

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成22年12月9日 (2010.12.9)

【公表番号】特表2010-504096(P2010-504096A)

【公表日】平成22年2月12日 (2010.2.12)

【年通号数】公開・登録公報2010-006

【出願番号】特願2009-529249(P2009-529249)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/90 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/90

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】平成22年9月17日 (2010.9.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) スルホチロシンである第 1 の非天然アミノ酸と；
- (b) 第 1 の直交アミノアシル tRNA シンテターゼ (O - R S) と；
- (c) 第 1 の直交 tRNA (O - tRNA) と、
- (d) 該当蛋白質をコードする核酸を含み；

前記第 1 の O - R S が前記第 1 の O - tRNA と前記スルホチロシンと配列番号 4、6、8 又は 10 のアミノ酸配列を含むアミノアシル tRNA シンテターゼを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも 50% の効率で前記第 1 の O - tRNA を前記スルホチロシンで優先的にアミノアシル化し、前記核酸が少なくとも 1 個のセクターコドンを含み、前記セクターコドンが前記第 1 の O - tRNA により認識される翻訳系。

【請求項 2】

- (a) 前記第 1 の O - R S が *Methanococcus jannaschii* アミノアシル tRNA シンテターゼから誘導される；
- (b) 前記第 1 の O - R S が野生型 *Methanococcus jannaschii* チロシル tRNA シンテターゼから誘導される；
- (c) 前記第 1 の O - R S が配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体を含む；
- (d) 前記第 1 の O - R S が配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列、又はその保存変異体を含み、かつ該保存変異体が配列番号 4、6、8 又は 10 のいずれか 1 つと少なくとも 90% 一致する；
- (e) 前記第 1 の O - R S が配列番号 2 の保存変異体であるアミノ酸配列を含み、該保存変異体が配列番号 2 と少なくとも 90% 一致し、かつ Tyr 32 に相当する位置のロイシン、Leu 65 に相当する位置のプロリン、Gln 155 に相当する位置のグルタミン酸、Asp 158 に相当する位置のグリシン、Ile 159 に相当する位置のシステイン又はスレオニン、及び Leu 162 に相当する位置のリシンよりなる群から選ばれた 2 種以

上のアミノ酸を含む；或いは

( f ) 前記第 1 の O - R S が配列番号 5、7、9 又は 11 に記載のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによりコードされる；

請求項 1 の翻訳系。

【請求項 3】

前記系が前記第 1 の O - R S と前記第 1 の O - t R N A を含む宿主細胞を含み、

( a ) 前記宿主細胞が前記第 1 の非天然アミノ酸を含む；

( b ) 前記宿主細胞が真性細菌細胞である；

( c ) 前記宿主細胞が大腸菌である；

( d ) 前記宿主細胞が前記第 1 の O - R S をコードするポリヌクレオチドを含む；

( e ) 前記宿主細胞が前記第 1 の O - t R N A をコードするポリヌクレオチドを含む；

或いは

( f ) 前記宿主細胞が前記 ( a ) ~ ( e ) のいずれかの組み合わせを含む；

請求項 1 に記載の翻訳系。

【請求項 4】

選択位置に非天然アミノ酸を組み込んだ蛋白質を翻訳系で生産する方法であって、

( a ) ( i ) スルホチロシンである第 1 の非天然アミノ酸と；

( i i ) 第 1 の直交アミノアシル t R N A シンテターゼ ( O - R S ) と；

( i i i ) 第 1 の直交 t R N A ( O - t R N A ) ( なお、前記第 1 の O - R S は前記第 1 の O - t R N A と前記スルホチロシンと配列番号 4、6、8 又は 10 のアミノ酸配列を含むアミノアシル t R N A シンテターゼを含む翻訳系で観察される効率の少なくとも 50 % の効率で前記第 1 の O - t R N A を前記スルホチロシンで優先的にアミノアシル化する ) と；

( i v ) 前記蛋白質をコードし、前記第 1 の O - t R N A により認識される少なくとも 1 個のセクターコドンを含む核酸を含む翻訳系を準備する段階と；

( b ) 前記セクターコドンに応答して前記蛋白質の翻訳中に前記蛋白質の前記選択位置に前記非天然アミノ酸を組み込むことにより、前記選択位置に前記非天然アミノ酸を組み込んだ前記蛋白質を生産する段階を含む前記方法。

【請求項 5】

( a ) 翻訳系を準備する前記段階が前記 O - R S をコードするポリヌクレオチドを準備する段階を含む；

( b ) 翻訳系を準備する前記段階が *Methanococcus jannaschii* アミノアシル t R N A シンテターゼから誘導される O - R S を準備する段階を含む；

( c ) 翻訳系を準備する前記段階が野生型 *Methanococcus jannaschii* チロシル t R N A シンテターゼから誘導される O - R S を準備する段階を含む；

( d ) 翻訳系を準備する前記段階が配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列及びその保存変異体を含む O - R S を準備する段階を含む；

( e ) 翻訳系を準備する前記段階が配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列、又はその保存変異体を含む O - R S を準備する段階を含み、該保存変異体が配列番号 4、6、8 又は 10 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % 一致する；

( f ) 翻訳系を準備する前記段階が配列番号 2 の保存変異体であるアミノ酸配列を含む O - R S を準備する段階を含み、該保存変異体が配列番号 2 と少なくとも 90 % 一致し、かつ Tyr 32 に相当する位置のロイシン、Leu 65 に相当する位置のプロリン、Gln 155 に相当する位置のグルタミン酸、Asp 158 に相当する位置のグリシン、Ile 159 に相当する位置のシステイン又はスレオニン、及び Leu 162 に相当する位置のリシンよりなる群から選ばれた 2 種以上のアミノ酸を含む；

( g ) 翻訳系を準備する前記段階が前記 O - t R N A をコードするポリヌクレオチドを準備する段階を含む；

( h ) 翻訳系を準備する前記段階が配列番号 1 に記載のポリヌクレオチド配列を含むか又は該配列によりコードされる O - t R N A を準備する段階を含む；

( i ) 翻訳系を準備する前記段階が宿主細胞を準備する段階を含み、該宿主細胞が前記第 1 の非天然アミノ酸と、前記第 1 の O - R S と、前記第 1 の O - t R N A と、前記核酸を含み、前記組み込み段階が前記宿主細胞を培養する段階を含む；

( j ) 翻訳系を準備する前記段階が細胞抽出液を準備する段階を含む；或いは

( k ) 翻訳系を準備する前記段階が前記 ( a ) ~ ( j ) のいずれかの組み合わせを含む；  
請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

( a ) 宿主細胞を準備する前記段階が真正細菌宿主細胞を準備する段階を含む；

( b ) 宿主細胞を準備する前記段階が大腸菌宿主細胞を準備する段階を含む；

( c ) 宿主細胞を準備する前記段階が前記 O - R S をコードするポリヌクレオチドを含む  
宿主細胞を準備する段階を含む；

( d ) 宿主細胞を準備する前記段階が前記 O - R S をコードするポリヌクレオチドを含む  
宿主細胞を準備する段階を含み、前記ポリヌクレオチドが配列番号 5、7、9 又は 11 に  
記載の配列を含む；或いは

( e ) 宿主細胞を準備する前記段階が前記 ( a ) ~ ( d ) の組み合わせを含む；

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

( a ) 配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列又はその保存変異体を含む；

( b ) 配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列又はその保存変異体を含み、該  
保存変異体が配列番号 4、6、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列のいずれかと少なくとも  
90%一致する；或いは

( c ) 配列番号 2 の保存変異体であるアミノ酸配列を O - R S を含み、該保存変異体が配  
列番号 2 と少なくとも 90%一致し、かつ T y r 32 に相当する位置のロイシン、L e u  
65 に相当する位置のプロリン、G l n 155 に相当する位置のグルタミン酸、A s p 1  
58 に相当する位置のグリシン、I l e 159 に相当する位置のシステイン又はスレオニ  
ン、及び L e u 162 に相当する位置のリシンよりなる群から選ばれた 2 種以上のアミノ  
酸を含む；

ポリペプチドを含有する組成物。

【請求項 8】

前記保存変異体ポリペプチドが前記 O - t R N A と前記非天然アミノ酸と配列番号 4、  
6、8 又は 10 のアミノ酸配列を含むアミノアシル t R N A シンテターゼを含む翻訳系で  
観察される効率の少なくとも 50% の効率でコグネイト直交 t R N A ( O - t R N A ) を  
非天然アミノ酸でアミノアシル化する請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

( a ) 請求項 7 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；又は

( b ) 配列番号 5、7、9 又は 11 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；を含む  
組成物。