チャージするべきイソ受容センス tRNA に特異的なネイティブアミノアシル-tRNA シンセターゼ、操作されたアミノアシル-tRNA シンセターゼ、または 1 タイプより多くのタイプのアミノ酸を tRNA 分子にチャージすることができる「無差別 (promiscuous)」アミノアシル-tRNA シンセターゼのいずれかを利用することができる。無差別アミノアシル-tRNA シンセターゼは、それら自体が操作されていてもよいし、または自然界で見つけられることもある内因的に生産されたアミノアシル-tRNA シンセターゼを含んでもよい。アミノアシル-tRNA シンセターゼを使用してイソ受容 tRNA にネイティブおよび非ネイティブアミノ酸をチャージする方法は、国際公開第 2010/081110 号に記載されており、その内容は、参照により本明細書に援用されている。

40

【0126】

翻訳システム

次に、上で説明したチャージされるイソ受容センスまたはアンバー tRNA を、予備選択 (被定義) 位置に非ネイティブアミノ酸を有する所望のポリペプチドまたはタンパク質の合成のための核酸テンプレートとともに無細胞抽出物、細胞溶解物または再構成翻訳システムを含むことができる翻訳システムと組み合わせる。前記反応混合物は、合成すべき

50

高分子のためのモノマー、例えばアミノ酸、ヌクレオチドなど、ならびに合成に不可欠であるような補因子、酵素および他の試薬、例えばリボソーム、tRNA、ポリメラーゼ、転写因子などをさらに含むことになる。上記成分、例えば無細胞抽出物、核酸テンプレートおよびアミノ酸に加えて、タンパク質合成に特に必要とされる材料を反応に加えてもよい。前記材料としては、塩、フォルリン酸、サイクリックAMP、タンパク質または核酸分解酵素の阻害剤、タンパク質合成の阻害剤または調節剤、酸化／還元電位の調整剤、非変性界面活性剤、バッファー成分、スベルミン、スベルミジン、プトレッシンなどが挙げられる。様々な無細胞合成反応システムが当該技術分野において周知である。例えば、Kim, D.M.およびSwartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 66:180-8 (1999); Kim, D.M.およびSwartz, J.R. *Biotechnol. Prog.* 16:385-90 (2000); Kim, D.M.およびSwartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 74:309-16 (2001); Swartzら, *Methods Mol Biol.* 267:169-82 (2004); Kim, D.M.およびSwartz, J.R. *Biotechnol. Bioeng.* 85:122-29 (2004); Jewett, M.C.およびSwartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:19-26 (2004); Yin, G.およびSwartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 86:188-95 (2004); Jewett, M.C.およびSwartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 87:465-72 (2004); Voloshin, A.M.およびSwartz, J.R., *Biotechnol. Bioeng.* 91:516-21 (2005)を参照されたい。所望のポリペプチドの無細胞合成のためのさらなる条件は、国際公開第2010/081110号に記載されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に援用されている。

【0127】

いくつかの実施形態では、DNAテンプレートをを使用してインビトロタンパク質合成を駆動し、RNAポリメラーゼをその反応混合物に添加して、DNAテンプレートの転写増進をもたらす。ここでの使用に適するRNAポリメラーゼは、細菌抽出物が由来する細菌において機能する任意のRNAポリメラーゼを含む。他の実施形態では、RNAテンプレートを使用してインビトロタンパク質合成を駆動し、その反応混合物の成分を任意の適便な順序で互いに混合することができるが、好ましくは、RNAテンプレートを最後に添加する順序で混合し、それによって、ヌクレアーゼによるRNAテンプレートの潜在的分解を最小にする。

【0128】

無細胞翻訳システム

無細胞タンパク質合成は、細胞機構の触媒力を活用することができる。インビトロでの最大タンパク質収量の獲得は、妥当な基質供給、例えば、ヌクレオシド三リン酸およびアミノ酸、ホメオスタシス環境、触媒安定性、および阻害性副産物の除去または回避を必要とする。インビトロ合成反応の最適化は、急速に成長する生物のインビボ状態の再現から恩恵を受ける。したがって、本発明のいくつかの実施形態では、酸化的リン酸化が活性化される反応、すなわち、CYTOMIM（商標）システムにおいて、無細胞合成を行う。CYTOMIM（商標）システムは、最適化されたマグネシウム濃度を有するポリエチレングリコール不在の反応条件を用いることによって規定される。CYTOMIM（商標）システムは、タンパク質合成を阻害することが公知であるリン酸塩を蓄積しないが、従来の二次エネルギー源は、リン酸塩蓄積をもたらす。CYTOMIM（商標）システムの様々な他の特徴は、米国特許第7,338,789号明細書に記載されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に援用されている。

【0129】

活性酸化的リン酸化経路の存在は、二次エネルギー源、例えば、ホスホエノールピルビン酸、クレアチンリン酸、アセチルリン酸、または解糖中間体、例えばグルコース、グルコース-6-リン酸およびピルビン酸の必要量を欠如させることによって実証することができる。活性酸化的リン酸化経路の存在は、電子伝達系阻害剤などの阻害剤に対する経路の感受性によって判定することもできる。電子輸送系阻害剤の例としては、2-ヘプチル-4-ヒドロキシキノリン-N-オキシド（HQNO）、2,4-ジニトロフェノール、シアニド、アジド、テノイルトリフルオロアセトン、およびカルボニル-シアニド-m-

クロロフェニルヒドラゾンが挙げられる。あるいは、1つの実施形態において、無細胞翻訳システムは、活性酸化的リン酸化経路を含まない。

【0130】

インビトロ、すなわち無細胞、タンパク質合成には、従来のインビボタンパク質発現法に勝るいくつかの利点がある。無細胞システムは、細菌の代謝資源のすべてではないが大部分を1つのタンパク質の排他的生産に向けることができる。さらに、インビトロで細胞壁および膜成分がないことは、合成環境の制御を可能にするので、有利である。例えば、発現される遺伝子のコドン利用頻度を反映するようにtRNAレベルを変化させることができる。細胞成長または生存の懸念が存在しないので、レドックス電位、pH、またはイオン強度も、インビボタンパク質合成でより大きい自由度で改変することができる。さらに、精製され、正しくフォールディングされたタンパク質産物の直接回収を容易に果たすことができる。

10

【0131】

無細胞システムの生産性は、近年、約 $5\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{時}$ から約 $500\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{時}$ に、2桁を超えて向上された。かかる向上は、インビトロタンパク質合成を実験室規模研究のための実用技術にしたとともに、高スループットタンパク質発現のプラットフォーム技術をもたらす。さらに、かかる向上は、タンパク質医薬のインビボでの大規模な商業生産の代替手段としての無細胞技術の使用の実行可能性を示す。

【0132】

溶解物の生成

本発明は、標的タンパク質のインビトロ翻訳に細胞溶解物を利用する。便宜上、溶解物源として使用する生物をソース生物または宿主細胞と呼ぶことがある。宿主細胞は、細菌、酵母、哺乳動物もしくは植物細胞、またはタンパク質合成が可能な任意の他のタイプの細胞であってよい。溶解物は、所望のタンパク質をコードするメッセンジャーリボ核酸(mRNA)を翻訳することができる成分を含み、および場合により、所望のタンパク質をコードするDNAを転写することができる成分を含む。かかる成分としては、例えば、DNA指向型RNAポリメラーゼ(RNAポリメラーゼ)、所望のタンパク質をコードするDNAの転写の開始に必要なとされる任意の転写アクチベーター、転移リボ核酸(tRNA)、アミノアシル-tRNAシンセターゼ、70Sリボソーム、 N^{10} -ホルミルテトラヒドロ葉酸、ホルミルメチオニン-tRNA^{fMet}シンセターゼ、ペプチジルトランスフェラーゼ、開始因子、例えばIF-1、IF-2およびIF-3、伸長因子、例えばEF-Tu、EF-TsおよびEF-G、放出因子、例えばRF-1、RF-2およびRF-3、などが挙げられる。

20

30

【0133】

ある実施形態は、溶解物が由来する細菌細胞を使用する。任意の細菌株に由来する細菌溶解物を本発明の方法で 사용할 ことができる。細菌溶解物は、次のように得ることができる。選ばれた細菌を、一晚、多数の成長培地のいずれかにおいて、かつ当該技術分野において周知であり、特定の細菌の成長のために実施者により容易に最適化される成長条件下で、成長させる。例えば、合成のための天然環境は、グルコースおよびリン酸を含有する培地中で成長した細菌細胞に由来する細胞溶解物を利用し、この場合、前記グルコースは、少なくとも約0.25% (重量/容量)、さらに通常は少なくとも約1%; および通常は約4%以下、さらに通常は約2%以下の濃度で存在する。かかる培地の例は、2YT PG培地であるが、被定義栄養源と未定義栄養源の両方を使用する大腸菌などの細菌の成長に適する培地が多く発表されているので多くの培地をこのために適応させることができることは、当業者には理解されるであろう。一晚、回収した細胞を、細胞ペレットに適する細胞浮遊バッファーに浮遊させること、そして前記浮遊細胞を超音波処理により粉碎すること、前記浮遊細胞をフレンチプレスにより破碎すること、連続流高圧ホモジネーション、または有効な細胞溶解に有用な当該技術分野において公知の任意の他の方法によって溶解することができる。その後、それらの細胞溶解物を遠心分離または濾過して、大きいDNA断片を除去する。

40

50

【実施例】

【0134】

(実施例1)

この実施例は、OmpT1プロテアーゼによって切断可能であるアミノ酸配列を導入するためのRF1タンパク質の改変を記載する。

【0135】

方法：

RF1にOMPT1切断部位を導入するためのテンプレートの構築

PCRに基づく戦略を用いて、本明細書に記載する改変RF1タンパク質をコードする核酸テンプレートに所望のヌクレオチド配列変化を導入した。PCR反応は、Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (NEB) をその製造業者が推奨するプロトコルに従って使用して行った。一般に、2ステップオーバーラッピングPCRを、下でより詳細に説明するように行って、RF1エンコーディング遺伝子にOmpT切断突然変異を導入した。PCR生成DNAテンプレートを、無細胞発現に利用するためにQIAquick PCR精製キット (QIAGEN) を使用して精製した。PCR精製後、それらの変異体をMcLab (カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) がシーケンシングして、予想された突然変異の存在を確認した。

【0136】

無細胞反応におけるDNAテンプレートの分解を防止するためのGamSタンパク質の調製

DNAテンプレートからの転写効率は、無細胞抽出物中に存在する内因性細菌エンドヌクレアーゼによるそのテンプレートの分解のため減少され得る。ショートフォームのλファージGamタンパク質 (GamS) が、RecBCD (エンドヌクレアーゼV) の活性を阻害することにより分解からDNAテンプレートを保護することは公知である (Sitaraman, K.、Esposito, D.、Klarman, G.、Grice, S. F. L.、Hartley, J. L. およびChatterjee, D. K.、2004、A Novel Cell-free Protein Synthesis System、J Biotechnol. 110:257-263を参照されたい)。したがって、この実施例ではGamSタンパク質を使用して、無細胞転写反応中にPCRテンプレートを安定させた。組換えGamSタンパク質を生産するために、テンプレートとしてpKD46 (Datsenko, K. A. およびWanner, B.、2000、One-step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia coli K-12 Using PCR Products、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645) を使用してプライマー5'-ATATATCATATGAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAG-3' (配列番号51) および5'-ATATATGTCGACTTAATGATGATGATGATGATGAGAACCCCTACCTCTGAATCAATATCAACCTGGTGGTG-3' (配列番号52) によって、C末端ポリヒスチジンタグ、GGSHHHHHH (配列番号50) を含むようにGamS遺伝子を増幅した。そのGamS遺伝子が無細胞発現プラスミドpYD317のNdeI/SalI制限部位にサブクローニングした。GamSをインビトロで発現させ、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によって90%より高い純度 (データを示さない) で精製した。GamSタンパク質を利用前は100mM Tris-酢酸バッファー (pH 8.2) 中、-70℃で保管し、このバッファーは、160mM 酢酸カリウム、200mM 塩化ナトリウムおよび10%スクロースも含有した。

【0137】

細菌株およびプラスミド

SBJY001は、公開された無細胞タンパク質生産のために最適化された大腸菌K12誘導体である。ファージλ Redリコンビナーゼ遺伝子を含むプラスミドpKD46 (Coli Genetic Stock Center) を用いて誘導性アラビノースプロモーターの下でSBJY001を形質転換させた。

【0138】

SBHS002の構築

SBHS002は、P1形質導入を用いて作られたompT欠失大腸菌株である。FR T部位に隣接するompT::Kan^R突然変異を含有するKeioコレクション株であるJW0554-1 (CGSC#8680) から、P1溶解物を作った。その後、そのJW0554-1 P1溶解物を使用して、P1形質導入により突然変異をSBJY001に導入した。30 µg/mLのカナマイシンを有するLBでコロニーを成長させて、カナマイシン耐性について選択した。SBJY001ompT::Kan^Rを708-FLPe Cm^R発現プラスミド (Gene Bridges) で形質転換させた。FLP合成を誘導し、コロニーをカナマイシン耐性の喪失についてスクリーニングした。カナマイシン耐性コロニーをシーケンシングして、ompTの欠失を確認した。このompT欠失株をSBHS002と呼ぶ。

10

【0139】

N末端Hisタグ付きRF1のクローニングおよび発現

N末端HisタグおよびNdeI/SalI制限部位を導入したプライマー5His-RF1: CATATGCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGCTCTAAGCCTTCTATCGTTGCCAAACTGGAAGCC (配列番号138) および3RF1: GTCGACTTATTCCTGCTCGGACAACGCCGCCAG (配列番号139) を使用して、大腸菌A19株ゲノムDNAからRF1を増幅した。インサートを発現ベクターpYD317にライゲートし、シーケンシングによって確認した。プラスミドを使用してRF1を25 mL無細胞反応で発現させ、IMACによって精製し、バッファーをPBSに交換した。

20

【0140】

無細胞抽出物を使用する組換えRF1変異体の切断

本明細書に記載する改変RF1タンパク質が、OmpTによって切断可能であるかどうかを試験するために、組換えRF1変異体を、OmpTを有するまたは有さない細胞抽出物とともにインキュベートした。外膜上にインタクトompTプロテアーゼを有するSBJY001細胞、およびompTが欠失されたSHBS002を、5 mLのLB中、一晚、37°Cで成長させた。50 µLの各培養物を8,000 rpmで2分間、遠沈し、10 mM Tris、20 mM 塩化アンモニウムおよび10 mM 塩化マグネシウムで2回洗浄した。その後、それらの細胞ペレットを50 µLのバッファーに再浮遊させ、10 µgの精製組換え大腸菌RF1タンパク質を添加した。それらの試料を37°Cでインキュベートした。試料を8,000 rpmで2分間、遠沈した。RF1タンパク質を含有する上清を除去し、SDS-PAGEゲルで泳動させた。

30

【0141】

RF1変異体の無細胞発現

無細胞転写／翻訳反応を、60 µLの容量で、30°Cで、24深ウェルプレート (カタログ番号95040470、Thermo Scientific) において4.5時間行った。RF1変異体発現のためのPCRテンプレート濃度は、10 µg/mLであった。反応組成物は、8 mM グルタミン酸マグネシウム、130 mM グルタミン酸カリウム、35 mM ピルビン酸ナトリウム、1.2 mM AMP、0.86 mM GMP、UMPおよびCMPの各々、4 mM シュウ酸ナトリウム、1 mM プトレッシン、1.5 mM スペルミジン、15 mM リン酸カリウム、1 mM チロシン、2 mMの他の19のアミノ酸各々、100 nM T7 RNAポリメラーゼ、30% (V/V) S30細胞抽出物も含んだ。ジスルフィド形成を助長するために、S30細胞抽出物を、無細胞反応前に30分間、室温で、50 µM IAMで処理した。2 mM 酸化グルタチオン (GS SG) と1 mM 還元グルタチオン (GSH) の混合物も、4.3 µM 大腸菌ジスルフィドイソメラーゼDsbCとともに添加した。無細胞発現RF1変異体をSDS-PAGEおよびオートラジオグラムで分析するために、微量の [¹⁴C]-ロイシン (300 µCi/モル; GE Life Sciences、ニュージャージー州) の存在下で反応を行った。RF1変異体を、細菌株SBJY001から調製したOmpT陽性 (OmpT

40

50

+) 細胞抽出物、または細菌株 S B H S 0 0 2 (S B J Y 0 0 1 Δ o m p T) から調製した O m p T 陰性 (O m p T -) 細胞抽出物いずれかにおいて発現させた。無細胞反応において P C R テンプレートを実定させるために、1 . 4 μ M G a m S タンパク質も添加して、R e c B C D の活性を阻害した。

【0142】

S D S - P A G E およびオートラジオグラフィー

改変 R F 1 タンパク質が O m p T によって切断可能であるかどうかを判定するために、上で説明した無細胞反応において翻訳された R F 1 タンパク質を S D S - P A G E およびオートラジオグラフィーによって分析した。¹⁴C で標識した無細胞反応試料を卓上遠心分離機において最大速度で遠心分離し、4 μ L の上清を I n v i t r o g e n S D S - P A G E サンプルローディングバッファーおよび水と混合した。試料を 4 ~ 1 2 % B i s - T r i s S D S - P A G E ゲルに負荷し、M E S ランニングバッファーで約 4 5 分間、泳動させた。その後、ゲルを乾かし、一晚、蛍光スクリーン (6 3 - 0 0 3 4 - 8 6 、 G E h e a l t h c a r e 、 米国) に曝露し、その後、S t o r m 4 6 0 (G E h e a l t h c a r e 、 米国) を使用してスキャンした。

【0143】

R F 1 への O m p T 切断部位の導入

R F 1 配列における潜在的 O m p T 切断部位を同定するために、単一 A r g または L y s 突然変異を、R F 1 の異なるループ領域内の既存 A r g または L y s のそばに導入した。それらのループ領域は、原核生物クラス I 放出因子の配列アラインメントに基づいて予測した (G r a i l l e , M . , H e u r g u e - H a m a r d , V . , C h a m p , S . , M o r a , L . , S c r i m a , N . , U l r y c k , N . , T i l b e u r g h , H . および B u c k i n g h a m , R . H . , 2 0 0 5 , M o l e c u l a r B a s i s f o r B a c t e r i a l C l a s s I R e l e a s e F a c t o r M e t h y l a t i o n b y P r m C . M o l e c u l a r C e l l . 2 0 : 9 1 7 - 9 2 7 を参照されたい) 。所望の変異体を生成するために、突然変異配列を、フォワードオリゴプライマーとリバースオリゴプライマー (表 1) の真ん中に設計した。第 1 ステップ P C R では、5 χ T 2 P T 7 である 5 ' - G C G T A C T A G C G T A C C A C G T G G C T G G T G G C C G A T T C A T T A A T G C A G C T G G C A C G A C A G G - 3 ' (配列番号 5 3) およびリバースプライマー (表 1) を使用して P C R によって 5 ' 断片を増幅した。この 5 ' 断片は、T 7 プロモーター、N 末端配列の定常領域、および突然変異部位を含んだ。フォワードプライマー (表 1) および 3 χ T 2 T T 7 である 5 ' - G C G T A C T A G C G T A C C A C G T G G C T G G T G G C G G T G A G T T T T C T C C T T C A T T A C A G A A A C G G C - 3 ' (配列番号 5 4) を使用して第 1 ステップで 3 ' 断片も増幅した。この 3 ' 断片は、突然変異部位、定常 C 末端領域および T 7 ターミネーター配列を含んだ。第 2 ステップ P C R では、単一プライマー 5 χ T 2 , 5 ' - G C G T A C T A G C G T A C C A C G T G G C T G G T G G - 3 ' (配列番号 5 5) を使用してオーバーラッピング P C R によって 5 ' 断片および 3 ' 断片 D N A を構築した。

【0144】

先ず、9 つの単一突然変異、M 7 4 R 、 E 7 6 R 、 E 8 4 R 、 A 8 5 R 、 E 8 7 R 、 E 1 0 8 R 、 T 2 9 3 R 、 N 2 9 6 K および S 3 0 4 R 、をループ領域内の既存 A r g または L y s のそばに導入した (表 2) 。これらの R F 1 変異体および W T R F 1 を、O m p T を有するまたは有さない無細胞抽出物において、P C R テンプレートを使用して発現させた。R F 1 タンパク質を S D S - P A G E およびオートラジオグラフィーによって分析した。O m p T 陰性細胞抽出物において発現させたとき、1 0 個すべての R F 1 変異体が S D S - P A G E で完全長タンパク質を示した。しかし、O m p T を含有する細胞抽出物において発現させたとき、変異体 N 2 9 6 R は、部分的に消化されたが、他の変異体は、完全長未消化タンパク質について予想されるように泳動した。N 2 9 6 は、R F 1 のスイッチループ領域内に位置し、この領域は、柔軟であり、プロテアーゼ質消化に利用され

やすい。

【0145】

第1ラウンドスクリーニングでは、N296Kを細胞抽出物におけるOmpTによる部分的消化について選択した。第2ラウンドスクリーニングでは、二重突然変異型変異体および三重突然変異型変異体のPCRテンプレートを、表1に収載するプライマーで、上記と同じ方法を用いて生成した。6つの二重突然変異体、N296K/L297V、N296K/L297K、N296K/L297R、N296R/L297V、N296R/L297K、N296R/L297R、ならびに2つの三重突然変異体、N296K/L297R/L298KおよびN296K/L297R/L298R（表2）を、OmpTを伴うまたは伴わない無細胞発現で試験した。8つすべての二重および三重RF1突然変異型変異体がOmpT1によって切断された（データを示さない）。これらの変異体の中で、N296K/L297R/L298Rは、OmpTによる消化に対して最も感受性であった。

【表 1】

表 1. OmpT切断部位スクリーニングに使用したフォワードおよびリバースプライマー配列

RF1 変異体	フォワード	配列番号
WT	GCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCGCAGG	56
M74R	GCTCGATGATCCTGAAC <u>GCG</u> CTGAGATGGCGCAGG	57
E76K	CGATGATCCTGAAATGCGTAAAGATGGCGCAGGATGAAC	58
E84K	CAGGATGAACTGCGCAAAGCTAAAGAAAAAAGCGAGCAAC	59
A85R	CAGGATGAACTGCGCGAAC <u>GTA</u> AGAAAAAAGCGAGCAAC	60
E87R	GGATGAACTGCGCGAAGCTAAAC <u>GTA</u> AAAAAGCGAGCAACTGGAAC	61
E108R	GCCAAAAGATCCTGATGACC <u>GTC</u> GTAACGCCTTCCTCG	62
T293R	CAACAGGCCGAAGCGTCTCGCCGTCGTAACCTGC	63
N296K	GCGTCTACCCGTCGTAAACTGCTGGGGAGTGGCG	64
S304K	GGGAGTGGCGATCGCAAGGACCGTAACCGTACTTAC	65
N296K/L297V	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	66
N296K/L297K	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAAAGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	67
N296K/L297R	CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	68
N296R/L297V	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	69
N296R/L297K	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGAAGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	70
N296R/L297R	CGAAGCGTCTACCCGTCGTGCGGCTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC	71
N296K/L297R/L298K	CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTAAGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC	72
N296K/L297R/L298R	CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAACGTCGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC	73
リバース		
WT	CCTGCGCCATCTCACGCATTTACGATCATCGAGC	74
M74R	CCTGCGCCATCTCACG <u>GCG</u> TTCAGGATCATCGAGC	75
E76K	GTTTCCTGCGCCATCTTACGCATTTACGATCATCG	76
E84K	GTTGCTCGCTTTTTCTTAGCTTTCGCGAGTTCATCCTG	77
A85R	GTTGCTCGCTTTTTCTTAGCTTCGCGAGTTCATCCTG	78
E87R	GTTCCAGTTGCTCGCTTTTACGTTTAGCTTCGCGAGTTCATCC	79
E108R	CGAGGAAGGCGTTACGACGCTCATCAGGATCTTTGGC	80
T293R	GCAGGTTACGACGCGAGACGCTTCGGCCTGTTG	81
N296K	CGCCACTCCCCAGCAGTTTACGACGGGTAGACGC	82
S304K	GTAAGTACGGTTACGGTCCTTTCGATCGCCACTCCC	83
N296K/L297V	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	84
N296K/L297K	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	85
N296K/L297R	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCG	86
N296R/L297V	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	87
N296R/L297K	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	88
N296R/L297R	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGGCGACGACGGGTAGACGCTTCG	89
N296K/L297R/L298K	GGTCGCTGCGATCGCCACTCCCCTTACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG	90
N296K/L297R/L298R	GGTCGCTGCGATCGCCACTCCC <u>GCG</u> ACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG	91

*突然変異配列に下線を引く。

【表 2】

表2. RF1の一、二および三置換変異体

番号	一置換変異体
A-1	M74R
A-2	E76K
A-3	E84K
A-4	A85R
A-5	E87R
A-6	E108R
A-7	T293R
A-8	N296K
A-9	S304K
	二置換変異体
A-11	N296K/L297V
A-12	N296K/L297K
A-13	N296K/L297R
A-14	N296R/L297V
A-15	N296R/L297K
A-16	N296R/L297R
	三置換変異体
A-17	N296K/L297R/L298K
A-18	N296K/L297R/L298R

10

20

30

【0146】

RF1のスイッチループ領域へのOmpT切断ペプチドの挿入

上で説明したアミノ酸突然変異の導入に加えて、スイッチループ領域内の野生型配列を既知OmpTプロテアーゼ感受性ペプチド配列で置換するようにもRF1を改変した（Hwang, B.、Varadarajan, N.、Li, H.、Rodriguez, S.、Iverson, B. L. およびGeorgiou, G.、2007、Substrate Specificity of the Escherichia coli Outer Membrane Protease OmpP、J. Bacteriol. 189:522-530; McCarter, J. D.、Stephens, D.、Shoemaker, K.、Rosenberg, S.、Kirsch, J. F. およびGeorgiou, G.、2004、Substrate Specificity of the Escherichia coli Outer Membrane Protease OmpT、J. Bacteriol. 186:5919-5925を参照されたい）。22のRF1変異体を構築した。それらを表3に収載する。変異体番号1から14は、OmpT消化のためのARRG（配列番号47）を含有した。変異体番号15は、スイッチループの末端にあるので、ARRG（配列番号47）ではなくARRを含有した。変異体番号16は、単一突然変異N296Rを含有した。配列番号17、18および19は、OmpT切断ペプチドWLAARRGRG（配列番号48）を含有した。変異体番号20、21および22は、別のOmpT切断ペプチドWGGRWARKKGTI（配

40

50

列番号49)を含有した。

【0147】

突然変異配列を、表4に収載するフォワードおよびリバースオリゴプライマーで設計した。第1ステップPCRでは、プライマー5'χT2PT7およびリバースプライマー(表4)を使用してPCRによって5'断片を増幅した。この5'断片は、T7プロモーター、N末端配列の定常領域、および突然変異部位を含んだ。フォワードプライマー(表3)および3'χT2TT7を使用して第1ステップで3'断片も増幅した。この3'断片は、突然変異部位、定常C末端領域、およびT7ターミネーター配列を含んだ。第2ステップPCRでは、上で説明したように単一プライマー5'χT2を使用してオーバーラッピングPCRにより5'断片および3'断片DNAを構築した。

10

【0148】

22個のRF1変異体(表3)を、OmpTを有するまたは有さない細胞抽出物においてPCRテンプレートを使用して発現させた。ARRG(配列番号47)挿入変異体の中で、番号9は、OmpT消化に対して最高の感受性を示した。OmpT切断ペプチドWLARRGRG(配列番号48)を含有する変異体番号17、18および19は、OmpTによって部分的に消化された。しかし、それらは、OmpT切断ペプチドWGGRWARKKGTI(配列番号49)を含有する変異体番号20、21および22よりはるかに感受性が低かった。変異体番号9、20、21および22を、これら22の構築物の中でOmpT消化に対して最も感受性の高いRF1変異体として選択した。

【表 3】

表3. RF1のスイッチループに挿入したOmpT切断ペプチド配列

番号	ペプチド**	配列番号
*0	QQAEASTRRNLLGSGDRS	4
1	Q <u>ARRG</u> STRNLLGSGDRS	26
2	QQ <u>ARRG</u> TRRNLLGSGDRS	27
3	QQA <u>ARRG</u> RRNLLGSGDRS	28
4	QQAE <u>ARRG</u> RNLLGSGDRS	29
5	QQAEA <u>ARRG</u> NLLGSGDRS	30
6	QQAEAS <u>ARRG</u> LLGSGDRS	31
7	QQAEAST <u>ARRG</u> LGSGDRS	32
8	QQAEASTR <u>ARRG</u> SGDRS	33
9	QQAEASTRR <u>ARRG</u> SGDRS	34
10	QQAEASTRRN <u>ARRG</u> SGDRS	35
11	QQAEASTRRNL <u>ARRG</u> SGDRS	36
12	QQAEASTRRNLL <u>ARRG</u> SGDRS	37
13	QQAEASTRRNLLG <u>ARRG</u> SGDRS	38
14	QQAEASTRRNLLGSA <u>RRG</u>	39
15	QQAEASTRRNLLGSGA <u>RR</u>	40
16	QQAEASTRRLLGSGDRS	6
17	QQAWLAARRGRGSGDRS	41
18	QQAEWLAARRGRGSGDRS	42
19	QQAEAWLAARRGRGSGDRS	43
20	QQWGGRWARKKGTIGDRS	44
21	QQAWGGRWARKKGTIDRS	45
22	QQAEWGGRWARKKGTIRS	46

10

20

30

* WTスイッチループペプチド配列 (Q287からS304)

** 挿入したアミノ酸またはペプチド配列に下線を引く

【表 4 - 1】

表4. OmpT切断ペプチド挿入のためのフォワードおよびリバースプライマー配列

番号	フォワード	配列番号
0	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACT TACAACTTCCCG	92
1	<u>CGCCGTGGT</u> TCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	93
2	<u>GCACGCCGTGGT</u> ACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	94
3	<u>GCCGCACGCCGTGGT</u> CTGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	95
4	GCCGAAG <u>CACGCCGTGGT</u> CGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	96
5	GCCGAAGCG <u>GACGCCGTGGT</u> AACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT TCCCG	97
6	GCCGAAGCGTCT <u>GACGCCGTGGT</u> CTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	98
7	GCCGAAGCGTCTACCG <u>CACGCCGTGGT</u> CTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	99
8	GCCGAAGCGTCTACCCGT <u>GACGCCGTGGT</u> GGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	100
9	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGT <u>GACGCCGTGGT</u> AGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	101
10	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAAC <u>GACGCCGTGGT</u> GCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	102
11	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGG <u>CACGCCGTGGT</u> GATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	103
12	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGG <u>CACGCCGTGGT</u> CGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCG	104
13	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGG <u>CACGCCGTGGT</u> AGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	105
14	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGT <u>GACGCCGTGGT</u> GACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	106
15	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGC <u>CACGCCGT</u> GACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	107
16	GCCGAAGCGTCTACCCGTCGT <u>CGT</u> CTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	108
17	GCCTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGG <u>G</u> GGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT TCCCG	109
18	GCCGAATGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT TCCCG	110
19	GCCGAAGCGTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCGTGGCGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT TCCCG	111
20	<u>TGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTA</u> CTATTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	<u>112</u>
21	GCCTGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTA <u>CTATT</u> GATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	113
22	GCCGAATGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTA <u>CTATT</u> CGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTT CCCG	114

10

20

30

40

【表 4 - 2】

	リバース	
0	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	115
1	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGAC <u>ACCACGGCGTG</u> CCTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	116
2	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGT <u>ACCACGGCGTG</u> CCTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	117
3	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGAC <u>ACCACGGCGTG</u> CCTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	118
4	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGAC <u>ACCACGGCGTG</u> CCTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	119
5	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTT <u>ACCACGGCGTG</u> CGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCC ATTTTCAGCAGC	120
6	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAG <u>ACCACGGCGTG</u> CAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	121
7	GCTGCGATCGCCACTCCCCAG <u>ACCACGGCGTG</u> CGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	122
8	GCTGCGATCGCCACTCCC <u>ACCACGGCGTG</u> CACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	123
9	GCTGCGATCGCCACT <u>ACCACGGCGTG</u> CACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	124
10	GCTGCGATCGCC <u>ACCACGGCGTG</u> CGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	125
11	GCTGCGATC <u>ACCACGGCGTG</u> CCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	126
12	GCTGCG <u>ACCACGGCGTG</u> CCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	127
13	GCT <u>ACCACGGCGTG</u> CCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	128
14	<u>ACCACGGCGTG</u> CACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	<u>129</u>
15	<u>ACGGCGTG</u> CGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	<u>130</u>
16	GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAG <u>ACG</u> ACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAG CAGC	131
17	GCTGCGATCGCCACTCCC <u>GCCACGACCGCGACGCGTGCCAGCC</u> AGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	132
18	GCTGCGATCGCCACT <u>GCCACGACCGCGACGCGTGCCAGCC</u> ATTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	133
19	GCTGCGATCGCC <u>GCCACGACCGCGACGCGTGCCAGCC</u> AGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	134
20	GCTGCGATCGCCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCACTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	135
21	GCTGCGATCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCAAGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	136
22	GCTGCGAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCAATTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGC AGC	137

*突然変異配列に下線を引く。

【0149】

(実施例2)

R F 1 が O m p T 1 プロテアーゼによって切断可能になるように首尾よく改変されたことを実証されたので、この実施例は、改変 R F 1 とインタクト O m p T 1 の両方を発現する組換え細菌株の構築を記載する。この実施例の目的は、前記組換え株によって発現された R F 1 変異体が、O m p T 1 を発現する組換え株からの無細胞抽出物において切断され

10

20

30

40

50

ることを証明することである。

【0150】

オリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換

本明細書に記載する改変RF1タンパク質を発現する細菌株を産生するために、オリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換 (OMAR) を用いて細菌ゲノムにRF1突然変異を挿入した。OMARプロトコルは、以前に報告されたプロトコル (WangおよびChurch、Methods in Enzymology、2011、498、409-426) から改造した。簡単に言うと、pKD46プラスミドを含有するSBJY001を3 mL LBおよび50 µg/mL アンピシリン中、30°CでOD₆₀₀ 0.3まで成長させた。その後、それらの細胞を1 mM L-アラビノースで37°Cで45分間、誘導した。細胞ペレットを冷10%グリセロールで2回洗浄し、30 µL 冷10%グリセロールに再浮遊させた。5 µMの各オリゴを再浮遊細胞に添加した。合成オリゴ (Integrated DNA Technologies) は、90塩基対長であり、DNA複製中にラギング鎖にアニールするように設計された (表5を参照されたい)。それらの細胞を1800 Vで5ミリ秒間、1 mmキューベットの中で電気穿孔した。その後、それらを3 mL LBおよび50 µg/mL Amp中で回復させた。このプロセスを13サイクル反復した。細胞を希釈し、LB寒天プレートに蒔き、37°Cで一晩成長させた。

10

【0151】

所望の突然変異を有する細菌株を同定するためのMAMA PCR

ミスマッチ増幅突然変異アッセイ (MAMA) PCRを改造したものをを用いて細菌コロニーをスクリーニングして、RF1に所望の突然変異がある株を同定した (Chambers、PCR Methods and Applications、1992、2、14-20)。簡単に言うと、ユニバーサル5'プライマーを、各突然変異に特異的である3'プライマーと併用して、突然変異体コロニーとWTコロニーとを区別した (表5を参照されたい)。オリゴは、Eurofins MWG Operonから取り寄せた。Platinum (登録商標) Blue PCR Supermix (Invitrogen) を使用してMAMA PCRを実行した。PCRを95°C 3分、30× (95°C 15秒、58°C 20秒、72°C 1分) そして72°C 5分で実行した。PCR産物を96ウェルE-gel (Invitrogen) で泳動させて一切のバンドを視覚化した。

20

【0152】

抽出物調製およびウェスタンブロット

改変RF1変異体を含有するように操作した株SBHS015、SBHS016およびSBHS017をTunair振盪フラスコの中の500 mL TBにおいて37°Cで振盪しながら一晩成長させた。それらの細胞を6000 x gで15分間、ペレット化した。細胞ペレットを6 mL S30バッファー (10 mM Tris、14 mM 酢酸マグネシウムおよび60 mM 酢酸カリウム) : 1 g 細胞ペレットで、2回洗浄した。その後、細胞を2 mL S30バッファー : 1 g 細胞ペレットに再浮遊させた。ホモジナイザーを使用して再浮遊細胞を溶解した。その後、その抽出物を15,000 x gで30分間、2回、清澄化した。その抽出物を1、2または3時間、30°Cの水浴で活性化した。精製された組換え大腸菌RF1タンパク質をウサギに接種することによって抗RF1抗体を作製し、その後、アフィニティマトリックス (YenZym Antibodies LLC) を使用して精製した。その組換えタンパク質のELISAおよびウェスタンブロットを用いて、抗体の特異性を確認した。細胞ペレット、溶解物および抽出物試料をSDS-PAGEゲルで泳動させ、iBlot (登録商標) システム (Invitrogen) を使用してPVDF膜に転写した。一次抗RF1抗体を使用し、続いて二次抗ウサギアルカリホスファターゼ結合抗体 (Invitrogen) を使用した。5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-1-リン酸とニトロブルーテトラゾリウムとを含有するアルカリホスファターゼ発色基質溶液 (Invitrogen) を使用してバンドを視覚化した。

30

40

【表 5】

表5. OMARおよびMAMA PCRのためのオリゴヌクレオチドの配列。

オリゴ名	オリゴ配列(5' から3' へ)	配列 番号
1opRF1 KR (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCtgaaCCaAGac GcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCC	140
1opRF1 KRR (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCtgaaCCacgacG cTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCC	141
1opRF1 KRK (OMAR)	GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCCtgaaCCcttacG cTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCC	142
3KR op-PCR (MAMA)	GCG ATC CCC TGA ACC AAG ACG C	143
3 KRR op-PCR (MAMA)	CGATCcCCtgaaCCacgacGc	144
3KRK op-PCR (MAMA)	TGCGATCcCCtgaaCCcttacGc	145
5 RF1 op-PCR (MAMA)	CGTGACGGGGATAACGAACGCC	146

【0153】

それらのゲノムにRF1の突然変異が首尾よく組み込まれた3つの組換え型細菌株を同定した。株SBHS015は、RF1のN296K/L297R二重突然変異型変異体を含有し、これを変異体A13と呼ぶ。株SBHS016は、RF1のN296K/L297R/L298R三重突然変異型変異体を含有し、これを変異体A18と呼ぶ。株SBHS017は、RF1のN296K/L297R/L298K三重突然変異型変異体を含有し、これを変異体A17と呼ぶ。3つすべての株は、親株SBJY001から誘導したので、インタクトOmpT1も発現する。それらの組換え株を溶解し、様々な期間（0、1、2および3時間）にわたってインキュベートしたとき、改変RF1タンパク質変異体は、ウェスタンブロット分析によって判定して、無細胞抽出物によって試験したすべての時点で効率的に切断された（データを示さない）。対照的に、株SBJY001による非改変、野生型RF1の切断は、同じ期間にわたって検出されなかった。これは、野生型RF1が、インタクトOmpT1を含有する無細胞抽出物において効率的に切断されないことを示す。

【0154】

この実施例は、組換え細菌株が、改変RF1変異体を発現するように操作されたこと、および前記RF1変異体が、OmpT1陽性株からの無細胞抽出物によって切断されたことを実証する。

【0155】

10

20

30

40

50

(実施例 3)

実施例 3 は、スイッチループ領域内に O m p T 1 切断部位を含むように改変されたインタクト R F 1 タンパク質が野生型 R F 1 機能を有することを実証する。

【0156】

組換え R F 1 変異体の機能試験

本明細書に記載する組換え R F 1 変異体の機能を試験するために、アンバーコドンで翻訳を終結させる R F 1 変異体の能力を判定した。T A G 突然変異を有する F c タンパク質は、S B H S 0 0 2 抽出物 (O m p T 欠失株) において 5 0 0 n M の精製組換え大腸菌野生型または突然変異型 R F 1 および 2 μ M 非天然アミノ酸の存在下で発現された。6 0 μ L 無細胞反応を 3 0 ° C で 5 時間、¹⁴ C - L e u の存在下で実行した。最終反応物を遠心分離して可溶性画分を得、還元 S D S - P A G E ゲルで泳動させ、P V D F 膜 (I n v i t r o g e n) に転写し、ホスホスクリーンに一晩曝露した。S t o r m I m a g e r を使用してそのホスホスクリーンを視覚化し、I m a g e Q u a n t を使用して相対バンド強度を判定した。短縮型 F c タンパク質の量と陰性対照 (外因性 R F 1 添加なし) および陽性対照 (W T R F 1 添加) と比較することにより、突然変異体の相対活性を判定した。式: (短縮型タンパク質カウント / 全タンパク質カウント) × 1 0 0 % を用いて、短縮型タンパク質パーセントを決定した。式: [(変異体短縮型タンパク質 - 陰性対照短縮型タンパク質) / (W T R F 1 短縮型タンパク質 - 陰性対照短縮型タンパク質)] × 1 0 0 % を用いて、相対 R F 1 活性を決定した。

【0157】

図 1 に示すように、本明細書に記載する R F 1 変異体は、F c タンパク質の位置 S 3 7 8 に導入されたアンバーコドンに非ネイティブアミノ酸 (p A z F) を組み込んだときの翻訳による短縮によって実証されるように、R F 1 活性を有する。特に、R F 1 変異体 A 1 3 (N 2 9 6 K / L 2 9 7 R 置換を有する) は、野生型 R F 1 と同様の活性レベルを有した。

【0158】

この実施例は、スイッチループ領域内に O m p T 切断部位を含むように改変されたインタクト R F 1 タンパク質が機能性 R F 1 活性 (例えば、アンバー抑制の低減) を有することを実証する。

【0159】

(実施例 4)

実施例 4 は、スイッチループ領域内に O m p T 1 切断部位を有する R F 1 変異体を含む無細胞抽出物を使用するハーセプチンタンパク質の I g G 重鎖への非天然アミノ酸の組み込み増加を実証する。前記無細胞抽出物は、実施例 2 に記載した細菌株からのものである。

【0160】

方法

ハーセプチン重鎖の部位特異的突然変異誘発

ハーセプチンの重鎖に n n A A を導入するために、ハーセプチンをコードする D N A テンプレートを、コーディング配列の異なる位置にアンバーコドンを導入するように突然変異させた。部位特異的突然変異誘発は、ハーセプチン 6 x H i s のコーディング領域を C 末端に含有する p Y D プラスミドを D N A テンプレートとして使用し、かつセンスおよびアンチセンス両方向にアンバーコドンを含む合成オリゴヌクレオチド (オペロン) (表 6) を使用して行った。各突然変異のオリゴヌクレオチドを、D N A テンプレートおよび P h u s i o n (登録商標) ポリメラーゼ (T h e r m o、カタログ番号 F 5 3 1 s) と、2 0 μ L の最終容量まで混合した。各成分の最終濃度は、1. 5 m M M g C l ₂ と 2 0 0 μ M d N T P とを含む H F バッファー (T h e r m o) 中、0. 1 6 μ M の各オリゴヌクレオチド、0. 5 n g / μ L テンプレート D N A、0. 0 2 U / μ L P h u s i o n (登録商標) ポリメラーゼであった。混合物を 9 8 ° C で 5 分間インキュベートし、1 8 P C R サイクル (9 8 ° C 3 0 秒、5 5 ° C 1 分、7 2 ° C 4 分)、7 2 ° C で 1 0 分

、そして16時間まで4℃で保管した。DpnI (NEB)をその混合物に0.6 U/μLの最終濃度まで添加し、37℃1時間インキュベートした。5 μLの各混合物を50 μLのケミカルコンピテント大腸菌細胞に、製造業者手順 (Invitrogen、MultiShot (商標) 96ウェルプレートTOP10)に従って形質転換させた。形質転換細胞を200 μL SOC (Invitrogen)中、37℃1時間、回復させ、50 μg/mLカナマイシンを補足したルリア・ベルターニ (LB) 寒天 (Teknova) に蒔いた。37℃で24時間後、Qpix2 (Genetix)を使用してコロニーを、7.5%グリセロールと50 μg/mLカナマイシンとを有する200 μLのLBに採取し、37℃で24時間成長させ、20 μLの培養物をローリングサークル増幅に使用し、そしてT7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'; 配列番号147) およびT7 term (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG-3'; 配列番号148) プライマー (Sequetech) を使用するプライマー伸長によってシーケンシングした。配列をシーケンサー (Gene Codes) によって分析した。

【表6】

表6. 示されているハーセプチン位置にアンバーコドンを導入するためのプライマー。

変異体	センスオリゴ(配列番号)	アンチセンスオリゴ(配列番号)
SP-00067_V422	CGTTGGCAGCAGGGTAATTAGTT CAGCTGCAGCGTTATG (149)	CATAACGCTGCAGCTGAACATA TTACCCTGCTGCCAACG (150)
SP-00127_S415	GCAAGCTGACCGTCGATAAATA GCGTTGGCAGCAGGGTAATG (151)	CATTACCCTGCTGCCAACGCTA TTTATCGACGGTCAGCTTGC (152)
SP-00128_Q418	CGATAAAAGCCGTTGGTAGCAG GGTAATGTGTTTCAG (153)	CTGAACACATTACCCTGCTACC AACGGCTTTTATCG (154)
SP-00114_P343	GCAAAGCGAAAGGCCAATAGCG TGAACCGCAGGTC (155)	GACCTGCGGTTACAGCTATTGG CCTTCGCTTTGC (156)
SP-00112_G341	GACGATCAGCAAAGCGAAATAG CAACCGCGTGAACCGCAG (157)	CTGCGGTTACGCGGTTGCTAT TTCGCTTTGCTGATCGTC (158)
SP-00102_K320	GCTGAATGGTAAAGAATACTAG TGCAAAGTGAGCAACAAGG (159)	CCTTGTTGCTCACTTTGCACTAG TATTCTTTACCATTTCAGC (160)
SP-00066_F404	CTGGACAGCGACGGTAGCTAGT TTCTGTATAGCAAGCTG (161)	CAGCTTGCTATACAGAACTAG CTACCGTCGCTGTCCAG (162)
SP-00113_Q342	GCAAAGCGAAAGGCTAGCCGCG TGAACCGCAG (163)	CTGCGGTTACGCGGCTAGCCT TTCGCTTTGC (164)
SP-00096_T299	GTGAGGAACAATACTAGCTA GTATCGCGTAGTGAGCGTGC (165)	GCACGCTCACTACGCGATACTA GCTATTGTATTGTTCTCCTCAC (166)
SP-00120_Y373	GGTGAAGGGCTTTTAGCCGAGC GACATCGC (167)	GCGATGTCGCTCGGCTAAAAGC CCTTCACC (168)
SP-00094_N297	CGCGTGAGGAACAATACTAGAG CACGTATCGCGTAGTG (169)	CACTACGCGATACGTGCTCTAG TATTGTTCTCAGCG (170)
SP-00125_F405	GACAGCGACGGTAGCTTCTAGCT GTATAGCAAGCTGAC (171)	GTCAGCTTGCTATACAGCTAGA AGCTACCGTCGCTGTC (172)

【0161】

抽出物調製

改変RF1変異体A18を有する大腸菌株SBHS016を40~55 ODの最終密度で回収し、Sharples Model AS14遠心分離機において10分間、14,000 gで遠心分離して使用済み培地を除去した。その細胞ペーストを6 mL/g細胞S30バッファー (14 mM MgAcO、60 mM KAcO、10 mM Tris) の比で均質に再浮遊させ、使用済み培地のさらなる除去のために前記Sharples AS14を使用して14,000 gで10分間、再び遠心分離した。得られた清澄細胞ペーストをS30に2 mL/g細胞の比で再浮遊させ、17,000 psiでのAvestin Emulsiflex C-55ホモジナイザーによるシングルパスによって細胞を溶解した。そのホモジネートを14,000 gでの2回の各30分間の遠心分離によって清澄化し、得られたペレットを廃棄した。得られた細胞抽出溶液を30℃で2時間インキュベートし、その後、微粒子除去のために前記Sharples AS14を使用して14,000 gで再び遠心分離した。この最終溶液をLN₂で凍結させ、無細胞タンパ

ク質合成に必要とされるまで -80°C で保管した。

【0162】

無細胞抽出物を室温に解凍し、 $50\mu\text{M}$ ヨードアセトアミドとともに30分間インキュベートした。 30% (v/v) ヨードアセトアミド処理抽出物とともに 8mM グルタミン酸マグネシウム、 10mM グルタミン酸アンモニウム、 130mM グルタミン酸カリウム、 35mM ピルビン酸ナトリウム、 1.2mM AMP、 0.86mM GMP、UMPおよびCMPの各々、 2mM アミノ酸（チロシンについては 1mM ）、 4mM シュウ酸ナトリウム、 1mM プトレッシン、 1.5mM スペルミジン、 15mM リン酸カリウム、 100nM T7 RNAP、 $2.5\mu\text{M}$ 大腸菌DsbC、 $5\mu\text{M}$ 酵母PDI、 2mM 酸化(GSSG)グルタチオンならびに $15\mu\text{M}$ 酵母tRNA pN3FアミノアシルtRNAを含有する、無細胞反応を、 30°C で10時間まで実行した。合成されたタンパク質を ^{14}C で標識するために、 3.33% (v/v) $1-[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -ロイシン ($300\text{mCi}/\text{ミリモル}$; GE Life Sciences、ニュージャージー州ピスカタウェイ)も反応に加えた。重鎖TAG変異型プラスミドおよび野生型軽鎖プラスミドの濃度は、それぞれ、 $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ および $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。対照として、野生型軽鎖の無細胞発現をTAG変異型と並行して行った。

10

【0163】

本発明者らの内部研究に基づいて、N297、T299、K320、G341、Q342、P343、Y373、F404、F405、S415、Q418およびV422を含む12の抑制困難な部位を、重鎖から選択した。相対的に高い抑制を有するS136を陽性対照として選択した。株SBJY001（野生型RF1を発現する）およびSBHS016（改変RF1を発現する）からの2つの細胞抽出物を使用して、これらの抑制困難な部位にnnAAを組み込む前記抽出物の能力を比較した。

20

【0164】

$60\mu\text{L}$ 無細胞反応を24ウェルプレートで実行した。無細胞反応が完了した後、TCA沈殿を行って、合成された全および可溶性タンパク質を測定した。並行して、オートラジオグラフィーアッセイのために非還元および還元ゲルがあった。非還元ゲルについては、 $4\mu\text{L}$ の試料、 $8\mu\text{L}$ のDI H_2O および $4\mu\text{L}$ の4X LDSバッファー (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を、ゲルに負荷する前に混合した。還元ゲルについては、 $4\mu\text{L}$ の試料、 $1\mu\text{L}$ の1M DTT、 $7\mu\text{L}$ のDI H_2O および $4\mu\text{L}$ の4X LDSバッファー (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を混合し、 70°C のホットブロックで5分間加熱した。 $4\sim 12\%$ Bis-Tris SDS-PAGEゲル (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)によりその製造業者の推奨に従って試料を分析した。ゲルを乾かし、約16時間の曝露後にStorm 840 PhosphorImagerを使用してオートラジオグラフィーによって分析した。

30

【数3】

$$\text{IgG収量} = \frac{\text{非還元ゲルからのIgG完全長バンド強度}}{\text{還元ゲルからのすべてのバンド強度の合計}} \times [\text{可溶性タンパク質}]$$

40

この式中のバンド強度は、ImageQuant（商標）ソフトウェアによって決定し、[可溶性タンパク質]は、TCA沈殿法によって推定した。

【0165】

重鎖の異なる部位のアンバーコドンの抑制を、還元SDS-PAGEゲルの ^{14}C -オートラジオグラフィーによって判定した。完全長野生型重鎖および抑制重鎖TAG変異体は、SDS-PAGEにおいて49Kdで泳動する。TAG変異体の非抑制（短縮型）重鎖は、より低い分子量で泳動する。

重鎖におけるTAGの抑制は、次の式によって予測される：

【数 4】

$$\text{抑制} = \frac{\text{抑制重鎖TAG変異体のバンド強度}}{\text{野生型重鎖のバンド強度}}$$

この式中のバンド強度は、Image Quant（商標）ソフトウェアによって決定する。

【0166】

精製のための材料を生成するために、反応を同じ条件下、10cmペトリ皿中、1mLに拡大した。

【0167】

tRNAの生産

すべてのtRNA^{phe}_{CUA}転写物の転写を次の条件下で行った：20～50ng/μL pYD318-tRNA^{phe} AAA-HDV-T7 trm、40mM NaCl、10mM MgCl₂、10mM DTT、4mM dNTP、2.5mM スペルミジン、1U/mL PPIase、2.5mg/mL T7 RNAポリメラーゼ、および40mM Tris (pH 7.9)。XK50/100カラムにおいてタンデムセファクリル100または300レジンを使用して、ゲル濾過クロマトグラフィーによって、tRNA分子を親RNAおよびHDVリボザイムRNA産物から分離した。サイズ分離カラムを50mM Tris (pH 6.5) および250mM NaCl中で展開した。tRNAを含有する画分をプールし、1/10容量の3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と混合し、等容量のイソプロパノールを添加してRNAを沈殿させた。tRNAをペレットとして保管するか、または10mM Tris (pH 6.5) および0.1mM EDTAに再懸濁させた。

【0168】

アミノアシル化反応で使用するためのtRNAを、100mM MES pH 5.5、10mM MgCl₂ および10mM 2-メルカプトエタノール中のT4ポリヌクレオチドキナーゼで1時間処理して、tRNAの3'末端の2', 3'-環状リン酸を除去して2', 3'-OH基を遊離させる。T4 PNK処理tRNAをフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール抽出し、無機リン酸塩および過剰なフェノールを除去するG25カラムを使用してバッファー交換した。tRNAをイソプロパノールまたはエタノール沈殿させ、10mM Tris (pH 6.5) および0.1mM EDTAに再懸濁させた。tRNAを20分間、70℃に加熱することによって、tRNAをリフォルディングさせた。その後、10mM MgCl₂を添加し、その混合物をゆっくりと室温に平衡させた。

【0169】

tRNA転写物のHDVリボザイム切断は、相同3'末端を生じさせながら、後続のアミノアシル化に干渉する2'-3'環状リン酸部分を遊離する。これを、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (PNK) を使用して除去できることが判明した。40μM tRNAを、37℃で、50mM MES (pH 5.5)、10mM MgCl₂、300mM NaCl および0.1mM EDTA中、0.050mg/mL PNKとともにインキュベートした。脱リン酸化を2つの異なる方法によってアッセイした。変性ゲル電気泳動を用いて脱リン酸化を確認した。報告されているように、脱リン酸化tRNAは、酸/尿素ゲル電気泳動において低減された移動度を有する。3μgの脱リン酸化tRNAを含有するアリコートローディングバッファー (100mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、7M 尿素、1mg/mL ブロモフェノールブルー染料) で2倍希釈し、6.5% 19:1 アクリルアミド、100mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、7M 尿素ゲル (40cm×34cm) に負荷し、40Wで一晩、電気泳動させた。0.06%メチレンブルー、0.5M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を使用して30分間、ゲルを染色し、脱イオン水で脱染した。両方のアッセイが、ほんの5分後に有意な脱リン酸化を示した。脱リン酸化は、1時間後に本質的に完了し、70℃への加熱および10mM MgCl₂

10

20

30

40

50

の添加によって tRNA をリフォールディングさせ、その後、ゆっくりと室温に冷却した。Nano-Drop 1000 分光光度計 (Thermo Scientific) を使用して RNA 濃度を測定し、ゲル電気泳動によって確認した。

【0170】

アンバーサプレッサー tRNA アミノアシル化

非天然アミノアシル化についての条件は、50 mM HEPES pH 8.1、40 mM KCl、75 mM MgCl₂、5 mM ATP、8~40 μM tRNA^{P^he_CU_A}、10 mM DTT、2 mM アミノ酸 (pN₃F)、および 40 μM PheRS T415A D243A である。tRNA^{P^he_CU_A} のアミノアシル化パーセントの決定を、tRNA のアミノアシル化された部分とアミノアシル化されていない部分の HPLC/HIC 分割によって遂行した。この方法により、本発明者らは、本発明者らの tRNA のアミノアシル化度を、tRNA を処理した後にタンパク質への組み込みの準備が整うと、モニターすることができる。反応を 37℃ で 15 分間インキュベートし、2.5 容量の 300 mM 酢酸ナトリウム pH 5.5 で失活させる。失活した試料を 25:24:1 フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール pH 5.2 (ambion) で抽出し、2 分間、ボルテックスにかける。その後、これらを 14,000 rcf で 10~30 分間、4℃ で遠心分離して、水性相 (tRNA) と有機相 (タンパク質) を分離する。水性相 (tRNA を含有) を除去し、そして、分子サイズに基づいて分離する、前平衡 (300 mM NaOAc) G25 セファデックスレジンサイズ排除カラムにそれを添加する。溶出物を 2.5 容量の 100% エタノールと混合し、-80℃ で 15~30 分間インキュベートし、12,000~14,000 rcf で 30~45 分間、遠心分離する。今やアミノアシル化 tRNA はペレット状態であり、それを -80℃ で保管するか、または HPLC への注入および/もしくは OCF S 反応での使用のためにわずかに酸性のバッファーに再懸濁させる。

【0171】

HPLC C5 HIC カラムをバッファー A (50 mM リン酸カリウムおよび 1.5 M 硫酸アンモニウム pH 5.7) 中で、UV トレースがゼロから変動しなくなるまで平衡させる。1~10 μg tRNA を 100 μL の 2X バッファー A (100 mM リン酸カリウムおよび 3 M 硫酸アンモニウム) と混合する。その試料を注入し、50 分にわたってバッファー A からバッファー B (50 mM リン酸カリウムおよび 5% イソプロパノール) への勾配で実行する。

【0172】

turboGFP TAG 突然変異体への pN₃F の組み込み:

アンバーコドン (終止コドン) がある構築物中の緑色蛍光タンパク質の蛍光をモニターするために、turboGFP (Evrogen、ロシア) をコードする DNA を本発明者らの OCF S 発現ベクター pYD317 にクローニングした。turboGFP (pdb 2G6X) の結晶構造に従ってアミノ酸リジン 37、チロシン 50 およびグルタメート 205 (および組み合わせ) に対応するヌクレオチドにオーバーラッピング PCR 突然変異誘発によって終止コドン (TAG) を挿入した。したがって、チャージされた tRNA での終止コドンのいかなる抑制も蛍光をもたらすことになる。30℃ で、蛍光光度計 (Molecular Devices、SpectraMax M5) の中で、5 時間、接着カバー (VWR、9503130) をして反応物をインキュベートし、10 分間隔、λ_E_x = 476 nm および λ_E_m = 510 で蛍光強度を測定した。DEPC 処理水 (Gibco sciences、786-109) 中の 30% S30 抽出物、24 μg/mL T7 RNA ポリメラーゼ、1 mM L-チロシン (Sigma、T8566)、プレミックス*、10~60 μM pN₃F-tRNA^{P^he_CU_A} またはチャージされていない tRNA^{P^he}、および 3 nM turboGFP プラスミドを含有する、25 μL 最終反応容量のための阻害剤とともに、OCF S 反応ミックスを直ちにマイクロプレートに添加した。以前に観察された同様の速度で反応が確実に進行するように、終止コドンを有さない turboGFP を使用する陽性対照反応を用いた一方で、蛍光が確実に検出され

ないように、t u r b o G F P Y 5 0 T A G を含有反応を t R N A なしも実行した（陰性対照）。陽性対照蛍光とアンバーコドン含有テンプレート蛍光との比較によって、抑制効率を算出した。

【0173】

図2に示すように、O m p T 1 と野生型 R F - 1 とを発現する S B J Y 0 0 1 無細胞抽出物における I g G 重鎖 T A G 変異体の発現は、可溶性完全長 I g G の相対的に不良な収率をもたらした。対照的に、O m p T 1 と三重置換 N 2 9 6 K / L 2 9 7 R / L 2 9 8 R を含有する改変 R F - 1 タンパク質（変異体 A 1 8 ）とを発現する S B H S 0 1 6 無細胞抽出物における I g G 重鎖 T A G 変異体の発現は、完全長 I g G の相対的に高い収率をもたらした。さらに、図3に示すように、S B J Y 0 0 1 無細胞抽出物における I g G 重鎖 T A G 変異体の発現は、相対的に不良なアンバー抑制をもたらした（すなわち、重鎖タンパク質が短縮された）。対照的に、S B H S 0 1 6 無細胞抽出物における I g G 重鎖 T A G 変異体の発現は、図2において観察された完全長 I g G の実質的に高い収率に対応する、相対的に高いアンバー抑制をもたらした（すなわち、はるかに少ない重鎖タンパク質が短縮された）。

【0174】

この実施例は、R F 1 の O m p T 1 切断が、O m p T 1 により切断可能でないインタクト R F 1 と比較して、コーディング配列内のアンバーコドンに所望の n n A A を含む重鎖の収率の劇的な向上をもたらすことを実証する。

【0175】

本明細書に記載する実施例および実施形態が単に例証のためのものであること、ならびにそれらの実施例および実施形態にかんがみて様々な改変形態または変更形態が当業者に示唆されることになり、およびそれらの改変形態または変更形態が本出願の精神および権限ならびに添付のクレームの範囲に含まれることは、理解される。本明細書において引用するすべての出版物、配列受託番号、特許および特許出願は、あらゆる目的でそれら全体が参照により本明細書に援用されている。

【0176】

（配列表）

配列番号1

大腸菌（*Escherichia coli*）放出因子1 (RF1)

MKPSIVAKLEALHERHEEVQALLGDAQTIADQERFRALSREYAQLSDVSRCTDWQQVQEDIETAQMMLDDPEMREMAQD
ELREAKEKSEQLEQQLQVLLLPKDPDDERNAFLVVRAGTGGDEAALFAGDLFRMYSRYAEARRWRVEIMSAASEGEHGGYK
EIIAKISGDGVYGRLLKFESGGHRVQRPATESQGRIHSTACTVAVMPELPDAELPDINPADLRIDTFRSSGAGGQHVNTT
DSAIRITHLPTGIVVEQCQDERSQHKNKAKALSVLGARIHAAEMAKRQQAESTRRNLLGSGDRSDRNRTYNFPQGRVTDH
RINLTLYRLDEVMEGKLDMLIEPIIQEHQADQLAALSEQE

配列番号2

大腸菌放出因子2(RF2)

MFEINPVNNRIQDLTERSDVLRGYLDYDAKKERLEEVENAELEQPDVWNEPERAQALGKERSSLEAVVDTLDQMKQGLEDV
SGLLELAVEADDEETFNEAVAELDALEEKLAQLEFRRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQDWASMLERMYLRWAESRG
FKTEIIIESEGEVAGIKSVTIKISGDYAYGWLRTETGVHRLVRKSPFDSGGRRHTSFSSAFVYPEVDDDDIDIEINPADLR
IDVYRTSGAGGQHVNRTESAVRITHIPTGIVTQCQNDRSQHKNKDQAMKQMKAKLYELEMQKKNAEKQAMEDNKSIDIGW
SQIRSYVLDDSRIKDLRTGVETRNTQAVLDGSLDQFIEASLKAGL

配列番号3

大腸菌外膜タンパク質T1(OmpT) (シグナルペプチドに下線を引く)

MRAKLLGIVLTTPIAISSFASTETLSFTPDNINADISLGTLSGKTKERVYLAEEGGRKVSQLDWKFNNAAIIKGAINWDL
MPQISIGAAGWTTLGSRGGMVDQDWMSSNPGTWTDESHPDTQLNYANEFDLNKGWLLNEPNYRLGLMAGYQESRYS
FTARGGSYIYSSEEGFRDDIGSFNGERAIGYKQRFKMPYIGLTGSYRYEDFELGGTFKYSGWVESSDNDEHYDPGKRIT
YRSKVKDQNYYSVAVNAGYYVTPNAKVYVEGAWNVRVTNKKGNTSLYDHNNNTSDYSKNGAGIENYNFITTAGLKYTF

配列番号4

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304
QQAEASTRRNLLGSGDRS

【化 1】

配列番号 5

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K 突然変異
QQAEASTRRKLLGSGDRS

配列番号 6

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296R 突然変異
QQAEASTRRRLLGSGDRS

10

配列番号 7

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における L297K 突然変異
QQAEASTRRNKLGSGDRS

配列番号 8

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における L297R 突然変異
QQAEASTRRNRLGSGDRS

20

配列番号 9

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における L297V 突然変異
QQAEASTRRNVLGSGDRS

配列番号 10

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における L298K 突然変異
QQAEASTRRNLKGSGDRS

30

配列番号 11

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における L298R 突然変異
QQAEASTRRNLRGSGDRS

配列番号 12

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K,L297K 突然変異
QQAEASTRRKKLGSGDRS

40

配列番号 13

【化 2】

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K,L297R=A13突然変異
QQAEASTRRKRLGSGDRS

配列番号 14

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K,L297V 突然変異
QQAEASTRRKVLGSGDRS

10

配列番号 15

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K,L297V 突然変異
QQAEASTRRRRLGSGDRS

配列番号 16

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296R,L297R 突然変異
QQAEASTRRRRRLGSGDRS

20

配列番号 17

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296R,L297V 突然変異
QQAEASTRRRVLGSGDRS

配列番号 18

放出因子1(RF1)のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304における N296K,L297K,L298K 突然
変異
QQAEASTRRKKKGSGDRS

30

【化 3】

配列番号 19

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296K,L297K,L298R突然変異

QQAEASTRRKKRGSGDRS

配列番号 20

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296K,L297R,L298K = A17突然変異

QQAEASTRRKRKGSGDRS

10

配列番号 21

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296K,L297R,L298R = A18突然変異

QQAEASTRRKRRGSGDRS

20

配列番号 22

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296R,L297R,L298R突然変異

QQAEASTRRRRRGSGDRS

30

配列番号 23

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296R,L297K,L298R突然変異

QQAEASTRRRKRGSGDRS

配列番号 24

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296R,L297R,L298K突然変異

QQAEASTRRRRKGSGDRS

40

【化 4】

配列番号25

放出因子1 (RF1) のスイッチループ領域であるアミノ酸287から304におけるN296R,L297K,L298K突然変異

QQAEASTRRRKKGSGDRS

配列番号26

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QARRGSTRNLLGSGDRS

10

配列番号27

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQARRGTRNLLGSGDRS

配列番号28

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAARRGRNLLGSGDRS

20

配列番号29

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEARRGRNLLGSGDRS

配列番号30

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEAAARRGNLLGSGDRS

30

配列番号31

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASARRGLLGSGDRS

配列番号32

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTARRGLGSGDRS

40

配列番号33

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRARRGGSGDRS

配列番号34

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

50

QQAEASTRRARRGSGDRS

配列番号35

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNARRGGDRS

配列番号36

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNLARRGGDRS

10

配列番号37

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNLLARRGRS

配列番号38

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNLLGARRGS

20

配列番号39

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNLLGSARRG

配列番号40

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEASTRRNLLGSGARR

30

配列番号41

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAWLAARRGRGGSGDRS

配列番号42

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEWLAARRGRGGSGDRS

40

配列番号43

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEAWLAARRGRGGSGDRS

配列番号44

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

50

QQWGGRWARKKGTIGDRS

配列番号45

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAWGGRWARKKGTIDRS

配列番号46

放出因子1 (RF1) のスイッチループであるアミノ酸287から304に挿入されたOmpT切断ペプチド配列

QQAEWGGRWARKKGTIRS

配列番号47

OmpT切断ペプチド

ARRG

配列番号48

OmpT切断ペプチド

WLAARRGRG

配列番号49

OmpT切断ペプチド

WGGRWARKKGTI

配列番号50

ショートフォームのλファージGamタンパク質 (GamS) のC末端配列

GGSHHHHHH

配列番号51

ショートフォームのλファージGamタンパク質 (GamS) 遺伝子増幅プライマー

ATATATCATATGAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTGAG

配列番号52

ショートフォームのλファージGamタンパク質 (GamS) 遺伝子増幅プライマー

ATATATGTCGACTTAATGATGATGATGATGATGAGAACCCCTACCTCTGAATCAATATCAACCTGGTGGTG

配列番号53

T7プロモーターとN末端配列の定常領域と突然変異部位とを含む5'断片

第1ステップPCR増幅プライマー5' χT2PT7

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGG

配列番号54

突然変異部位、定常C末端領域、およびT7ターミネーター配列とを含む3'断片

第1ステップPCR増幅プライマー3' χT2TT7

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGGCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGC

配列番号55

オーバーラッピングPCRによる5'断片および3'断片構築のための単一プライマー5'

χT2

GCGTACTAGCGTACCACGTGGCTGGTGG

10

20

30

40

50

配列番号56

W T R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GCTCGATGATCCTGAAATGCGTGAGATGGCGCAGG

配列番号57

M 7 4 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GCTCGATGATCCTGAACGCCGTGAGATGGCGCAGG

配列番号58

E 7 6 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CGATGATCCTGAAATGCGTAAGATGGCGCAGGATGAAC

10

配列番号59

E 8 4 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CAGGATGAACTGCGCAAAGCTAAAGAAAAAGCGAGCAAC

配列番号60

A 8 5 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CAGGATGAACTGCGCAACGTAAAGAAAAAGCGAGCAAC

20

配列番号61

E 8 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GGATGAACTGCGCGAAGCTAAACCGTAAAAAGCGAGCAACTGGAAC

配列番号62

E 1 0 8 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GCCAAAAGATCCTGATGACCGTCGTAACGCCTTCCTCG

配列番号63

T 2 9 3 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CAACAGGCCGAAGCGTCTCGCCGTCTAACCTGC

30

配列番号64

N 2 9 6 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GCGTCTACCCGTCGTAAACTGTGTTGGGAGTGGCG

配列番号65

S 3 0 4 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
GGGAGTGGCGATCGCAAGGACCGTAACCGTACTTAC

40

配列番号66

N 2 9 6 K / L 2 9 7 V R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

配列番号67

N 2 9 6 K / L 2 9 7 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー
CGAAGCGTCTACCCGTCGTAAAAAGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

50

配列番号68

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CGAAGCGTCTACCCGTCGTTAAACGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

配列番号69

N 2 9 6 R / L 2 9 7 V R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CGAAGCGTCTACCCGTCGTTCGCGTTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

10

配列番号70

N 2 9 6 R / L 2 9 7 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCAAGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

配列番号71

N 2 9 6 R / L 2 9 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCCGTCTGGGGAGTGGCGATCGCAGC

20

配列番号72

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R / L 2 9 8 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTTAAACGTAAGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC

配列番号73

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R / L 2 9 8 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングフォワードプライマー

CAGGCCGAAGCGTCTACCCGTCGTTAAACGTCGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACC

30

配列番号74

W T R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリバースプライマー

CCTGCGCCATCTCACGCATTTTCAGGATCATCGAGC

配列番号75

M 7 4 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリバースプライマー

CCTGCGCCATCTCACGGCGTTCAGGATCATCGAGC

配列番号76

E 7 6 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリバースプライマー

GTTTCATCCTGCGCCATCTTACGCATTTTCAGGATCATCG

40

配列番号77

E 8 4 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリバースプライマー

GTTGCTCGCTTTTTTCTTTAGCTTTGCGCAGTTCATCCTG

配列番号78

A 8 5 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリバースプライマー

GTTGCTCGCTTTTTTCTTTACGTTTCGCGCAGTTCATCCTG

50

配列番号79

E 8 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GTTCCAGTTGCTCGCTTTTACGTTTAGCTTCGCGCAGTTCATCC

配列番号80

E 1 0 8 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
CGAGGAAGGCGTTACGACGGCATCAGGATCTTTTGGC

配列番号81

T 2 9 3 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCAGGTTACGACGGCGGAGACGCTTCGGCCTGTTG

10

配列番号82

N 2 9 6 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
CGCCACTCCCCAGCAGTTTACGACGCGGTAGACGC

配列番号83

S 3 0 4 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GTAAGTACGGTTACGGTCTTGCGATCGCCACTCCC

20

配列番号84

N 2 9 6 K / L 2 9 7 V R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACTTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

配列番号85

N 2 9 6 K / L 2 9 7 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

30

配列番号86

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCG

配列番号87

N 2 9 6 R / L 2 9 7 V R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGAACGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

40

配列番号88

N 2 9 6 R / L 2 9 7 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCTTGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

配列番号89

N 2 9 6 R / L 2 9 7 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーングリバースプライマー
GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACGGCGACGACGGGTAGACGCTTCG

50

配列番号90

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R / L 2 9 8 K R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリ
バースプライマー

GGTCGCTGCGATCGCCACTCCCGCTTACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG

配列番号91

N 2 9 6 K / L 2 9 7 R / L 2 9 8 R R F 1 変異体 O m p T 切断部位スクリーニングリ
バースプライマー

GGTCGCTGCGATCGCCACTCCCGCGACGTTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTG

配列番号92

番号0 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号93

番号1 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

CGCCGTGGTTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号94

番号2 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCACGCCGTGGTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号95

番号3 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGCACGCCGTGGTTCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号96

番号4 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCACGCCGTGGTTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号97

番号5 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGGCACGCCGTGGTAACTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号98

番号6 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTGCACGCCGTGGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号99

番号7 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTCACGCCGTGGTCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号100

番号8 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTGCACGCCGTGGTGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号101

番号9 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTGCACGCCGTGGTAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

10

20

30

40

50

配列番号102

番号10 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACGCACGCCGTGGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号103

番号11 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGGCAGGCCGTGGTGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号104

番号12 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGCAGGCCGTGGTTCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

10

配列番号105

番号13 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGGCACGCCGTGGTAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号106

番号14 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGCACGCCGTGGTGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

20

配列番号107

番号15 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTAACCTGCTGGGGAGTGGCGCACGCCGTGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号108

番号16 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTCTACCCGTCGTCGCTGCTGGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号109

番号17 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCTGGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

30

配列番号110

番号18 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAATGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCTGGCAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号111

番号19 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCGAAGCGTGGCTGGCAGCGCGTCGCGGTCTGGCGGGAGTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

40

配列番号112

番号20 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

TGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTACTATTGGCGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号113

番号21 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

GCCTGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTACTATTGATCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTCCCG

配列番号114

番号22 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入フォワードオリゴプライマー

50

GCCGAATGGGGTGGCCGTTGGGCTCGCAAGAAAGGTACTATTTCGCAGCGACCGTAACCGTACTTACAACCTTCCCG

配列番号115

番号0 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号116

番号1 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGAAACCACGGCGTGCTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号117

番号2 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTACCACGGCGTGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号118

番号3 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGACCACGGCGTGCGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号119

番号4 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACCACGGCGTGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号120

番号5 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGGTTACCACGGCGTGCCGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号121

番号6 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGACCACGGCGTGCAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号122

番号7 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGACCACGGCGTGCGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号123

番号8 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCACCACGGCGTGCACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号124

番号9 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTACCACGGCGTGCACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号125

番号10 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACCACGGCGTGCCTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号126

番号11 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバースオリゴプライマー

GCTGCGATCACCACGGCGTGCCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

10

20

30

40

50

配列番号127

番号12 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGACCACGGCGTGCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号128

番号13 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTACCACGGCGTGCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号129

番号14 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

ACCACGGCGTGCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号130

番号15 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

ACGGCGTGCGCCACTCCCCAGCAGGTTACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号131

番号16 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCAGCAGACGACGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号132

番号17 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTCCCCGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCAGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号133

番号18 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCACTGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCATTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号134

番号19 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCGCCACGACCGCGACGCGCTGCCAGCCACGCTTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号135

番号20 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCGCCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCACTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号136

番号21 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGATCAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCAAGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号137

番号22 R F 1 変異体 O m p T 切断ペプチド挿入リバーソオリゴプライマー

GCTGCGAATAGTACCTTTCTTGCGAGCCCAACGGCCACCCCATTCGGCCTGTTGGCGTTTTGCCATTTTCAGCAGC

配列番号138

R F 1 増幅プライマー 5 H i s - R F 1

CATATGCATCACCATCACCATCAGGTGGTGGCTCTAAGCCTTCTATCGTTGCCAAACTGGAAGCC

配列番号139

R F 1 増幅プライマー 3 R F 1

10

20

30

40

50

GTGCGACTTATTCCTGCTCGGACAACGCCGCCAG

配列番号140

オリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換 (OMAR) PCRオリゴ1 o p R F 1 K R
GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCaAGacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTG
GCGTTTTGCC

配列番号141

オリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換 (OMAR) PCRオリゴ1 o p R F 1 K R R
GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCacgacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTG
GCGTTTTGCC 10

配列番号142

オリゴヌクレオチド媒介対立遺伝子置換 (OMAR) PCRオリゴ1 o p R F 1 K R K
GGGAAGTTGTAAGTACGGTTACGGTCGCTGCGATCcCctgaaCCcttacGcTTtCGACGGGTAGACGCTTCGGCCTGTTG
GCGTTTTGCC

配列番号143

ミスマッチ増幅突然変異アッセイ (MAMA) PCRオリゴ3 K R o p - P C R
GCG ATC CCC TGA ACC AAG ACG C 20

配列番号144

ミスマッチ増幅突然変異アッセイ (MAMA) PCRオリゴ3 K R R o p - P C R
CGATCcCctgaaCCacgacGc

配列番号145

ミスマッチ増幅突然変異アッセイ (MAMA) PCRオリゴ3 K R K o p - P C R
TGCGATCcCctgaaCCcttacGc

配列番号146

ミスマッチ増幅突然変異アッセイ (MAMA) PCRオリゴ5 R F 1 o p - P C R
CGTGACGGGGATAACGAACGCC 30

配列番号147

ローリングサークル増幅およびプライマー伸長シーケンシングプライマー T 7
TAATACGACTCACTATAGG

配列番号148

ローリングサークル増幅およびプライマー伸長シーケンシングプライマー T 7 t e r
m 40
GCTAGTTATTGCTCAGCG

配列番号149

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 6 7 _ V 4 2 2 センスオリゴ
CGTTGGCAGCAGGGTAATTAGTTCAGCTGCAGCGTTATG

配列番号150

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 6 7 _ V 4 2 2 アンチセンスオリゴ
CATAACGCTGCAGCTGAACTAATTACCCTGCTGCCAACG

配列番号151

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 7 _ S 4 1 5 センスオリゴ
GCAAGCTGACCGTCGATAAATAGCGTTGGCAGCAGGGTAATG

配列番号152

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 7 _ S 4 1 5 アンチセンスオリゴ
CATTACCCTGCTGCCAACGCTATTTATCGACGGTCAGCTTGC

配列番号153

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 8 _ Q 4 1 8 センスオリゴ
CGATAAAAGCCGTTGGTAGCAGGGTAATGTGTTTCAG

10

配列番号154

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 8 _ Q 4 1 8 アンチセンスオリゴ
CTGAACACATTACCCTGCTACCAACGGCTTTTATCG

配列番号155

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 4 _ P 3 4 3 センスオリゴ
GCAAAGCGAAAGGCAATAGCGTGAACCGCAGGTC

20

配列番号156

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 4 _ P 3 4 3 アンチセンスオリゴ
GACCTGCGGTTACGCTATTGGCCTTTTCGCTTTTC

配列番号157

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 2 _ G 3 4 1 センスオリゴ
GACGATCAGCAAAGCGAAATAGCAACCGCGTGAACCGCAG

配列番号158

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 2 _ G 3 4 1 アンチセンスオリゴ
CTGCGGTTACGCGGTTGCTATTTTCGCTTTGCTGATCGTC

30

配列番号159

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 0 2 _ K 3 2 0 センスオリゴ
GCTGAATGGTAAAGAATACTAGTGCAAAGTGAGCAACAAGG

配列番号160

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 0 2 _ K 3 2 0 アンチセンスオリゴ
CCTTGTTGCTCACTTTGCACTAGTATTCTTTACCATTCAGC

40

配列番号161

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 6 6 _ F 4 0 4 センスオリゴ
CTGGACAGCGACGGTAGCTAGTTTCTGTATAGCAAGCTG

配列番号162

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 6 6 _ F 4 0 4 アンチセンスオリゴ
CAGCTTGCTATACAGAACTAGCTACCGTCGCTGTCCAG

配列番号163

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 3 _ Q 3 4 2 センスオリゴ

50

GCAAAGCGAAAGGCTAGCCGCGTGAACCGCAG

配列番号164

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 1 3 _ Q 3 4 2 アンチセンスオリゴ
CTGCGGTTACGCGGCTAGCCTTTCGCTTTGC

配列番号165

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 9 6 _ T 2 9 9 センスオリゴ
GTGAGGAACAATACAATAGCTAGTATCGCGTAGTGAGCGTGC

10

配列番号166

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 9 6 _ T 2 9 9 アンチセンスオリゴ
GCACGCTCACTACGCGATACTAGCTATTGTATTGTTTCCTCAC

配列番号167

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 0 _ Y 3 7 3 センスオリゴ
GGTGAAGGGCTTTTAGCCGAGCGACATCGC

配列番号168

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 0 _ Y 3 7 3 アンチセンスオリゴ
GCGATGTCGCTCGGCTAAAAGCCCTTCACC

20

配列番号169

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 9 4 _ N 2 9 7 センスオリゴ
CGCGTGAGGAACAATACTAGAGCACGTATCGCGTAGTG

配列番号170

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 0 9 4 _ N 2 9 7 アンチセンスオリゴ
CACTACGCGATACGTGCTCTAGTATTGTTCTCCTCACGCG

30

配列番号171

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 5 _ F 4 0 5 センスオリゴ
GACAGCGACGGTAGCTTCTAGCTGTATAGCAAGCTGAC

配列番号172

部位特異的突然変異誘発変異体 S P - 0 0 1 2 5 _ F 4 0 5 アンチセンスオリゴ
GTCAGCTTGCTATACAGCTAGAAGCTACCGTCGCTGTC

(項目1) 外膜タンパク質 T 1 (O m p T 1) によって切断可能である機能性放出因子 1 タンパク質 (R F 1) であって、切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合が、野生型 R F 1 (配列番号1) のアミノ酸 2 8 7 ~ 3 0 4 に対応するスイッチループ領域内に位置し、
および前記スイッチループ領域が、p H 7 . 0 で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、R F 1 タンパク質。

40

(項目2) 前記2つの隣接する塩基性アミノ酸が、アルギニンおよびリジンを含む群から独立して選択される、項目1に記載の R F 1 タンパク質。

(項目3) 前記スイッチループ領域が、3つの隣接する塩基性アミノ酸を有するように改変される、項目1に記載の R F 1 タンパク質。

(項目4) 位置 2 9 6 のネイティブアスパラギンが、前記3つの隣接する塩基性アミノ酸のうちの1つの代わりとなる、項目3に記載の R F 1 タンパク質。

(項目5) 前記改変タンパク質および野生型タンパク質が O m p T 1 を発現する細菌からの無細胞抽出物中に同様の濃度で存在するとき、O m p T 1 による切断活性が、3 0 ° C

50

で30分後、野生型RF1（配列番号1）の50%より大きい、項目1に記載のRF1タンパク質。

（項目6） 前記スイッチループ領域が、
【化5】

QQAEEASTRRKLLGSGDRS (N296K) (配列番号5),
QQAEEASTRRRLGSGDRS (N296R) (配列番号6),
QQAEEASTRRNKLGSGDRS (L297K) (配列番号7),
QQAEEASTRRNRLGSGDRS (L297R) (配列番号8),
QQAEEASTRRNVLGSGDRS (L297V) (配列番号9),
QQAEEASTRRNLKGSGDRS (L298K) (配列番号10),
QQAEEASTRRNLRGSGDRS (L298R) (配列番号11),
QQAEEASTRRKKLGSGDRS (N296K,L297K) (配列番号12),
QQAEEASTRRKRLGSGDRS (N296K,L297R = A13) (配列番号13),
QQAEEASTRRKVLGSGDRS (N296K,L297V) (配列番号14),
QQAEEASTRRRKLGSGDRS (N296R,L297K) (配列番号15),
QQAEEASTRRRLGSGDRS (N296R,L297R) (配列番号16),
QQAEEASTRRRVLGSGDRS (N296R,L297V) (配列番号17),
QQAEEASTRRKKKGSGDRS (N296K,L297K,L298K) (配列番号18),
QQAEEASTRRKKRGSGDRS (N296K,L297K,L298R) (配列番号19),
QQAEEASTRRKRKGSGDRS (N296K,L297R,L298K = A17) (配列番号20),
QQAEEASTRRKRRGSGDRS (N296K,L297R,L298R = A18) (配列番号21),
QQAEEASTRRRRRGSGDRS (N296R,L297R,L298R) (配列番号22),
QQAEEASTRRRKRGSGDRS (N296R,L297K,L298R) (配列番号23),
QQAEEASTRRRRKGSGDRS (N296R,L297R,L298K) (配列番号24), および
QQAEEASTRRRKKGSGDRS (N296R,L297K,L298K) (配列番号25)

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目1に記載のRF1タンパク質。

（項目7） 前記スイッチループ領域が、

10

20

30

【化 6】

QARRGSTRRNLLGSGDRS (配列番号 26);
 QQARRGTRRNLLGSGDRS (配列番号 27);
 QQAARRGRRNLLGSGDRS (配列番号 28);
 QQAEARRGRNLLGSGDRS (配列番号 29);
 QQAEAAARRGNLLGSGDRS (配列番号 30);
 QQAEASARRGLLGSGDRS (配列番号 31);
 QQAEASTARRGLGSGDRS (配列番号 32);
 QQAEASTRARRGGSGDRS (B8) (配列番号 33);
 QQAEASTRRARRGSGDRS (B9) (配列番号 34);
 QQAEASTRRNARRGGDRS (配列番号 35);
 QQAEASTRRNLARRGDRS (配列番号 36);
 QQAEASTRRNLLARRGRS (B12) (配列番号 37);
 QQAEASTRRNLLGARRGS (配列番号 38);
 QQAEASTRRNLLGSARRG (配列番号 39); および
 QQAEASTRRNLLGSGARR (配列番号 40)

10

20

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 8) 前記スイッチループ領域が、
 【化 7】

QQAWLAARRGRGGSGDRS (B17) (配列番号 41);
 QQAEWLAARRGRGGSGDRS (配列番号 42);
 QQAEAWLAARRGRGGDRS (配列番号 43);
 QQWGGRWARKKGTIGDRS (B20) (配列番号 44);
 QQAWGGRWARKKGTIDRS (B21) (配列番号 45); および
 QQAEWGGRWARKKGTIRS (B22) (配列番号 46)

30

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 9) 前記スイッチループ領域が、
 【化 8】

QQAEASTRRKRLGSGDRS (N296K,L297R = A13) (配列番号 13),
 QQAEASTRRKRKGGSGDRS (N296K,L297R,L298K = A17) (配列番号 20),
 QQAEASTRRKRRGSGDRS (N296K,L297R,L298R = A18) (配列番号 21), および
 QQAWLAARRGRGGSGDRS (B17) (配列番号 41)

40

から成る配列の群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 に記載の R F 1 タンパク質。

(項目 10) 外膜タンパク質 T 1 (O m p T 1) と切断しやすい O m p T 1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であっ

50

て、前記結合が、前記タンパク質が複合体を形成していないとき少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ の B 因子を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが、pH 7.0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目 11) 外膜タンパク質 T1 (Omp T1) と切断しやすい Omp T1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であって、前記結合が、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ の間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内にある前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが、pH 7.0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目 12) 外膜タンパク質 T1 (Omp T1) と切断しやすい Omp T1 ペプチド結合を含むように組換え改変された必須標的タンパク質との両方を発現する細菌細胞であって、前記結合が、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にあり、およびそのネイティブモチーフが、pH 7.0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、細菌細胞。

(項目 13) 前記必須標的タンパク質が、RF1、RF2、RNase、プロテアーゼ、チオレドキシシンレダクターゼ、グルタレドキシシンレダクターゼ、グルタチオンレダクターゼ、アミノ酸分解酵素、ポリリン酸キナーゼ、および低温ショックタンパク質から成る群より選択される、項目 10～12 に記載の細菌細胞。

(項目 14) 前記細菌細胞が大腸菌 (E. coli) である、項目 10～12 に記載の細菌細胞。

(項目 15) インビトロ無細胞合成システムにおける改変必須標的タンパク質の有害な活性を低減させるための方法であって、

i) 前記改変必須標的タンパク質を発現する Omp T1 陽性細菌を培養するステップであって、前記タンパク質が、切断しやすい Omp T1 ペプチド結合を含むように改変され、該タンパク質が、pH 7.0 で正に荷電する 2 つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されるものであるステップ；

ii) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

iii) 前記必須標的タンパク質を、インタクトタンパク質を 50% 低減させるために十分な量の Omp T1 と接触させるステップ；

iv) 目的のタンパク質をコードする核酸テンプレートを前記抽出物に添加するステップ；および

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含む方法。

(項目 16) 前記切断しやすい Omp T1 ペプチド結合が、前記タンパク質が複合体を形成していないときに少なくとも $50 \text{ \AA}^2$ の B 因子を有する表面露出モチーフ内に位置する、項目 15 に記載の方法。

(項目 17) 前記切断しやすい Omp T1 ペプチド結合が、約 $25 \text{ \AA}^2$ と約 $225 \text{ \AA}^2$ との間の溶媒露出表面積合計を有する表面露出モチーフ内に位置する、項目 15 に記載の方法。

(項目 18) 前記切断しやすい Omp T1 ペプチド結合が、ラマチャンドラプロットにおいて 0° から -180° のファイ角度または 0° から $+180^\circ$ のプサイ角度を示す前記タンパク質の位置にある、項目 15 に記載の方法。

(項目 19) 前記 Omp T1 陽性細菌が、大腸菌である、項目 15 に記載の方法。

(項目 20) 前記細菌の酸化的リン酸化システムが、細胞溶解後および前記目的のタンパク質の合成中に活性のままである、項目 15 に記載の方法。

(項目 21) 前記無細胞合成システムが、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコドンに配置する、項目 15 に記載の方法。

(項目 22) 外膜タンパク質 T1 (Omp T1) によって切断可能である機能性放出因

10

20

30

40

50

子1タンパク質(RF1)をコードする核酸であって、切断しやすいOmpT1ペプチド結合が、野生型RF1(配列番号1)のアミノ酸287~304に対応するRF1のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、核酸。

(項目23) インビトロ無細胞合成システムにおいてアンバーコドンでのRF1競合を低減させるための方法であって、

i) 外膜タンパク質T1(OmpT1)によって切断可能である機能性放出因子1タンパク質(RF1)を発現するOmpT1陽性細菌を培養するステップ；

ii) 前記細菌を溶解して、無細胞合成抽出物を生じさせるステップ；

iii) 前記抽出物中の前記RF1タンパク質を、インタクトRF1タンパク質を50%低減させるために十分な量のOmpT1と接触させるステップ；

iv) 目的のタンパク質をコードし、かつアンバーコドンを含む核酸テンプレートを、前記抽出物に添加するステップ；および

v) 前記無細胞合成システムに前記目的のタンパク質を生産させるステップを含み、

前記RF1タンパク質が、野生型RF1(配列番号1)のアミノ酸287~304に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすいOmpT1ペプチド結合を有し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、方法。

(項目24) 前記OmpT1陽性細菌が、大腸菌由来である、項目23に記載の方法。

(項目25) 前記細菌の酸化的リン酸化システムが、細胞溶解後および前記目的のタンパク質の合成中に活性のままである、項目23に記載の方法。

(項目26) 前記無細胞合成システムが、非ネイティブアミノ酸を前記目的のタンパク質のアンバーコドンに配置する、項目23に記載の方法。

(項目27) 無細胞合成システムであって、単一反応混合物中に、

i) タンパク質をコードする核酸テンプレートを翻訳するために十分な細菌溶解物からの成分と、

ii) 目的のタンパク質をコードし、かつ少なくとも1つのアンバーコドンを有する、核酸テンプレートと、

iii) 前記アンバーコドンに相補的なtRNAと、

iv) 外膜タンパク質T1(OmpT1)によって切断可能な機能性放出因子1(RF1)タンパク質であって、切断しやすいOmpT1ペプチド結合が、野生型RF1(配列番号1)のアミノ酸287~304に対応するRF1のスイッチループ領域内に位置し、および前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変される、RF1タンパク質とを含む、無細胞合成システム。

(項目28) 前記反応混合物が、非天然アミノ酸および対応するアミノ酸シンセターゼをさらに含み、前記シンセターゼが、前記アンバーコドンに相補的なtRNAに前記非天然アミノ酸をチャージすることができる、項目27に記載の無細胞合成システム。

(項目29) 前記システムが活性酸化的リン酸化システムによりATPを生成する、項目27に記載の無細胞合成システム。

(項目30) 無細胞合成システムにおいてタンパク質を発現させるための方法であって、

i. 核酸テンプレートと細菌抽出物を、タンパク質合成を可能にする条件下であわせるステップであって、前記細菌抽出物が、野生型RF1(配列番号1)のアミノ酸287~303に対応するスイッチループ領域内に位置する切断しやすいOmpT1ペプチド結合においてOmpT1によって切断されたRF1タンパク質を含み、前記スイッチループ領域が、pH7.0で正に荷電する2つの隣接する塩基性アミノ酸を含むように改変されたものであるステップ；および

ii. 前記核酸テンプレートからタンパク質を発現させるステップ

を含む方法。

(項目 3 1) 細菌細胞であって、前記細菌細胞のゲノムに組み込まれた項目 1 に記載の機能性 R F 1 を含む細菌細胞。

Figure 1

【図 1】

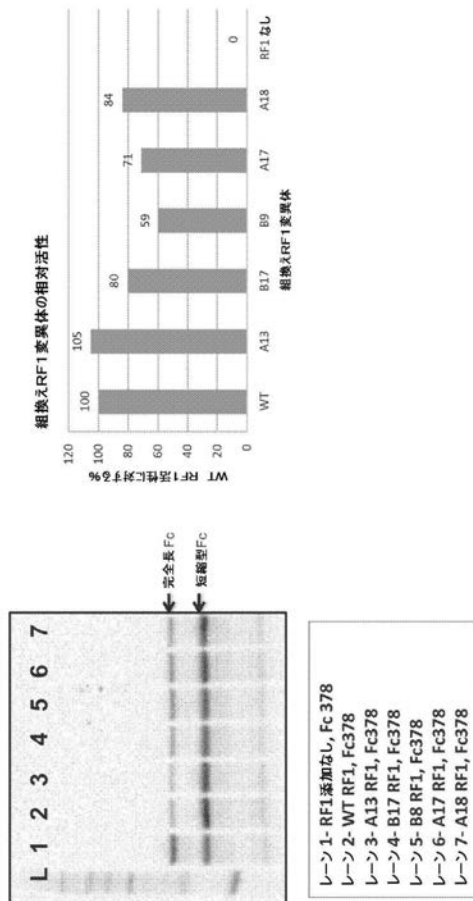


Figure 1B.

Figure 2

【図 2】

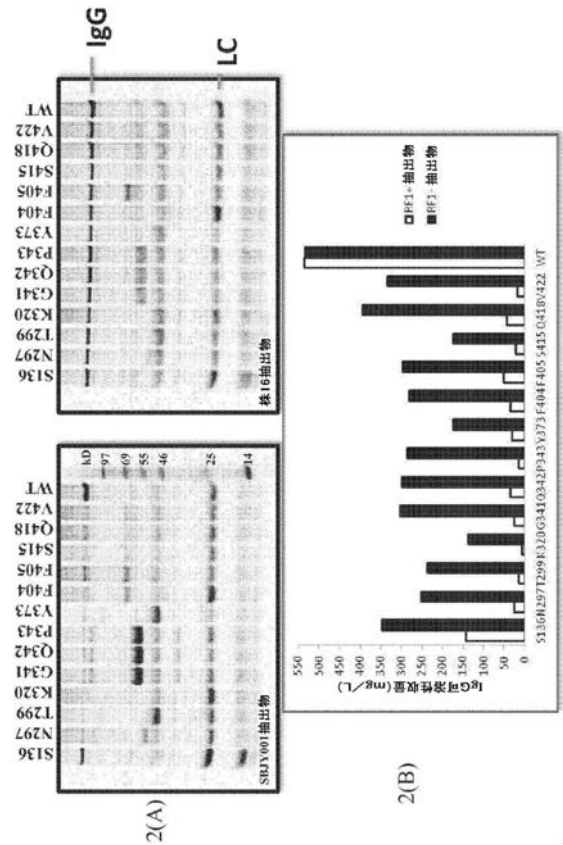


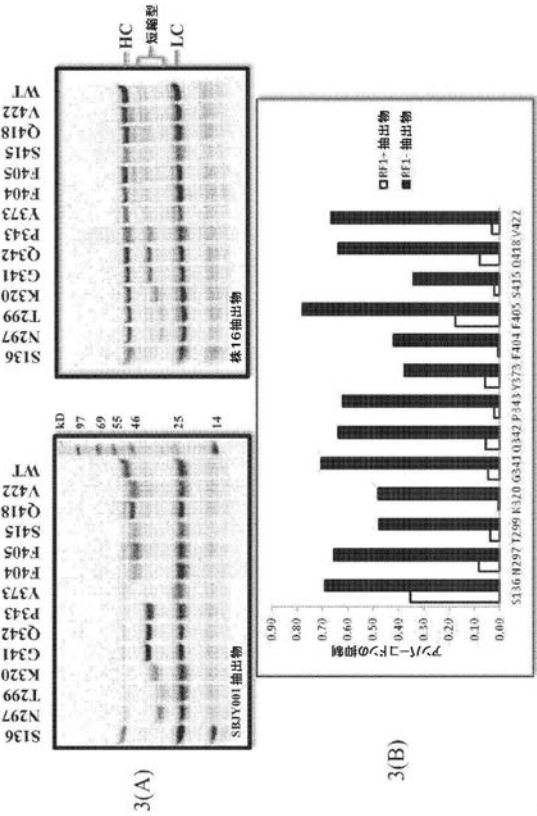
Figure 1A.

2(A)

2(B)

【図 3】

Figure 3



【配列表】

2018029621000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クリストファー ディー. サノス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94920, ティブロン, メドレー ヒル ドライブ 38

(72)発明者 クリストファー ジェイ. マレー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95073, ソケル, オリーブ スプリングス ロード
700

(72)発明者 ジュンハオ ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, イースト チャールストン
ロード 428

(72)発明者 ヘザー スティーブンソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129, サン ホセ, ウィンディング ウェイ 46
48

Fターム(参考) 4B029 AA01 BB02 CC01 CC02 CC08

4B064 AG01 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13 DA16

4B065 AA26X AA26Y AA87Y AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
CA46

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】
2018029621000001.pdf