

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011 年 12 月 22 日(22.12.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/158895 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/063778
- (22) 国際出願日: 2011 年 6 月 16 日(16.06.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-137635 2010 年 6 月 16 日(16.06.2010) JP
特願 2011-047663 2011 年 3 月 4 日(04.03.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 向井 崇人 (MUKAI, Takahito) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究

所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 坂本 健作 (SAKAMOTO, Kensaku) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 松元 明子 (MATSUMOTO, Akiko) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋 2 丁目北 2 番 6 号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR CONSTRUCTING RECOMBINANT BACTERIUM FOR PRODUCING NON-NATIVE PROTEIN, AND UTILIZATION OF SAME

(54) 発明の名称: 非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法、及びその利用

[図2]



(57) Abstract: Provided is a method for constructing a recombinant bacterium for producing a novel non-native protein, said method comprising: (1) expressing tRNA, which recognizes UAG codon, in a bacterium; (2) expressing an aminoacyl-tRNA synthase, which acylates said tRNA using a non-native amino acid or an α -hydroxy acid, in the bacterium; (3) transferring, into the bacterium, a DNA construct which allows the expression of at least one gene, said gene being selected from a group of genes losing function through the deletion of a gene encoding a translation termination factor terminating translation at UAG codon, in the absence of the translation termination factor, and/or introducing, into the gene selected above on the chromosome of the bacterium, a mutation for expressing the function of said gene in the absence of the translation termination factor; and (4) deleting the gene encoding the translation termination factor.

(57) 要約: (1) UAG コドンを認識する tRNA を細菌内に発現させ、(2) 前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA 合成酵素を細菌内に発現させ、(3) UAG コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を翻訳終結因子の非存在下において発現させる DNA 構築物を細菌に導入する及び/又は細菌染色体上の前記選択される遺伝子に、当該遺伝子の機能を翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入し、(4) 翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させることにより、新規な非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法を提供する。

WO 2011/158895 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法、及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法、非天然タンパク質製造用の組換え細菌を作製するためのDNA構築物、非天然タンパク質製造用の組換え細菌、組換え細菌を用いる非天然タンパク質の製造方法、非天然タンパク質の製造に用いる組換え細菌の抽出物に関する。特に、本発明は、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損した組換え細菌の作製方法、該遺伝子を欠損させるためのDNA構築物、該遺伝子が欠損した組換え細菌、該遺伝子が欠損した組換え細菌を用いる非天然タンパク質の製造方法、該遺伝子が欠損した組換え細菌の抽出物に関する。

背景技術

[0002] 非天然タンパク質（又は超タンパク質）と呼ばれる、所望の位置のアミノ酸残基を非天然型アミノ酸及び／又は α -ヒドロキシ酸で置換したタンパク質がある。この非天然タンパク質は、天然タンパク質に存在しない新しい生理活性、触媒活性、構造及び機能を有する。そのため、非天然タンパク質の合成は、従来のタンパク質工学における制約を乗り越える必要不可欠な基盤技術となる。

[0003] 近年では、大腸菌、酵母、昆虫細胞及び哺乳類細胞を用いて非天然タンパク質を合成することが可能である。このような合成システムにおいて、非天然型アミノ酸が非特異的な位置に導入されることは望ましくないため、一般的には、ストップコドンの一つであるアンバーコドン（UAGコドン）に非天然型アミノ酸が導入される。

[0004] アンバーコドンへの非天然型アミノ酸の導入は、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子と競合することが知られており、非特許文献1、2では

、大腸菌の翻訳終結因子であるRF-1の活性を弱めることによって、非天然型アミノ酸の導入効率が改善されること、非特許文献3では、無細胞タンパク質合成系においてRF-1の量を減らすことによって、アンバーコドンへ効率よく非天然型アミノ酸が導入されることが報告されている。

[0005] さらに、RF-1をコードするprfA遺伝子を欠損させることで非天然型アミノ酸の導入効率をさらに改善できると考えられる。ここで、prfA遺伝子を欠損させる方法として、非特許文献4では、ゲノム上の全ての遺伝子のアンバーコドンをオーカーコドン又はオパールコドンに置き換える方法が開示されている。また、非特許文献5、6では、アンバーコドンを全てオーカーコドンに置き換え、prfA遺伝子を欠損させた大腸菌が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許出願公開第2009/0317910号明細書

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ryden, S.M., and Isaksson, L.A., *Molecular and General Genetics*, 193, 38-45 (1984)

非特許文献2：Kleina, L.G., et al., *Journal of Molecular Biology*, 213, 705-717 (1990)

非特許文献3：Short III, G.F., et al., *Biochemistry*, 38, 8808-8819 (1999)

非特許文献4：Forster, A.C. et al., *Genome Research*, 17, 1-6 (2007)

非特許文献5：Wang, H.H., et al., *Nature*, 460, 894-898 (2009)

非特許文献6：“Synthetic Biology Projects”、[online]、[平成21年4月30日検索]、インターネット<URL: <http://arep.med.harvard.edu/SBP/>>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] ところで、種々の細菌の翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損株に対するニーズがあるが、上記の従来技術には、欠損株の作製に手間がかかるという課題がある。例えば、特許文献5、6に開示の大腸菌は、非天然型アミノ酸導入タンパク質に用いる大腸菌としての汎用性が低く、この大腸菌よりも汎用性が高い *prfA* 欠損株に対するニーズがある。しかしながら、非特許文献4に開示の技術を用いて欠損株を作製する場合には、ゲノム上の全ての遺伝子のアンバーコドン（314個）を置き換えることが必要であり、手間がかかるため、非天然タンパク質を合成する系としては好ましくない。

[0009] 従って、本発明の主な目的は、細菌の翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させる場合に好適に適用し得る、非天然タンパク質製造用の組換え細菌を作製するための新規な方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、以下の好適な実施形態を含む。

[0011] （形態1）

第一の視点において、本発明は、非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法であって、

（1）UAGコドンを認識する tRNA を細菌内に発現させるステップと、

（2）前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA 合成酵素を細菌内に発現させるステップと、

（3）UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される1以上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を細菌に対して行うステップと、

（4）細菌内の前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、

を含み、前記（１）～（４）のステップにおける前記各細菌は全て同一の細菌であり、前記処理が、前記１以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるＤＮＡ構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記１以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理であることを特徴とする。

[0012] （形態２）

第一の視点における別の作製方法として、本発明は、非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法であって、

ＵＡＧコドンを認識するｔＲＮＡを発現する細菌に対して、

（５）前記ｔＲＮＡを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-ｔＲＮＡ合成酵素を発現させるステップと、

（６）ＵＡＧコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される１以上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を行うステップと、

（７）前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、
を含み、

前記処理が、前記１以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるＤＮＡ構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記１以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理であることを特徴とする。

[0013] （形態１５）

第二の視点において、本発明は、非天然タンパク質製造用の組換え細菌を作製するためのＤＮＡ構築物であって、ＵＡＧコドンで認識するｔＲＮＡ及び前記ｔＲＮＡを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-ｔＲＮＡ合成酵素の存在下において、ＵＡＧコドンで翻

訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する全ての遺伝子から選択される1以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現することを特徴とするDNA構築物を含むことを特徴とする。

[0014] (形態16)

第三の視点において、本発明は、非天然タンパク質製造用の組換え細菌であって、UAGコドンを認識するtRNAを発現すること、前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素を発現すること、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される1以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA構築物が導入されていること、及び／又は細菌染色体上の前記1以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変が導入されていること、及び、前記翻訳終結因子をコードする遺伝子が欠損していること、を特徴とする。

[0015] (形態18)

第四の視点において、本発明は、組換え細菌を用いる非天然タンパク質の製造方法であって、(a)非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を活性化しうるアミノアシルtRNA合成酵素と、(b)前記アミノアシルtRNA合成酵素の存在下において非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸と結合可能な、UAGコドンで認識するtRNAと、(c)ランダムに、あるいは所望の位置に1つ以上のナンセンス変異を受けた所望のタンパク質をコードする遺伝子と、を形態16の組換え細菌又は当該組換え細菌の抽出液内で発現させることを特徴とする。

[0016] (形態20)

第五の視点において、本発明は、非天然タンパク質の製造に用いる組換え細菌の抽出物であって、前記組換え細菌が、UAGコドンで認識するtRNAを発現すること、前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸

によってアシル化するアミノアシルー t R N A 合成酵素を発現すること、U A G コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させる D N A 構築物が導入されていること、及び／又は細菌染色体上の前記 1 以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変が導入されていること、前記翻訳終結因子をコードする遺伝子が欠損していることを特徴とする。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、細菌の翻訳終結因子をコードする遺伝子欠損させる場合においても、非天然タンパク質製造用の組換え細菌を容易に作製することができる。そのため、所望の細菌又は大腸菌を用いた非天然タンパク質の製造効率を容易に向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図 1 は、p r f A 欠損体におけるアンバーコドンの翻訳を示す図である。

[図2]図 2 は、B A C 7 を導入した p r f A 欠損体の生育能力を示す図である。

[図3]図 3 は、B A C 7 上の遺伝子配座を示す図である。

[図4]図 4 は、p r f A 遺伝子の欠損を示す図である。

[図5]図 5 は、アンバーコドンへのグルタミン酸の導入を示す図である。

[図6]図 6 は、非天然タンパク質製造用の大腸菌の増殖速度を示す図である。

[図7]図 7 は、アンバーコドンへの非天然型アミノ酸の導入を示す図である。

[図8]図 8 は、グルタミン酸又はチロシンが導入されたタンパク質の質量分析結果を示す図である。

[図9]図 9 は、アンバーコドンへのアジドフェニルアラニンの導入を示す図である。

[図10]図 10 は、B A C 6 を導入した大腸菌の p r f A 遺伝子の欠損を示す

図である。

[図11]図11は、BAC3を導入した大腸菌のp r f A遺伝子の欠損を示す図である。

[図12]図12は、HMS174 (DE3) のp r f A遺伝子の欠損を示す図である。

[図13]図13は、BAC8上の遺伝子配座を示す図である。

[図14]図14は、p r f A遺伝子の欠損を示す図である。

[図15]図15は、UAGトリプレットを4-アジドフェニルアラニン又はオースルホチロシンへ再定義した非天然タンパク質製造用の大腸菌の増殖を示す図である。

[図16]図16は、Nap3発現系が導入された非天然タンパク質製造用の大腸菌の増殖を示す図である。

[図17]図17は、HST08由来のRF zero-y株における、sucB遺伝子及びiodoTy r RS-mj (D286R) /Nap3過剰発現系の大腸菌の増殖速度を示す図である。

[図18]図18は、BW25113由来のRF zero-y株における、sucB遺伝子及びiodoTy r RS-mj (D286R) /Nap3過剰発現系の大腸菌の増殖速度を示す図である。

[図19]図19は、BW25113由来のRF zero-y株における、アンバーコドンへの3-ヨード-L-チロシンの導入を示す図である。

[図20]図20は、BW25113由来のRF zero-y株における、アンバーコドンへの3-ヨード-L-チロシンの導入を示す図である。

[図21]図21は、supE tRNA分子の改変を説明する図であり、(a)は、改変前のsupE tRNA分子の二次構造を示しており、四角で囲った塩基がランダム化する部分であり。(b)は、改変supE tRNA分子を作製する3種のオリゴマーのアニールリング状態を示す模式図であり、(c)は、ランダム化部位に出現した各塩基の頻度を表している。

[図22]図22は、改変supE tRNA分子を導入した大腸菌における、

アンバーコドンへのグルタミンの導入を示す図である。

[図23]図23は、改変supE tRNA分子を導入した大腸菌の増殖を示す図であり、(a)～(c)は異なる条件下での増殖を示している。

[図24]図24は、BW25113、HMS174 (DE3) およびBL21 (DE3) 由来のRFzero-y株における増殖速度を示す図である。

[図25]図25は、BW25113、HMS174 (DE3) およびBL21 (DE3) 由来のRFzero-y株における、対応する非天然型アミノ酸の有無による増殖を示す図である。

[図26]図26は、数種の非天然型アミノ酸の構造を示す図である。

[図27]図27は、UAGコドンをも3-ヨード-L-チロシン以外の非天然型アミノ酸に再定義したBW25113 RFzero-y株における増殖速度を示す図である。

[図28]図28は、UAGコドンをも3-ヨード-L-チロシン以外の非天然型アミノ酸に再定義したBW25113 RFzero-y株における、対応する非天然型アミノ酸の有無による増殖を示す図である。

[図29]図29は、BW25113 RFzero-y株、およびUAGコドンをも3-ヨード-L-チロシン以外の非天然型アミノ酸に再定義した株における、アンバーコドンへの3-ヨード-L-チロシンまたは他の非天然型アミノ酸の導入を示す図である。

[図30]図30は、3-ヨード-L-チロシンが導入されたことを確認する質量分析の結果を示す図である。

[図31]図31は、prfA⁺株におけるアンバーコドンへの非天然型アミノ酸の導入効率を示す図である。

[図32]図32は、H4ヒストンにアセチルリジンが導入されたことを確認する質量分析の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] [非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製]

本発明に係る組換え細菌の作製方法は、非天然タンパク質製造用の組換え

細菌の作製方法であって、

(1) UAGコドンを認識する tRNA を細菌内に発現させるステップと、

(2) 前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を細菌内に発現させるステップと、

(3) UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を細菌に対して行うステップと、

(4) 細菌内の前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、
を含み、

前記 (1) ~ (4) のステップにおける前記各細菌は全て同一の細菌であり、

前記処理が、前記 1 以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させる DNA 構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記 1 以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理である、構成、又は、

非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法であって、

UAGコドンを認識する tRNA を発現する細菌に対して、

(5) 前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を発現させるステップと、

(6) UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を行うステップと、

(7) 前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、
を含み、

前記処理が、前記1以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記1以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理である、構成であればよい。

[0020] なお、上記(3)及び(6)のステップにおいて、さらに、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失し、これにより細菌の増殖速度が低下することが知られている遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理が含まれていてもよい。

[0021] なお、本発明に係る非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法において、(1) UAGコドンを認識するtRNAを細菌内に発現させるステップと、(2) 前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素を細菌内に発現させるステップとを含む場合に、当該細菌は、UAGコドンを認識する別のtRNAをもともと発現している細菌であってもよい。例えば、詳しくは後述するが、UAGコドンを認識する大腸菌由来のtRNAを発現する大腸菌に対して、UAGコドンを認識する古細菌のtRNAと、この古細菌のtRNAを非天然型アミノ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素とを発現させるようにしてもよい。

[0022] また、上記(1)～(4)又は上記(5)～(7)のステップの処理を施される細菌が、UAGコドンを認識するtRNAであって上記(2)又は上記(5)のステップにおいて導入されるアミノアシル-tRNA合成酵素によってはアシル化されないtRNAを発現している細菌である場合には、そのtRNAをコードする遺伝子を欠損させることが好ましい。例えば、詳しくは後述するが、内在性のアンバーサプレッサーtRNAを発現している大

腸菌に対して、古細菌の tRNA を発現させ、かつ古細菌の tRNA をアシル化する古細菌のアミノアシルー tRNA 合成酵素（大腸菌の tRNA をアシル化することができない）を導入する場合には、大腸菌が保持する内在性のアンバーサプレッサー tRNA をコードする遺伝子を欠損させることが好ましい。本遺伝子を欠損させることによって、UAG コドンにおいて、目的とする非天然型アミノ酸等によってアシル化されている tRNA との競合を回避でき、非天然型アミノ酸等を効率良くタンパク質に導入することができる。本遺伝子を欠損させるステップは、上記（１）～（４）又は上記（５）～（７）のステップとの関係において、どの段階で実施されてもよい。

[0023] UAG コドンを認識する内在性の tRNA を発現している細菌に対して、この tRNA を非天然型アミノ酸等によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を導入する場合に、当該細菌が、この tRNA を天然型アミノ酸によってアシル化する内在性のアミノアシルー tRNA 合成酵素が発現している細菌であるときには、天然型アミノ酸を結合させる当該アミノアシルー tRNA 合成酵素をコードする遺伝子を欠損させることが好ましい。本遺伝子を欠損させることによって、UAG コドンにおいて、目的とする非天然型アミノ酸等によってアシル化されている tRNA との競合を回避でき、非天然型アミノ酸等を効率良くタンパク質に導入することができる。

[0024] 上記（１）～（４）の各ステップの順序に特に制限はなく、例えば（１）のステップと（２）のステップとが同時に行なわれてもよい。しかしながら、翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損効率の観点から、上記（４）のステップよりも前に、上記（１）及び上記（２）のステップを行うことが好ましい。また、上記（１）及び（２）のステップが完了した後に、（３）のステップ及び（４）のステップをこの順で行うことが特に好ましい。

[0025] 同様に、上記（５）～（７）の各ステップの順序に特に制限はないが、翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損効率の観点から、上記（７）のステップよりも前に、上記（５）のステップを行うことが好ましい。また、上記（５）、（６）及び（７）のステップをこの順で行うことが特に好ましい。

- [0026] 本明細書では、UAGコドンを認識するtRNAのことを「アンバーサプレッサーtRNA」ともいう。このtRNAは、非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化され得るものである。
- [0027] 本明細書において「非天然タンパク質」とは、天然型アミノ酸のみから生成されるタンパク質以外のタンパク質を意味している。非天然タンパク質としては、例えば、非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を含む非天然タンパク質が挙げられる。
- [0028] また、「非天然型アミノ酸」とは、生物が普遍的に利用する20種類の標準型アミノ酸以外のアミノ酸を意味する。非天然型アミノ酸としては、非限定的に、例えば、リジン誘導体、及びチロシン誘導体が含まれる。また、本明細書においては、上記標準型アミノ酸が例えばリン酸化等によって修飾されているアミノ酸もまた、非天然型アミノ酸に含まれることを意図している。
- [0029] ここで、リジン誘導体としては、 ϵ 位の窒素原子に結合した水素原子が他の原子又は原子団に置換されたものが好ましい。このようなリジン誘導体には、例えば、ピロリジン、 $N\epsilon$ -t-ブトキシカルボニルリジン（Boc-リジン）、 $N\epsilon$ -アセチルリジン、 $N\epsilon$ -t-ベンジルオキシカルボニルリジン（Z-リジン）、及び $N\epsilon$ -(α -アジドベンジルオキシカルボニル)リジン（アジドZ-リジン）が含まれる。また、アミノ酸以外にも、 α -ヒドロキシ酸を含むアミノ酸すなわち、Boc-リジン主鎖部分のアミノ基をヒドロキシ基に置換したBoc-LysOHなどが含まれる。
- [0030] チロシン誘導体としては、チロシンのフェニル基の3位又は4位に置換基を有する3位置換チロシン及び4位置換チロシン、及び酸素原子に置換基を有するO-修飾チロシンが含まれる。3位置換チロシンとしては、3-ヨード-L-チロシン、3-ブロモ-L-チロシン、3-クロロ-L-チロシン、3-アジド-L-チロシン及び3-ヒドロキ-L-チロシンが含まれる。また、4位置換チロシンとしては、4-アセチル-L-フェニルアラニン、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン及び4-アジド-L-フェニルアラニン

ラニンが含まれる。O-修飾チロシンとしては、O-スルホチロシンが含まれる。以下、本明細書では、3-ヨード-L-チロシン、3-ブロモ-L-チロシン及び3-クロロ-L-チロシンのことを、それぞれ、単に、3-ヨードチロシン、3-ブロモチロシン及び3-クロロチロシンと称する。

[0031] 翻訳終結因子は、終結因子又はポリペプチド鎖終結因子ともいい、mRNA上の終止コドンを認識し、ポリペプチド鎖をリボソームから遊離させる因子である。UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子（以下、単に、「UAGを認識する翻訳終結因子」ともいう）としては、例えば大腸菌及び枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等の細菌では、RF-1である。UAGを認識する翻訳終結因子をコードする遺伝子（以下、単に、「UAG認識翻訳終結因子遺伝子」ともいう）としては、配列番号1に示す核酸配列からなる大腸菌の *prfA* 遺伝子等が含まれる。

[0032] 本明細書において「UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損」とは、当該遺伝子が細胞内に存在しないことを指す場合のほか、当該遺伝子のORFの大半が欠損している場合、当該遺伝子の主要部分が欠損している場合、当該遺伝子が発現しない場合、あるいは当該遺伝子に変異が含まれており翻訳終結因子がUAGコドンを認識できないなど翻訳終結因子としての機能が阻害されている場合なども含むことを意図している。

[0033] UAG認識翻訳終結因子遺伝子は、遺伝子の相同性組換えを利用した方法など、周知の遺伝子破壊方法によって欠損させることができるが、特に、Red/ET Recombination System Quick and Easy BAC MODIFICATION Kit (Gene Bridges GmbH、ドイツ) を用いることが好ましい。ここで、アンバーサプレッサー tRNA を発現するように細菌を形質転換した後に、UAG認識翻訳終結因子遺伝子を欠損させることが、欠損効率の点で好ましい。

[0034] 本明細書において「UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する」とは、ある遺伝子の機能に関し

、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を完全に喪失する場合のほか、機能の一部を喪失する場合、機能が阻害される場合、及び機能が低下する場合も含むことを意図している。ある遺伝子が、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する機構としては、例えば、UAGコドンで翻訳が終結せず、C末端に余分なペプチドが付加されることによって、タンパク質の機能が阻害される機構が考えられる。あるいは、UAGコドンで翻訳が終結せず、染色体上その遺伝子の下流にある遺伝子の翻訳が適切になされなくなり、この下流の遺伝子のタンパク質の機能が阻害される機構が考えられる。しかしながら機能を喪失する機構はこれらに限定されるものではない。

[0035] 本明細書において「UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子」は、終止コドンがUAGコドンである遺伝子であって、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の上記定義の欠損によって、機能を喪失する遺伝子、及び、終止コドンがUAGコドンではないが、染色体上、終止コドンがUAGコドンである遺伝子の下流にある遺伝子であって、終止コドンがUAGコドンである上流の遺伝子の翻訳終結が適切になされないことによって、適切に翻訳されなくなる遺伝子を意図している。

[0036] 本明細書において「遺伝子の機能を発現させる」とは、その遺伝子の正常に機能するタンパク質が翻訳されるようにすることを意図している。したがって、「UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させる」とは、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の正常なタンパク質が、当該翻訳終結因子の非存在下において発現するようにすることを意図している。

[0037] 本発明に用いられる細菌としては、外来遺伝子の導入又は遺伝子の改変が可能な細菌であれば特に制限はない。なお、本発明は、UAGコドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で欠損させると致死になる遺伝子を発現さ

せると、p r f A 遺伝子を欠損させた大腸菌は生育可能になるという、本発明者らが見出した知見に基づいて完成したものである。大腸菌以外においても、U A G コドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で欠損させると致死になる遺伝子を発現させると、U A G コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させても生育可能になると考えられる。そのため、本発明を適用できる細菌は、大腸菌に限定されず、枯草菌などの他の細菌を含むものである。

[0038] 本明細書において「DNA構築物」とは、細菌に導入できる形態であって、細胞内で自己複製が可能なもの、又は細胞の染色体内に組み込まれ得るものが意図される。DNA構築物としては、バクテリア人工染色体（BAC）、プラスミド及び直鎖状DNAの形態が可能である。

[0039] 形質転換させる細菌として大腸菌のH S T O 8株を用い、DNA構築物としてBACを用いる場合には、BACとしては、mini Fレプリコンを有するBACが好ましい。一方、Fプラスミドを保有する大腸菌を形質転換させる細菌として選択する場合には、他のオリジン、例えばC o l i b P 9オリジンを有するプラスミドに遺伝子を導入してBACを作製することが好ましい。

[0040] DNA構築物は、細菌染色体にトランス及び／又はシスに補充（導入）されるものである。本明細書において「細菌染色体にトランスに補充（導入）される」とは、細菌の細胞内には導入されるものの、細菌染色体に組み込まれないことを意図している。また、本明細書において「細菌染色体にシスに補充（導入）される」とは、細菌の細胞内に導入され、さらに細菌染色体に組み込まれることを意図している。

[0041] U A G コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA構築物とは、具体的には、U A G 認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の終止コドンをアンバーコドン（U A G）からオーカーコドン（U A A）又はオパールコドン（U G A）に置き換

えたこれらの改変型遺伝子を含むDNA構築物を指す。終止コドンアンバーコドン以外のコドンとすることによって、UAGを認識する翻訳終結因子が存在しない場合であっても、本来の位置で翻訳を終止させることができ、これらの遺伝子の正常に機能するタンパク質を生成することができる。したがって、このDNA構築物を細菌内に導入することによって、UAGを認識する翻訳終結因子が存在しない場合であっても、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の機能を細菌内において発現させることができる。

[0042] 例えば、周知の遺伝子組み換え技術を用いて、細菌から対象となる遺伝子又は当該遺伝子を含むオペロンをクローニングした後、PCRなどを用いて各遺伝子の終止コドンをUAGからUAA又はUGAに置換する変異を導入する。次いで、これら改変した遺伝子又はオペロンをBAC又はプラスミドに導入することにより、所望のDNA構築物を調製できる。あるいはこれらの遺伝子及びオペロンをつなぎ合わせて直鎖状DNAとすることもできる。

[0043] ほかに、TakaraのPrimeStar GXLなどを用いたオーバーラップPCR法を用いて複数のオペロンをつないでフラグメントを作製し、そのフラグメントをBACプラスミドに導入してもよい。ここで、20kbp未満のフラグメントを作製する場合には、TakaraのHST08株を用いることが好ましい。また、20kbp以上のフラグメントを作製する場合には、Red/ET Recombination System Quick and Easy BAC MODIFICATION Kit (Gene Bridges GmbH、ドイツ)を用いることが好ましい。

[0044] DNA構築物を細菌染色体に導入する場合、細菌染色体にトランスに導入してもよいし、細菌染色体にシスに導入してもよい。言い換えると、DNA構築物に組み込まれた遺伝子をDNA構築物から発現させてもよいし、これらの遺伝子を大腸菌染色体にノックインして、発現させてもよい。大腸菌染色体に遺伝子をノックインする方法は、周知の方法を採用することができる。

。

[0045] また、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変の導入とは、具体的には、細菌の染色体上にある、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子に対して、当該遺伝子の終止コドンを、アンバーコドン（UAG）からオーカーコドン（UAA）又はオパールコドン（UGA）に置き換える改変を導入することを指す。細菌の染色体上にあるこれらの遺伝子の終止コドンをアンバーコドン以外のコドンとすることによって、UAGを認識する翻訳終結因子が存在しない場合であっても、本来の位置で翻訳を終止させることができ、これらの遺伝子の正常に機能するタンパク質を生成することができる。したがって、このような改変を細菌の染色体に導入することによって、UAGを認識する翻訳終結因子が存在しない場合であっても、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の機能を細菌内において発現させることができる。

[0046] 染色体上の遺伝子の終止コドンに改変を導入する方法としては、周知の方法を用いて行うことができ、例えば、遺伝子の相同性組換えを利用する方法、あるいはランダムに細菌染色体上に生じる突然変異の中から該当する変異を選別する方法などが可能である。

[0047] 遺伝子をトランスに導入して発現させる方法、遺伝子をシスに導入して発現させる方法、及び染色体上のアンバーコドンを改変して発現させる方法を組み合わせて採用することもできる。例えば、7つの遺伝子の機能を発現させる場合に、6つの遺伝子をDNA構築物によって細菌の細胞内に導入し、残りの1つの遺伝子について染色体上にある当該遺伝子のアンバーコドンを改変することによって、7つの遺伝子の機能を発現させるようにしてもよい。

[0048] UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の中には、単独で遺伝子欠損させると致死になる遺伝子も含まれている。そのた

め、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によってこれらの遺伝子の機能が喪失することにより、細菌が生育しなくなる場合が考えられる。そのため、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の非存在下においてもその機能を発現させる遺伝子、すなわち、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する全ての遺伝子から選択される1以上の遺伝子には、これら単独で遺伝子欠損させると致死になる遺伝子が含まれていることが好ましい。

[0049] UAGコドンで翻訳終結する、単独で欠損させると致死になる遺伝子としては、大腸菌の`coaD`、`murF`、`hda`、`mreC`、`lpxK`、`hemA`及び`lolA`が挙げられる。`coaD`、`murF`、`hda`、`mreC`、`lpxK`、`hemA`及び`lolA`の遺伝子の核酸配列を、それぞれ、配列番号2、3、4、5、6、7及び8に示す。なお、各配列番号によって表されているこれら遺伝子の核酸配列は、大腸菌K-12株のものであり、他の菌株においては塩基の置換が含まれる場合もあるが、それらも上記遺伝子として含まれる。

[0050] 枯草菌における、UAGコドンで翻訳終結する、単独で欠損させると致死になる遺伝子としては、`accD`、`acpS`、`cspR`、`dapB`、`divIC`、`dnaA`、`fmt`、`fold`、`ftsA`、`map`、`mrpD`、`murE`、`murG`、`plsX`、`ppnK`、`racE`、`resB`、`resC`、`rnpA`、`rplX`、`rpmGB`、`rpmH`、`rpsG`、`secA`、`secY`、`topA`、`trmD`、`yacM`、`ydiC`、`yloQ`、`ypuH`及び`ysxC`の遺伝子が挙げられる。

[0051] また、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子のうち、終止コドンがUAGコドンではないが、染色体上、終止コドンがUAGコドンである遺伝子の下流にある遺伝子である`mreD`及び`hemK`の遺伝子は、その上流の遺伝子（`mreC`、`hemA`）の翻訳が正しく終結しないと、自身の翻訳が影響を受けると考えられる。`mreD`及び`hemK`の遺伝子どちらも必須遺伝子である。その

ため、これらの遺伝子も、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する全ての遺伝子から選択される1以上の遺伝子に含まれていることが好ましい。

[0052] 大腸菌において、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の非存在下においてもその機能を発現させる遺伝子としては、*coaD*、*murF*、*hda*、*mreC*、*hemA*、*lpxK*及び*lolA*の中から選択される1以上の遺伝子であることが好ましく、これらの中から選択される任意の6つの遺伝子であることがより好ましく、これら全ての遺伝子が選択されることが特に好ましい。

[0053] また、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の中には、機能の喪失によって細菌が致死になるわけではないが、機能の喪失によって細菌の増殖速度が低下する遺伝子も含まれる。細菌の増殖速度が低下すると、得られるタンパク質の量が低下することが予想される。そのため、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する全ての遺伝子から選択される1以上の遺伝子には、機能の喪失によって細菌の増殖速度が低下することが知られている遺伝子が含まれていることが好ましい。

[0054] 大腸菌において、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失し、これにより細菌の増殖速度が低下することが知られている遺伝子であって、UAG認識翻訳終結因子遺伝子の非存在下においてもその機能を発現させる遺伝子としては、後述する実施例3に挙げられている*fliN*、*fliP*、*fliQ*、*sucB*、*ubiF*、*ulaF*、*atpE*、*fabH*が好ましく、中でも*sucB*遺伝子であることが特に好ましい。

[0055] [非天然タンパク質の製造方法]

非天然タンパク質の製造は、周知の製造方法を採用することができる。例えば、(a) 非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を活性化しうるアミノアシル-tRNA合成酵素と、(b) 当該アミノアシル-tRNA合成酵素

の存在下において非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸と結合可能なアンバーサプレッサー tRNA と、(c) ランダムに、あるいは所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質をコードする遺伝子とを、所望の細菌、又は所望の細菌の細胞抽出液（抽出物）内で発現させる非天然タンパク質の製造方法を採用することができる。本製造方法において、細菌を培養する培地中、又は細胞抽出液内に、非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を添加しておくことにより、この非天然型アミノ酸及び α -ヒドロキシ酸をタンパク質に導入することができる。ここで、培地及び細胞抽出液に添加すべき非天然型アミノ酸及び α -ヒドロキシ酸は、前記(a)におけるアミノアシル-tRNA合成酵素に対応するもの、すなわち当該アミノアシル-tRNA合成酵素によって活性化されるものである。

[0056] 具体的には、メタノサルシナ・マゼイあるいはメタノサルシナ・バルケリのピロリジル tRNA合成酵素 (PyIRS、あるいは pyIS 遺伝子) と tRNA^{PyI} (pyIT 遺伝子) とを大腸菌に導入すればピロリジンをタンパク質に導入することができる。また、メタノサルシナ・マゼイの PyIRS の H61K, Y384F 変異体 (BocLysRS1) と、K61R, E131G, Y384F 変異体 (BocLysRS2) とを導入すれば、Boc-リジン及び BocLysOH を導入することができる。メタノサルシナ・マゼイの PyIRS の Y384F, Y306A 変異体 (ZLysRS) を導入すれば、Z-リジン、2-クロロ-Z-リジン、2-ニトロ-Z-リジン及び 2-アジド-Z-リジンを導入することができる。メタノサルシナ・マゼイの PyIRS の H63Y, S193R, N203T, M300F, A302G, Y384W 変異体を導入すれば、BocLysOH を特異的に認識するので、BocLysOH を導入することができる。メタノサルシナ・マゼイの PyIRS の N203T, L301I, L305I, Y306F, L309A, C348F 変異体 (AcLysRS2、未発表) を導入すれば、アセチルリジンを導入することができる。さらに、メタノサルシナ・マゼイの PyIRS の A302F, Y306A, N346S, C348I, Y38

4 F 変異体を導入すれば、3-（3-ヨードフェニル）乳酸、3-（3-ブロモフェニル）乳酸、3-（4-アセチルフェニル）乳酸、3-（4-ベンゾイルフェニル）乳酸、3-（4-アジドフェニル）乳酸、3-（3-メチル-4-ヒドロキシフェニル）乳酸などの3置換乳酸を導入することができる。

なお、メタノサルシナ・バルケリのPyIRS変異体（AckRS-3, Neumann H et al. A method for genetically installing site-specific acetylation in recombinant histones defines the effects of H3 K56 acetylation. Chin et al., Mol Cell. 2009 Oct 9; 36(1):153-63.）を導入しても、アセチルリジンを導入することができる。このほかにも、Yanagisawaら（Yanagisawa T. et al, Chem. Biol., 15, 1187-1197 (2008)）により報告されているメタノサルシナ・マゼイのPyIRS変異体を用いて、Nε-アリルオキシカルボニル-L-リジン（AlcLys）およびNε-（o-アジドベンジルオキシカルボニル）-L-リジン（AzZLys）を導入することができる。

[0057] また、以下のアミノアシル-tRNA合成酵素変異体が大腸菌に導入し、対応する非天然型アミノ酸を培地中に添加することによって、非天然タンパク質を製造することができる。

- ・非天然型アミノ酸が3-ヨードチロシン及びアジドチロシン：アミノアシル-tRNA合成酵素変異体がiodoTyrRS-mjのH70A, D158T, I159S, D286Y変異体（Sakamoto K, Murayama K, Oki K, Iraha F, Kato-Murayama M, Takahashi M, Ohtake K, Kobayashi T, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S. Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in Escherichia coli for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. Structure. 2009 Mar 11;17(3):335-44.）。

- ・非天然型アミノ酸がヒドロキシチロシン：アミノアシル-tRNA合成酵素変異体がmutDHPRSのY32L, A67S, H70N, A167Q変異体（Guo J, Wang J, Anderson JC, Schultz PG. Addition of an alpha-

hydroxy acid to the genetic code of bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008;47(4):722-5.)。

・非天然型アミノ酸がアセチルフェニルアラニン：アミノアシルー t R N A 合成酵素変異体が L W 1 の Y 3 2 L, D 1 5 8 G, I 1 5 9 C, L 1 6 2 R 変異体 (Wang L, Zhang Z, Brock A, Schultz PG. Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):56-61. Epub 2002 Dec 23.)。

・非天然型アミノ酸がベンゾイルフェニルアラニン：アミノアシルー t R N A 合成酵素変異体が M j B p a R S - 1 の Y 3 2 G, E 1 0 7 S, D 1 5 8 T, I 1 5 9 S 変異体 (Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20;99(17):11020-4. Epub 2002 Aug 1.)。

・非天然型アミノ酸がアジドフェニルアラニン：アミノアシルー t R N A 合成酵素変異体が A z P h e R S - 1 の Y 3 2 T, E 1 0 7 N, D 1 5 8 P, I 1 5 9 L, L 1 6 2 Q 変異体 (Chin JW, Santoro SW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc.* 2002 Aug 7;124(31):9026-7.)。

[0058] 〔非天然タンパク質製造用の組換え細菌の抽出物、及び該抽出物を用いた非天然タンパク質の製造〕

非天然タンパク質の製造方法は、上述のように、無細胞タンパク質合成系を採用することもできる。例えば、Z u b a y ら (Zubay et al., *Ann. Rev. Genet.* Vol.7, pp.267-287 (1973))、P r a t t ら (Pratt, J.M. et al., *Transcription and Translation - A practical approach*, (1984), pp.179-209, Henes, B.D. et al. eds., IRL Press, Oxford)、又は K i g a w a ら (Kigawa, T. et al, *J. Struct. Funct. Genomics*, Vol.5, pp63-68 (2004)) に開示の方法に従って組換え細菌株の抽出液を調製し、該抽出液の中で、非天

然タンパク質を製造してもよい。

[0059] したがって、非天然タンパク質の製造に用いる組換え細菌の抽出物であって、前記組換え細菌が、UAGコドンを認識するtRNAを発現すること、前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素を発現すること、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される1以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA構築物が導入されていること、及び／又は細菌染色体上の前記1以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変が導入されていること、前記翻訳終結因子をコードする遺伝子が欠損していることを特徴とする抽出物もまた、本発明の範疇に含まれる。

[0060] 非天然タンパク質製造用の組換え細菌の抽出物は、以下の調製方法を用いて調製することができる。非天然型アミノ酸に特異的なアミノアシル-tRNA合成酵素を生成することができる組換え細菌を培養し、遠心分離により回収する。回収した細菌を、洗浄し、緩衝液に再懸濁し、フレンチプレスやガラスビーズ、ワーリングブレンダー等を用いて破砕する。細菌の不溶分画を遠心分離で除去し、インキュベーションする。このインキュベーションによって内在性の核酸（DNA及びRNA）を分解することができる。内在性の核酸は、インキュベーション溶液に、さらにカルシウム塩やマイクロコッカスのヌクレアーゼ等を添加することでさらに分解できる。インキュベーション後、透析によって内在性のアミノ酸、核酸、ヌクレオシドなど除去して、抽出液を調製する。

[0061] 組換え細菌の抽出物を用いた非天然タンパク質の製造は、以下の製造方法を採用することができる。インビトロで調製したアンバーサプレッサーtRNAと、市販のtRNA画分と、鋳型DNA／RNAとを、組換え細菌の抽出物に加える。ここで、タンパク質及び製造系の種類に応じて、非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を加え、さらにエネルギー、イオン、緩衝液、

A T P再生系、核酸分解酵素阻害剤、還元剤、ポリエチレングリコール、c A M P、葉酸類及び抗菌剤等を加えてもよい。また、鋳型としてD N Aを用いる場合には、R N A合成系（基質、及びポリメラーゼなど）を加えることが好ましい。

[0062] 上述のとおり、本発明は、以下の形態でもあり得る。

[0063] （形態3）

形態1または形態2の作製方法において、前記細菌が、U A Gコドンを認識するt R N Aであって前記アミノアシルー t R N A合成酵素によってはアシル化されないt R N Aを発現しており、当該t R N Aをコードする遺伝子を欠損させるステップをさらに含む作製方法もまた可能である。

[0064] （形態4）

形態1または形態2の作製方法において、前記非天然タンパク質が非天然型アミノ酸あるいは α -ヒドロキシ酸を含む非天然タンパク質であることが好ましい。

[0065] （形態5）

また、前記細菌が大腸菌であることが好ましい。

[0066] （形態6）

また、前記1以上の遺伝子が、U A Gコドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で遺伝子欠損させると細菌が致死になる遺伝子であることが好ましい。

[0067] （形態7）

また、前記細菌が大腸菌であり、前記1以上の遺伝子が、c o a D、m u r F、h d a、m r e C、h e m A、l p x K及びl o l Aの中から選択される1以上の遺伝子であることが好ましい。

[0068] （形態8）

また、前記1以上の遺伝子が、大腸菌のc o a D、m u r F、h d a、m r e C、h e m A、l p x K及びl o l Aの中から選択される任意の6つの遺伝子であることが好ましい。

[0069] (形態 9)

また、前記 1 以上の遺伝子が、大腸菌の *coaD*、*hda*、*mreC* 及び *hemA* の遺伝子であることが好ましい。

[0070] (形態 10)

また、前記 1 以上の遺伝子として、遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が低下する遺伝子をさらに含むことが好ましい。

[0071] (形態 11)

また、遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が低下する上記遺伝子が、大腸菌の *sucB* 遺伝子であることが好ましい。

[0072] (形態 12)

また、前記細菌が大腸菌であり、前記 DNA 構築物は、*coaD*、*murF*、*hda*、*mreC*、*hemA*、*lpxK* 及び *lolA* の中から選択される 1 以上の遺伝子の機能を発現する DNA 構築物であることが好ましい。

[0073] (形態 13)

また、前記 DNA 構築物は、さらに大腸菌の *sucB* 遺伝子の機能を発現する DNA 構築物であることが好ましい。

[0074] (形態 14)

また、前記 DNA 構築物は、細菌染色体にトランス及び／又はシスに補充されるバクテリア人工染色体、プラスミドあるいは直鎖状 DNA であることが好ましい。

[0075] (形態 17)

形態 16 の組換え細菌において、前記組換え細菌が大腸菌由来であることが好ましい。

[0076] (形態 19)

形態 18 の製造方法において、前記組換え細菌が大腸菌由来であることが好ましい。

[0077] (形態 21)

形態 20 の抽出物において、前記組換え細菌が大腸菌由来であることが好

ましい。

[0078] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0079] [実施例 1]

[コンディショナル p r f A 変異株の作製]

p r f A 遺伝子を欠損させた大腸菌が生育するために必要な遺伝子を同定するために、本願発明者らは、コンディショナル p r f A 変異株を作製した（図 1 参照）。図 1 に示すように p r f A 遺伝子を欠損させることにより、終止コドン部位におけるサプレッサー t R N A との拮抗をなくすることができる。ここで、コンディショナル p r f A 変異株とは、L-アラビノースの存在下では p r f A 遺伝子の発現が誘導され、D-グルコースの存在下では p r f A 遺伝子の発現が抑制される変異株を意味する。

[0080] コンディショナル p r f A 変異株のグルコース存在下での生育状態を図 2 のレーン 1 及びレーン 2 に示している。図 2 のレーン 1 及び 2 に示すように、コンディショナル p r f A 変異株は、グルコースの存在下では生育しなかったが（レーン 1）、恒常的に p r f A 遺伝子を発現するプラスミドを導入したコンディショナル p r f A 変異株では、グルコースの存在下で生育した（レーン 2）。

[0081] 次に、大腸菌のアンバーサプレッサー t R N A^{Gln} 遺伝子又はアンバーサプレッサー t R N A^{Tyr} 遺伝子をコンディショナル p r f A 変異株に導入して、アンバーコドンが翻訳されるようにした。しかしながら、図 2 のレーン 4（アンバーサプレッサー t R N A^{Gln} を導入）及びレーン 5（アンバーサプレッ

サー tRNA^{Tyr}を導入) に示すように、何れの tRNA もグルコースの存在下でのコンディショナル p r f A 変異株の生育をサポートしなかった。一般的には、C末端に余分なペプチドを含むタンパク質は毒性を発揮しないが、余分なペプチドの付加がタンパク質の機能を欠損させることがある。そのため、アンバーサプレッサー tRNA^{Gln}又は tRNA^{Tyr}を導入した p r f A 変異株の成長は、アンバーコドンにおいて翻訳が終結せず、タンパク質に余分なペプチドが付加されたことによって、阻害されたと考えられる。

[0082] この知見に基づいて、本発明者らは、UAGコドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で欠損させると致死になる7つの大腸菌の遺伝子(すなわち、c o a D、m u r F、h d a、m r e C、h e m A、l p x K、l o l A)のアンバーコドン进行他の終止コドンに置き換えることによって、余分なペプチドの付加に起因する大腸菌の致死性を克服できると考えた。そして、アンバーコドンがオーカーコドン又はオパールコドンに置き換えられたこれら7つの遺伝子を発現するBACプラスミドであるBAC7を作製した。BAC7の作製方法を以下に示す。

[0083] [BAC7の作製、及びBAC7の導入]

まず、mini Fレプリコン及びゼオシン耐性遺伝子を有するBACプラスミドであるBAC0を、M o t o h a s h i ら (Motohashi, T., et al., Biochem Biophys Res Commun, Vol. 326, pp. 564-569 (2005)) に開示の方法に従って調製した。そして、f t s I 遺伝子、m u r E 遺伝子、m u r F 遺伝子、w a a A - c o a D のオペロン、m r e B - m r e C - m r e D のオペロン、y c a I - m s b A - l p x K のオペロン、h d a 遺伝子、h e m A 遺伝子、h e m K 遺伝子、及び l o l A 遺伝子を、BL21 (DE3) からクローニングした。クローニングされたc o a D、m u r F、h d a、m r e C、l p x K、l o l A、h e m A の各遺伝子のアンバーコドン (TAG) をオーカーコドン (TAA) に置き換える変異をPCRを用いて導入した。変異を導入したオペロン (又は変異遺伝子) をBAC0に導入して、BAC7を作製した。各オペロン及び各遺伝子の導入位置及び導入方向の概略を

図3に示す。図3の「gent」は、ゲンタマイシン耐性遺伝子を意味する。また、遺伝子名を囲んでいる矢印の向きは遺伝子の方向（5' から3' へ）を示しており、遺伝子名を含んでいない矢印は、転写プロモーターを示しており、その矢印の向きは転写の方向を示している。

[0084] なお、BAC7は、coaD、murF、hda、mreC、hemA、lpxK、lolAの遺伝子、及びmreD、hemKの遺伝子を発現すればよく、任意の方法を採用して作製することができる。例えば、hemA-prfA-hemKのオペロンをクローニングし、そのオペロンからprfAを除去するようにしてもよい。オペロン又は遺伝子は、プロモーター領域からクローニングすることが好ましい。

[0085] また、アンバーコドンがオーカーコドン又はオパールコドンに置き換えられたcoaD、murF、hda、mreC、lpxK、lolAの遺伝子及びhemKの遺伝子を発現するプラスミドを大腸菌に導入し、prfA遺伝子を欠損させるときに、ゲノム上のhemA遺伝子のアンバーコドンを、オーカーコドン又はオパールコドンに置き換えてもよい。

[0086] 作製したBAC7を、エレクトロポレーション法によってコンディショナルprfA変異株にトランスに導入した。

[0087] BAC7を導入したコンディショナルprfA変異株のグルコース存在下での生育状態を図2のレーン6-10に示している。図2のレーン6-8に示すように、コンディショナルprfA変異株は、BAC7のみを導入した場合には生育できなかったが（レーン6）、アンバーサプレッサーtRNA^{Gln}遺伝子及びBAC7を導入した場合（レーン7）並びにアンバーサプレッサーtRNA^{Tyr}遺伝子及びBAC7を導入した場合（レーン8）には、コンディショナルprfA変異株は生育できた。また、図2のレーン9及び10に示すように、大腸菌のアンバーサプレッサーtRNA遺伝子の代わりに、3-ヨードチロシンをタンパク質に導入するための古細菌の遺伝子のペアを導入した場合であっても、コンディショナルprfA変異株は生育でき（レーン9）、培地への3-ヨードチロシンの添加によってコンディショナルp

r f A 変異株の生育能力は改善された（レーン 10）。ここで、「古細菌の遺伝子のペア」とは、メタノカルドコッカス・ジャナシイ（*Methanocardococcus jannaschii*）由来のアンバーサプレッサー tRNA 遺伝子、及びチロシル tRNA 合成酵素（T y r R S）変異体（engineered tyrosyl-tRNA synthetase）をコードする I Y R S 遺伝子のペアである（Sakamoto, K., et al., Structure, Vol. 17, pp. 335-344 (2009)）。

[0088] 図 2 の結果は、アンバーコドンを含む 314 個の遺伝子の中で、2% の遺伝子のアンバーコドンを変更し、内在性又は直交性のアンバーサプレッサー tRNA を発現させることで、p r f A 遺伝子を欠損させたことによる大腸菌の致死性を克服できることを示唆する。

[0089] [p r f A 遺伝子の破壊株の作製]

次に、大腸菌 H S T O 8 株に B A C 7 を形質導入し、p r f A 遺伝子の主要部分（51-858 nt）をゼオシン耐性遺伝子で置き換えることによって、p r f A 遺伝子を欠損させた。ここで、H S T O 8 とは、アンバーサプレッサー tRNA^{Gln} をコードする s u p E 44 遺伝子を有する大腸菌である。

[0090] p r f A 遺伝子は、以下の遺伝子破壊方法を用いて欠損させた。ゼオシン耐性遺伝子（I n v i t r o g e n）の 5' 末端及び 3' 末端に、それぞれ、R F - 1 の N 末端に対応する 50 塩基対の DNA 配列及び R F - 1 の C 末端に対応する 225 塩基対の DNA 配列をセンス方向で連結し組換え用フラグメントを作製した。得られたフラグメントを大腸菌 H S T O 8 の染色体に挿入した。B A C 7 が導入されている大腸菌において、p r f A 遺伝子とゼオシン耐性遺伝子を含む組換え用フラグメントとの相同性組み換えを行うことによって、p r f A 遺伝子を欠損させた。この p r f A 遺伝子欠損株を、以下、R F z e r o - q と呼ぶ。なお、p r f A 遺伝子の遺伝子破壊は、本破壊方法に限定されず、周知の遺伝子破壊方法によって欠損させればよい。

[0091] p r f A 遺伝子の欠損を P C R によって確認した。結果を図 4 に示す。図 4（a）は遺伝子の置き換えの概略及び確認の P C R のためのプライマーの

位置を示した図であり、図4 (b) は、PCR産物のゲル電気泳動の結果を示す図である。図4 (b) のレーン1は、HST08における全長prfAのバンドを示し、図4 (b) のレーン2は、RFzero-qにおける全長prfAに対応するバンドを示す(図4 (a) における矢印P1, P2に示されるプライマーセットを使用して増幅)。図4 (b) のレーン3は、HST08のゲノムDNAを用いてprfAの中央領域を増幅した場合に検出されるバンドを示し、図4 (b) のレーン4は、RFzero-qのゲノムDNAを用いてprfAの中央領域を増幅した場合の検出結果を示す(図4 (a) における矢印P3, P4に示されるプライマーセットを使用して増幅)。図4に示される結果から、prfA遺伝子の欠損が確認できた。また、600nmにおける吸光度を測定することによって、各株の成長速度を測定した。その結果、BAC7を導入した大腸菌HST08株の増殖速度は、 1.3 h^{-1} であったのに対し、RFzero-q株の増殖速度は、 0.9 h^{-1} であった。

[0092] RFzero-q株がアンバーコドンにグルタミン酸を導入できることを確認するために、ORF内に3つのアンバーコドンを有するクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(c at)の変異遺伝子(c at (3Am)、と呼ぶ)でRFzero-q株を形質転換した。c at (3Am)のアミノ酸配列を図5 (a) に示す。図5 (a) のアミノ酸配列中の「X」は、c at (3Am)におけるアンバーコドンの位置を示し、RFzero-q株においてはグルタミン酸となる(配列番号17)。図5 (c) は、c at (3Am)形質転換体におけるクロラムフェニコール(Cm)耐性を調べた結果を示す図である。図5 (c) に示すように、野生型c at、及びc at (3Am)で形質転換されたRFzero-q株は、培地中のクロラムフェニコール濃度が $400\mu\text{g/mL}$ まで、クロラムフェニコール(Cm)耐性を示した。

[0093] さらに、ORF内に10個のアンバーコドンを有するc atの変異遺伝子(c at (10Am)、と呼ぶ)でRFzero-q株を形質転換した。c

a t (10Am) のアミノ酸配列を図5 (b) に示す。図5 (b) に示す配列中の「X」は、c a t (10Am) におけるアンバーコドンの位置を示し、R F z e r o - q 株においてはグルタミン酸となる (配列番号18)。図5 (c) に示すように、c a t (10Am) で形質転換された R F z e r o - q 株は、培地中のクロラムフェニコール濃度が $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで Cm 耐性を示した。グルタミン酸コドンの翻訳効率が、アンバーコドンへのグルタミン酸の導入効率よりも優れるため、c a t (10Am) を導入した R F z e r o - q 株では、Cm 耐性が落ちたと考えられる。一方では、図5 (b) に示すように、c a t (10Am) を導入した H S T 0 8 は、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cm が培地中に存在するだけで、生育できなかった。

[0094] 図5 に示す結果は、複数のアンバーコドンにグルタミン酸が組み込まれたことを示唆する。また、H S T 0 8 に B A C 7 を導入し、p r f A 遺伝子を欠損させることによって、アンバーコドンへのグルタミン酸の導入効率が劇的に改善されたことを実証する。

[0095] [非天然タンパク質製造用の組換え大腸菌の作製]

R F z e r o - q 株の s u p E 4 4 遺伝子を、大腸菌アンバーサプレッサー t R N A^{Tyr} 遺伝子で置き換えて、R F z e r o - y 株を作製した。また、3-ヨードチロシンの存在下で、R F z e r o - q 株の s u p E 4 4 遺伝子を、上述の古細菌の遺伝子のペアで置き換えて、R F z e r o - i y 株を作製した。具体的には、以下の形質転換方法を用いて、大腸菌を非天然タンパク質製造用の組換え大腸菌 (R F z e r o - i y) に形質転換した。メタノカルドコッカス・ジャナシイのアンバーサプレッサー t R N A (M J R 1 変異体) と、この直交系アンバーサプレッサー t R N A に 3-ヨードチロシンを付加するアミノアシル t R N A 合成酵素との組合せを発現するプラスミド (p i o d o T y r R S - M J R 1) のカナマイシン耐性誘導体 (p i o d o T y r R S - M J R 1 - k a n) (Sakamoto, K., et al., Structure, Vol. 17, pp. 335-344 (2009)) を R F z e r o - q に導入した。

[0096] なお、メタノカルドコッカス・ジャナシイの t R N A^{Tyr} は、上記で採用し

たMJR1変異体に限定されず、例えば、J17変異体 (Wang L, Schultz P G. A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. Chem Biol. 2001 Sep; 8(9):883-90) を採用してもよい。

[0097] RFzero-y株の生育速度の測定結果を図6に示す。図6中、「+LY」は、3-ヨードチロシン存在下での生育を、「-LY」は、3-ヨードチロシン非存在下での生育を示している。図6に示すように、RFzero-y株の生育速度は、3-ヨードチロシンの存在に依存した。図6の結果は、図2の結果と合致する。

[0098] [非天然タンパク質の製造方法]

次に、6つのアンバーコドンにN端付近に導入したグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子 (gst (6Am) と呼ぶ) をtacプロモーターの制御によって発現する変異GST発現システムを作製し、該変異GST発現システムをRFzero-q株、RFzero-y株、及びRFzero-i株に導入した。図7(a)は、gst (6Am) のN端側の45アミノ酸残基の配列を示している。図7(a)に示す配列中のアスタリスクは、gst (6Am) におけるアンバーコドンの位置を示す。このアンバーコドンの位置にグルタミン酸、チロシン及び3-ヨードチロシンが導入されている各gst (6Am) のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号19~21に示している。

[0099] 変異GST発現システムを導入した各株 (30 µLカルチャー) からgst (6Am) タンパク質を取得し、SDS-PAGEにかけ、抗GST抗体を用いてウエスタンブロッティングした (図7(b) 参照)。

[0100] また、取得したgst (6Am) タンパク質をトリプシン処理し、質量分析によって解析した。RFzero-i株から取得したgst (6Am) タンパク質の解析結果を図7(c)に示し、RFzero-q株及びRFzero-y株から取得したgst (6Am) タンパク質の解析結果をそれぞれ図8(a)及び(b)に示す。図7(c)に示すように、質量分析の結果から、RFzero-i株は、5つの3-ヨードチロシンを含むペプチド

A : D P * S * S * S * S * S N S G V T K (配列番号 2 2) と、1 つの 3-ヨードチロシンを含むペプチド B : N P * S S P I L G Y W K (配列番号 2 3) を生産したことがわかった。ここで「*」は、g s t (6 A m) タンパク質におけるアンバーコドンの位置を示し、3-ヨードチロシンが導入されている。また、図 8 に示すように、R F z e r o - q 株、及び R F z e r o - y 株も、6 つのアンバーコドンに対応する位置にグルタミン酸、及びチロシンを含むペプチドを各々生産したことがわかった。R F z e r o - q 株から取得したタンパク質の解析により得られたアミノ配列を配列番号 2 4 及び 2 5 に示し、R F z e r o - y 株から取得したタンパク質の解析により得られたアミノ配列を配列番号 2 6 及び 2 7 に示す。

[0101] 上述のように、U A G コドンを認識する t R N A を大腸菌内で発現させ、この t R N A を非天然型アミノ酸である 3-ヨードチロシンによってアシル化するアミノアシルー t R N A 合成酵素を発現させ、p r f A 遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を発現させる DNA 構築物 (例えば、B A C 7) を大腸菌に導入し、大腸菌の p r f A 遺伝子を欠損させることによって、非天然タンパク質製造用の大腸菌が作製できることがわかった。

[0102] 以上のように、本発明の非天然タンパク質製造用の大腸菌の作製方法を使用すれば、大腸菌の p r f A 遺伝子を容易に欠損させることができるので、所望の大腸菌を用いた非天然タンパク質の製造効率を容易に向上させることができる。また、本発明の大腸菌は、効率よく非天然型アミノ酸をタンパク質に導入することができる。また、本発明の非天然タンパク質の製造方法を用いれば、効率よく非天然タンパク質を製造することができる。

[0103] 本発明は、大腸菌の p r f A 遺伝子を容易に欠損させることができるので、大腸菌株のライブラリーを利用して、多様な p r f A 欠損株を作製できる。それによって、非天然タンパク質を製造するときに、目的のタンパク質に応じて最適な p r f A 欠損株を選択することができる。そのため、本発明は、汎用性が低い大腸菌を使用する場合よりも、効率の良い非天然タンパク質

の製造が期待できる。

[0104] 〔実施例 2〕

実施例 1 では、3-ヨードチロシンが導入された非天然タンパク質製造用の大腸菌の作製方法などについて説明した。しかしながら、本発明は、3-ヨードチロシンに限定されず、任意の非天然型アミノ酸を採用することができる。本実施例では、非天然型アミノ酸として 4-アジドフェニルアラニンを導入する非天然タンパク質を製造する組換え大腸菌を作製し、この組換え大腸菌を用いて非天然タンパク質を製造した。

[0105] 本実施例では、I Y R S 遺伝子の代わりに、アンバーサプレッサー t R N A に 4-アジドフェニルアラニン付加するアミノアシルー t R N A 合成酵素であるメタノコッカス・ジャナシイ (*Methanococcus jannaschii*) の A z F R S 遺伝子 (Chin JW, Santoro SW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. J Am Chem Soc. 2002 Aug 7;124(31):9026-7.) を導入して、R F z e r o - a z f 株を作製した。I Y R S 遺伝子の代わりに A z F R S 遺伝子を導入した以外は実施例 1 と同様である。

[0106] 変異 G S T 発現システムを導入した各株 (30 μ L カルチャー) から g s t (6 A m) タンパク質を取得し、S D S - P A G E にかき、抗 G S T 抗体を用いてウエスタンブロッティングした。結果を図 9 に示す。

[0107] 図 9 に示すように、R F z e r o - a z f 株は、全長の g s t を発現している。したがって、I Y R S 遺伝子の代わりに A z F R S 遺伝子を導入した R F z e r o - a z f 株は、アンバーコドンへ 4-アジドフェニルアラニンを導入することができたことを示している。すなわち、本発明は、任意の非天然型アミノ酸を採用することができる。

[0108] 〔実施例 3〕

上述の実施例では、U A G コドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で欠損させると致死になる大腸菌の 7 つの遺伝子全てについて、その機能が発揮できるようにしていた。

[0109] 本実施例では、BACに導入する遺伝子を減らして、組換え細菌を作製した。具体的には、単独で欠損させると致死になる大腸菌の7つの遺伝子（*coaD*、*murF*、*hda*、*mreC*、*hemA*、*lpxK*、*lolA*）のうちの*hda*を除く他の6つの遺伝子の何れかを含んでいないBACプラスミドを調製し、このBACプラスミドを導入した大腸菌について、*prfA*遺伝子を欠損させた。使用した大腸菌はHST08株である。結果を図10に示す。

[0110] 図10（a）は、遺伝子の置き換えの概略及び確認のPCRのためのプライマーの位置を示した図であり、図10（b）は、PCR産物のゲル電気泳動の結果を示す図である。図10（b）は、図10（a）のP7，P8のプライマーセット又はP9，P10のプライマーセットで増幅した以下の株のフラグメント又は*prfA*遺伝子の欠損を示す、レーン1及び2：HST08+BAC7、レーン3及び4：RFzero-qのみ、レーン5及び6：RFzero-q+ Δ *murF*（*murF*を除く6種類の遺伝子を導入したBAC、以下同様）、レーン7及び8：RFzero-q+ Δ *coaD*、レーン9及び10：RFzero-q+ Δ *mreBCD*、レーン11及び12：RFzero-q+ Δ *lpxK*、レーン13及び14：RFzero-q+ Δ *hemAK*、レーン15及び16：RFzero-q+ Δ *lolA*。奇数レーンは図10（a）における矢印P5，P6に示されるプライマーセットを使用して増幅したものであり、偶数レーンは図10（a）における矢印P7，P8に示されるプライマーセットを使用して増幅したものである。

[0111] 図10に示す結果から、BACに導入する遺伝子（*hda*を除く）を減らしても、増殖可能な*prfA*欠損株を作製できることが示された。

[0112] また、*waaA-coaD*のオペロン、*hda*遺伝子、*mreB-mreC-mreD*のオペロン（又は変異遺伝子）のみを含むBAC3を作製し、HST08に導入した（図11参照）。次いで、*prfA*全長を除くように、*prfA*遺伝子をゼオシン耐性遺伝子で置換して、*prfA*遺伝子を欠損させた。なお、*hemA*遺伝子はゲノム上で*prfA*遺伝子に隣接している

ため、p r f A 遺伝子を欠損させる組換えのときに、ゲノム上の h e m A 遺伝子の T A G コドン（終止コドン）を T A A に置き換えた。すなわち、単独で欠損させると致死になる遺伝子をトランスに導入する方法、及び染色体上の単独で欠損させると致死になる遺伝子のアンバーコドンを改変する方法を組み合わせている。

[0113] 図 1 1 (a) 遺伝子の置き換えの概略及び確認の P C R のためのプライマーの位置を示した図であり、図 1 1 (b) は、P C R 産物のゲル電気泳動の結果を示す図である。図 1 1 (b) は、図 1 1 (a) の矢印 P 5, P 6 のプライマーセット又は矢印 P 7, P 8 のプライマーセットで増幅した、B A C 3 を導入した以下の株のフラグメント又は p r f A 遺伝子の欠損を示す、レーン 1 : H S T 0 8、レーン 2 : H S T 0 8、レーン 3 : H S T 0 8 + B A C 3 + p r f A の欠損、レーン 4 : H S T 0 8 + B A C 3 + p r f A の欠損。奇数レーンは図 1 1 (a) における矢印 P 5, P 6 に示されるプライマーセットを使用して増幅したものであり、偶数レーンは図 1 1 (a) における矢印 P 7, P 8 に示されるプライマーセットを使用して増幅したものである。

[0114] 図 1 1 に示す結果から、B A C に導入する遺伝子（h d a を除く）を減らしても、増殖可能な p r f A 欠損株を作製できることが示された。

[0115] また、U A G コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子として選択される 1 以上の遺伝子に、任意の遺伝子を付加することもできる。すなわち、B A C に導入する遺伝子を減らした株には、成長速度が減少した株があった。そのため、遺伝子の数を増やした場合には、さらに大腸菌の生育速度及び／又は非天然タンパク質の製造効率が改善されることは容易に理解でき、本発明は、遺伝子の数を増やした実施形態も含む。増やす遺伝子としては、U A G コドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が極端に低下する事が知られている遺伝子である事が望ましい。大腸菌においては、f l i N, f l i P, f l i Q, s u c B, u b i F, u l a F, a t p E, f

a b Hがこれに該当するがこれらに限らない。f l i N, f l i P, f l i Q, s u c B, u b i F, u l a F, a t p E及びf a b Hの遺伝子の核酸配列を、それぞれ、配列番号9、10、11、12、13、14、15及び16に示す。なお、各配列番号によって表されているこれら遺伝子の核酸配列は、大腸菌K-12株のものであり、他の菌株においては塩基の置換が含まれる場合もあるが、それらも上記遺伝子として含まれる。増やす遺伝子の数としては、好適には1~30個、更に好適には1~20個、最も好適には1~10個である事が望ましい。

[0116] 〔実施例4〕

上述の実施例では、宿主細胞の細菌として大腸菌HST08株を使用した。しかしながら、他の大腸菌を使用してもよい。本実施例では、大腸菌HST08株の代わりに、K-12株であるHMS174 (DE3) を使用して、非天然タンパク質製造用の組換え細菌 (RF zero-y) を作製した。また、メタノカルドコッカス・ジャナシイ由来のアンバーサプレッサー tRNA 遺伝子及びIYRS 遺伝子を含むペアの代わりに、GlnRS 及び tRNA^{Gln}_{CUA} を導入した組換え細菌も作製した (RF zero-q) 。

[0117] まず、HMS174 (DE3) にBAC6-ΔhemAKをトランスに導入した。ここで、BAC6-ΔhemAKは、BAC7プラスミドからhemAKオペロンをCATで置換して除いたBACプラスミドである。次いで、アンバーサプレッサー tRNA 及び対応アミノアシルー tRNA 合成酵素のペアをコードしているプラスミドを導入した。次いで、prfAをゼオシン耐性遺伝子で置換することにより、prfA遺伝子を欠損させた。なお、本実施例では、prfA全長が取り除かれるように、ゼオシン耐性遺伝子で置換した (図12 (a) 参照)。なお、本実施例においても、prfA遺伝子を欠損させる組換えのときに、ゲノム上のhemA遺伝子のTAGコドン (終止コドン) をTAAに置き換えている。

[0118] なお、図2に示すように、UAGコドンを認識する tRNA (言い換えると、アンバーサプレッサー tRNA) 及びこの tRNA をアミノアシル化す

る酵素を発現しない大腸菌は、BAC7を導入しただけでは、生育できない。そのため、UAGコドンを認識するtRNA及びこのtRNAをアミノアシル化する酵素を発現するように形質転換した後に、大腸菌のprfA遺伝子を欠損させることが好ましい。

[0119] 図12(a)は、prfA遺伝子の置き換えの概略及び欠損確認のPCRのためのプライマーの位置を示した図であり、図12(b)は、PCR産物のゲル電気泳動の結果を示す図である。各レーンにおける鋳型DNAとした菌株は次の通りである；レーン1：HST08、レーン2：HST08、レーン3：HMS174(DE3)のRFzero-q、レーン4：HMS174(DE3)のRFzero-q、レーン5：HMS174(DE3)のRFzero-i y、レーン6：HMS174(DE3)のRFzero-i y。奇数レーンは図12(a)における矢印P5、P6に示されるプライマーセットを使用して増幅したものであり、偶数レーンは図12(a)における矢印P7、P8に示されるプライマーセットを使用して増幅したものである。図12に示される結果から、prfA遺伝子の欠損が確認できた。

[0120] [実施例5]

本実施例では、UAGコドンで翻訳終結し、単独で遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が極端に低下することが知られている遺伝子の中から、非天然タンパク質製造用の組換え大腸菌の増殖速度を向上させる遺伝子の探索を行った。候補遺伝子の探索には、BW25113株を使用した。BW25113株はKEIOコレクションの親株であり(Baba et al., Mol. Syst. Biol. 2, 2006.0008 (2006))、K-12株の野生型とほぼ同等である。候補遺伝子の探索のために、BW25113株から Δ prfA株を作製した。具体的には、cat遺伝子を持つBAC6- Δ hemAKを導入し、supEとグルタミニル-tRNA合成酵素(GlnRS)とを発現するpGlnRS-supE-kan、又はpiodoTy rRS-MJR1-kanをさらに導入した後に、prfAをゼオシン耐性遺伝子で置換することにより、prfA遺伝子を欠損させた。なお、本実施例では、prfA全長が取り除かれ

るように、ゼオシン耐性遺伝子で置換した。なお、本実施例においても、*p r f A* 遺伝子を欠損させる組換えのときに、ゲノム上の *h e m A* 遺伝子の *T A G* コドン（終止コドン）を *T A A* に置き換えている。BW25113は野生株に近い抗生物質に対する耐性が強く、ゼオシン $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ で組換えコロニーのセレクションを行った。

[0121] 各候補遺伝子の終始コドンをPCRによって *T A A* に置換した後、*p A p 102* ベクターにクローニングして各発現プラスミドを作製した。次いで、この発現プラスミドを用いて、上記の $\Delta p r f A$ 株を形質転換した。その結果、候補遺伝子の一つである *s u c B* の発現系を導入した形質転換体は、 30°C の液体培地中でとりわけよく増殖した。表1は、*s u c B* 発現プラスミド又はコントロールを、上記の $\Delta p r f A$ 株であるBW25113 [*B A C 6* - $\Delta h e m A K$ *p i o d o T y r R S* - *M J R 1* - *k a n* *p r f A* : : *z e o* *h e m A* (*T A G* $\rightarrow$ *T A A*)] に導入し、単一コロニーを1晩 30°C で振とう培養したときの増殖を調べた結果を示している。*s u c B* はクエン酸回路を構成する α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼのE2サブユニットをコードする遺伝子である。野生型 *s u c B* 遺伝子の *U A G* コドンは2つ連続しており、3-ヨードチロシンが連続して導入されることで、発現量あるいは活性が大幅に低下するものと考えられる。なお、プレート培養におけるコロニーはサイズがほとんど変わらなかったため、*s u c B* の機能は、特に液性培地中での増殖能に寄与していると予想される。

[0122] [表1]

導入コンストラクト	OD600
<i>s u c B</i> 発現系	1.26
<i>p A p 102</i> ベクター	0.93

[0123] [実施例6]

本実施例では、大腸菌HST08株の代わりに、BW25113、K-12株であるHMS174 (DE3)、及びB株由来のBL21 (DE3) を使用して、かつ *B A C 7* プラスミドに *s u c B* 遺伝子を組み込んだプラスミ

ドを用いて、非天然タンパク質製造用の組換え細菌（BW25113RFzero-y、HMS174RFzero-y、BL21RFzero-y）を作製した。

[0124] まず、終始コドンにTAAに置換したsucBをBAC7プラスミドへクローニングした。また、このプラスミドにおいてセレクションマーカーをcatに置換した。このプラスミドをBAC8プラスミドとした。BAC8における各オペロン及び各遺伝子の導入位置及び導入方向の概略を図13に示す。図13に示すとおり、catの終止コドンのすぐ下流にsucBがクローニングされている。そのため、sucBはcatプロモーターにより転写されることとなる。

[0125] 次に、BW25113、HMS174（DE3）、及びBL21（DE3）にBAC8を導入した。さらに、マーカー遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子からゲンタマイシン耐性遺伝子に変更している以外はpidoTyRS-MJR1-kanと同じであるpidoTyRS-MJR1-gentを、BAC8を導入した株に導入した。次いで、実施例5と同様にしてprfAをゼオシン耐性遺伝子で置換して、prfA遺伝子を欠損させた。それぞれのRFzero-y株においてprfA遺伝子の欠損をPCRによって確認した結果を図14に示す。図14（a）は遺伝子の置き換えの概略及び確認のPCRのためのプライマーの位置を示した図であり、図14（b）は、PCR産物のゲル電気泳動の結果を示す図である。コロニーPCRを行った結果、prfA遺伝子の欠損が確認できた（図14（b）参照）。以上から、BAC8を用いて、K-12株及びB株由来の大腸菌株において、容易にprfA遺伝子を欠損させることが可能であることが示された。

[0126] 得られたBW25113RFzero-y、HMS174RFzero-y、及びBL21RFzero-yに関し、3-ヨードチロシンを含む培地における増殖速度を測定した。結果を図24に示す。その結果、BW25113RFzero-y及びBL21RFzero-yは、prfA⁺であるこれらの親株とほとんど同程度の速度で増殖した（図24（a）及

び(c))。一方、HMS174RFzero-yは、prfA⁺であるこの親株よりも緩やかに増殖した(図24(b))。

[0127] さらに、各RFzero-y株の増殖における非天然型アミノ酸の依存性について確認した。1晩培養した細胞培養物を希釈して、3-ヨードチロシンを含む非選択LB培地上、および3-ヨードチロシンを含まない非選択LB培地上にスポットしてさらに培養した。結果を図25に示す。図25に示されるように、いずれのRFzero-y株の増殖も、3-ヨードチロシンの存在に完全に依存していた。このことは、prfAノックアウトにおける致死性を回避するためには細胞内におけるUAG翻訳活性が必要であることと整合している。

[0128] [実施例7]

本実施例では、実施例6で作製したBW25113RFzero-y株の性質を調べた。

[0129] まず、BW25113RFzero-y株の微量のグリセロールストックをLB液体培地、及び、3-ヨードチロシン(IY)、3-ブロモチロシン(BrY)又は3-クロロチロシン(CIY)のいずれかを添加したLB液体培地に加えて37℃で一晩振とう培養して、その増殖を調べた。結果を表2に示す。

[0130] [表2]

非天然アミノ酸	OD600
—	0.00
IY	1.36
BrY	1.39
CIY	1.41

[0131] 表2に示すとおり、非天然型アミノ酸を含まないLB液体培地では細胞増殖が全く見られなかった。一方、非天然型アミノ酸を加えた場合は、いずれの非天然型アミノ酸であっても、培養液の濁度がOD600=約1.4になり、十分に増殖することができた。すなわち、iodoTyRS-mjは3-ヨードチロシン以外にも、3-ブロモチロシン及び3-クロロチロシン

を認識することができた。

[0132] 以上から、BW25113RFzero-y株においては、UAGコドンに3-ヨードチロシン、3-ブロモチロシン及び3-クロロチロシンのいずれにも割り当てることが可能であることが示された。HMS174(DE3)RFzero-y及びBL21(DE3)RFzero-yにおいても同様であると予想される。

[0133] [実施例8]

上記の実施例2では、HST08株を宿主細胞の細菌として、3-ヨードチロシン以外の非天然型アミノ酸(4-アジドフェニルアラニン)を導入する非天然タンパク質製造用の組換え細菌(RFzero-azf)を作製した。本実施例では、宿主細胞の細菌としてBL21(DE3)を使用するとともに、3-ヨードチロシン以外の非天然型アミノ酸として、4-アジドフェニルアラニンのほかにO-スルホチロシンの導入も試みた。

[0134] 4-アジドフェニルアラニン又はO-スルホチロシンを導入する場合には、それぞれに特異的なアミノアシル-tRNA合成酵素である、メタノコッカス・ジャナシイのAzFRS遺伝子(AzFRS-mj)又はメタノコッカス・ジャナシイのSfYRS遺伝子(SfYRS-mj)(Liu, C.C. and Schultz, P.G., Nat. Biotechnol., 2006, 24, 1436-1440.)を発現させる必要がある。

[0135] まず、pET21bベクターにgst(6Am)がクローニングされたプラスミドpETGST(6Am)に、AzFRS-mj又はSfYRS-mjの発現系をクローニングすることで、pETGST(6Am)-AzFRS-mj又はpETGST(6Am)-SfYRS-mjを作製した。なお、AzFRS-mj及びSfYRS-mjの活性を高めるために、新たにD286R変異(Kobayashi, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 4678-4683.)を導入した。

[0136] 次いで、実施例6で作製したBL21RFzero-yを、pETGST(6Am)-AzFRS-mj又はpETGST(6Am)-SfYRS

—m j によって形質転換し、4-アジドフェニルアラニン又はO-スルホチロシンを含むLBプレートにまき、コロニー形成を観察した。UAGコドンの割り当てを4-アジドフェニルアラニンに変更した株を、BL21RF zero-azfとし、O-スルホチロシンに変更した株をBL21RF zero-sfyとする。結果、BL21RF zero-azfのAzFプレート上での増殖速度は、LYプレート上でのRF zero-iyの増殖速度より遅く、SfYプレート上でのBL21RF zero-sfyの増殖速度は、LYプレート上でのRF zero-iyの増殖速度以上であった。なお、BL21RF zero-azf及びBL21RF zero-sfyは3-ヨードチロシンを含むLBプレート上ではほとんど増殖できない。これはAzFRS—m j 及びSfYRS—m j が中程度コピープラスミドから発現するとともに、D286R変異によりM. jannaschiiのtRNA^{Tyr_C}_{UA}分子を強く認識するため、低コピープラスミドから発現する弱いiodoTyrRS—m j からtRNAが奪われてしまうためだと考えられる。

[0137] 〔実施例9〕

実施例8において、BL21RF zero-sfyの増殖速度はBL21RF zero-azfの増殖速度よりも優れていた。AzFRS—m j の活性は他の変異体よりも弱いため、UAGコドンの翻訳効率とRF zero株の増殖速度とが相関している可能性が高い。そこで、過剰量のメタノコッカス・ジャナシイTyrRS変異体に対してメタノコッカス・ジャナシイtRNA^{Tyr_C}_{UA}分子が不足していると予想されるため、さらにメタノコッカス・ジャナシイtRNA^{Tyr_C}_{UA}の過剰発現系を導入することを試みた。AzFRS—m j の基質tRNAとして、pAzPhe1変異体が報告されており、アンバーサプレッション効率が3.6倍増加することが知られている (Guo et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2009, 48, 9148-9151.)。そこで、pETGST (25Am) にAzFRS—m j 及びpAzPhe1の両方の発現系をクローニングした、pETGST (25Am) —AzFRS—m j —pAzPhe1を作製した。pAzPhe1はlppプロモーターから発

現させた。l p pプロモーターは強力なプロモーターとして知られている。

[0138] 実施例6で作製したBL21RFzero-iy株をpETGST(25Am)-AzFRS-mj-pAzPhe1によって形質転換し、4-アジドフェニルアラニン又は3-ヨードチロシンを含むLBプレートにまいた。結果を表3に示す。4-アジドフェニルアラニン入りプレート上において、BL21RFzero-azf(AzFRS-mj-pAzPhe1)株はBL21RFzero-azf(AzFRS-mj)株よりもはるかに生育がよく(表3中、カラム1vs3)、かつRFzero-iy株よりも生育がよかった(表3中、カラム1vs2)。また、BL21RFzero-azf(AzFRS-mj-pAzPhe1)株は3-ヨードチロシンを含むLBプレート上でも、増殖することができた(表3中、カラム4)。したがって、メタノコッカス・ジャナシイのTy rRS変異体／tRNA^{Ty r}_{CUA}ペアを中程度コピー数のプラスミドに載せてBL21(DE3)RFzero-iy株に導入することにより、UAGコドン、さらに他の非天然型アミノ酸に再定義できることが示された。

[0139] [表3]

	1	2	3	4
コロニーサイズ	++++	+++	++	+
AzFRS-mj(D286)	+	-	+	+
pAzPhe1	+	-	-	+
アミノ酸	AzF	IY	AzF	IY

[0140] 次に、BW25113RFzero-iy株を用いて確認実験を行った。gstをtacプロモーター下流につないだpTacGSTプラスミドに、それぞれiodoTy rRS-mj-Nap3発現系、AzFRS-mj-pAzPhe1発現系、及びSfYRS-mj-Nap3発現系を載せた、pTacGST-iodoTy rRS-mj-Nap3、pTacGST-AzFRS-mj-pAzPhe1、及びpTacGST-SfYRS-mj-Nap3を作製した。Nap3は後述するように、tRNA^{Ty r}_{CUA}の高活型変異体である。また、いずれのaaRSもD286変異を有するもので

ある。BW25113RFzero-iy株をこれら3種類のプラスミドのいずれかによって形質転換し、得られた形質転換体のコロニーを10倍ずつ段階希釈して、それぞれ非天然型アミノ酸有り、及び非天然型アミノ酸無しのLBプレートにスポットした。結果を図15に示す。

[0141] 図15に示されるように、いずれの形質転換体も、非天然型アミノ酸を含むプレート上でのみ増殖が見られ、非天然型アミノ酸を含まないプレート上では一切増殖しなかった。以上から、BW25113RFzero-iy株においても、BL21(DE3)RFzero-iy株と同様に、UAGコドンを中心に他の非天然型アミノ酸に再定義できることが示された。

[0142] [実施例10]

上述の実施例から、RFzero-iy株の増殖速度を向上させるためには、iodoTy rRS-mj / tRNA^{Tyr}_{CUA}ペアを改良すればよいことが示唆される。そこで、本実施例では、pAzPhe1変異体のように高活性であり、多くのメタノコッカス・ジャナシイTy rRS変異体に対して優れた基質であると予想されるNap3変異体を採用した。なお、pAzPhe1はNap3のC16が欠損したものである(Guo et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2009, 48, 9148-9151.)。

[0143] まず、gst(73Am)変異体がクローニングされたpTacGST(73Am)プラスミドに、iodoTy rRS-mj(D286R)及びNap3の発現系を組み込んだ、pTacGST(73Am)-iodoTy rRS-mj-Nap3を作製した。次いで、BW25113RFzero-iy株にpTacGST(73Am)又はpTacGST(73Am)-iodoTy rRS-mj-Nap3を導入し、3-ヨードチロシンを含むLBプレート上でのコロニー形成を観察した。結果を図16に示す。

[0144] 図16に示されるように、pTacGST(73Am)-iodoTy rRS-mj-Nap3を導入したRFzero-iy株(図16(b))はpTacGST(73Am)を導入したRFzero-iy株(図16(a))と比較して圧倒的に増殖能が高かった。以上より、UAGコドンの翻訳

効率を高めることにより、RF zero-y株の増殖速度を向上させることができることが示された。

[0145] 〔実施例 11〕

上述の実施例から、RF zero-y株の増殖速度を高めるには、sucBを正常に発現させ、UAGコドンの翻訳効率を高めればよいことが明らかとなった。そこで、本実施例では、これらの要素が増殖速度に与える効果を確認した。具体的には、増殖曲線を観察することで、増殖速度に与えるそれぞれの効果を見積もった。

[0146] まず、HST08株由来のRF zero-y株における効果を調べた。終止コドンにUAAに置換したsucB遺伝子を、アンピシリン耐性遺伝子の直下につなぎ、pBR322ベクターにクローニングした。同様に、iodoTy rRS-mj / Nap3ペアを、pBR322に、単独あるいはsucB発現系と共にクローニングした。次いで、RF zero-y株をpBR322 (vector)、sucB発現系プラスミド、sucB / iodoTy rRS-mj / Nap3発現系プラスミドによって形質転換した。得られた形質転換体の増殖速度を測定した。比較として、HST08 [BAC7 gent supE44 :: cat piodoTy rRS-MJR1-kan] 株にpBR322又はaaRS / tRNA発現系プラスミドを導入し、同様にして増殖速度を測定した。結果を図17に示す。

[0147] 図17に示されるとおり、RF zero-y株にpBR322ベクターを導入した場合には、図6に示す増殖曲線を再現し、OD600が0.4を超えるあたりで増殖速度を落とし、その後、そのままの速度で増え続けた。なお、20時間後には野生型よりも濁度が高くなるが、死滅細胞が多いようであり、正常に分裂を休止できないようであった。一方、RF zero-y株にsucB発現系を導入すると、OD600が0.4を超えるあたりでも増殖速度が落ちず、最終的には野生型HST08株と同程度に増殖した。なお、sucB発現系に加えてiodoTy rRS-mj / Nap3発現系を導入した場合（図17中、「sucB & aaRS & tRNA」）には、BW2511

3株とは異なり、増殖速度をさらに高めることはなかった。形質転換コロニーの形状にも変化が見られないことから、HST08株のRF zero-iy株においては、UAGの翻訳効率には既に十分に高いことが予想される。

[0148] ところで、野生型のHST08株においてiodoTy rRS-mj/Nap3ペアを過剰発現させた場合には、わずかながら増殖速度が低下するものの、報告されている通り (Guo et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2009, 48, 9148-9151.)、Nap3変異体は大量発現させても細胞毒性がでにくいことが確認された。

[0149] 次に、HST08株由来のRF zero-iy株と同様にして、BW25113由来のRF zero-iy株における効果を確認した。具体的には、BW25113 [BAC6-hemAK piodoTy rRS-MJR1-kan prfA::zeo hemA (TAG→TAA)] 株をpBR322、sucB発現系プラスミド、又はsucB/iodoTy rRS-mj/Nap3発現系プラスミドによって形質転換し、それぞれの増殖速度を測定した。比較として、BW25113 [BAC6-hemAK piodoTy rRS-MJR1-kan] 株に、pBR322又はiodoTy rRS-mj/Nap3発現系プラスミドを導入し、同様にして増殖速度を測定した。結果を図18に示す。

[0150] 図18に示されるとおり、BW25113由来のRF zero-iy株においてsucBを発現させたところ、増殖速度が速まるのではなく、増殖速度は維持されていた。一方、sucB発現系に加えてiodoTy rRS-mj/Nap3発現系を導入した場合 (図18中、「sucB & aaRS & tRNA」) には、HST08株とは異なり、劇的な増殖速度の回復が見られ、 Δ prfA株でありながら、野生株に近い増殖曲線が観察された。また、形質転換コロニーの形状も、野生株における形状に非常に類似していた。

[0151] HST08から作製したRF zero-iy株とBW25113から作製したRF zero-iy株とを比較すると、HST08RF zero-iy株においては、UAGの翻訳効率ではなく、sucBの低活性化が増殖を妨

げており、一方、BW25113RFzero-iy株においては、sucBの低活性化に加え、UAGの翻訳が間に合っていないことが増殖を妨げていたことが明らかとなった。さらに、BL21(DE3)株においては、BAC7を用いてBL21(DE3)RFzero-iy株を作製でき、プレート培養が可能であるものの、液体培養を含む通常の遺伝子作業に用いるには、BAC8を用いたり、トランスにsucB発現系を導入したりするなど、sucB発現系を補充することがより望ましいことが明らかとなった。

[0152] [実施例12]

本実施例では、ORF中にUAGコドンを含むgst変異体の発現を確認した。

[0153] まず、pTacGST(73Am)-iodoTyrrRS-mj-Nap3上のgst(73Am)変異体において、さらに22、57、141、155及び163残基目のいずれかのチロシンコドンにUAGを置換し、UAGコドンが2か所に導入されたシリーズを作製した。比較として、野生型gstを同様にクローニングして、pTacGST-iodoTyrrRS-mj-Nap3を作製した。BW25113RFzero-iy株に、上記シリーズのうちのいずれか、又はpTacGST(73Am)-iodoTyrrRS-mj-Nap3、又はpTacGST-iodoTyrrRS-mj-Nap3を導入し、全長GSTの発現を、抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。結果を図19に示す。

[0154] 図19に示されるように、野生型gstの発現と比較し、gst(73Am)変異体も、さらなるUAGコドンを導入した各変異体も同程度に発現していた。すなわち、UAGコドンが3-コードチロシンとして効率良く翻訳されていることが示された。さらに、UAGの位置で翻訳終結した断片は検出されなかったため、UAGは完全なセンスコドンになっていることが明らかとなった。

[0155] 次に、gstの1(gst(25Am)に相当)、22、57、73、141、155、163残基目のアミノ酸のコドン全てをUAGコドンに置換

した、pTacGST (7Am) -iodoTy rRS -mj -Nap3を作製した。当該コンストラクトをBW25113RFzero-y株に導入し、gstの発現を調べた。結果を図20に示す。

[0156] 図20に示されるように、野生型gst及びgst (7Am)の発現量をSDS-PAGEにより比較したところ、同程度の大量発現が観察された。したがって、BW25113RFzero-y株は、増殖速度において野生株に匹敵し、UAGの翻訳効率においてもチロシンコドンに匹敵し、UAGコドンが完全に3-ヨードチロシンに再定義された生物種であることが明らかとなった。

[0157] [実施例13]

本実施例では、BW25113株におけるUAGコドンを種々のチロシン誘導体およびリジン誘導体に割り当てることによって、非天然型アミノ酸の導入を試みた。具体的には、実施例6で作製したBW25113RFzero-y株において、UAGコドンを種々のチロシン誘導体およびリジン誘導体に再定義することにより、非天然型アミノ酸の導入を試みた。

[0158] 本実施例において使用される古細菌のTy rRSおよびPy lRSは、大腸菌において、所望の非天然型アミノ酸を、UAGコドンを認識するtRNAと結合させるように改変されている。具体的には、実施例8におけるAzFRS -mj、実施例8におけるSfYRS -mj、Nε-アセチル-L-リジン (AcLys) をペアとなるアンバーサプレッサーtRNA (Methanosarcina mazei tRNA^{Py l}) に結合させるPy lRS誘導体 (上述のAcKRS -3)、Nε-アリルオキシカルボニル-L-リジン (Al o cLys) またはNε-(o-アジドベンジルオキシカルボニル)-L-リジン (AzZLys) をペアとなるアンバーサプレッサーtRNA (Methanosarcina mazei tRNA^{Py l}) に結合させるPy lRS誘導体 (Yanagisawa T. et al, Chem, Biol, 15, pp1187-1197 (2008)) を使用した。本実施例で使用した非天然型アミノ酸の構造を図26に示す。

[0159] RS誘導体のそれぞれを、ペアとなるアンバーサプレッサーtRNAとと

もに、BW25113RFzero-yにおいて発現させた。なお、UAGコドンをも3-ヨードチロシンに翻訳するRFzero-yの内在性の系は、3-ヨードチロシンの非存在下においては機能しない。そのため、別のRS誘導体ペア-tRNAをコードするコンストラクトを導入してこれらを発現させ、対応する非天然型アミノ酸を添加することにより、RFzero-yにおけるUAGコドンをも3-ヨードチロシンから所望の非天然型アミノ酸に再定義することができる。

[0160] 各RS誘導体-tRNAペアを発現している株を、対応する非天然型アミノ酸を含む培地において増殖させ、その増殖速度を測定した。結果を図27に示す。その結果、4-アジドフェニルアラニン、O-スルホチロシン又はN ϵ -アリルオキシカルボニル-L-リジンを導入するRS誘導体-tRNAペアを有しているBW25113RFzero-y株（図27中、それぞれBW-azf、BW-sfy、及びBW-Aloclys）は、それぞれに対応する非天然型アミノ酸を含む培地において、親株のBW25113とほとんど同じ速度で増殖した。一方、N ϵ -(4-アジドベンジルオキシカルボニル)-L-リジンまたはアセチルリジンを導入するRS誘導体-tRNAペアを有しているBW25113RFzero-y株（図27中、それぞれBW-AzZlys及びBW-Aclys）は、それぞれに対応する非天然型アミノ酸を含む培地において、親株のBW25113に比べ緩やかに増殖した。

[0161] さらに、各RFzero-y株の増殖における非天然型アミノ酸の依存性について確認した。1晩培養した細胞培養物を希釈して、対応する非天然型アミノ酸を含む非選択LB培地上、および対応する非天然型アミノ酸を含まない非選択LB培地上にスポットしてさらに培養した。結果を図28に示す。図28に示されるように、いずれのRFzero-y株の増殖も、対応する非天然型アミノ酸の存在に完全に依存していた。このことから、UAGコドンに割り当てられたアミノ酸が3-ヨードチロシンから4-アジド-L-フェニルアラニン、O-スルホ-L-チロシン、N ϵ -アセチル-L-

リジン、Nε-アリルオキシカルボニル-L-リジン、またはNε-(o-アジドベンジルオキシカルボニル)-L-リジンに切り替えられていることが示された。

[0162] 以上の結果から、様々な遺伝的バックグラウンドにおいて、および種々の非天然型アミノ酸を用いて、コドンの迅速な再割り当てを行うことが可能であることが示された。また、製造されたRF zero株の増殖は、大規模なタンパク質生産にあたって十分な増殖速度であることが示された。

[0163] [実施例14]

本実施例では、BW25113のRF zero株におけるUAGコドンの割り当てを3-ヨードチロシン、4-アジドフェニルアラニン、またはO-スルホチロシンに変更した株（以下、それぞれを、BW25113RF zero-iy、BW25113RF zero-azfおよびBW25113RF zero-sfyと称する）において、非天然型アミノ酸が導入されたタンパク質が実際に合成されていることを確認した。

[0164] まず、GST遺伝子における15のチロシンコドンのうちの3つまたは7つのチロシンコドンにUAGコドンに変更した改変GST遺伝子(gst(3×amb)、gst(7×amb))を発現させる発現プラスミドを作成した。この改変GST遺伝子は、N末端に25の追加のアミノ酸が付加されている。gst(3×amb)においては、この25の追加アミノ酸を含めて数えて、25位、47位、および98位のチロシンコドンがUAGコドンに変更されている。また、gst(7×amb)においては、gst(3×amb)における変更位置に加えて、さらに82位、166位、180位、および188位のチロシンコドンがUAGコドンに変更されている。各改変GST遺伝子は、tacプロモータの制御下におかれている。また、各発現プラスミドには、UAGコドンの割り当てを3-ヨードチロシン、4-アジドフェニルアラニン、またはO-スルホチロシンに変更する発現ユニット(RS誘導体-tRNAペア)が組み込まれている。

[0165] 各発現プラスミドを、実施例6で作製したBW25113RF zero-

i yに導入した。各株からタンパク質を取得し、SGS-PAGEにかけ、CBB染色するとともに、抗GST抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。結果を図29に示す。図29において、RF zero-azf及びRF zero-sfyは、それぞれBW25113RF zero-i yに対して、UAGコドンの割り当てを4-アジドフェニルアラニンに変更する発現ユニット及びUAGコドンの割り当てをO-スルホチロシンに変更する発現ユニットを導入した株である。図29中、上側の写真はCBB染色の結果を示しており、下側の写真はウエスタンブロッティングの結果を示している。図29に示すように、全ての株において、改変GST遺伝子の全長（図29中、矢印）が発現していることが確認された。なお、本実施例における「野生型のGST（WT）」は、N末端に25の追加のアミノ酸が付加されているGSTを指す。各レーンの下部にある数値は、見積もられた生成量（1 Lの培養物あたりのmg）を示している。BW25113RF zero-i yにおけるgst（3×amb）およびgst（7×amb）の発現量は、野生型GSTの発現量とほぼ等しい発現量であった。BW25113RF zero-azfおよびBW25113RF zero-sfyにおけるgst（3×amb）およびgst（7×amb）の発現量は、野生型GSTの発現量よりも低下していた。しかしながら、このうち最も発現量が低かった、BW25113RF zero-sfyにおけるgst（7×amb）でさえも、培養物1 Lにつきミリグラム単位の量の目的タンパク質を生成することができた。

[0166] さらに、BW25113RF zero-i yにおけるgst（7×amb）産物を用いて、7つのヨードチロシンが確かにタンパク質内に導入されていることを、質量分析（ESI-MS）によって確認した。結果を図30に示す。確認の結果、BW25113RF zero-i y由来のGSTタンパク質の推定質量（28846.0 Da）は、野生型のGSTタンパク質の推定質量（27966.0 Da）よりも880 Da大きい値であった。これは、7つの水素原子がヨウ素原子に置き換わったときの値に相当する。したが

って、7つのチロシンがいずれも3-ヨードチロシンに置き換わっていることが確認された。

[0167] 翻訳機構または順応機序は、種々の非天然型アミノ酸に対して、異なる効率でもって機能することが知られている (Liu, C.C. and Schultz, P.G., *Annu. Rev. Biochem.*, 79, 413-444 (2010))。そのため、タンパク質の生成量の低下は、4-アジドフェニルアラニンおよびO-スルホチロシンを用いたタンパク質合成の速度が3-ヨードチロシンを用いたタンパク質合成よりも緩やかであったためと考えられる。このことは、以下の *p r f A⁺* の株を用いた実験によっても確認された。

[0168] ここでは、N末端近傍にUAGコドンを含むGST遺伝子を、非天然型アミノ酸を導入するための発現ユニットとともに、*p r f A⁺*株であるBW25113に導入し、その翻訳効率を確認した。N末端近傍にUAGコドンを含むGST遺伝子は、チオレドキシン (TRX) との融合タンパク質となるようにプラスミドに組み込まれている (図31 (a) 参照)。結果を図31 (b) に示す。図31 (b) は、抗Hisタグ抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示している。図31 (b) 中、レーン2は、インフレームのUAGコドンを含んでいないGST遺伝子を導入した株であり、レーン1、4~6は、N末端近傍にUAGコドンを含む融合GST遺伝子を導入した株である。また、レーン1は、非天然型アミノ酸を導入するコンストラクトが含まれていない株である。レーン4~6に示されるように、UAGコドンを3-ヨードチロシン、4-アジドフェニルアラニン、またはO-スルホチロシンに割り当てるためのコンストラクトが導入された株は、対応する非天然型アミノ酸の存在下において、全長の融合タンパク質を生成することが示されている (図中、矢印A)。また、これらの株においては、UAGコドンにおける翻訳の中断により生じたタンパク質も生成されている (図中、矢印B)。各レーンの下部の括弧内に示した数字は、この翻訳中断により生じたタンパク質および生成された全長融合タンパク質の総量に対する全長融合タンパク質の割合 (%) を示している。すなわち、UAGコドンにおける非天

然型アミノ酸の導入効率を示している。2つのチロシン誘導体（4-アジドフェニルアラニン、およびO-スルホチロシン）に関しては、 $p r f A^+$ の条件においても、3-ヨードチロシンよりも導入の効率が低いことが明らかとなった。なお、より多くの部位に非天然型アミノ酸を導入することによってタンパク質が不安定化した場合にも、タンパク質の生産量は低下するものと考えられる。

[0169] 〔実施例15〕

本実施例では、BL21 (DE3) RF zero-iy株を利用して、特定の複数の部位にアセチルリジンを含むヒストンを生成することを試みた。ヒストンH4は、10のリジン残基のうち、最大4つの特定のリジンが翻訳後にアセチル化されている。特定の位置において修飾されている均質なヒストンを合成する方法は、エピジェネティックの研究、および染色体の再構築に作用する治療薬の開発に有用である。

[0170] 具体的には、実施例6で作製したBL21 (DE3) RF zero-iy株から細胞抽出物を調製して、これを用いた無細胞タンパク質合成系により、目的タンパク質の合成を試みた。無細胞タンパク質合成系においては、ニコチンアミドを高濃度で直接添加することができる。そのため、無細胞タンパク質合成系においては、脱アセチル化を防ぐことができ、これによりアセチル化に関して均質なヒストンを得ることができるためである。また、BL21株の細胞抽出物は、高いタンパク質生産性を示すことが知られている (Kigawa, T. et al, J. Struct. Funct. Genomics, Vol.5, pp63-68 (2004))。

[0171] まず、BL21 (DE3) RF zero-iyから細胞抽出物を調製した後、3-ヨードチロシンを取り除くために透析を行った。ついで、アセチルリジンをtRNAに結合させる、メタノサルシナ・マゼイ由来のPyIRS誘導体、およびこの誘導体のペアとなる、アンバーサプレッサーtRNAを、細胞抽出物に添加した。また、終濃度10mMのニコチンアミドを添加した。

[0172] ヒトのヒストンH4においてアセチル化される4つの部位（5位、8位、12位および16位）に対応するコドン全てをUAGに置換したヒトのヒストンH4改変遺伝子を用いて、発現用プラスミドを構築した。なお、この改変遺伝子においては、生成されるタンパク質のN末端にペプチドタグ（MKDHLIHNNHHKHEHAHALVPRGSH：配列番号31）が付加されている。この発現用プラスミドを上記細胞抽出物に添加した。

[0173] 合成されたH4ヒストンタンパク質は不溶性画分として得られた。これを尿素を用いて溶解させた後、クロマトグラフィーにより精製した。

[0174] その結果、H4ヒストン全長が生成されたことが確認できた。その収量は、反応液1mlにつき0.3mgであった。さらに、質量分析（ESI-MS）によって、H4ヒストンにおけるアセチルリジンの導入を確認した。結果を図32に示す。その結果、得られたH4ヒストンの推定質量（14356.0Da）は、未修飾のH4ヒストンの推定質量（14188.0Da）よりも168.0Da大きい値であった。これは、4つのアセチル基（計168.1Da）の追加に対応するものである。したがって、ヒストンH4に4つのアセチルリジンが導入されていることが示された。

[0175] [参考例]

本参考例では、UAGコドン翻訳するtRNA分子の改変によってRF zero-q株の増殖能力を向上させる方法を示す。

[0176] （UAG翻訳効率を高めたsupE tRNA分子の作製）

実施例1で示された通り、cat（10Am）を導入したRF zero-q株は、野生型のcatで形質転換したRF zero-q株と比べCm耐性が落ちていた。これは、グルタミンのアンバーサプレッサー変異型tRNAによるUAGコドンの翻訳効率が、通常のグルタミンtRNAによるグルタミンコドン（CAA、CAG）の翻訳効率より低かったためと考えられる。ところで、supE44変異に対応するtRNA^{Gln}のアンチコドンの三番目に変異を入れるとアミノアシル活性が低下することが知られている。HSTO8株由来のRF zero-q株は、アンバーサプレッサーtRNA^{Gln}（su

pE tRNA) をコードする supE44 遺伝子を有しているが、tRNA^{Gln} のアンチコドン (CUG) の三番目 (36 位) に変異 (G→A) が入っている。そこで、アミノアシル tRNA 合成酵素を改変するのではなく、supE tRNA 分子の UAG 翻訳効率を改善することによって RF zero-q 株の増殖能力を向上させることを試みた。

[0177] 図 21 (a) に示すように、supE tRNA 遺伝子の 30 位～40 位 (アンチコドン部位 (34～36 位) を除く) にランダムに変異を入れて supE tRNA 変異体のライブラリーを構築した。3 種類の DNA オリゴマー OLG1 (配列番号 28)、OLG2 (配列番号 29) 及び OLG3 (配列番号 30) を用意し、以下の工程を経て 2 本鎖 DNA を形成させた。

[0178] 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、10 mM 2-メルカプトエタノール、4.7 mM ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (10 units) を含む反応混合物 (20 ml) に、OLG1 又は OLG2 (それぞれ 200 pmol) を加えて、37℃ 30 分間処理し、それぞれ別々に 5 末端のリン酸化反応を行った。これらのオリゴマーを混合してから、OLG3 (200 pmol) を加えて、アニーリングを行った。アニーリングは、94℃ で 30 秒間、80℃ で 1 分間、74℃ で 1 分間、65℃ で 30 秒間、及び 55℃ で 1 分間の条件で行った。アニールしたオリゴマーの溶液から、簡易ゲルろ過法によって ATP を除去した。

[0179] アンチセンス鎖にはギャップが入っており、このギャップはセンス鎖のアンチコドン部位 (CTA) と 8 箇所のランダム化した配列部位に対応する (図 21 (b) 参照)。このギャップは形質転換後に細胞内の DNA ポリメラーゼによって埋められる。

[0180] tyrT プロモーターの下流に当該変異体遺伝子を組み込み、cat の変異遺伝子 (cat (3Am)) 及び 3 つのインフレームの UAG コドンを持つ pKS3 cat (3amb)-kan にクローニングした。得られたプラスミドによってサプレッサー tRNA を含まない DH10B 株を形質転換し、カナマイシン (30 µg/ml) を含む LB 培地でコロニーのセレクション

を行った。その結果、 2×10^7 のコロニー（s u p E t R N A変異体遺伝子ライブラリー）が得られた。23個のクローンのシーケンシングを行ったところ、15個のクローン（65%）が完全長のt R N A配列を有しており、残りはt R N A配列全体が欠失しているか、ランダム化した領域のヌクレオチドが欠失していた（図21（c）参照）。

[0181] 次に、 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ のC mを含むL B培地上でs u p E t R N A変異体遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、18個のクローンを得た。これらのクローンについて $150-500 \mu\text{g}/\text{ml}$ のC mを含むL B培地上でC m耐性を調べた。18個のクローンの配列についてシーケンシングしたところ、13種類の異なるt R N A塩基配列が認められた。s u p E t R N A変異体は全てもとのs u p E t R N Aと比較して高いC m耐性を示した。この結果は、これらの変異体がもとのs u p E t R N Aと比較してU A Gの翻訳効率が高いことを示している。また、これらの変異体全てにおいて、33位にU、37位にA、そして30位-40位間塩基対を有していた。これら3つの要素はU A Gの効率的な翻訳に必要な要素と考えられる。

[0182] 上記の13種類のクローンのうち、クローン2、3、4、5、7、9、及び11が最も高いC m耐性を示した。クローン3は38位がUからAに置き換わっている以外はs u p E t R N Aと同じであった。この置換は、高いC m耐性を示した上位7クローンのうち、クローン2を除く全てに見られたことから、U A Gの翻訳効率を更に向上させる働きがあると考えられる。

[0183] クローン4及び7はもとのt R N Aとは最も異なった配列を有していた（ランダム化した8箇所のうち、6箇所が置き換わっていた）。そこで、置換の数が最も少なかったクローン3（以下、「s u p E 3 t R N A」と呼ぶ）、及び最も多かったクローン7（以下、「s u p E 7 t R N A」と呼ぶ）を用いてR F z e r o - q株のU A G翻訳効率のさらなる向上を試みた。これらの変異体は38位がUからAに置き換わっている。しかし、2種類の大腸菌t R N A^{Gln}の38位はUで不変部位であり、グルタミニルt R N A合

成酵素による tRNA^{Gln} の認識に関わっている。実際、大腸菌 tRNA^{Gln} においてこの部位を U から G へ置換した結果、アミノアシル活性が低下したことが報告されている。このことから、supE3 tRNA 及び supE7 tRNA の高い UAG 翻訳効率は、UAG を認識する能力がアミノアシル活性低下を十分打ち消す程度まで高められたことによるものと考えられる。

[0184] (supE3 tRNA 又は supE7 tRNA を有する RF zero-q 株の開発)

RF zero-q 株の親株である HST08 株において、supE tRNA をコードする配列を supE3 又は supE7 に置き換えた、HST08-3 株及び HST08-7 株を作製した。相同性組み換えは、RT/ET キット (Gene Bridges 社) を用いて行った。ゲンタマイシン耐性の BAC7 である BAC7 gent を HST08-3 及び HST08-7 株に導入して prfA 遺伝子のノックアウトを行い、RF zero-q3、RF zero-q7 を作製した。なお、本実施例では、prfA 遺伝子は全長のうちの大部分をゼオシン耐性遺伝子で置換した。最後に、HST08-3 及び HST08-7 株のゲノム上の prfA 領域についてシーケンシングして、ゲノム中に prfA が残存していないことを確認した。

[0185] (UAG コドンの翻訳効率の比較)

cat 遺伝子にある 13 箇所のグルタミンコドン全てを UAG に置換した cat (13Am) を RF zero-q3 株、RF zero-q7 株それぞれに導入し、UAG コドンの翻訳効率が向上しているか確認した。RF zero-q 株及び RF zero-q7 株は 200 µg/ml の Cm に対して耐性を示した。これは、野生型 cat 遺伝子が入った pACYC184 によって形質転換した HST08 株及び RF zero-q 株における Cm に対する耐性 (400 µg/ml) よりも低かった。一方、RF zero-q3 株では 400 µg/ml に近い Cm 濃度で耐性を示した。この結果は、RF zero-q3 株における UAG コドンの翻訳効率が劇的に向上したことを示し

ている。

[0186] 次に、グルタミンコドンへの再定義を行ったUAGとグルタミンコドン(CAG)との翻訳効率を比較した。まず、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)遺伝子のN末端に6つのUAGコドンを導入し(gst(6amb))、tacプロモーター下流につないで作製したpTacGST(6Am)によってRFzero-q株、RFzero-q3株、及びRFzero-q7株を形質転換した。比較対象として、UAGコドンの代わりにCAGコドンの入ったpTacGST(6gln)によって形質転換したRFzero-q株、RFzero-q3株及びRFzero-q7株を用意した。gst(6amb)及びgst(6gln)の発現量はSDS-PAGE及びウエスタブロットによって確認した。結果を図22(a)に示す。gst(6amb)を発現させたRFzero-q株はgst(6gln)を発現させた同株と比べて、その発現量が著しく低下していた。この結果は、UAGコドンの翻訳効率が、通常のグルタミンtRNAによるグルタミンコドン(CAA、CAG)の翻訳効率より低いという上述の見解を裏付けるものであった。一方、RFzero-q3株では、gst(6amb)及びgst(6gln)の発現量はほとんど同じであったのに対し、RFzero-q7株では、gst(6amb)の発現量がgst(6gln)と比較して若干低下していた。また、RFzero-q株、RFzero-q7株のgst(6gln)発現量はRFzero-q3株における発現量より低かった。これは、後述の通り、RFzero-q3株の増殖速度がRFzero-q株及びRFzero-q7株と比較して速いことに起因するものと思われる。

[0187] 次に、細胞抽出液のGST活性を測定し、gst(6gln)に対するgst(6amb)の相対収量を調べた。結果を図22(b)に示す。

[0188] 図22(b)に示されるとおり、prfA遺伝子をノックアウトしていない親株のHST08株では、supE tRNA遺伝子が発現していたにも関わらず、gst(6amb)遺伝子がほとんど発現していなかった。一方

、*prfA* 遺伝子をノックアウトしている *RF zero-q* 株、*RF zero-q 3* 株及び *RF zero-q 7* 株においては、*gst (6 amb)* 収量が劇的に増加した。相対収量は、29% (*RF zero-q* 株)、59% (*RF zero-q 7* 株)、及び89% (*RF zero-q 3* 株)であった。また、*RF zero-q 3* 株では、*gst (6 amb)* の収量と *gst (6 gl n)* の収量とはほとんど同じであった。これらの結果は、*RF zero-q 3* 株及び *RF zero-q 7* 株において *UAG* 翻訳効率が劇的に向上し、*RF zero-q 3* 株ではグルタミンコドン (*CAA*、*CAG*) の翻訳効率とほぼ同程度まで向上したことを示している。

[0189] (HST08株及びRF zero-q株の増殖率の比較)

HST08株及びRF zero-q株をそれぞれLB培地（抗生物質なし）中、37℃で培養し、増殖速度を比較した。結果を図23（a）に示す。RF zero-q株は親株であるHST08株と比べて増殖は遅かった。RF zero-q 7株の増殖速度はRF zero-q株とほぼ同じであった。一方、RF zero-q 3株はHST08株と同程度の増殖速度を有しており、*supE 3* 変異が大腸菌の増殖に好ましい影響を与えていることが示された。

[0190] RF zero株では、*prfB* 遺伝子にコードされているRF-2が唯一の終結因子であり、UGAコドン及びUAAコドンを認識する。RF-2に変異を入れることにより、UGA及びUAAに加えてUAGを翻訳させることが可能であるとの報告がされている。もし、RF zero-q株のRF-2に変異が入っている場合、欠失したRF-1の働きをRF-2が補ってしまいう可能性がある。そこで、増殖速度の向上がRF-2の変異によるものではないことを確認するため、RF zero-q 3株のゲノム上の*prfB* 領域についてシーケンシングを行った。その結果、*prfB* に変異が入っていないことが確認された。

[0191] さらに、HST08株及びRF zero-q 3株をより厳しい条件下で培養し、増殖速度を比較した。結果を図23（b）及び（c）に示す。LB培

地中、37℃では対数増殖していた両株を、42℃の条件下に移して増殖率を比較したところ、最初の1時間は増殖率をほとんど変化させずに対数増殖したが、2時間後は両株の増殖率にほとんど差が見られなくなった（図23（b）参照）。一方、M9塩、グリセロール及びマグネシウム塩のみを含む栄養欠乏培地では、HST08株はゆっくり増殖したのに対し、RFzero-q3株はほとんど増殖しなかった（図23（c）参照）。これらの結果は、UAGコドンの読み飛ばしによって、飢餓状態での成長に重要な遺伝子の活性が低くなったことが原因と考えられる。

産業上の利用可能性

[0192] 本発明によれば、非天然タンパク質の合成を日常的な基礎技術に採用することができ、それによって、医薬品生産、タンパク質の機能解析、酵素の改変、大腸菌の改変などの発展が期待される。

請求の範囲

[請求項1]

非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法であって、

(1) UAGコドンを認識する tRNA を細菌内に発現させるステップと、

(2) 前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を細菌内に発現させるステップと、

(3) UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を細菌に対して行うステップと、

(4) 細菌内の前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、

を含み、

前記 (1) ~ (4) のステップにおける前記各細菌は全て同一の細菌であり、

前記処理が、前記 1 以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させる DNA 構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記 1 以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理である、作製方法。

[請求項2]

非天然タンパク質製造用の組換え細菌の作製方法であって、

UAGコドンを認識する tRNA を発現する細菌に対して、

(5) 前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を発現させるステップと、

(6) UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以

上の遺伝子の機能を、前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための処理を行うステップと、

(7) 前記翻訳終結因子をコードする遺伝子を欠損させるステップと、を含み、

前記処理が、前記1以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA構築物を前記細菌に導入する処理及び／又は前記細菌の染色体上の前記1以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変を導入する処理である、作製方法。

[請求項3] 前記細菌が、UAGコドンを認識するtRNAであって前記アミノアシル-tRNA合成酵素によってはアシル化されないtRNAを発現しており、

当該tRNAをコードする遺伝子を欠損させるステップをさらに含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の作製方法。

[請求項4] 前記非天然タンパク質が非天然型アミノ酸あるいは α -ヒドロキシ酸を含む非天然タンパク質であることを特徴とする請求項1又は2に記載の作製方法。

[請求項5] 前記細菌が大腸菌であることを特徴とする請求項1～4の何れか1項に記載の作製方法。

[請求項6] 前記1以上の遺伝子が、UAGコドンで翻訳終結する全ての遺伝子中で、単独で遺伝子欠損させると致死になる遺伝子であることを特徴とする請求項1～5の何れか1項に記載の作製方法。

[請求項7] 前記細菌が大腸菌であり、

前記1以上の遺伝子が、大腸菌のcoaD、murF、hda、mreC、hemA、lpxK及びlolAの中から選択される1以上の遺伝子であることを特徴とする請求項6に記載の作製方法。

[請求項8] 前記1以上の遺伝子が、大腸菌のcoaD、murF、hda、mreC、hemA、lpxK及びlolAの中から選択される任意の

6つの遺伝子であることを特徴とする請求項7に記載の作製方法。

[請求項9] 前記1以上の遺伝子が、大腸菌の`coaD`、`hda`、`mreC`及び`hemA`の遺伝子であることを特徴とする請求項7に記載の作製方法。

[請求項10] 前記1以上の遺伝子として、遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が低下する遺伝子をさらに含むことを特徴とする請求項6～9の何れか1項に記載の作製方法。

[請求項11] 遺伝子欠損させると細菌の増殖速度が低下する上記遺伝子が、大腸菌の`sucB`遺伝子であることを特徴とする請求項10に記載の作製方法。

[請求項12] 前記細菌が大腸菌であり、
前記DNA構築物は、大腸菌の`coaD`、`murF`、`hda`、`mreC`、`hemA`、`lpxK`及び`loliA`の中から選択される1以上の遺伝子の機能を発現するDNA構築物であることを特徴とする請求項1～7の何れか1項に記載の作製方法。

[請求項13] 前記DNA構築物は、さらに大腸菌の`sucB`遺伝子の機能を発現するDNA構築物であることを特徴とする請求項12に記載の作製方法。

[請求項14] 前記DNA構築物は、細菌染色体にトランス及び／又はシスに補充されるバクテリア人工染色体、プラスミドあるいは直鎖状DNAであることを特徴とする請求項1～13のいずれか1項に記載の作製方法。

[請求項15] 非天然タンパク質製造用の組換え細菌を作製するためのDNA構築物であって、

UAGコドンを認識するtRNA及び前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素の存在下において、UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の

群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現することを特徴とする DNA 構築物。

[請求項16]

非天然タンパク質製造用の組換え細菌であって、

UAG コドンを認識する tRNA を発現すること、

前記 tRNA を非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によってアシル化するアミノアシルー tRNA 合成酵素を発現すること、

UAG コドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される 1 以上の遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させる DNA 構築物が導入されていること、及び／又は細菌染色体上の前記 1 以上の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるための改変が導入されていること、及び、

前記翻訳終結因子をコードする遺伝子が欠損していること、を特徴とする組換え細菌。

[請求項17]

前記組換え細菌が大腸菌由来であることを特徴とする請求項 16 に記載の組換え細菌。

[請求項18]

組換え細菌を用いる非天然タンパク質の製造方法であって、

(a) 非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸を活性化しうるアミノアシルー tRNA 合成酵素と、

(b) 前記アミノアシルー tRNA 合成酵素の存在下において非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸と結合可能な、UAG コドンを認識する tRNA と、

(c) ランダムに、あるいは所望の位置に 1 つ以上のナンセンス変異を受けた所望のタンパク質をコードする遺伝子と、を請求項 16 に記載の組換え細菌又は当該組換え細菌の抽出液内で発現させることを特徴とする非天然タンパク質の製造方法。

[請求項19]

前記組換え細菌が大腸菌由来であることを特徴とする請求項 18 に記載の非天然タンパク質の製造方法。

[請求項20] 非天然タンパク質の製造に用いる組換え細菌の抽出物であって、
前記組換え細菌が、

UAGコドンを認識するtRNAを発現すること、

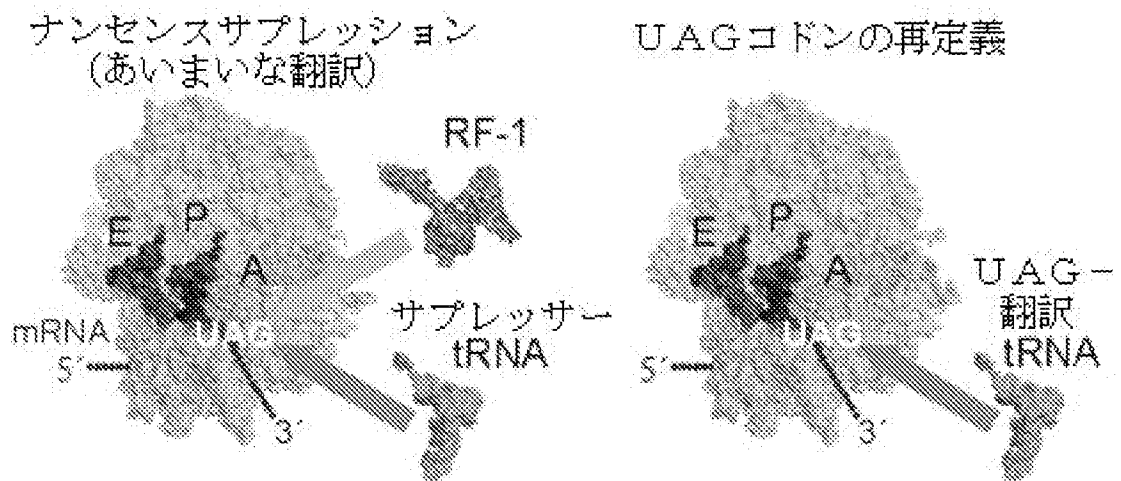
前記tRNAを非天然型アミノ酸又は α -ヒドロキシ酸によって
アシル化するアミノアシル-tRNA合成酵素を発現すること、

UAGコドンで翻訳を終結する翻訳終結因子をコードする遺伝子
の欠損によって機能を喪失する遺伝子の群から選択される1以上の遺
伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下において発現させるDNA
構築物が導入されていること、及び／又は細菌染色体上の前記1以上
の遺伝子に、当該遺伝子の機能を前記翻訳終結因子の非存在下におい
て発現させるための改変が導入されていること、

前記翻訳終結因子をコードする遺伝子が欠損していること、
を特徴とする抽出物。

[請求項21] 前記組換え細菌が大腸菌由来であることを特徴とする請求項20に
記載の抽出物。

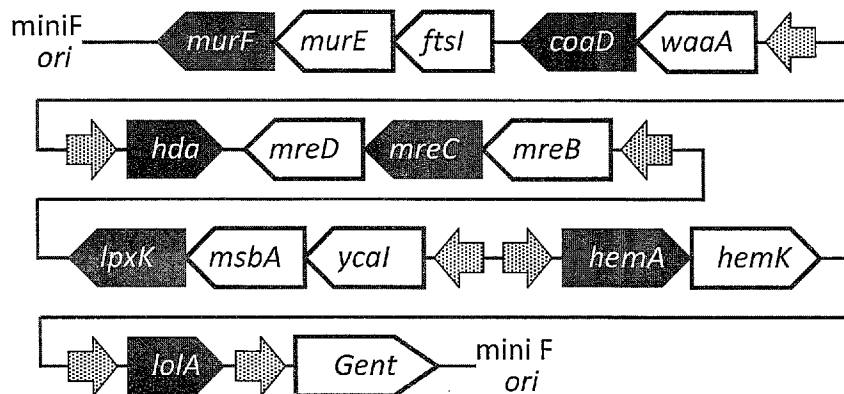
[図1]



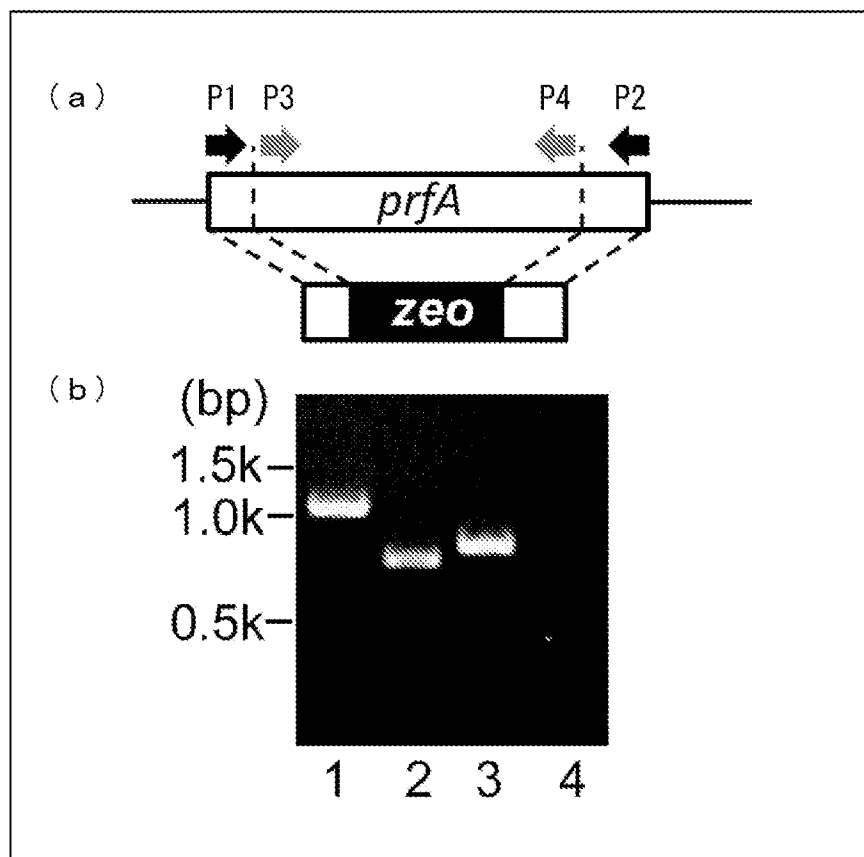
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]

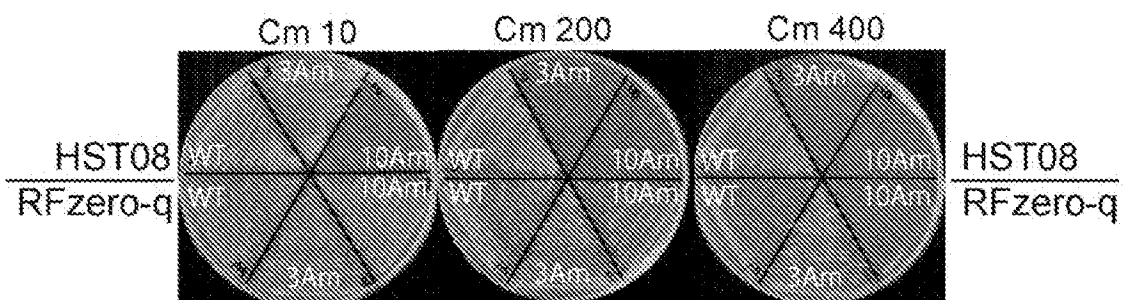
(a)

MEKKITGYT**X**VDISQWHRKEHFEEAFQSV AQCTYN**X**TV**X**LDITAF LKTVKKNKH
 KFYPAFIHILARLMNAHPEFRMAMKDGELVIWDSVHPCYTVFHEQTETESSLW
 SEYHDDFRQFLHIYSQDVACYGENLAYFPKGF IENMFFVSANPWVSFTSFDLN
 VANMDNFFAPVFTMGKYYTQGDKVL MPLAIQVHHAVCDGFHVGRMLNELQQYC
 DEWQGGA

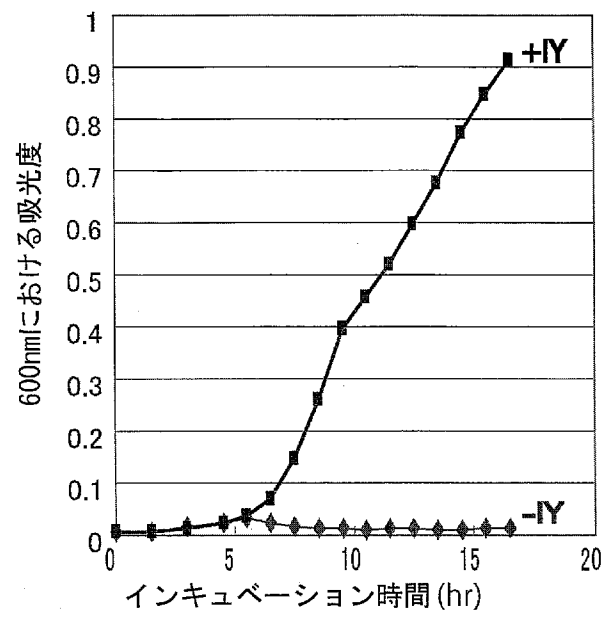
(b)

MEKKITGYTTVDIS**X**WHRKEHFEEAF**X**SV**X**ACTYN**X**TV**X**LDITAF LKTVKKNKH
 KFYPAFIHILARLMNAHPEFRMAMKDGELVIWDSVHPCYTVFHE**X**TETESSLW
 SEYHDDFR**X**FLHIYS**X**DVACYGENLAYFPKGF IENMFFVSANPWVSFTSFDLN
 VANMDNFFAPVFTMGKYYT**X**GDKVLMPLAI**X**VHHAVCDGFHVGRMLNELQQYC
 DEWQGGA

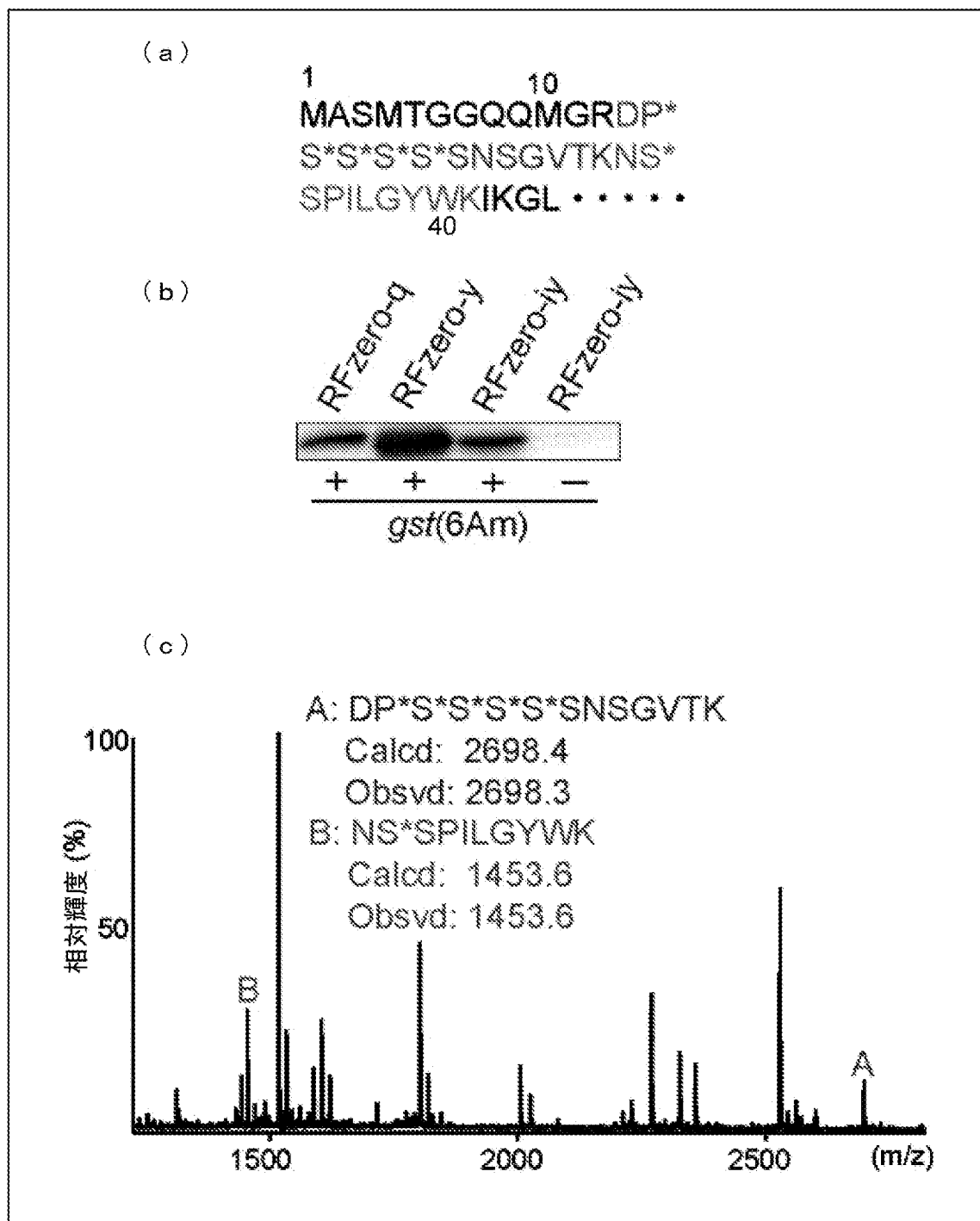
(c)



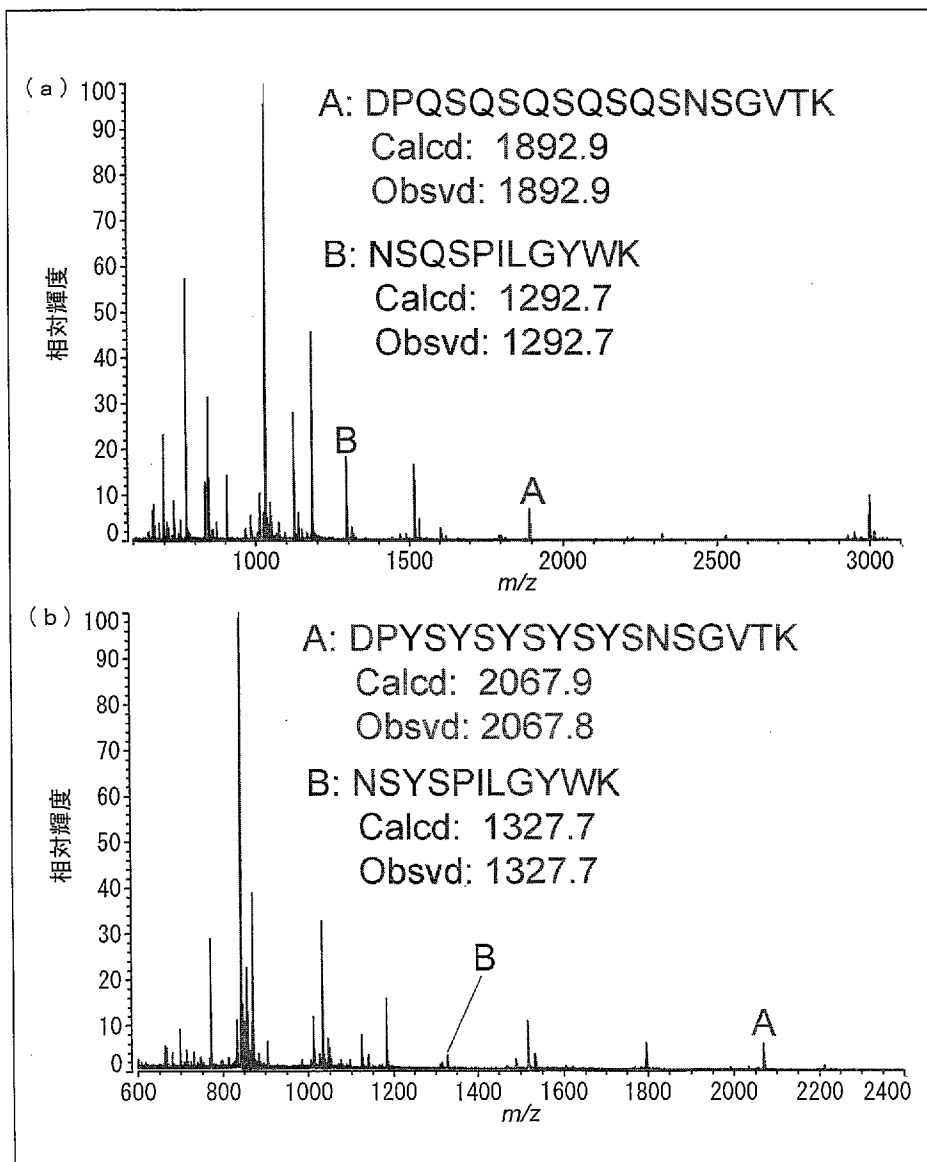
[図6]



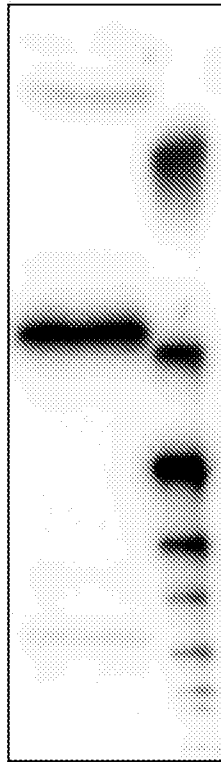
[図7]



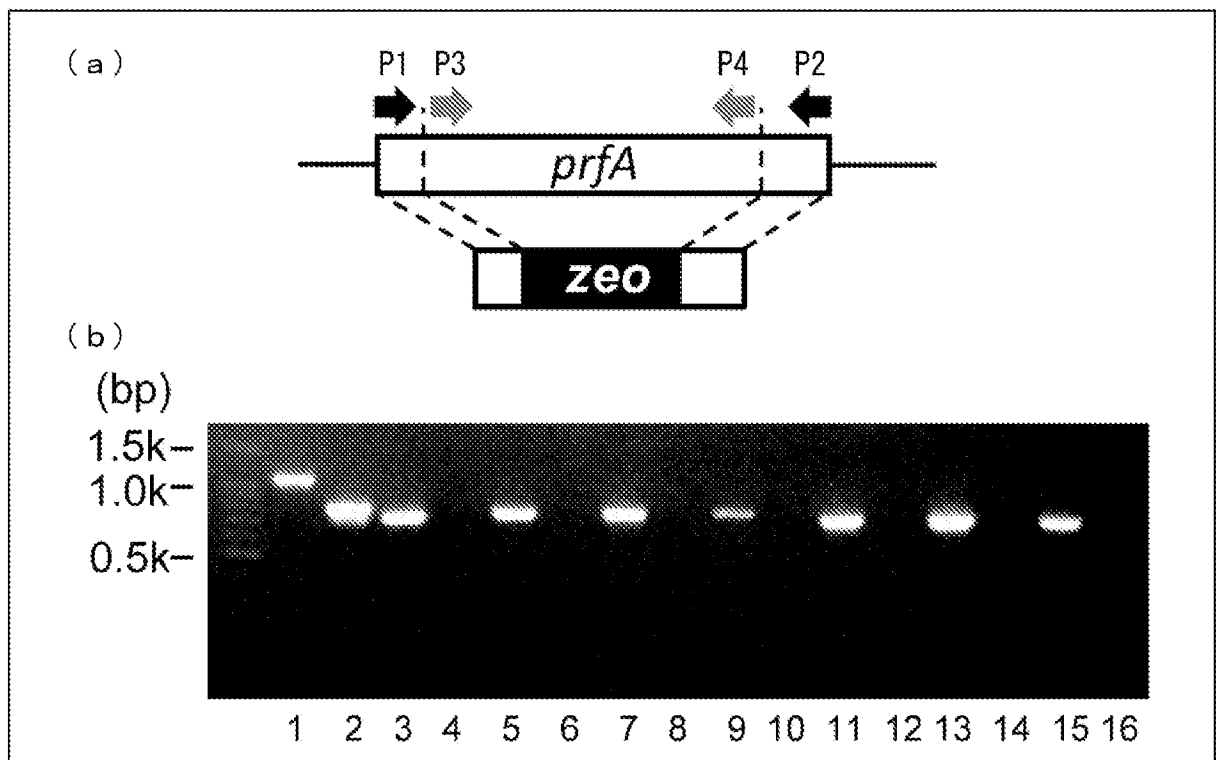
[図8]



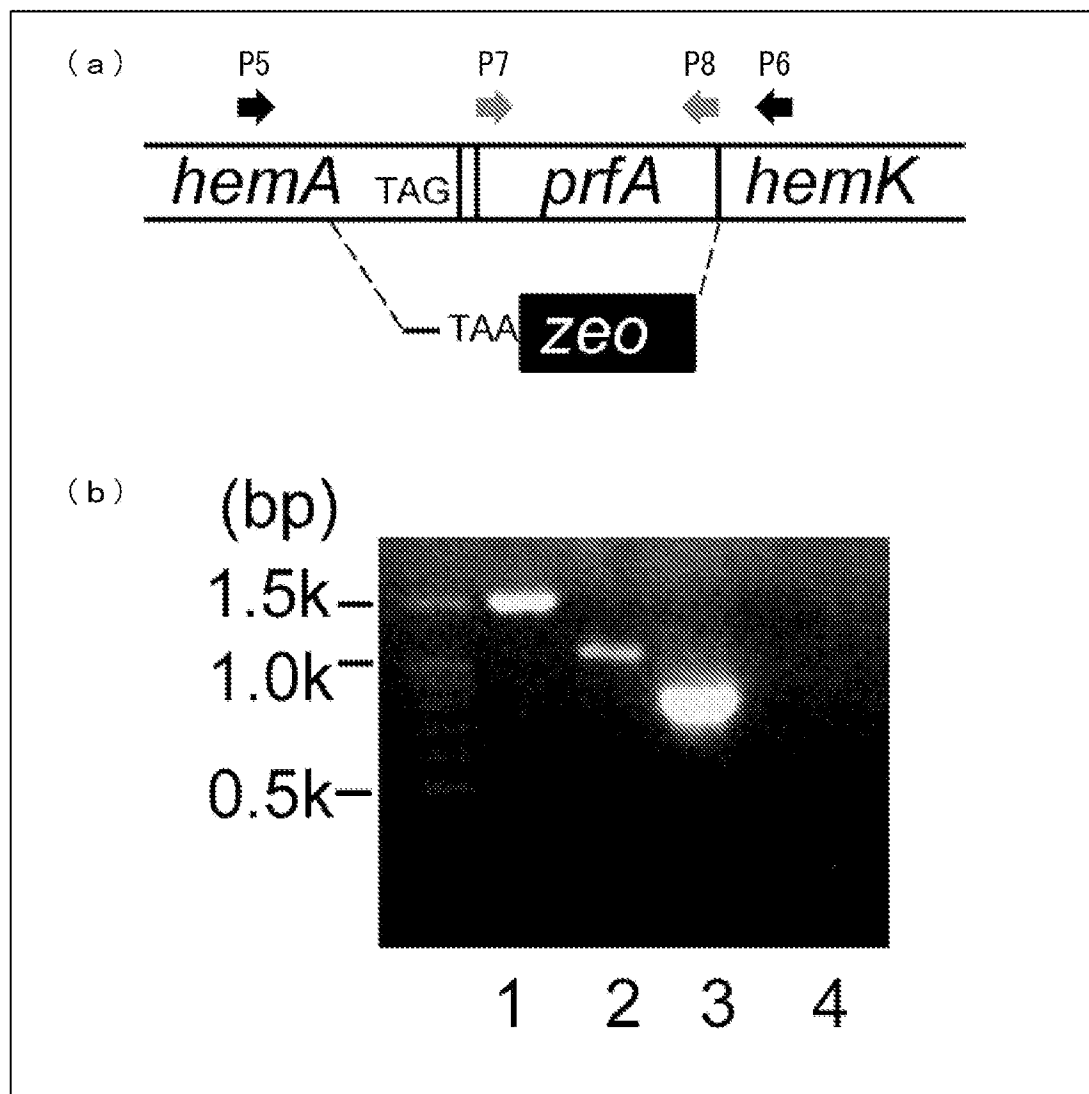
[図9]



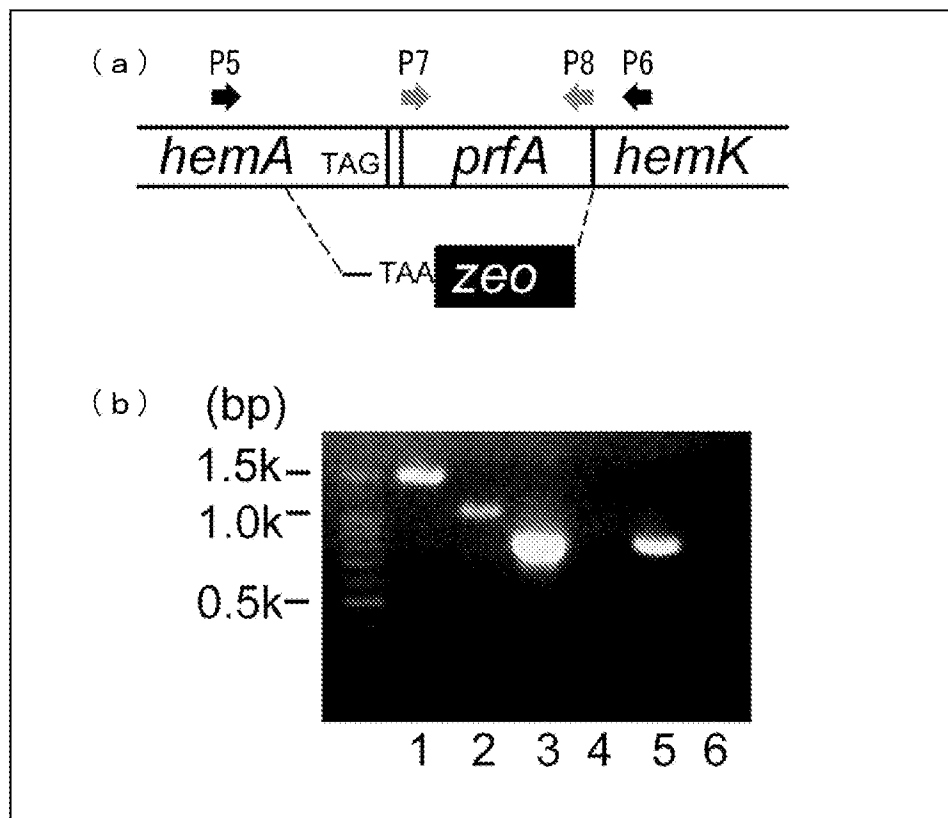
[図10]



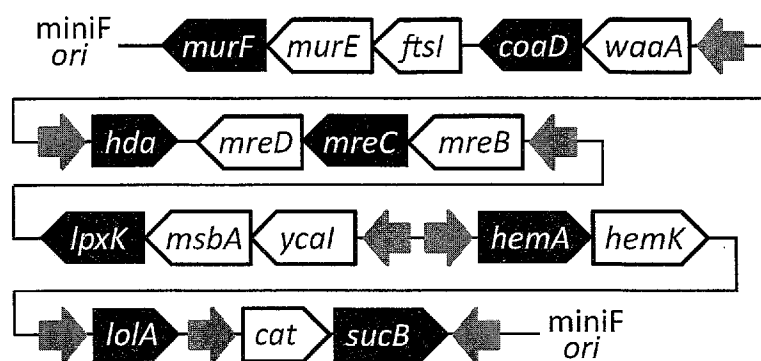
[図11]



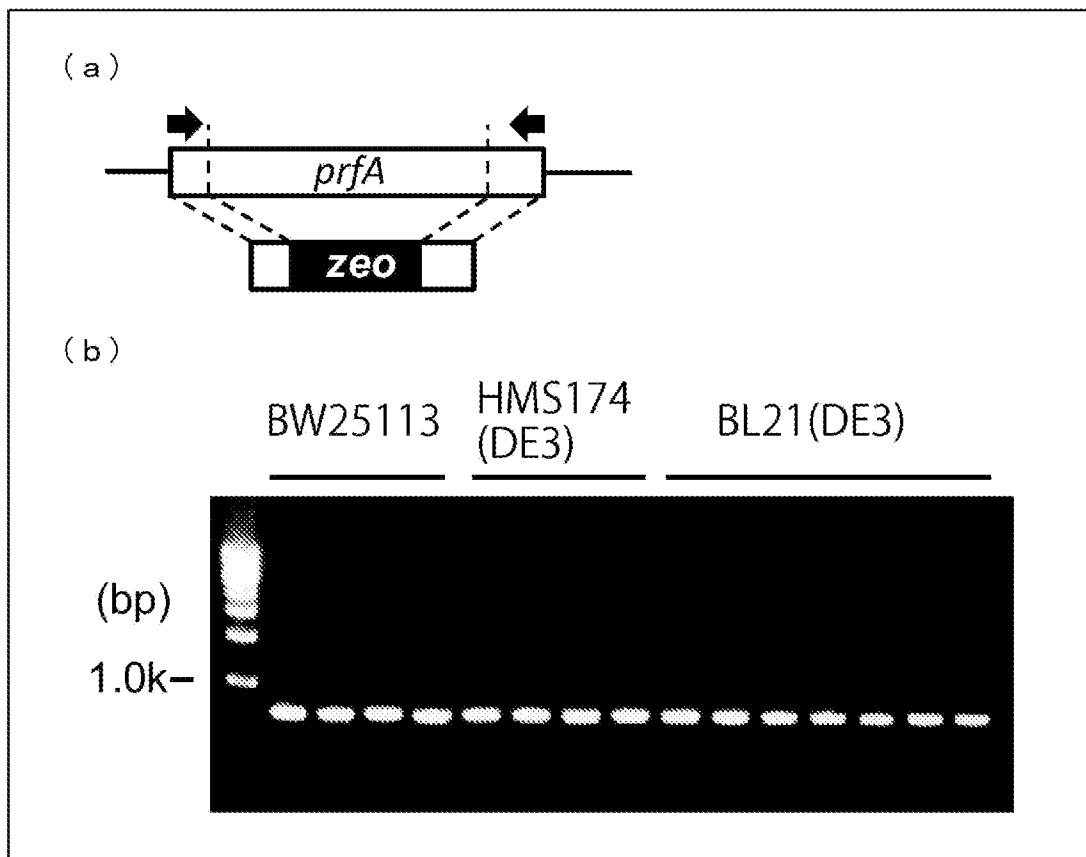
[図12]



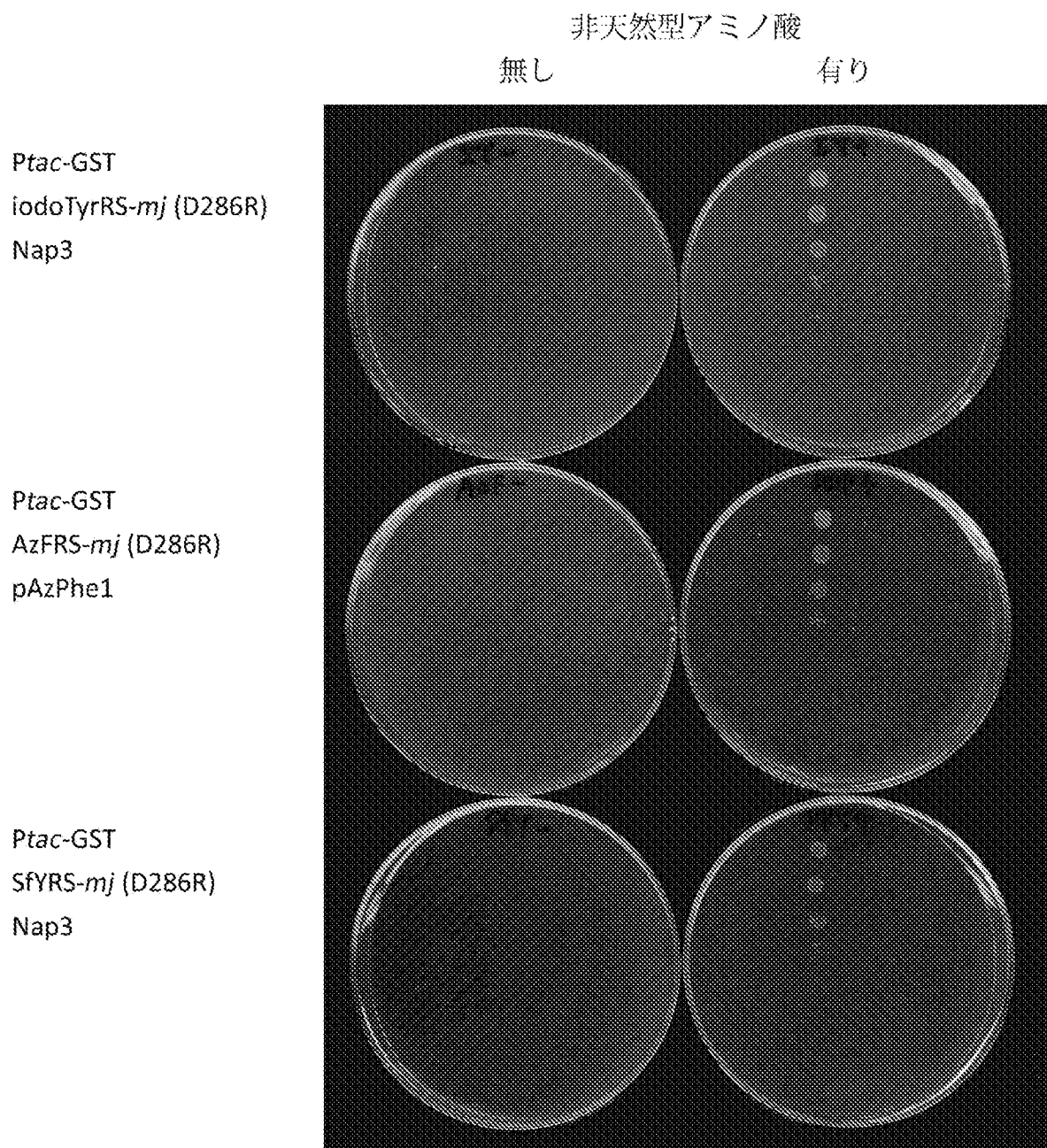
[図13]



[図14]

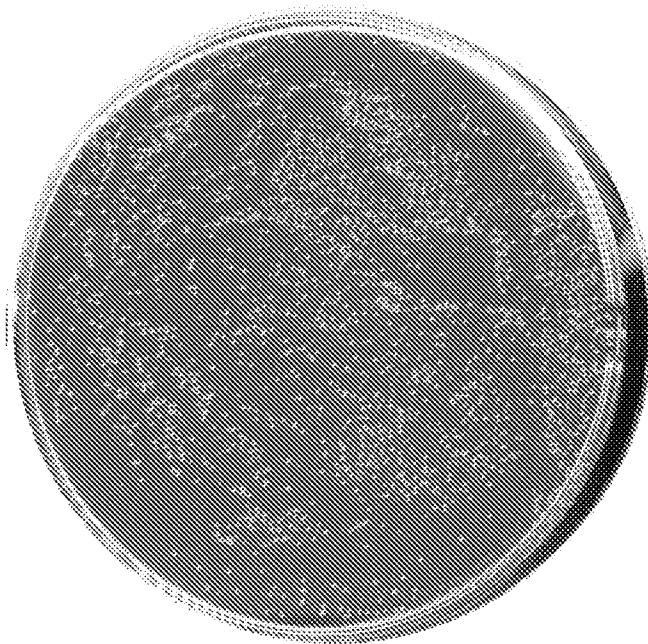


[図15]



[図16]

(a)



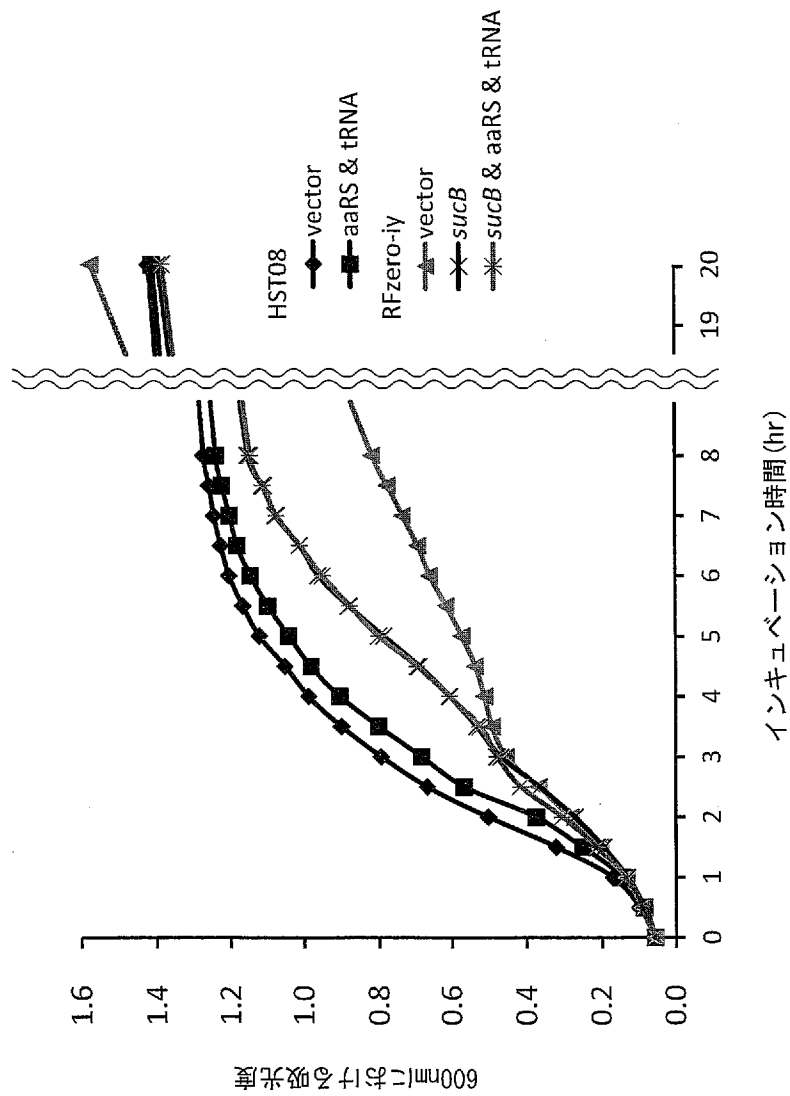
(b)

+ iodoTyrRS-*mj* (D286R)

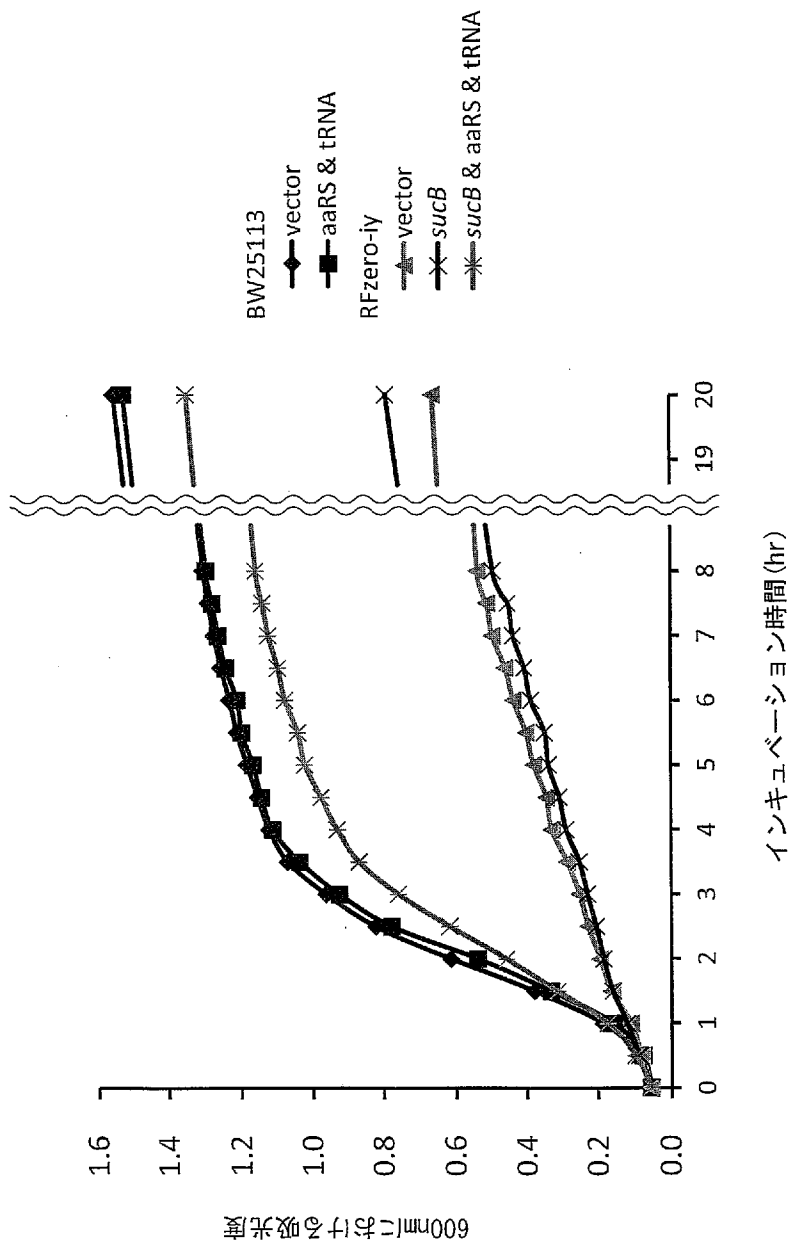
+ Nap3



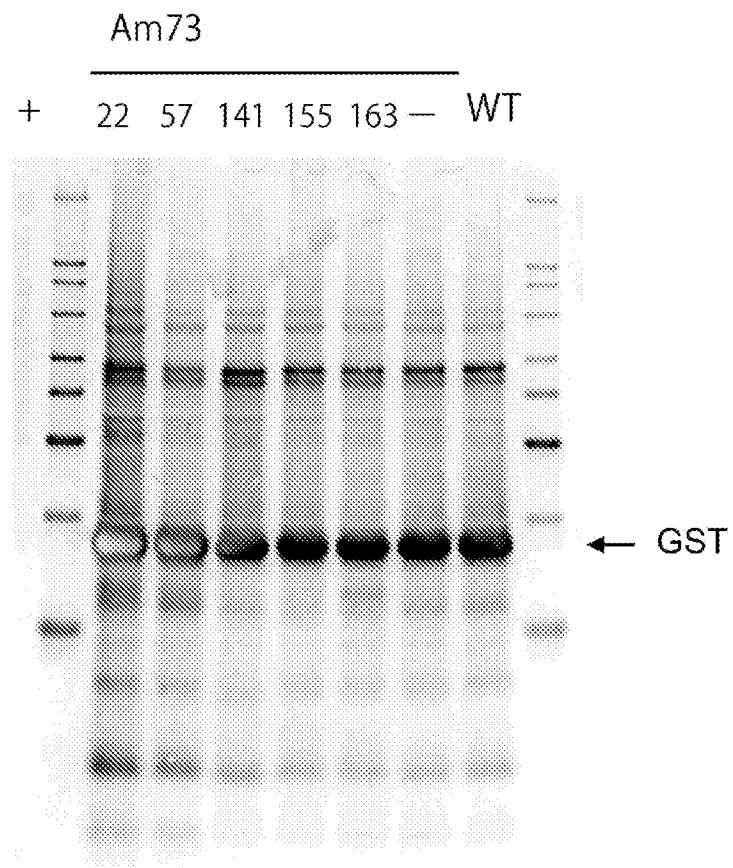
[図17]



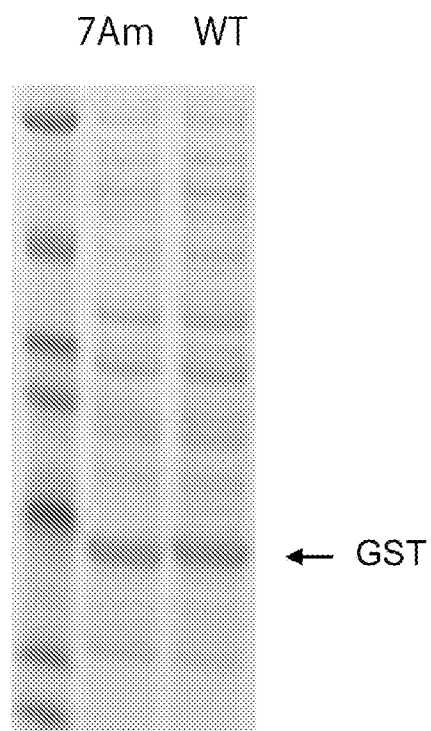
[図18]



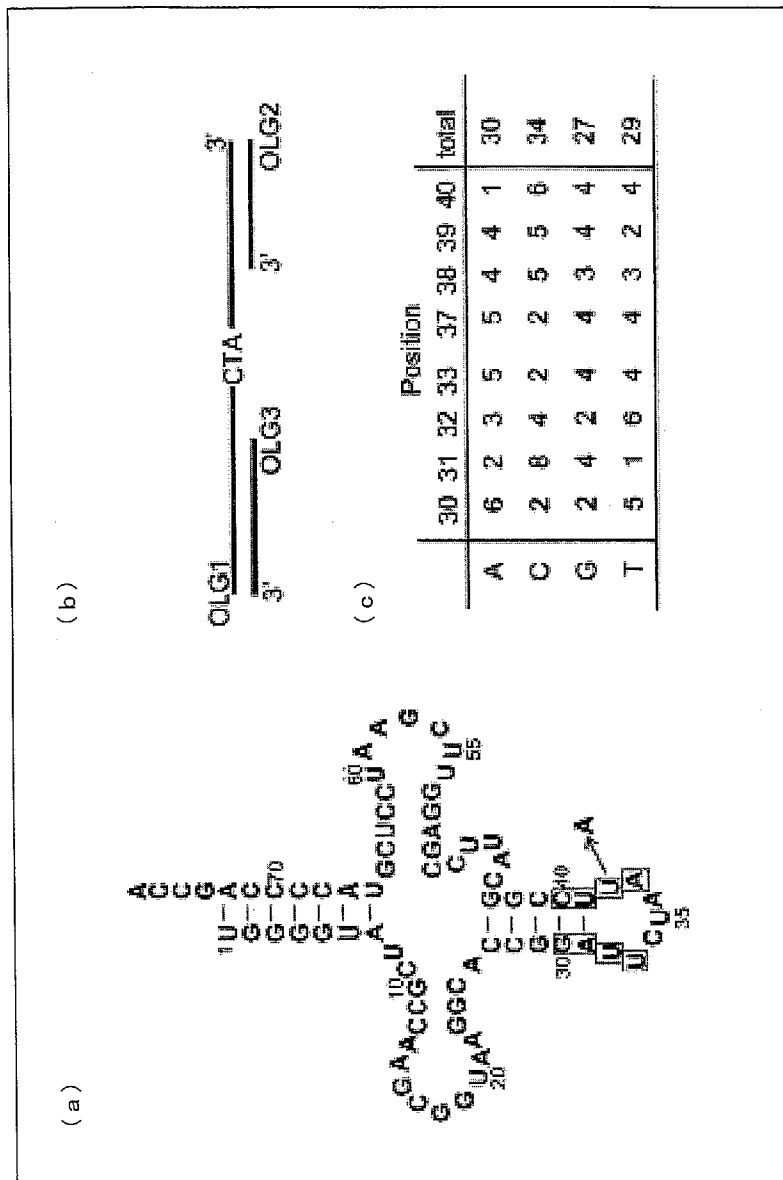
[図19]



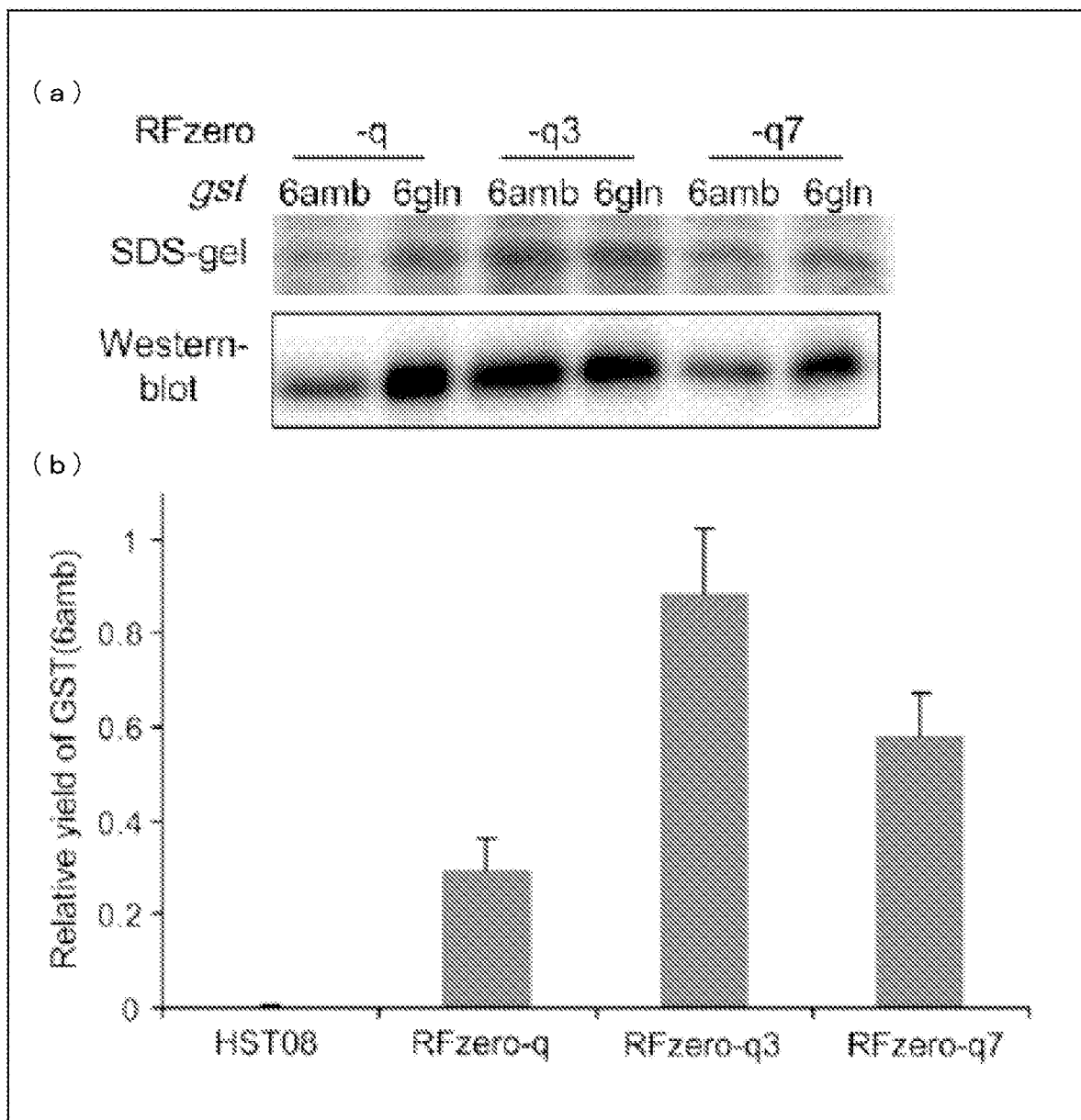
[図20]



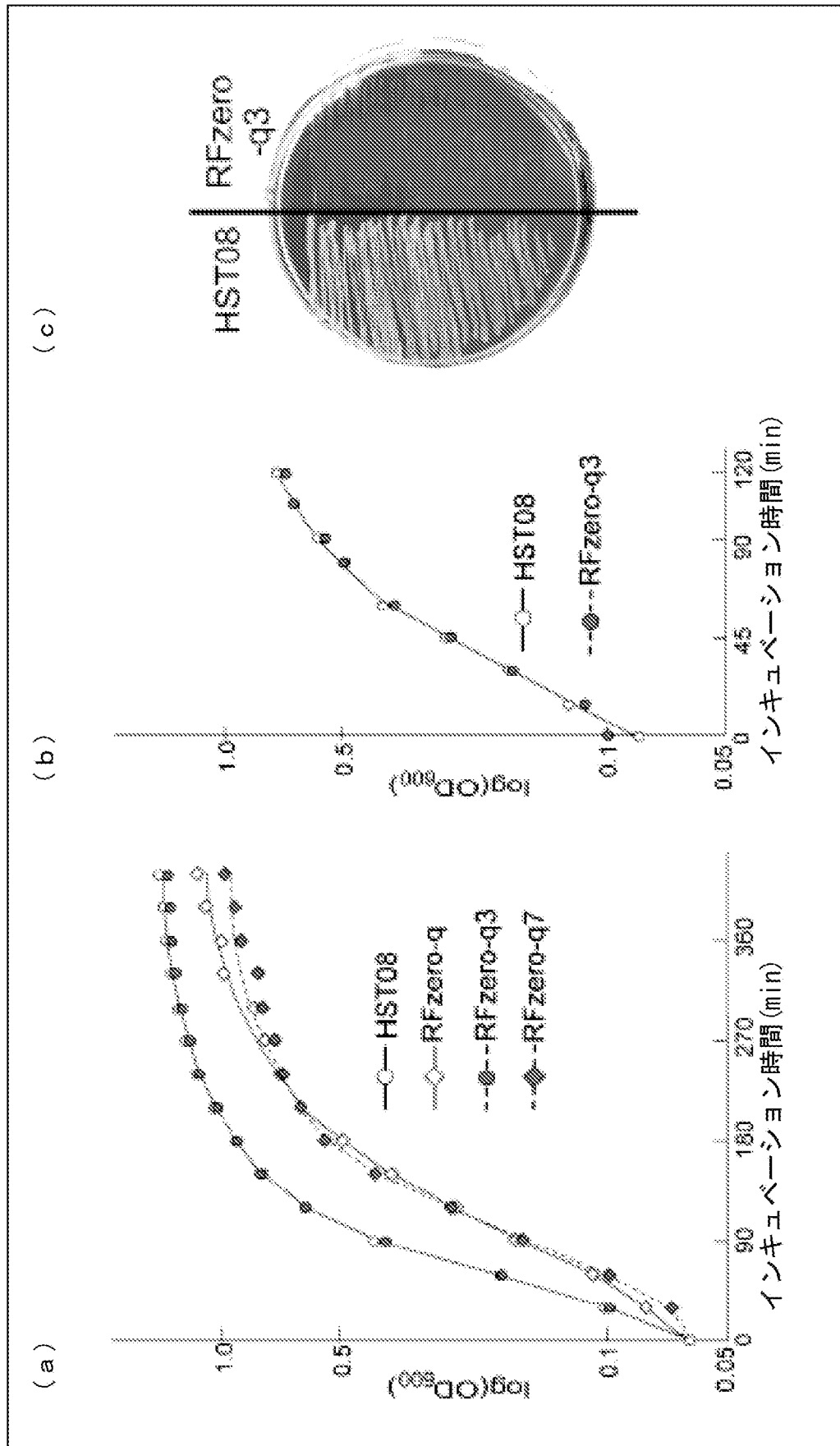
[図21]



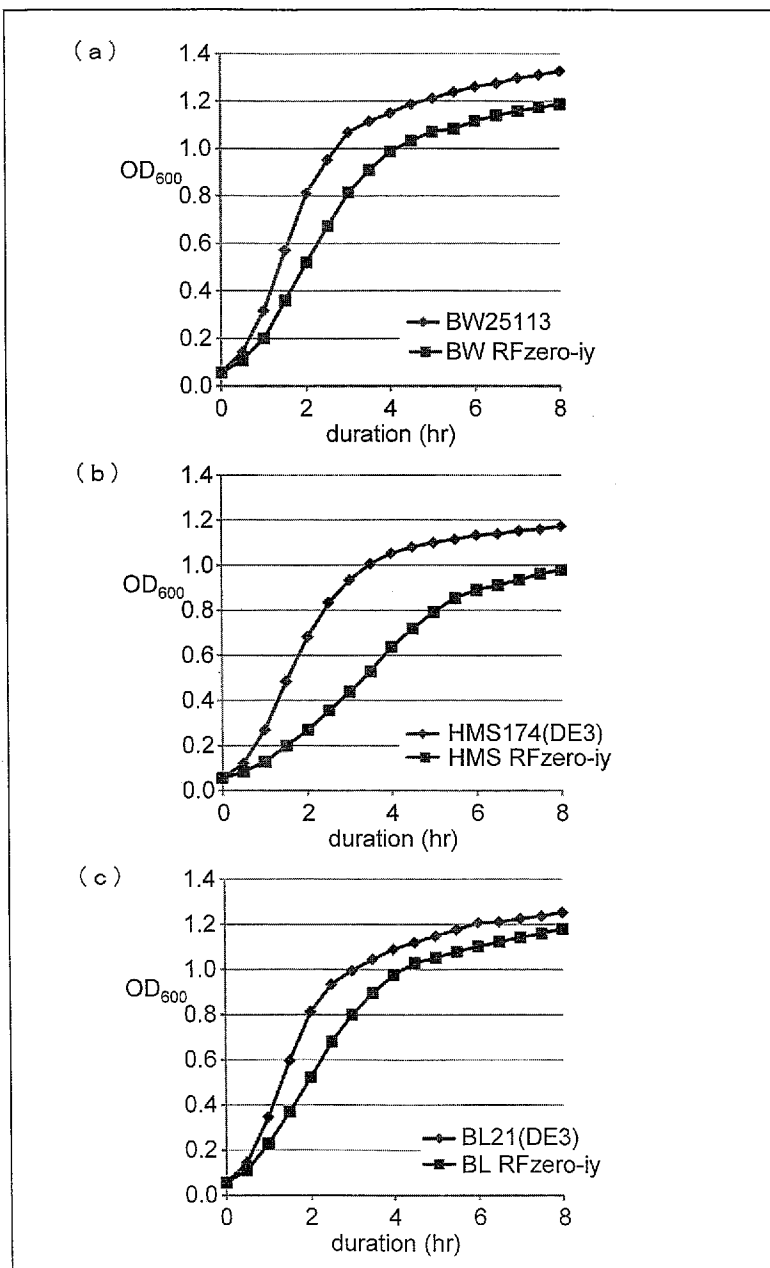
[図22]



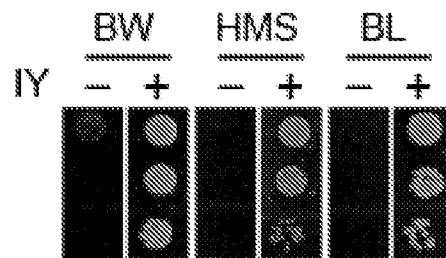
[図23]



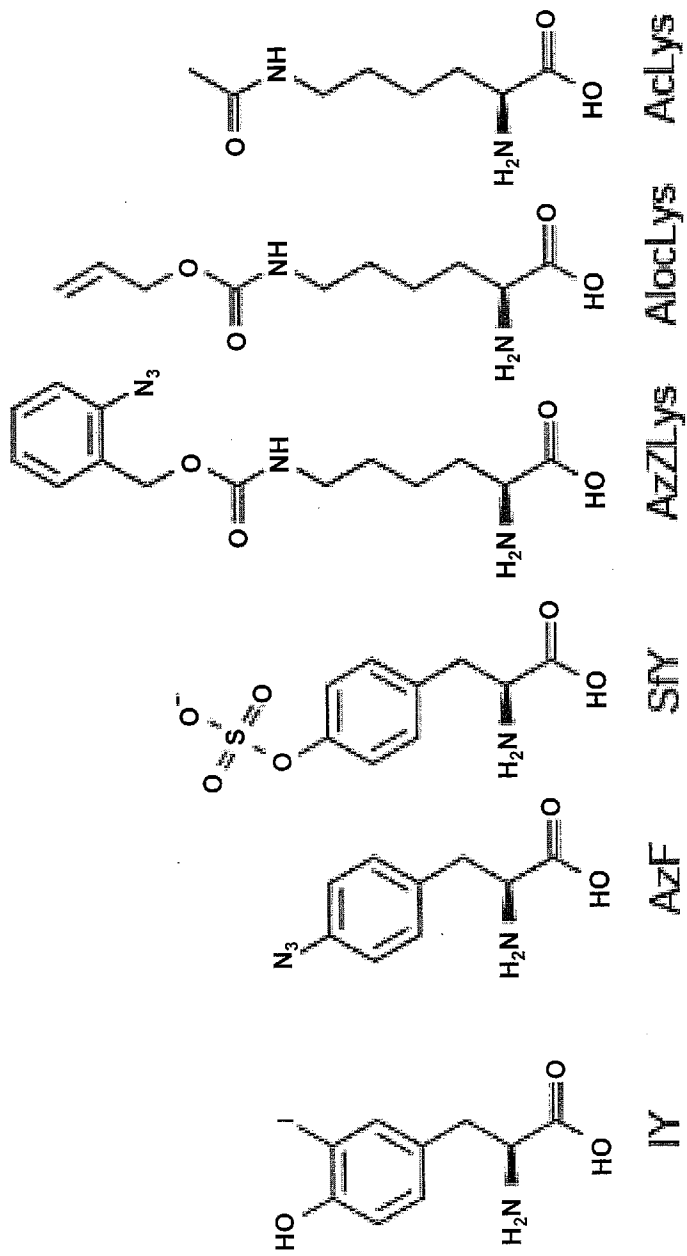
[図24]



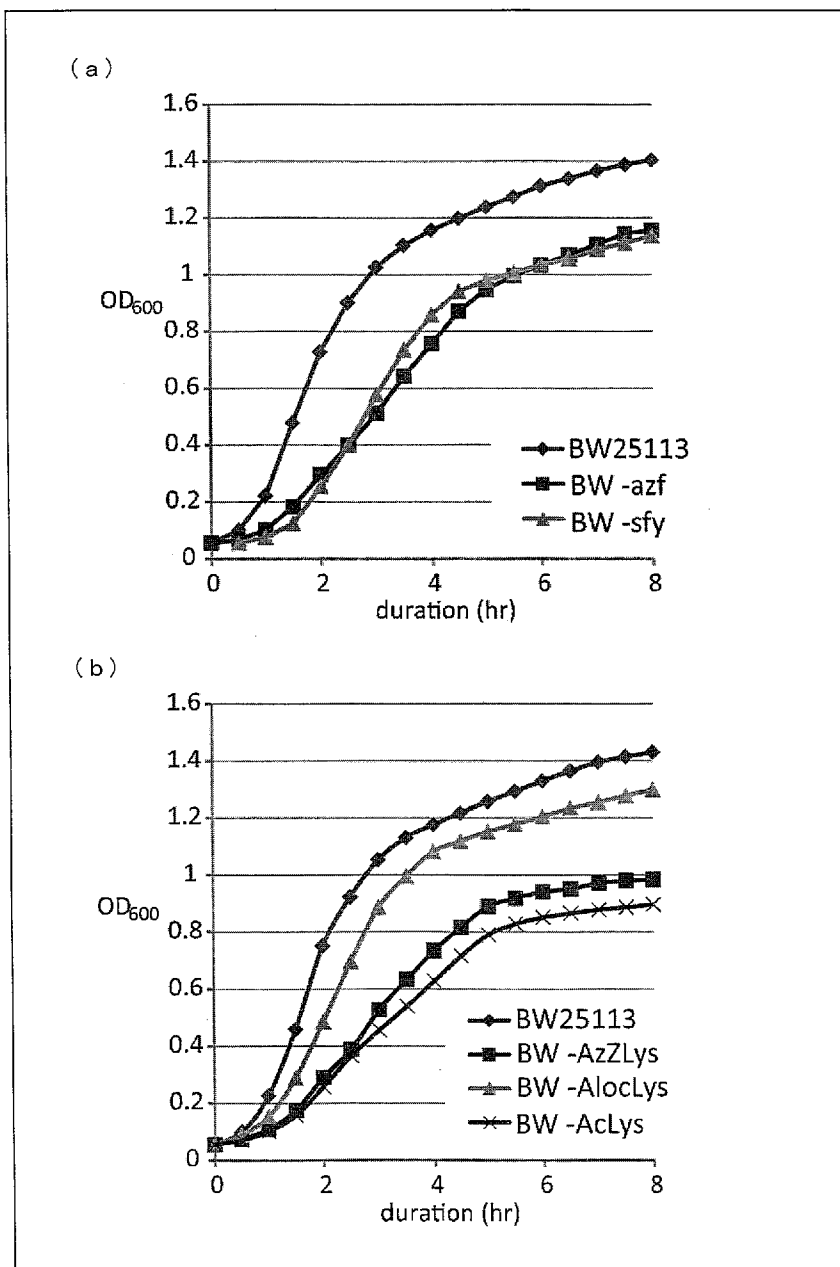
[図25]



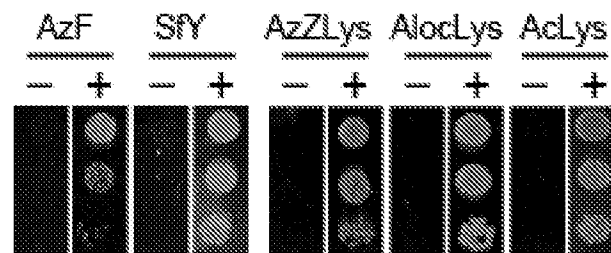
[図26]



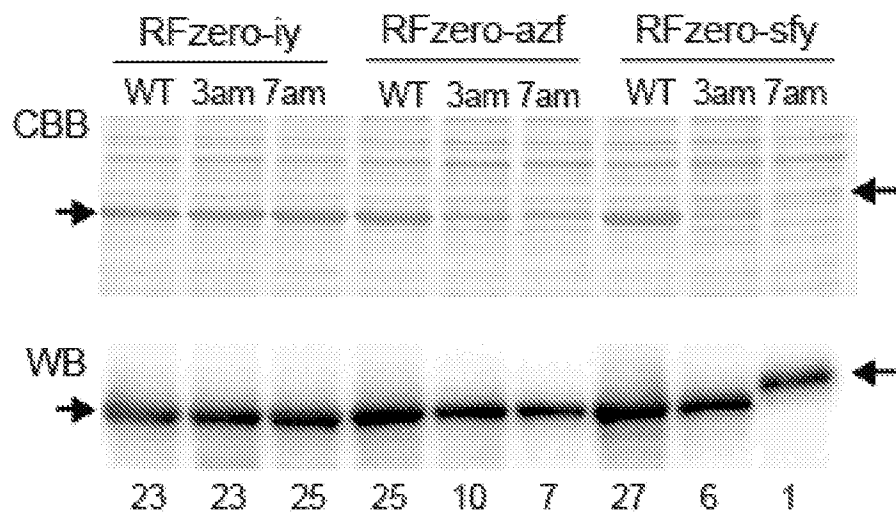
[図27]



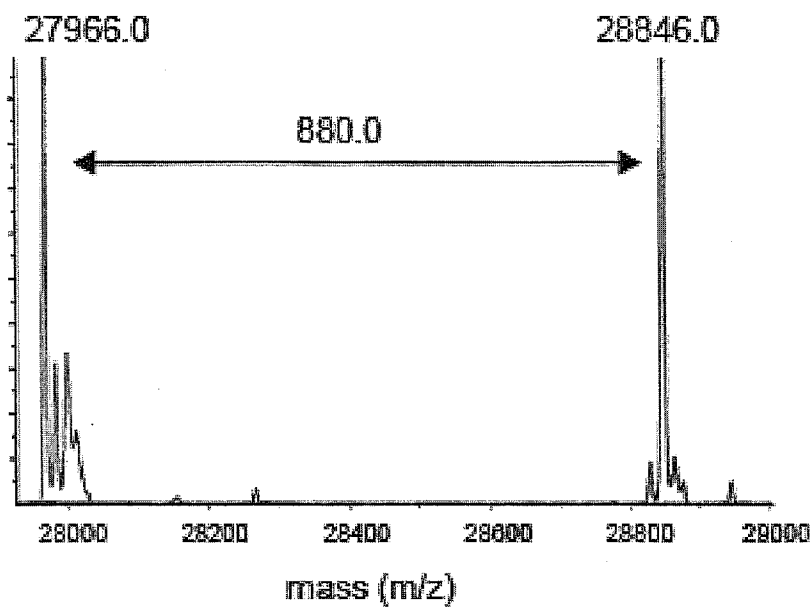
[図28]



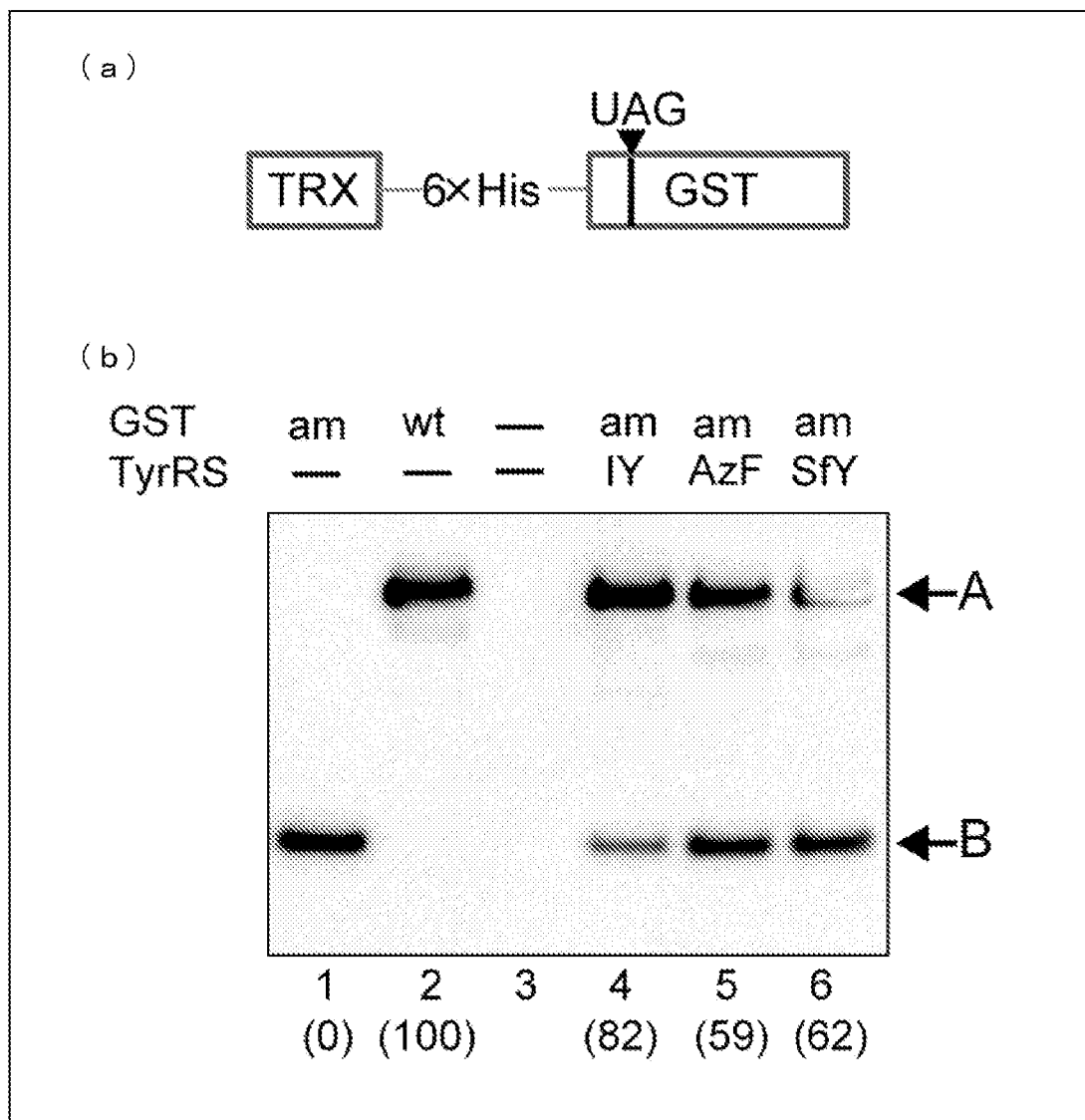
[図29]



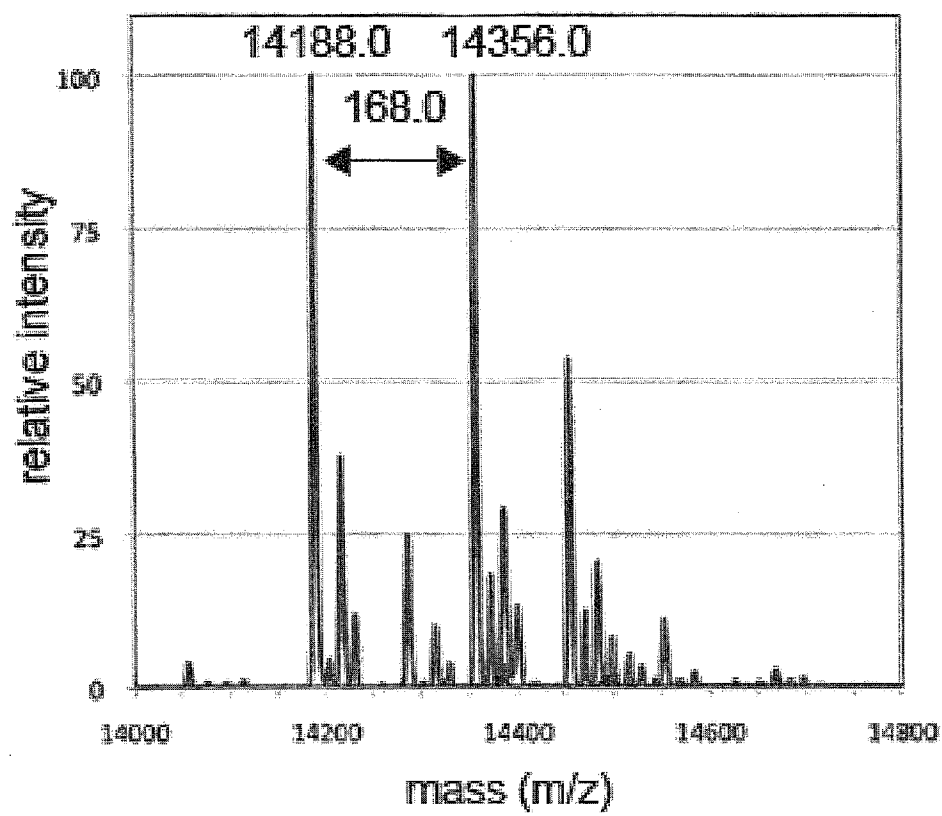
[図30]



[図31]



[図32]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C12N9/10

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KATO, Jun-ichi and KATAYAMA, Tsutomu., Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in Escherichia coli., EMBO J., 2001, Vol. 20, No. 15, p. 4253-4262, Materials and methods	15
Y	JP 2005-502322 A (The Scripps Research Institute), 27 January 2005 (27.01.2005), examples; paragraph [0133]	1-14, 16-21
Y	JP 2010-510798 A (Medical Research Council), 08 April 2010 (08.04.2010), paragraphs [0006], [0009]	1-14, 16-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 August, 2011 (23.08.11)Date of mailing of the international search report
30 August, 2011 (30.08.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KATO, Jun-ichi and HASHIMOTO, Masayuki., Construction of consecutive deletions of the Escherichia coli chromosome., Mol. Syst. Biol., 2007, Vol. 3, No. 132, p. 1-7, page 3, right column, line 9 to page 5, left column, line 14	1-14, 16-21
P,X	MUKAI, Takahito et al., Codon reassignment in the Escherichia coli genetic code., Nucleic Acids Res., 2010.08.11, Vol. 38, No. 22, p. 8188-8195	1-21
P,X	Takahito MUKAI, "UAG Codon Kaidoku Bunshi no Sosa ni yoru Iden Ango Kasosei no Kenkyu", The University of Tokyo, Seibutsu Kagaku Senko, Heisei 22 Nendo Hakushironbun Happyokai, 14 January 2011 (14.01.2011)	1-21
A	FORSTER, Anthony C. and CHURCH, George M., Synthetic biology projects in vitro., Genome Res., 2007, Vol. 17, No. 1, p. 1-6	1-21
A	IRAHA, Fumie et al., Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase-tRNA ^{Tyr} pair by the archaeal tyrosine pair in Escherichia coli for genetic code expansion., Nucleic Acids Res., 2010, Vol. 38, No. 11, p. 3682-3691	1-21
A	RYDEN, S. M. and ISAKSSON, L. A., A temperature-sensitive mutant of Escherichia coli that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors., Mol. Gen. Genet., 1984, Vol. 193, No. 1, p. 38-45	1-21
A	SHORT, Glenn F. III et al., Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids., Biochemistry, 1999, Vol. 38, No. 27, p. 8808-8819	1-21
A	SHIMIZU, Yoshihiro et al., Cell-free translation reconstituted with purified components., Nat. Biotechnol., 2001, Vol. 19, No. 8, p. 751-755	1-21
A	JP 2007-501007 A (Rina Netzwerk RNA-Technologien GmbH), 25 January 2007 (25.01.2007)	1-21
A	JP 2007-082543 A (Kyoto University), 05 April 2007 (05.04.2007)	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/063778

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JEONG, Haeyoung et al., Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21 (DE3)., J. Mol. Biol., 2009, Vol. 394, p. 644-652	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2011/063778

JP 2005-502322 A 2005.01.27

JP 2004-537984 A
JP 2009-077731 A
JP 2009-132704 A
JP 2011-030571 A
US 2003/0082575 A1
US 2003/0108885 A1
US 2005/0208536 A1
US 2005/0250183 A1
US 2006/0063244 A1
US 2006/0233744 A1
US 2006/0234367 A1
US 2007/0117184 A1
US 2008/0166783 A1
US 2008/0167243 A1
US 2008/0227152 A1
US 2008/0261311 A1
US 2009/0053791 A1
US 2009/0068717 A1
US 2011/0027867 A
EP 1456360 A
EP 1490483 A
EP 2128246 A1
WO 2002/085923 A2
WO 2002/086075 A2
CA 2444098 A
CA 2443757 A
IL 158418 D
IL 158419 D
AU 2002256292 B
AU 2002303431 B
IL 196714 D
AU 2007251897 A

JP 2010-510798 A 2010.04.08

US 2010/0105565 A1
GB 623974 D
GB 710094 D
GB 623974 D0
EP 2099912 A
WO 2008/065398 A2
CA 2670588 A

JP 2007-501007 A 2007.01.25

US 2009/0087879 A1
EP 1651767 A
WO 2005/017166 A1
DE 10336705 A

JP 2007-082543 A 2007.04.05

(Family: none)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12P21/02, C12N9/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KATO, Jun-ichi and KATAYAMA, Tsutomu., Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in Escherichia coli., EMBO J., 2001, Vol. 20, No. 15, p. 4253-4262, Materials and methods	1 5
Y	JP 2005-502322 A (ザ スクリップス リサーチ インスティテュート) 2005.01.27, 実施例、段落【0133】	1 - 1 4、1 6 - 2 1
Y	JP 2010-510798 A (メディカル リサーチ カウンシル)	1 - 1 4、1

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小倉 梢

4 B

4 5 0 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	2010.04.08, 段落【0006】、【0009】	6-21
Y	KATO, Jun-ichi and HASHIMOTO, Masayuki., Construction of consecutive deletions of the Escherichia coli chromosome., Mol. Syst. Biol., 2007, Vol. 3, No. 132, p. 1-7, 第3頁右欄第9行－第5頁左欄第14行	1-14、1 6-21
P, X	MUKAI, Takahito et al., Codon reassignment in the Escherichia coli genetic code., Nucleic Acids Res., 2010.08.11, Vol. 38, No. 22, p. 8188-8195	1-21
P, X	向井崇人, UAGコドン解読分子の操作による遺伝暗号可塑性の研究, 国立大学法人東京大学 生物化学専攻 平成22年度 博士論文発表会, 2011.01.14	1-21
A	FORSTER, Anthony C. and CHURCH, George M., Synthetic biology projects in vitro., Genome Res., 2007, Vol. 17, No. 1, p. 1-6	1-21
A	IRAHA, Fumie et al., Functional replacement of the endogenous tyrosyl-tRNA synthetase-tRNA ^{Tyr} pair by the archaeal tyrosine pair in Escherichia coli for genetic code expansion., Nucleic Acids Res., 2010, Vol. 38, No. 11, p. 3682-3691	1-21
A	RYDEN, S. M. and ISAKSSON, L. A., A temperature-sensitive mutant of Escherichia coli that shows enhanced misreading of UAG/A and increased efficiency for some tRNA nonsense suppressors., Mol. Gen. Genet., 1984, Vol. 193, No. 1, p. 38-45	1-21
A	SHORT, Glenn F. III et al., Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids., Biochemistry, 1999, Vol. 38, No. 27, p. 8808-8819	1-21
A	SHIMIZU, Yoshihiro et al., Cell-free translation reconstituted with purified components., Nat. Biotechnol., 2001, Vol. 19, No. 8, p. 751-755	1-21
A	JP 2007-501007 A (リナ ネットヴェルク エルエヌアーテクトロジーエン ゲザルシャフト ミット ベグレンツター ハフトウング) 2007.01.25	1-21

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2007-082543 A (国立大学法人京都大学) 2007. 04. 05	1 - 2 1
A	JEONG, Haeyoung et al., Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3)., J. Mol. Biol., 2009, Vol. 394, p. 644-652	1 - 2 1

JP 2005-502322 A	2005. 01. 27	JP 2004-537984 A
		JP 2009-077731 A
		JP 2009-132704 A
		JP 2011-030571 A
		US 2003/0082575 A1
		US 2003/0108885 A1
		US 2005/0208536 A1
		US 2005/0250183 A1
		US 2006/0063244 A1
		US 2006/0233744 A1
		US 2006/0234367 A1
		US 2007/0117184 A1
		US 2008/0166783 A1
		US 2008/0167243 A1
		US 2008/0227152 A1
		US 2008/0261311 A1
		US 2009/0053791 A1
		US 2009/0068717 A1
		US 2011/0027867 A
		EP 1456360 A
		EP 1490483 A
		EP 2128246 A1
		WO 2002/085923 A2
		WO 2002/086075 A2
		CA 2444098 A
		CA 2443757 A
		IL 158418 D
		IL 158419 D
		AU 2002256292 B
		AU 2002303431 B
		IL 196714 D
		AU 2007251897 A
JP 2010-510798 A	2010. 04. 08	US 2010/0105565 A1
		GB 623974 D
		GB 710094 D
		GB 623974 D0
		EP 2099912 A
		WO 2008/065398 A2
		CA 2670588 A
JP 2007-501007 A	2007. 01. 25	US 2009/0087879 A1
		EP 1651767 A

WO 2005/017166 A1

DE 10336705 A

JP 2007-082543 A

2007. 04. 05

ファミリーなし