

【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 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 9/90 (2006.01)

C 12 P 21/02 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 A

C 12 N 9/90

C 12 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-RS)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-RS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個のセレクターコドンを含み、前記セレ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-RS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-RS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-RS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-RS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-RS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Tyr32に相当する位置のロイシン、Leu65に相当する位置のプロリン、Gln155に相当する位置のグルタミン酸、Asp158に相当する位置のグリシン、Ile159に相当する位置のシステイン又はスレオニン、及びLeu162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-RS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-RSと前記第1のO-tRNA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-RS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-tRNA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；

(ii) 第1の直交アミノアシルtRNAシンテターゼ(O-RS)と；

(iii) 第1の直交tRNA(O-tRNA)(なお、前記第1のO-RSは前記第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する)と；

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

(b) 前記セレ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-RS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tRNAシンテターゼから誘導されるO-RS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tRNAシンテターゼから誘導されるO-RS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-RS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-RS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-RS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Tyr32に相当する位置のロイシン、Leu65に相当する位置のプロリン、Gln155に相当する位置のグルタミン酸、Asp158に相当する位置のグリシン、Ile159に相当する位置のシステイン又はスレオニン、及びLeu162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-tRNA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-tRNA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-RSと、前記第1のO-tRNAと、前記核酸を含み、前記組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-RS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-RS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-RS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Tyr32に相当する位置のロイシン、Leu65に相当する位置のプロリン、Gln155に相当する位置のグルタミン酸、Asp158に相当する位置のグリシン、Ile159に相当する位置のシステイン又はスレオニン、及びLeu162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-tRNA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%の効率でコグネイト直交tRNA(O-tRNA)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。