(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-510259
(P2017-510259A)
(43)公表日　平成29年4月13日(2017.4.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B050
C07K 1/13	(2006.01)	C07K	1/13		4B064
C07K 14/00	(2006.01)	C07K	14/00		4C076
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	Z	4C085
C12N 9/36	(2006.01)	C12N	9/36		4H006

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 54 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-554887 (P2016-554887)
(86)(22)出願日　平成27年3月10日 (2015.3.10)
(85)翻訳文提出日　平成28年10月4日 (2016.10.4)
(86)国際出願番号　PCT/GB2015/050694
(87)国際公開番号　WO2015/136265
(87)国際公開日　平成27年9月17日 (2015.9.17)
(31)優先権主張番号　1404569.4
(32)優先日　平成26年3月14日 (2014.3.14)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

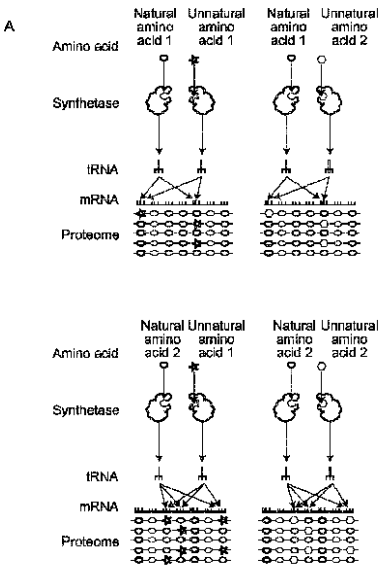
(71)出願人　503276997
メディカル　リサーチ　カウンシル
イギリス国　エスエヌ２　１エフエル，スウィンドン，　ノース　スター　アベニュー，　ポラリス　ハウス，　デービット　フィリップス　ビルディング　２階
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74)代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74)代理人　100188352
弁理士　松田　一弘

最終頁に続く

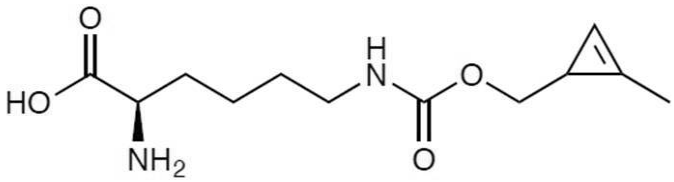
(54)【発明の名称】シクロプロペンアミノ酸及び方法

(57)【要約】
本発明は、シクロプロペン基を有するアミノ酸を含むポリペプチドであって、前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介して前記アミノ酸に結合されている、ポリペプチドに関する。適切には、シクロプロペン基は、１，３－ジメチルシクロプロペンのような１，３－二置換シクロプロペンである。適切には、シクロプロペン基は、リジンアミノ酸の残基として存在する。本発明はまた、ポリペプチドを製造する方法に関する。本発明はまた、シクロプロペンを含むアミノ酸であって、前記シクロプロペン基がカルバメート基を介してアミノ酸部分に結合されている、アミノ酸に関する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】
【請求項１】
シクロプロペン基を有するアミノ酸を含むポリペプチドであって、前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介して前記アミノ酸に結合されている、前記ポリペプチド。
【請求項２】
シクロプロペン基が、１，３－二置換シクロプロペンである、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
シクロプロペンが、１，３－ジメチルシクロプロペンである、請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
シクロプロペン基が、リジンアミノ酸の残基として存在する、請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項５】
シクロプロペン基に連結されたテトラジン化合物をさらに含む、請求項１～４のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項６】
シクロプロペンを含むアミノ酸であって、前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介して前記アミノ酸部分に結合されている、前記アミノ酸。
【請求項７】
シクロプロペンが、１，３－二置換シクロプロペンである、請求項６に記載のアミノ酸。
【請求項８】
シクロプロペンが、１，３－ジメチルシクロプロペンである、請求項７に記載のアミノ酸。
【請求項９】
リジンアミノ酸である、請求項６～８のいずれかに記載のアミノ酸。
【請求項１０】
Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－ｌ－リジンを含む、請求項９に記載のアミノ酸。
【請求項１１】
【化１】



からなる、請求項１０に記載のアミノ酸。
【請求項１２】
シクロプロペン基を含むポリペプチドを生産する方法であって、
前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介してアミノ酸部分に結合されており、
前記方法が、カルバメート基を介して前記アミノ酸部分に結合されているシクロプロペン基を含むアミノ酸を、ポリペプチドに遺伝学的に取り込むことを含む、前記方法。
【請求項１３】
ポリペプチドの生産が、
（ｉ）前記ポリペプチドをコードし、シクロプロペン基を有するアミノ酸をコードする直交性コドンを含む核酸を用意すること、
（ii）前記直交性コドンを認識し、シクロプロペン基を有する前記アミノ酸をポリペプチ

ド鎖に取り込むことが可能な直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対の存在下で前記核酸を翻訳すること
を含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
直交性コドンがアンバーコドン（ＴＡＧ）を含み、ｔＲＮＡが$MbtRNA_{CUA}$を含み、かつｔＲＮＡシンセターゼがMbPylRSを含むか、或いは
直交性コドンがアンバーコドン（ＴＡＧ）を含み、ｔＲＮＡが$MmtRNA_{CUA}$を含み、かつｔＲＮＡシンセターゼがMmPylRSを含む、請求項１２又は１３に記載の方法。
【請求項１５】
シクロプロペン基を含むアミノ酸が、請求項６～１１のいずれかに記載のアミノ酸である、請求項１２～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
テトラジン基を含むポリペプチドを生産する方法であって、請求項１～４のいずれかに記載のポリペプチドを用意すること、前記ポリペプチドをテトラジン化合物と接触させること、及びインキュベートして、逆電子要求型ディールス－アルダー環化付加反応によりテトラジンを前記シクロプロペン基に結合させることを含む、前記方法。
【請求項１７】
反応が、１０分以下、好ましくは、１分以下、好ましくは、３０秒以下、進行してもよい、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
それぞれがシクロプロペン基を有する２又は３以上のアミノ酸を含む、請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドであって、それぞれの前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介してそれぞれの前記アミノ酸に結合される、前記ポリペプチド。
【請求項１９】
それぞれがシクロプロペン基を有する４つのアミノ酸を含む、請求項１８に記載のポリペプチド。
【請求項２０】
請求項１～５、１８及び１９のいずれかに記載のポリペプチドを含む、抗体薬物複合体（ＡＤＣ）。
【請求項２１】
実質的に本明細書に記載されている、化合物、ポリペプチド、又は方法。
【請求項２２】
添付の図面を参照して実質的に本明細書に記載される、化合物、ポリペプチド、又は方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、（拡張された）遺伝子コードを介した生体直交基（bio-orthogonal group）の部位特異的取り込みに関する。特に、本発明は、リジンのような遺伝学的に取り込まれたアミノ酸を介した、カルバメート結合シクロプロペンのポリペプチドへの取り込みに関する。かかるシクロプロペン基は、テトラジンのようなさらなる化学基の付加に有用である。
【背景技術】
【０００２】
遺伝子コード拡張を介した生体直交基の部位特異的取り込みは、あらゆるプローブを用いたタンパク質の部位特異的標識のための強力な一般的戦略をもたらす。しかしながら、遺伝学的にコードされ得る生体直交官能基の遅い反応性、及び／又はそれらの光活性化の必要性が、この戦略の有用性を制限している。
【０００３】
多様なプローブでのタンパク質の迅速な部位特異的標識は、化学生物学者にとって未解

決の問題であり続けている。酵素により媒介される標識アプローチは迅速であり得るが、研究中のタンパク質に変動をもたらすタンパク質又はペプチド融合を用いるため、標識され得る部位を制限する可能性があり、一方、そのための成分を遺伝学的にコードすることができる多くの「生体直交」反応は、多くの生物学的プロセスを研究するのに有用な時間スケールでタンパク質の定量的及び部位特異的標識を達成するには遅すぎる。

【０００４】

多様な事情において、ユーザー定義のプローブで、タンパク質を部位特異的に標識する一般的な方法が早急に求められている。

【０００５】

迅速な生体直交反応の重要なクラスとして、テトラジンを含む逆電子要求型ディールスーアルダー反応が頭角を現してきた。これらの反応のいくつかについて報告された速度は、非常に速い。

【０００６】

Yu et al 2012（Angew. Chem. Int. Ed. Volume 51, pages 10600-10604）は、遺伝学的にコードされたシクロプロペンが、哺乳動物細胞において、迅速な光クリック化学により媒介されるタンパク質標識を指示することを開示する。著者らは、安定なシクロプロペンアミノ酸の合成、２つのテトラゾールとの光により誘導される環化付加反応におけるその反応性の特徴決定、大腸菌及び哺乳動物細胞両方におけるタンパク質へのその部位特異的取り込み、並びにインビトロ及びインビボ両方でのタンパク質の生体直交標識の指示におけるその使用を報告している。シクロプロペン含有アミノ酸をタンパク質に取り込むために、著者らは、ＴＡＧアンバーコドンに応答してそれらのシクロプロペンリジンアミノ酸を選択的に付加する直交性ｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンセターゼ対を考案しなければならなかった。これは、シンセターゼライブラリーの構築、そのシンセターゼ内の５つの位置の無作為化、それと共に少なくとも５ラウンドの正及び負の選択スクリーニングを必要とした。この研究の短所は、特異的な変異シンセターゼの生産に頼っていることである。Yu et alは、修飾されたアミノ酸中のシクロプロペン部分にテトラゾール化合物を結合させる際に光活性化を用いている。光活性化は、３０２ナノメーター又は３６５ナノメーターのいずれかで行われる。Yu et alのテトラゾールをアミノ酸に結合させる際に光活性化を要することは、当該技術分野における短所である。これは、コンジュゲーション化学において面倒で余分なステップである。またＵＶは、細胞にも損傷を与えることから、インビボ／細胞の状況において不都合である。

【０００７】

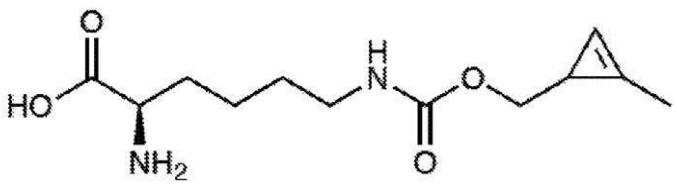
Kamber et alは、固有の生体直交反応性を示す異性体シクロプロペンを開示する（2013 JACS Volume 135, pages 13680-13683）。著者らは、複雑な環境：テトラジンの１，３－二置換シクロプロペンとの逆電子要求型ディールスーアルダー反応、及びニトリルイミンの３，３－二置換シクロプロペンとの１，３－双極性環化付加において、生体分子をタグ付けするために用いられ得る２つの反応を考察する。著者らは、安定なシクロ付加物を生成するために用いられた種々の化学反応スキームを考察する。Kamber et alにより考察された分子はどれもアミノ酸ではない。記載された化合物が、アミノ酸に取り込まれる可能性があると想像する根拠は何もない。たとえいかなるかかる取り込みが試みられたとしても、かかる化合物がポリペプチドに取り込まれることを可能にすると思われる示唆又は指導は絶対的に存在しない。記載される化学基のいずれかを含むアミノ酸の合成についてのスキームは、Kamber et alにより提示されていない。本文書においてどこかで言及される、タンパク質への取り込みのための生化学的ツールは存在しない。Kamber et alは、シクロプロペン上の置換パターン、すなわち１つはテトラジンとの反応を可能にするようなパターン、及び１つはテトラジンとの反応が許容されていないようなパターンを調べることにのみ関心を示している。

【０００８】

本発明は、先行技術に付随する課題を克服しようとする。

【先行技術文献】

【非特許文献】
【０００９】
【非特許文献１】Yu et al 2012（Angew. Chem. Int. Ed. Volume 51, pages 10600-10604）
【非特許文献２】Kamber et al 2013 JACS Volume 135, pages 13680-13683
【発明の概要】
【００１０】
一態様において、本発明は、シクロプロペン基を有するアミノ酸を含むポリペプチドであって、前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介して前記アミノ酸に結合されている、ポリペプチドを提供する。
【００１１】
適切には、前記シクロプロペン基は、１，３－二置換シクロプロペンである。適切には、前記シクロプロペンは、１，３－ジメチルシクロプロペンである。適切には、前記シクロプロペン基は、リジンアミノ酸の残基として存在する。適切には、前記ポリペプチドは、前記シクロプロペン基に連結されるテトラジン化合物をさらに含む。
【００１２】
別の態様において、本発明は、シクロプロペンを含むアミノ酸であって、前記シクロプロペン基がカルバメート基を介してアミノ酸部分に結合されている、アミノ酸に関する。
【００１３】
適切には、前記シクロプロペンは、１，３－二置換シクロプロペンである。適切には、前記シクロプロペンは、１，３－ジメチルシクロプロペンである。適切には、前記アミノ酸は、リジンアミノ酸である。適切には、前記アミノ酸は、Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－１－リジンを含む。
【００１４】
適切には、前記アミノ酸は、
【００１５】
【化１】



【００１６】
を含むか、又はより適切にはからなる。
【００１７】
別の態様において、本発明は、シクロプロペン基を含むポリペプチドを生産する方法であって、前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介してアミノ酸部分に結合されており、前記方法が、カルバメート基を介して前記アミノ酸部分に結合されているシクロプロペン基を含むアミノ酸を、ポリペプチドに遺伝学的に取り込むことを含む、方法に関する。
【００１８】
適切には、ポリペプチドの生産は、
（ｉ）前記ポリペプチドをコードし、シクロプロペン基を有するアミノ酸をコードする直交性コドンを含む核酸を用意すること、
（ii）前記直交性コドンを認識し、シクロプロペン基を有する前記アミノ酸をポリペプチド鎖に取り込むことが可能な直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対の存在下で前記核酸を翻訳すること
を含む。
【００１９】

適切には、前記直交性コドンはアンバーコドン（ＴＡＧ）を含み、前記ｔＲＮＡは$Mb tRNA_{CUA}$を含み、前記ｔＲＮＡシンセターゼはＭｂＰｙｌＲＳを含む。

【００２０】

適切には、前記直交性コドンはアンバーコドン（ＴＡＧ）を含み、前記ｔＲＮＡは$Mm tRNA_{CUA}$を含み、前記ｔＲＮＡシンセターゼはＭｍＰｙｌＲＳを含む。

【００２１】

別の態様において、本発明は、シクロプロペン基を含む前記アミノ酸が上述のアミノ酸である、上述の方法に関する。

【００２２】

別の態様において、本発明は、テトラジン基を含むポリペプチドを生産する方法であって、上述のシクロプロペン基を含むポリペプチドを用意すること、前記ポリペプチドをテトラジン化合物と接触させること、及びインキュベートして、逆電子要求型ディールス－アルダー環化付加反応（inverse electron demand Diels-Alder cycloaddition reaction）によりテトラジンをシクロプロペン基に結合させることを含む、方法に関する。

【００２３】

適切には、１０分以下、好ましくは、１分以下、好ましくは、３０秒以下、前記反応を進行させる。インビボでの、又は組織培養培地若しくは真核生物細胞に適した他の培地などの真核生物の培養条件における反応は、最大標識を達成するために３０秒より長い間行われることを必要とする場合がある。熟練した作業者は、本明細書に示されるガイダンスに基づき、試行錯誤により最適な反応時間を決定することができる。

【００２４】

別の態様において、本発明は、それぞれがシクロプロペン基を有する２又は３以上のアミノ酸を含む、上述のポリペプチドであって、それぞれの前記シクロプロペン基が、カルバメート基を介してそれぞれの前記アミノ酸に結合されている、ポリペプチドに関する。ポリペプチドに２又は３以上のシクロプロペン基を取り付けることにより、２又は３以上のコンジュゲート基（官能基）をポリペプチドに有利に結合させることができる。これは、抗体薬物複合体の場合のように、コンジュゲート基（官能基）が細胞毒性分子のような薬物分子を含むときに特に役立つ。

【００２５】

適切には、前記ポリペプチドは、それぞれがシクロプロペン基を有する、４つのアミノ酸を含む。

【００２６】

適切には、上述のポリペプチドを含む抗体薬物複合体（ＡＤＣ）は、それぞれがシクロプロペン基を有する、４つのアミノ酸を含む。これは、所望の４つの細胞毒性分子のＡＤＣへの結合に特に有利である。

【００２７】

別の態様において、本発明は、上述のポリペプチドを含む抗体薬物複合体（ＡＤＣ）に関する。適切には、ポリペプチドは、全体の抗体（例えば、モノクローナル抗体（ｍＡｂ））のような抗体ポリペプチドであるか、又は抗体フラグメント（例えば、１本鎖可変フラグメント［ｓｃＦｖ］）であり、適切には、ＣＤＲアミノ酸配列を含む抗体フラグメントである。

【００２８】

適切には、抗体ポリペプチド（又はフラグメント）は、キメラ抗体ポリペプチドの製造により有利にヒト化され得、適切には、抗体ポリペプチド（又はフラグメント）は、有利にＣＤＲグラフト化され得、適切には、抗体ポリペプチド（又はフラグメント）は、テクノロジーが許可する程度まで、有利に完全にヒト化され得る。

【００２９】

適切には、抗体ポリペプチド（又はフラグメント）は、ＡＤＣの輸送及び／若しくは標的化において補助するために、トランスフェリン受容体のリガンド、例えば、トランスフェリン又はその一部のような所望の別のポリペプチドに融合され得る。

【００３０】
別の態様において、本発明は、前記テトラジン基が、フルオロフォアにさらに結合される、上述のポリペプチドに関する。
【００３１】
適切には、前記フルオロフォアは、フルオレセイン、テトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）、又はホウ素－ジピロメテン（ＢＯＤＩＰＹ）を含む。
【００３２】
適切には、前記フルオロフォアは、１又は２以上のAlexaフルオロフォアを含み得る。適切には、前記フルオロフォアは、１又は２以上のシアニンベースのフルオロフォアを含み得る。
【発明を実施するための形態】
【００３３】
遺伝子コード拡張（genetic code expansion）方法は、多様な化学構造を有し、多様な官能基を有する非天然アミノ酸の、定量的な、部位特異的取り込み、及び遺伝学的に指示された取り込みを可能にする。これは、所望の遺伝子に導入されたアンバー終止コドンに応答して、非天然アミノ酸を挿入することにより、最も一般的に達成される（Rotenberg, S. A.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J. S.; Weinstein, I. B.; Rideout, D. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991, 88, 2490、Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. J Am Chem Soc 2012, 134, 2898）。遺伝子コード拡張は、直交性アミノアシル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対の細胞への導入を介して達成される。ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対は、１）広範な有用な非天然アミノ酸を特異的に認識することができ、２）拡張された範囲の化学構造を認識するよう発展させることができ、並びに３）大腸菌（Lang, K.; Davis, L.; Torres-Kolbus, J.; Chou, C.; Deiters, A.; Chin, J. W. Nat Chem, 2012, 4, 298）、酵母（Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C; Szymanski, J.; Mueller, R.; Wiesler, M.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 4166）、哺乳動物細胞（Kaya, E.; Vrabel, M.; Deiml, C.; Prill, S.; Fluxa, V. S.; Carell, T. Angewandte Chemie International Edition 2012, 57, 4466、Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G, J Am Chem Soc 2003, 125, 3192、Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816）、線虫（C.elegans）（Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Angewandte Chemie International Edition 2012, 57, 7476）、及びキイロショウジョウバエ（D.melanogaster）（Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518）において、遺伝子コード拡張のための直交対として用いられ得るので、とりわけ遺伝子コード拡張にとって最も有用な対である（Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. J Am Chem Soc 2012, 134, 2898）。
【００３４】
本発明者らは、化学選択的逆電子要求型ディールス－アルダー反応を介して導入されるテトラジンプローブで標識され得るシクロプロペン基を有する、新規に合成されるタンパク質の生産を示す。
【００３５】
別の態様において、本発明は、上述の同種の組換えポリペプチドに関する。適切には、前記ポリペプチドは、上述の方法により製造される。
【００３６】
本明細書で記載された方法に従い生産されるポリペプチドも開示される。このようなポリペプチドは、これらの新規方法の生成物であることに加えて、シクロプロペン、適切にはカルバメートが連結されたシクロプロペンを含むという技術特徴を有する。

【００３７】
変異させることは、当該技術分野において通常の意味を有し、言及される残基、モチーフ、若しくはドメインの置換、又はトランケーション、又は欠失を指し得る。変異は、例えば、変異させた配列を有するポリペプチドの合成により、ポリペプチドレベルにおいてもたらされ得るか、又は例えば、核酸が続いて翻訳されて、変異させたポリペプチドが生産され得る、変異させた配列をコードする核酸を製造することにより、ヌクレオチドレベルにおいてもたらされ得る。所定の変異部位について置き換えアミノ酸として特定されるアミノ酸がない場合、適切には、前記部位の無作為化が用いられる。デフォルト変異として、アラニン（Ａ）が用いられてもよい。適切には、特定の部位において用いられる変異は、本明細書において設定されるとおりである。

【００３８】
フラグメントは、適切には、少なくとも１０アミノ酸、適切には、少なくとも２５アミノ酸、適切には、少なくとも５０アミノ酸、適切には、少なくとも１００アミノ酸、適切には、少なくとも２００アミノ酸、適切には、少なくとも２５０アミノ酸、適切には、少なくとも３００アミノ酸、適切には、少なくとも３１３アミノ酸であり、又は適切には、所望のポリペプチドの大部分である。

【００３９】
本発明の方法は、インビボ又はインビトロで実施され得る。

【００４０】
一実施形態において、適切には、本発明の方法は、ヒト又は動物の身体に適用されない。適切には、本発明の方法は、インビトロでの方法である。適切には、方法は、ヒト又は動物の身体の存在を要求しない。適切には、方法は、ヒト若しくは動物の身体の診断の方法、又は手術の方法、又は治療の方法ではない。

【００４１】
用語「含む（comprises）（含む（comprise）、含むこと（comprising））」は、当該技術分野において通常の意味を有すること、すなわち、定められた特性又は特性の一群が含まれるが、この用語は、また存在するものからいかなる他の定められた特性又は特性の一群も除外しないことが理解されるものとする。

【００４２】
利点
シクロプロペンは、公知のタンパク質標識基より少ない炭素リッチな基である。

【００４３】
本発明のシクロプロペンアミノ酸は、先行技術の技術より迅速なタンパク質標識を導く。

【００４４】
本発明のシクロプロペンアミノ酸の使用は、先行技術の標識アミノ酸より効率的な取り込みを導く。

【００４５】
ノルボルネン基を有するアミノ酸をタンパク質に取り込むことが知られている。本発明は、ノルボルネン基に関する先行技術の方法を超えた特定の利点を提示する。例えば、本発明のシクロプロペンアミノ酸についてのコンジュゲーション化学は、アミノ酸を含有するノルボルネンのものに類似するが、シクロプロペンアミノ酸へのコンジュゲーションはそれより速い可能性がある。

【００４６】
本発明によるシクロプロペンアミノ酸の取り込みは、先行技術の非天然アミノ酸の取り込みより効率的であり得る。本発明によるシクロプロペンアミノ酸の取り込みは、先行技術の非天然アミノ酸より高いレベルの取り込みを導き得る。

【００４７】
教示されたシクロプロペンアミノ酸が、野生型ｔＲＮＡシンセターゼを用いて取り込まれ得ることは、本発明の利点である。先行技術の非天然アミノ酸は、例えば、ＢＣＮ基を

取り込むアミノ酸のような、それらの取り込みのため変異体ｔＲＮＡシンセターゼを要求する傾向があった。

【００４８】

ポリペプチドに取り込まれた非天然アミノ酸についての迅速なコンジュゲーション反応は、先行技術において述べられている。例えば、ＴＣＯ／ＢＣＮアミノ酸は、迅速な反応時間を提示し、それは、ノルボルネン反応時間より速い場合がある。しかしながら、非常に迅速な反応時間が提供されることは、シクロプロペンアミノ酸の利点である。

【００４９】

ある特定の公知の非天然アミノ酸は、野生型ｔＲＮＡシンセターゼを使うことができる。例えば、ノルボルネン基を含むアミノ酸は、野生型ｔＲＮＡシンセターゼを用いて取り込まれ得る。しかしながら、本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンを用いることにより、より高いレベルの取り込みが達成される。言い換えると、非天然アミノ酸を含む生産された材料の量は、本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンを用いたとき、ノルボルネンを含むもののような先行技術の非天然アミノ酸を用いたときより多い。

【００５０】

シクロプロペンアミノ酸が、本明細書において述べられるｔＲＮＡシンセターゼ、最も適切には、本明細書において述べられる野生型ｔＲＮＡシンセターゼの優れた基質を形成することは、本発明の利点である。

【００５１】

アミノ酸を含有するシクロプロペンが、優れたリンカー化学、例えば、化合物を含有するテトラジンとの迅速で特異的な反応を支持することは、本発明の利点である。

【００５２】

アミノ酸を含有するシクロプロペンが、タンパク質を標識するために従前に用いられた公知の非天然アミノ酸より小さいサイズであることは、本発明の利点である。例えば、ノルボルネンを含む公知の非天然アミノ酸は、ポリペプチドに取り込まれ得るが、本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンは、有利には、先行技術のアミノ酸を含有するノルボルネンより小さいサイズのものである。

【００５３】

シクロプロペンアミノ酸が、ポリペプチドに取り込まれたとき、タンパク質構造をあまり混乱させそうにないことは、本発明の利点である。この有利な効果の少なくとも一部は、シクロプロペン分子基の小さいサイズに起因し得る。

【００５４】

シクロプロペン基に容易で特異的に結合されるべき標識のような、広範な非常に有用なさらなる化合物を可能にすることは、シクロプロペン基の取り込みの鍵となる利点である。

【００５５】

別の態様において、本発明は、前記シクロプロペン基がテトラジン基に結合される、上述のポリペプチドに関する。

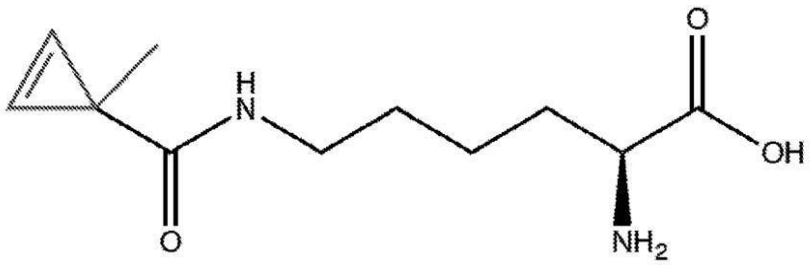
【００５６】

シクロプロペン－カルバメート結合

アミド結合したシクロプロペンを含む非天然アミノ酸は、先行技術（Yu et al 2012）において記載されている。このアミノ酸は、３，３二置換である。このアミノ酸は、以下のとおりである。

【００５７】

【化２】



【００５８】

このアミノ酸をポリペプチドに取り込むために、変異体ｔＲＮＡシンセターゼを用いることは必須である。

【００５９】

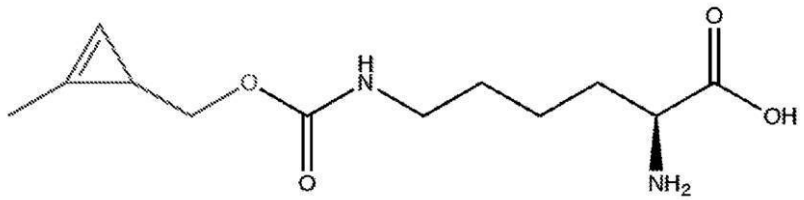
対照的に、本発明のシクロプロペンを含むアミノ酸は、（アミド基ではなく）カルバメート基を含有する。それ故、本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンは、当該技術分野におけるアミド結合したシクロプロペンアミノ酸とは化学的に異なる。

【００６０】

本発明の典型的なアミノ酸は、１，３二置換である。本発明の典型的なアミノ酸は、以下のとおりである。

【００６１】

【化３】



【００６２】

野生型ｔＲＮＡシンセターゼにより十分に取り込まれることは、本発明のカルバメート－シクロプロペンアミノ酸の利点である。これは、良好な取り込みを得るために、より少ない生物学的操作を必要とするという利点を有する。これはまた、取り込みの増強又は増大という利点をもたらす。言い換えると、本発明のシクロプロペン－カルバメートアミノ酸は、公知の非天然アミノ酸より高いレベルまで、及び／又は効率的に取り込まれる。

【００６３】

本発明のシクロプロペンアミノ酸の使用は、テトラジン化合物との優れた反応速度をもたらし得る。

【００６４】

本発明のカルバメート化学は、取り込まれたアミノ酸の化学構造において、さらなる自由度という利点をもたらす。特に、本発明のカルバメートシクロプロペンは、当該技術分野において公知のアミドシクロプロペンと比較して、さらなる自由度を有する。同様に、本発明のカルバメートシクロプロペンは、ポリペプチド鎖に存在するとき、より利用しやすい。

【００６５】

当該技術分野において公知のアミド結合したシクロプロペンと比較すれば、本発明のカルバメートシクロプロペンは、それよりわずかに「長い」アミノ酸である。これは、アミノ酸骨格から離れて突出するアミノ酸基にとって「リーチ」がより長いという利点をもたらす。再度、これは、それらの基に、さらなる標識又はコンジュゲーション反応のためのさらなる利用しやすさを与え得る。

【００６６】

本発明のカルバメートシクロプロペンの化学構造は、さらなる立体構造上の自由度を有

利にもたらす。言い換えると、本発明のカルバメートシクロプロペン基は、先行技術のアミド結合したシクロプロペンアミノ酸より、タンパク質構造内のさらなる立体構造を採用し得る。

【００６７】

より詳細には、これは、シクロプロペン基とアミノ酸基の間の結合の性質から生じ得る。先行技術のアミド配置において、重要な結合は、ＳＰ２ハイブリダイズされる。本発明において、重要な結合は、ＳＰ３ハイブリダイズされ、それは、より柔軟な結合配置である。

【００６８】

さらに、本発明のシクロプロペンカルバメート配置は、カルバメートとシクロプロペン基の間のメチレン基を含む。第一に、これは、より長い分子をもたらす。先行技術のアミド結合したバージョンは、利点が少ないより短い分子である。より具体的には、本発明のアミノ酸中のメチレン炭素は、本発明の有利なメチレン炭素の代わりに、２重結合した酸素基（＝ｏ）に対応する。先行技術のアミドアミノ酸において２重結合したバージョンは、本発明のアミノ酸中のメチレン炭素結合した基と同じ位自由に回転することができない。

【００６９】

本発明のアミノ酸が、先行技術のアミノ酸を含有するノルボルネンより小さくても、有利なカルバメート化学を依然保持するという事実は、本発明の恩恵である。この恩恵は、特に、アミノ酸のポリペプチド鎖へのより良好な取り込みをもたらす。

【００７０】

加えて、テトラジン化合物への結合（テトラジンのコンジュゲーション）は、本発明のアミノ酸におけるカルバメートシクロプロペン配置より、有利に促進される。

【００７１】

適切には、前記テトラジン基は、フルオロフォアにさらに結合される。

【００７２】

適切には、前記テトラジン基は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基にさらに結合される。

【００７３】

適切には、前記フルオロフォアは、フルオレセイン、テトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）、又はホウ素－ジピロメテン（ＢＯＤＩＰＹ）を含む。

【００７４】

取り込み

適切には、本発明のシクロプロペンアミノ酸は、野生型ｔＲＮＡシンセターゼを用いて、ポリペプチドに取り込まれる。

【００７５】

適切には、シクロプロペン基を有するアミノ酸は、野生型ポリペプチド中のリジン残基に対応する位置において取り込まれる。これは、それが由来する野生型ポリペプチドに、ポリペプチドを含有するシクロプロペンの最も近い可能な構造上の関連性を維持するという利点を有する。

【００７６】

適切には、ポリペプチドは、単一のシクロプロペン基を含む。これは、シクロプロペン基に向けられる可能性があるあらゆる追加の化学修飾にも特異性を維持するという利点を有する。例えば、所望のポリペプチド中に単一のシクロプロペン基のみが存在するとき（例えば、ポリペプチド中のシクロプロペン基の一部のみが、続いて修飾される場合）、又は（ポリペプチド中の異なる位置における異なるシクロプロペン基間の固有の反応性を導き得る）同一のポリペプチド中の互いに異なるシクロプロペン基間で変動する反応微小環境の問題が、有利に回避される。

【００７７】

適切には、ポリペプチドは、２つのシクロプロペン基を含み、適切には、ポリペプチド

は、３つのシクロプロペン基を含み、適切には、ポリペプチドは、４つのシクロプロペン基を含み、適切には、ポリペプチドは、５つのシクロプロペン基を含み、適切には、ポリペプチドは、１０のシクロプロペン基を、又はさらに多くを含む。

【００７８】

原則として、アミノ酸を含有する複数のシクロプロペンは、同一又は異なる直交性コドン／直交性ｔＲＮＡ対により取り込まれ得る。適切には、アミノ酸を含有する複数のシクロプロペンは、（本明細書において記載される適切な直交性ｔＲＮＡシンセターゼと一緒の）複数のアンバーコドンの挿入により取り込まれる。

【００７９】

適切には、シクロプロペンを含むアミノ酸は、リジンアミノ酸である。一実施形態において、ｔＲＮＡは、メタノサルシナ・バーケリ（Methanosarcina barkeri）のような１つの種に由来し得、ｔＲＮＡシンセターゼは、メタノサルシナ・マゼイ（Methanosarcina mazei）のような別の種に由来し得る。別の実施形態において、ｔＲＮＡは、メタノサルシナ・マゼイのような第１の種に由来し得、ｔＲＮＡシンセターゼは、メタノサルシナ・バーケリのような第２の種に由来し得る。直交対が、異なる種由来のｔＲＮＡ及びｔＲＮＡシンセターゼを含むとき、直交対が、一緒に有効に働く、すなわち、ｔＲＮＡシンセターゼが、所望のアミノ酸のｔＲＮＡを有効にアミノアシル化するという条件が常にある。同等に、変異体ｔＲＮＡ又は変異体ｔＲＮＡシンセターゼは、正しいアミノアシル化活性を有するという条件で用いられ得る。本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンが、野生型ＰｙｌＲＳシンセターゼを用いて、ｔＲＮＡ上に有効に荷電されることは、本発明の利点であるが、本発明のアミノ酸を含有するシクロプロペンでｔＲＮＡを荷電する際に有効であるという条件で、変異体ＰｙｌＲＳシンセターゼを用いることが、同等に可能である。最も適切には、直交対は、同一の種由来のｔＲＮＡ及びｔＲＮＡシンセターゼを含む。

【００８０】

確かに、増大した効率を有し得る、本発明のシクロプロペンアミノ酸の取り込みのためシンセターゼを製造するために、野生型シンセターゼ（又は適切なシンセターゼの別のバリアント）を発達させることが可能である。原則として、Ｐｙｌ由来のｔＲＮＡシンセターゼが有用であり得る。キメラｔＲＮＡシンセターゼは、ｔＲＮＡシンセターゼ分子の荷電／アセチル化対が、Ｐｙｌ　ｔＲＮＡシンセターゼに基づくか、又はそれに由来するという条件で生産され得る。言い換えると、ｔＲＮＡ分子のアンチコドン部分は、例えばセンスコドン、４塩基コドン、アンバーコドン、又は別の「終止」コドンのような互いに異なるコドンの認識においてｔＲＮＡを方向付けるために、作業者の選択に応じて変更可能である。しかしながら、ｔＲＮＡ分子の機能的アシル化／荷電部分は、シクロプロペン荷電活性を保存するために、保たれるべきである。

【００８１】

メタノサルシナ・バーケリ、及びメタノサルシナ・マゼイ種ピロリジンｔＲＮＡシンセターゼのいずれかが適当である。

【００８２】

メタノサルシナ・バーケリ及びメタノサルシナ・マゼイｔＲＮＡ両方が適当である。いかなる場合においても、これらのｔＲＮＡは、１つのヌクレオチドのみが異なる。この１つのヌクレオチド相違は、アミノ酸を含有するシクロプロペンに関連して、それらの活性への影響を有しない。それ故、いずれかのｔＲＮＡは、本発明において、同等に適用可能である。

【００８３】

用いられるｔＲＮＡは、変異されるように変動され得る。全ての場合において、Ｐｙｌ　ｔＲＮＡのいかなるかかるバリアント又は変異体も、アミノ酸を含有するシクロプロペンでｔＲＮＡを荷電するために用いられるｔＲＮＡシンセターゼと生産的に相互作用する能力を常に保持すべきである。

【００８４】

遺伝子取り込み及びポリペプチド生産

本発明による方法において、前記遺伝子取り込みは、直交又は拡張された遺伝子コードを好ましくは用い、ここで、１又は２以上の特異的直交性コドンは、直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対を用いることにより遺伝学的に取り込まれ得るように、シクロプロペン基を有する特異的なアミノ酸残基をコードするよう割り当てられている。直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対は、原則として、ｔＲＮＡを、シクロプロペン基を含むアミノ酸で荷電する能力があり、直交性コドンに応答してポリペプチド鎖にシクロプロペン基を含むそのアミノ酸を取り込む能力がある、いかなるかかる対であってもよい。直交性コドンは、直交性コドンアンバー、オーカー、オパール、又は４塩基コドンであり得る。コドンは、シクロプロペン基を含むアミノ酸を運ぶために用いられる、直交性ｔＲＮＡにただ対応していなければならない。好ましくは、直交性コドンはアンバーである。

【００８５】

本明細書において示される具体例の多くが、アンバーコドン、及び対応するｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンセターゼを用いていることに、留意するべきである。上で述べたとおり、これらは変動され得る。或いは、シクロプロペン基を含むアミノ酸と働く能力がある代替のｔＲＮＡ／ｔＲＮＡシンセターゼ対を用いるか、又は選択するというトラブルにつながることなく、他のコドンを用いるために、ｔＲＮＡのアンチコドン領域が、選択のコドンについての所望のアンチコドン領域と単純に交換され得る。アンチコドン領域は、かかる交換が、十分熟練した作業者の範囲内であるように、ｔＲＮＡの荷電又は取り込み機能においても、ｔＲＮＡシンセターゼによる認識においても含まれない。したがって、いくつかの実施形態において、$Mbt RNA_{CUA}$又は$Mmt RNA_{CUA}$のような本発明において用いられるｔＲＮＡのアンチコドン領域は、交換され得る、すなわち、キメラ$t RNA_{CUA}$は、アミノ酸を含有するシクロプロペンが、オーカー、オパール、又は４塩基コドンを含む、本明細書において考察される異なる直交性コドンに応答して取り込まれ得、シクロプロペンアミノ酸が取り込まれるべきである、ポリペプチドをコードする核酸が、対応して変異されて、シクロプロペンアミノ酸の取り込みのポイントにおいて同族コドンが導入されるように、アンチコドン領域を交換して、代替のコドンが認識されるように、用いられ得る。最も適切には、直交性コドンはアンバーである。

【００８６】

したがって、所望であれば、代替の直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対が用いられてもよい。

【００８７】

好ましくは、直交性シンセターゼ／ｔＲＮＡ対は、メタノサルシナ・バーケリＭＳピロリジンｔＲＮＡシンセターゼ（ＭｂＰｙｌＲＳ）、及びその同族アンバーサプレッサーｔＲＮＡ（$MbtRNA_{CUA}$）である。

【００８８】

メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＴ遺伝子は、$MbtRNA_{CUA}$ ｔＲＮＡをコードする。

【００８９】

メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＳ遺伝子は、ＭｂＰｙｌＲＳ ｔＲＮＡシンセターゼタンパク質をコードする。特定のアミノ酸残基が、数値アドレスを用いて言及されるとき、ナンバリングは、ＭｂＰｙｌＲＳ（メタノサルシナ・バーケリピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ）アミノ酸配列を、参照配列（すなわち、公的に入手可能な野生型メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＳ遺伝子受託番号Ｑ４６Ｅ７７）：

MDKKPLDVLI SATGLWMSRT GTLHKIKHYE VSRSKIYIEM ACGDHLVVNN
SRSCRTARAF RHHKYRKTCK RCRVSDEDIN NFLTRSTEGK TSVKVKVVSA
PKVKKAMPKS VSRAPKPLEN PVSAKASTDT SRSVPSPAKS TPNSPVPTSA
PAPSLTRSQL DRVEALLSPE DKISLNIAKP FRELESELVT RRKNDFQRLY
TNDREDYLGK LERDITKFFV DRDFLEIKSP ILIPAEYVER MGINNDTELS
KQIFRVDKNL CLRPMLAPTL YNYLRKLDRI LPDPIKIFEV GPCYRKESDG
KEHLEEFTMV NFCQMGSGCT RENLESLIKE FLDYLEIDFE IVGDSCMVYG
DTLDIMHGDL ELSSAVVGPV PLDREWGIDK PWIGAGFGLE RLLKVMHGFK
NIKRASRSES YYNGISTNL.

によりコードされる）として用いて、なされる。

【００９０】

所望であれば、当業者は、用いられるべきシクロプロペンアミノ酸について最適化するために、ＭｂＰｙｌＲＳ　ｔＲＮＡシンセターゼタンパク質を変異させることにより、それを適合し得る。（もしあれば）変異の必要性は、用いられるシクロプロペンアミノ酸に依存する。ＭｂＰｙｌＲＳ　ｔＲＮＡシンセターゼが、変異されることを必要とし得る場合の例は、シクロプロペンアミノ酸が、ＭｂＰｙｌＲＳ　ｔＲＮＡシンセターゼタンパク質により処理されないときである。

【００９１】

（所望であれば）かかる変異は、例えば、ＭｂＰｙｌＲＳ　ｔＲＮＡシンセターゼにおける次の位置：Ｍ２４１、Ａ２６７、Ｙ２７１、Ｌ２７４、及びＣ３１３の１つ又は２つ以上において、変異をＭｂＰｙｌＲＳ　ｔＲＮＡシンセターゼに導入することにより、行われ得る。

【００９２】

ｔＲＮＡシンセターゼ

本発明のｔＲＮＡシンセターゼは、変動され得る。特定のｔＲＮＡシンセターゼ配列は、実施例において用いられ得るが、本発明は、その実施例のみに制限されることを意図しない。

【００９３】

原則として、同一のｔＲＮＡ荷電（アミノアシル化）機能をもたらす、いかなるｔＲＮＡシンセターゼも、本発明において利用され得る。

【００９４】

例えば、ｔＲＮＡシンセターゼは、例えば、メタノサルシナ・バーケリＭＳ、メタノサルシナ・バーケリ・フサロ株（Methanosarcina barkeri str. Fusaro）、メタノサルシナ・マゼイＧ０１、メタノサルシナ・アセチボランス（Methanosarcina acetivorans）Ｃ２Ａ、メタノサルシナ・サーモフィラ（Methanosarcina thermophila）、又はメタノサルシナ・ブルトニー（Methanococcoides burtonii）由来の古細菌由来のような、いかなる適切な種由来であってもよい。或いは、ｔＲＮＡシンセターゼは、細菌、例えば、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス（Desulfitobacterium hafniense）ＤＣＢ－２、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＹ５１、デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＰＣＰ１、デスルホトマキュラム・アセトキシダンス（Desulfotomaculum acetoxidans）ＤＳＭ７７１由来であってもよい。

【００９５】

これらの生物由来の典型的な配列は、公的に入手可能な配列である。以下の例は、ピロリジンｔＲＮＡシンセターゼの典型的な配列として提供される。

＞メタノサルシナ・バーケリ（M.barker）ｉＭＳ／１～４１９／
メタノサルシナ・バーケリＭＳ
バージョンQ6WRH6.1　ＧＩ：７４５０１４１１

MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTA
RAFRHHKYRKTCKRCRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAP
KPLENSVSAKASTNTSRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISL
NMAKPFRELEPELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIP
AEYVERMGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLYNYLRKLDRILPGPIKIFEVGPC
YRKESDGKEHLEEFTMVNFCQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD
TLDIMHGDLELSSAVVGPVSLDREWGIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRS
ESYYNGISTNL

＞メタノサルシナ・バーケリＦ／１～４１９／
メタノサルシナ・バーケリ・フサロ株
バージョンYP_304395.1　ＧＩ：７３６６８３８０
MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHYEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTA
RAFRHHKYRKTCKRCRVSDEDINNFLTRSTEGKTSVKVKVVSAPKVKKAMPKSVSRAP
KPLENPVSAKASTDTSRSVPSPAKSTPNSPVPTSAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISL
NIAKPFRELESELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRDFLEIKSPILIPA
EYVERMGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLYNYLRKLDRILPDPIKIFEVGPCY
RKESDGKEHLEEFTMVNFCQMGSGCTRENLESLIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGDT
LDIMHGDLELSSAVVGPVPLDREWGIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRSE
SYYNGISTNL

＞メタノサルシナ・マゼイ（M.mazei）／１～４５４
メタノサルシナ・マゼイＧ０１
バージョンNP_633469.1　ＧＩ：２１２２７５４７
MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTAR
ALRHHKYRKTCKRCRVSDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARA
PKPLENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPI
TSMSAPVQASAPALTKSQTDRLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIY
AEERENYLGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSKQIFRVDKNF
CLRPMLAPNLYNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFTMLNFCQMGSG
CTRENLESIITDFLNHLGIDFKIVGDSCMVYGDTLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDREW
GIDKPWIGAGFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNGISTNL

＞メタノサルシナ・アセチボランス（M.acetivorans）／１～４４３
メタノサルシナ・アセチボランスＣ２Ａ
バージョンNP_615128.2　ＧＩ：１６１４８４９４４
MDKKPLDTLISATGLWMSRTGMIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGERLVVNNSRSSRTAR
ALRHHKYRKTCRHCRVSDEDINNFLTKTSEEKTTVKVKVVSAPRVRKAMPKSVARAP
KPLEATAQVPLSGSKPAPATPVSAPAQAPAPSTGSASATSASAQRMANSAAAPAAPVPT
SAPALTKGQLDRLEGLLSPKDEISLDSEKPFRELESELLSRRKKDLKRIYAEERENYLG
KLEREITKFFVDRGFLEIKSPILIPAEYVERMGINSDTELSKQVFRIDKNFCLRPMLAPN
LYNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFTMLNFCQMGSGCTRENLEAII
TEFLNHLGIDFEIIGDSCMVYGNTLDVMHDDLELSSAVVGPVPLDREWGIDKPWIGA
GFGLERLLKVMHGFKNIKRAARSESYYNGISTNL

＞メタノサルシナ・サーモフィラ（M.thermophila）／１～４７８

メタノサルシナ・サーモフィラ、バージョンDQ017250.1　ＧＩ：６７７７３３０８
MDKKPLNTLISATGLWMSRTGKLHKIRHHEVSKRKIYIEMECGERLVVNNSRSCRAA
RALRHHKYRKICKHCRVSDEDLNKFLTRTNEDKSNAKVTVVSAPKIRKVMPKSVART
PKPLENTAPVQTLPSESQPAPTTPISASTTAPASTSTTAPAPASTTAPAPASTTAPASAST
TISTSAMPASTSAQGTTKFNYISGGFPRPIPVQASAPALTKSQIDRLQGLLSPKDEISLDS
GTPFRKLESELLSRRRKDLKQIYAEEREHYLGKLEREITKFFVDRGFLEIKSPILIPMEYI
ERMGIDNDKELSKQIFRVDNNFCLRPMLAPNLYNYLRKLNRALPDPIKIFEIGPCYRK
ESDGKEHLEEFTMLNFCQMGSGCTRENLEAIIKDFLDYLGIDFEIVGDSCMVYGDTLD
VMHGDLELSSAVVGPVPMDRDWGINKPWIGAGFGLERLLKVMHNFKNIKRASRSES
YYNGISTNL

＞メタノサルシナ・ブルトニー（M.burtonii）／１～４１６
メタノサルシナ・ブルトニーＤＳＭ６２４２、バージョンYP_566710.1　ＧＩ：９１７７４０１８
MEKQLLDVLVELNGVWLSRSGLLHGIRNFEITTKHIHIETDCGARFTVRNSRSSRSAR
SLRHNKYRKPCKRCRPADEQIDRFVKKTFKEKRQTVSVFSSPKKHVPKKPKVAVIKSFS
ISTPSPKEASVSNSIPTPSISVVKDEVKVPEVKYTPSQIERLKTLMSPDDKIPIQDELPEF
KVLEKELIQRRRDDLKKMYEEDREDRLGKLERDITEFFVDRGFLEIKSPIMIPFEYIER
MGIDKDDHLNKQIFRVDESMCLRPMLAPCLYNYLRKLDKVLPDPIRIFEIGPCYRKES
DGSSHLEEFTMVNFCQMGSGCTRENMEALIDEFLEHLGIEYEIEADNCMVYGDTIDI
MHGDLELSSAVVGPIPLDREWGVNKPWMGAGFGLERLLKVRHNYTNIRRASRSELYY
NGINTNL

＞デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス（D.hafniense）＿ＤＣＢ－２／１～２７９
デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＤＣＢ－２
バージョンYP_002461289.1　ＧＩ：２１９６７０８５４
MSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLEMGFSDALSRDRAFQGIEHQLMSQGKRHLEQLR
TVKHRPALLELEEGLAKALHQQGFVQVVTPTIITKSALAKMTIGEDHPLFSQVFWLDG
KKCLRPMLAPNLYTLWRELERLWDKPIRIFEIGTCYRKESQGAQHLNEFTMLNLTEL
GTPLEERHQRLEDMARWVLEAAGIREFELVTESSVVYGDTVDVMKGDLELASGAMG
PHFLDEKWEIVDPWVGLGFGLERLLMIREGTQHVQSMARSLSYLDGVRLNIN

＞デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス＿Ｙ５１／１～３１２
デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＹ５１
バージョンYP_521192.1　ＧＩ：８９８９７７０５
MDRIDHTDSKFVQAGETPVLPATFMFLTRRDPPLSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLE
MGFSDALSRDRAFQGIEHQLMSQGKRHLEQLRTVKHRPALLELEEGLAKALHQQGF
VQVVTPTIITKSALAKMTIGEDHPLFSQVFWLDGKKCLRPMLAPNLYTLWRELERLW
DKPIRIFEIGTCYRKESQGAQHLNEFTMLNLTELGTPLEERHQRLEDMARWVLEAAGI
REFELVTESSVVYGDTVDVMKGDLELASGAMGPHFLDEKWEIVDPWVGLGFGLERLL
MIREGTQHVQSMARSLSYLDGVRLNIN

＞デスルフィトバクテリウム・ハフニエンスＰＣＰ１／１～２８８
デスルフィトバクテリウム・ハフニエンス
バージョンAY692340.1　ＧＩ：５３７７１７７２

MFLTRRDPPLSSFWTKVQYQRLKELNASGEQLEMGFSDALSRDRAFQGIEHQLMSQG
KRHLEQLRTVKHRPALLELEEKLAKALHQQGFVQVVTPTIITKSALAKMTIGEDHPLF
SQVFWLDGKKCLRPMLAPNLYTLWRELERLWDKPIRIFEIGTCYRKESQGAQHLNEF
TMLNLTELGTPLEERHQRLEDMARWVLEAAGIREFELVTESSVVYGDTVDVMKGDLE
LASGAMGPHFLDEKWEIFDPWVGLGFGLERLLMIREGTQHVQSMARSLSYLDGVRL
NIN

＞デスルホトマキュラム・アセトキシダンス（D.acetoxidans）／１～２７７
デスルホトマキュラム・アセトキシダンスＤＳＭ７７１
バージョンYP_003189614.1　ＧＩ：２５８５１３３９２
MSFLWTVSQQKRLSELNASEEEKNMSFSSTSDREAAYKRVEMRLINESKQRLNKLRH
ETRPAICALENRLAAALRGAGFVQVATPVILSKKLLGKMTITDEHALFSQVFWIEENKC
LRPMLAPNLYYILKDLLRLWEKPVRIFEIGSCFRKESQGSNHLNEFTMLNLVEWGLPE
EQRQKRISELAKLVMDETGIDEYHLEHAESVVYGETVDVMHRDIELGSGALGPHFLD
GRWGVVGPWVGIGFGLERLLMVEQGGQNVRSMGKSLTYLDGVRLNI

【００９６】
特定のｔＲＮＡ荷電（アミノアシル化）機能は、ｔＲＮＡシンセターゼを変異導入することによりもたらされる場合、別の野生型ｔＲＮＡ配列、例えば、上記から選択されるものを単純に用いることは適当ではない場合がある。このシナリオにおいて、同一のｔＲＮＡ荷電（アミノアシル化）機能を保存することは重要である。これは、典型的なｔＲＮＡシンセターゼにおける変異を、上記から選択されるもののような、代替のｔＲＮＡシンセターゼ骨格に移すことにより、成し遂げられる。
【００９７】
この方法において、選択された変異を、典型的なメタノサルシナ・バーケリ及び／又はメタノサルシナ・マゼイ配列を超えた他の生物由来の対応するｐｙｌＳ配列のような対応するｔＲＮＡシンセターゼ配列に移すことは可能であるべきである。
【００９８】
標的ｔＲＮＡシンセターゼタンパク質／骨格は、典型的なメタノサルシナ・バーケリ及び／又はメタノサルシナ・マゼイ配列のような公知のｔＲＮＡシンセターゼへのアライメントにより選択され得る。
【００９９】
この対象は、ｐｙｌＳ（ピロリジンｔＲＮＡシンセターゼ）配列への参照により、ここで説明されるが、原理は、所望の特定のｔＲＮＡシンセターゼと同等に適用する。
【０１００】
例えば、全てのＰｙｌＳ配列のアライメントが調製されてもよい。これらは、低い全体的％配列同一性を有し得る。したがって、用いられている配列が実際にｔＲＮＡシンセターゼであることを確かにするために（単純に低い配列同一性スコアを用いるのではなく）、配列を公知のｔＲＮＡシンセターゼに整列させることによるような、配列を研究することが重要である。
【０１０１】
したがって、適切には、配列同一性が考慮されているとき、適切には、それは、上のようなｔＲＮＡシンセターゼの例の配列に渡り考慮される。適切には、％同一性は、上の配列のアライメントから定義されるとおりであってもよい。
【０１０２】
触媒領域に焦点をあてることが有用であり得る。この目的は、高い％同一性が、同一のｔＲＮＡ荷電（アミノアシル化）機能、例えば、新規又は非天然アミノ酸認識を作出するために、移植された変異を許容するのに適切な骨格スキャフォールドを捕獲する／同定するよう定義され得る、ｔＲＮＡ触媒領域をもたらすことである。

【０１０３】
したがって、適切には、配列同一性が考慮されているとき、適切には、それは、触媒領域に渡り考慮される。適切には、％同一性は、触媒領域から定義されてもよい。
【０１０４】
代替のｔＲＮＡシンセターゼ骨格上に変異を「移すこと」又は「移植すること」は、ｔＲＮＡシンセターゼ骨格をコードするヌクレオチド配列の部位指向性変異誘発により成し遂げられ得る。この技術は、当該技術分野において周知である。本質的に、骨格ｐｙｌＳ配列が、（例えば、上で考察された活性部位アライメントを用いて）選択され、選択された変異は、対応する／相同な位置に移される（すなわち、そこで製造される）。
【０１０５】
特定のアミノ酸残基が、数値アドレスを用いて言及されるとき、別段明らかでない限り、ナンバリングは、ＭｂＰｙｌＲＳ（メタノサルシナ・バーケリピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ）アミノ酸配列を、参照配列（すなわち、公的に入手可能な野生型メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＳ遺伝子受託番号Ｑ４６Ｅ７７）：

MDKKPLDVLI SATGLWMSRT GTLHKIKHYE VSRSKIYIEM ACGDHLVVNN
SRSCRTARAF RHHKYRKTCK RCRVSDEDIN NFLTRSTEGK TSVKVKVVSA
PKVKKAMPKS VSRAPKPLEN PVSAKASTDT SRSVPSPAKS TPNSPVPTSA
PAPSLTRSQL DRVEALLSPE DKISLNIAKP FRELESELVT RRKNDFQRLY
TNDREDYLGK LERDITKFFV DRDFLEIKSP ILIPAEYVER MGINNDTELS
KQIFRVDKNL CLRPMLAPTL YNYLRKLDRI LPDPIKIFEV GPCYRKESDG
KEHLEEFTMV NFCQMGSGCT RENLESLIKE FLDYLEIDFE IVGDSCMVYG
DTLDIMHGDL ELSSAVVGPV PLDREWGIDK PWIGAGFGLE RLLKVMHGFK
NIKRASRSES YYNGISTNL

によりコードされる）として用いて、なされる。
【０１０６】
これは、所望の残基を位置付けるために、当該技術分野において十分に理解されるとおり、用いられることである。これは、必ずしも厳密な計数演算とは限らない－注意は、状況又はアライメントに払われなければならない。例えば、所望のタンパク質が、若干異なる長さのものであるなら、（例えば）Ｌ２６６に対応するその配列中の正しい残基の位置は、所望の配列の２６６番の残基を単純に取るのではなく、整列されるべき配列、及び厳選された同等又は対応する残基を要求し得る。これは、熟練の読者の十分範囲内である。
【０１０７】
本明細書において用いられる変異の表示法は、当該技術分野における標準的なものである。例えば、Ｌ２６６Ｍは、野生型配列の２６６位におけるＬに対応するアミノ酸が、Ｍで置き換えられることを意味する。
【０１０８】
代替のｔＲＮＡ骨格間の変異の移植は、典型的なメタノサルシナ・バーケリ及びメタノサルシナ・マゼイ配列を参照してここで説明されるが、同一の原理は、他の骨格への移植又は他の骨格からの移植に同等に適用する。
【０１０９】
例えば、Ｍｂ　ＡｃＫＲＳは、ＡｃＫの取り込みのために操作されたシンセターゼである。
親タンパク質／骨格：メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＳ
変異：Ｌ２６６Ｖ、Ｌ２７０Ｉ、Ｙ２７１Ｆ、Ｌ２７４Ａ、Ｃ３１７Ｆ
【０１１０】
Ｍｂ　ＰＣＫＲＳ：ＰＣＫの取り込みのために操作されたシンセターゼ
親タンパク質／骨格：メタノサルシナ・バーケリＰｙｌＳ
変異：Ｍ２４１Ｆ、Ａ２６７Ｓ、Ｙ２７１Ｃ、Ｌ２７４Ｍ

【０１１１】
同一の基質特異性を有するシンセターゼは、これらの変異を、メタノサルシナ・マゼイＰｙｌＳに移植することにより得ることができる。したがって、次のシンセターゼが、Ｍｂ骨格由来の変異のＭｍ　ｔＲＮＡ骨格への移植により生成され得る：
変異Ｌ３０１Ｖ、Ｌ３０５Ｉ、Ｙ３０６Ｆ、Ｌ３０９Ａ、Ｃ３４８Ｆをメタノサルシナ・マゼイＰｙｌＳに導入するＭｍ　ＡｃＫＲＳ、
及び
変異Ｍ２７６Ｆ、Ａ３０２Ｓ、Ｙ３０６Ｃ、Ｌ３０９Ｍをメタノサルシナ・マゼイＰｙｌＳに導入するＭｍ　ＰＣＫＲＳ。
【０１１２】
これらの典型的な移植された変異シンセターゼの全長配列は、以下で与えられる。

>Mb_PylS/1-419
MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTA
RAFRHHKYRKTCKRCRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAP
KPLENSVSAKASTNTSRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISL
NMAKPFRELEPELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIP
AEYVERMGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLAPTLYNYLRKLDRILPGPIKIFEVGPC
YRKESDGKEHLEEFTMVNFCQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD
TLDIMHGDLELSSAVVGPVSLDREWGIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRS
ESYYNGISTNL

>Mb_AcKRS/1-419
MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTA
RAFRHHKYRKTCKRCRVSGEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAP
KPLENSVSAKASTNTSRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISL
NMAKPFRELEPELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIP
AEYVERMGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMVAPTIFNYARKLDRILPGPIKIFEVGPC
YRKESDGKEHLEEFTMVNFFQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD
TLDIMHGDLELSSAVVGPVSLDREWGIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRS
ESYYNGISTNL

>Mb_PCKRS/1-419
MDKKPLDVLISATGLWMSRTGTLHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSCRTA
RAFRHHKYRKTCKRCRVSDEDINNFLTRSTESKNSVKVRVVSAPKVKKAMPKSVSRAP
KPLENSVSAKASTNTSRSVPSPAKSTPNSSVPASAPAPSLTRSQLDRVEALLSPEDKISL
NMAKPFRELEPELVTRRKNDFQRLYTNDREDYLGKLERDITKFFVDRGFLEIKSPILIP
AEYVERFGINNDTELSKQIFRVDKNLCLRPMLSPTLCNYMRKLDRILPGPIKIFEVGPC
YRKESDGKEHLEEFTMVNFCQMGSGCTRENLEALIKEFLDYLEIDFEIVGDSCMVYGD
TLDIMHGDLELSSAVVGPVSLDREWGIDKPWIGAGFGLERLLKVMHGFKNIKRASRS
ESYYNGISTNL

>Mm_PylS/1-454
MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTAR
ALRHHKYRKTCKRCRVSDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARA
PKPLENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPI
TSMSAPVQASAPALTKSQTDRLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIY
AEERENYLGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSKQIFRVDKNF
CLRPMLAPNLYNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFTMLNFCQMGSG
CTRENLESIITDFLNHLGIDFKIVGDSCMVYGDTLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDREW
GIDKPWIGAGFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNGISTNL

>Mm_AcKRS/1-454
MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTAR
ALRHHKYRKTCKRCRVSDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARA
PKPLENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPI
TSMSAPVQASAPALTKSQTDRLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIY
AEERENYLGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSKQIFRVDKNF
CLRPMVAPNIFNYARKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFTMLNFFQMGSG
CTRENLESIITDFLNHLGIDFKIVGDSCMVYGDTLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDREW
GIDKPWIGAGFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNGISTNL

>Mm_PCKRS/1-454
MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMACGDHLVVNNSRSSRTAR
ALRHHKYRKTCKRCRVSDEDLNKFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARA
PKPLENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTGATASALVKGNTNPI
TSMSAPVQASAPALTKSQTDRLEVLLNPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQQIY
AEERENYLGKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERFGIDNDTELSKQIFRVDKNFC
LRPMLSPNLCNYMRKLDRALPDPIKIFEIGPCYRKESDGKEHLEEFTMLNFCQMGSGC
TRENLESIITDFLNHLGIDFKIVGDSCMVYGDTLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDREWGI
DKPWIGAGFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNGISTNL

【０１１３】
同一の原理は、他の変異、及び／又は他の骨格に同等に適用する。
【０１１４】
この方法で生産された、移植されたポリペプチドは、所望の機能／基質特異性が保存されていることを確かにするために有利に試験されるべきである。
【０１１５】
上述の方法のための所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、組換え複製可能なベクターに取り込まれ得る。ベクターを用いて、適合宿主細胞において核酸が複製されてもよい。したがって、さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを複製可能なベクターに導入すること、ベクターを適合宿主細胞に導入すること、及びベクターの複製をもたらす条件下で宿主細胞を増殖させることにより、本発明のポリヌクレオチドを製造する方法を提供する。ベクターは、宿主細胞から回収され得る。適切な宿主細胞は、大腸菌のような細菌を含む。
【０１１６】
好ましくは、ベクター中の本発明のポリヌクレオチドは、宿主細胞によるコード配列の発現をもたらすことが可能である、制御配列に作動可能に連結され、すなわち、ベクターは発現ベクターである。用語「作動可能に連結された」は、記載される成分が、それらが、それらの意図される方法で機能することを可能にする関係にあることを意味する。コード配列に「作動可能に連結された」調節配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合す

る条件下で達成される方法で、ライゲーションされる。

【０１１７】

本発明のベクターは、記載される適切な宿主細胞に形質転換又はトランスフェクトされて、本発明のタンパク質の発現がもたらされ得る。この方法は、上述の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、タンパク質をコードするコード配列のベクターによる発現をもたらす条件下で培養すること、及び場合により発現されたタンパク質を回収することを含み得る。

【０１１８】

ベクターは、例えば、複製起源、場合により前記ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、及び場合によりプロモーターの調節因子と共に提供される、プラスミド、又はウイルスベクターであってもよい。ベクターは、１種又は２種以上の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、細菌プラスミドの場合、アンピシリン耐性遺伝子を含有してもよい。ベクターを用いて、例えば、宿主細胞がトランスフェクト、又は形質転換され得る。

【０１１９】

本発明のタンパク質をコードする配列に作動可能に連結した制御配列は、プロモーター／エンハンサー、及び他の発現調節シグナルを含む。これらの制御配列は、発現ベクターが用いられるよう設計される、宿主細胞と適合するよう選択され得る。用語、プロモーターは、当該技術分野において周知であり、サイズ及び複雑さにおいて、最小のプロモーターから上流エレメント及びエンハンサーを含むプロモーターまで渡る、核酸領域を包含する。

【０１２０】

本発明の別の態様は、適切には、真核生物細胞において、アミノ酸を含有するシクロプロペンを選択のタンパク質に遺伝学的及び部位特異的に取り込む、インビトロでの方法のような、方法である。前記方法により遺伝学的に取り込むことの１つの利点は、この実施形態ではシクロプロペンアミノ酸を含むタンパク質は標的細胞中で直接合成されるため、シクロプロペンアミノ酸を含むタンパク質が形成されたらそれを細胞に送達する必要性が回避されることである。方法は、次の

ｉ）特定のコドンを、タンパク質をコードするヌクレオチド配列中の所望の部位においてアンバーコドンのような直交性コドンで導入するか、又は置き換えるステップ、

ii）ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対のような、細胞における直交性ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対の発現系を導入するステップ、

iii）本発明による、アミノ酸を含有するシクロプロペンを含む培地中で細胞を増殖させるステップ

を含む。

【０１２１】

ステップ（ｉ）は、タンパク質の遺伝子配列中の所望の部位においてアンバーコドンのような直交性コドンで特定のコドンを置き換えることを必要とする。これは、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、プラスミドのような、構築物を単純に導入することにより達成することができ、ここで、アミノ酸を含有するシクロプロペンが、導入される／置き換えられるよう所望される部位が変更されて、アンバーコドンのような直交性コドンが含まれる。これは、当業者の能力の十分範囲内であり、そのような例は、本明細書において以下で与えられる。

【０１２２】

ステップ（ii）は、所望の位置（例えば、アンバーコドン）においてアミノ酸を含有するシクロプロペンを特異的に取り込むための直交性発現系を要求する。したがって、前記ｔＲＮＡを、アミノ酸を含有するシクロプロペンで荷電する能力を共に有する、直交性ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼのような特定の直交性ｔＲＮＡシンセターゼ、及び特定の対応する直交性ｔＲＮＡ対が要求される。これらの例は、本明細書に示される。

【０１２３】

タンパク質発現及び精製

本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を用いて、本発明のタンパク質が発現され得る。宿主細胞は、本発明のタンパク質の発現を可能にする適切な条件下で培養され得る。本発明のタンパク質の発現は、それらが継続して生産されるように恒常的であるか、又は誘導可能な、発現を開始するための刺激を要求するものであり得る。誘導可能な発現の場合、タンパク質生産は、例えば、インデューサー物質、例えば、デキサメタゾン又はＩＰＴＧの培養培地への添加により要求されるとき、開始され得る。

【０１２４】

本発明のタンパク質は、酵素的溶解、化学的溶解、及び／又は浸透圧溶解、並びに物理的破壊を含む、様々な当該技術分野で公知の技術により、宿主細胞から抽出され得る。

【０１２５】

本発明のタンパク質は、分取クロマトグラフィー、親和性精製、又は任意の他の適切な技術のような、当該技術分野において公知の標準的技術により精製され得る。

【０１２６】

さらなる利点

Yu et alは、テトラゾールをポリペプチド中のシクロプロペンアミノ酸に結合させる。Yu et alは、それらのコンジュゲーション基を光活性化するために、紫外線照射の使用を要求する。それらの最適な反応速度は、３０２ナノメーターのＵＶ照射で達成された。しかしながら、この種のＵＶ照射は、高いイオン化能を有する。これは、照射が向けられる、分子及び／又は細胞が、このＵＶエネルギーにより損傷される可能性が高いことを意味する。対照的に、本発明のコンジュゲーションは、光活性化のためいかなるＵＶステップも要求しない。Yu et alが、ＵＶ照射のより少ない損傷供給源（例えば、３６５ナノメーターのＵＶ照射）を用いるときでさえ、観察される反応速度は、本発明により提供されるものより、かなり遅い。したがって、たとえＵＶ照射が、ＵＶ処理に関連する欠点のいくつかを回避するか、又は低減しようとする試みにおいて、Yu et alにおいて調節されたとしても、同一の面倒な照射ステップは、依然行われなければならず、より遅い反応速度が達成される。ＵＶ照射が省かれ得ること、及び光活性化なしでも、優れた反応速度が得られることは、本発明の利点である。

【０１２７】

製造することが容易であることは、本発明のシクロプロペンアミノ酸の利点である。例えば、合成経路における番号のステップは、有利にはほとんどない。

【０１２８】

Yu et alの先行技術のシクロプロペンアミノ酸が、アミド基を含有することを、留意するべきである。このアミド結合は、ペプチダーゼの可能性のある基質である。先行技術のシクロプロペンアミノ酸のアミド結合上でのペプチダーゼ作用は、分子のシクロプロペン部分をポリペプチドから切断する。これは、明らかに不利である。対照的に、カルバメートが連結されたシクロプロペンがペプチダーゼの標的でないことは、本発明のカルバメート結合シクロプロペン基の利点である。

【０１２９】

先行技術に基づく技術は、コンジュゲーションのためのテトラゾール化学に頼る。対照的に、本発明は、有利なテトラジン化学の使用を教示する。

【０１３０】

野生型ＰｙｌＲＳシンセターゼの使用を可能にすることは、本発明のカルバメート結合シクロプロペンアミノ酸の利点である。野生型シンセターゼを用いることは、それが、変異体シンセターゼを調製するための必要性を軽減することにより、あまり面倒を含まないので、利点である。加えて、変異体シンセターゼが、野生型ｔＲＮＡシンセターゼと同一レベルまでｔＲＮＡを必ずしもアミノアシル化するとは限らない。言い換えると、先行技術のシクロプロペンアミド結合したアミノ酸を扱うために、シンセターゼを製造するために必要とされる変異は、アミノアシル化の効率の喪失を生じ得る。対照的に、本発明のアミノ酸での野生型シンセターゼを用いたアミノアシル化は、非常に効率的な方法であることが本明細書で示され、それは、先行技術の技術を超えたさらなる利点である。

【０１３１】
さらなる特定の好ましい態様は、添付の独立項及び従属項において説明される。従属項の特性は、必要に応じて、独立項の特性と組み合わされ、特許請求の範囲において明確に説明されるもの以外の組合せであってもよい。
【０１３２】
装置の特性が、機能をもたらすように作動可能であるとして記載される場合、これは、その機能をもたらすか、又はその機能をもたらすよう適合されるか、若しくは構成される、装置の特性を含むことと認識される。
【図面の簡単な説明】
【０１３３】
ここで、添付の図面を参照しながら本発明の実施形態をさらに説明する。
【図１】ＳＯＲＴ－Ｍは、遺伝学的に標的にされた細胞及び組織において、多様なコドンにおける多様な化学でのプロテオームタグ付け及び標識を可能にすることを示す図である。（ａ）翻訳の確率直交性再コード化（ＳＯＲＴ，stochastic orthogonal recoding of translation）を介したプロテオームタグ付けは、直交性アミノアシル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対を用いる。ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対はこの研究において用いられる。このシンセターゼ（及びその既に考案された活性部位バリアント）は、広範な非天然アミノ酸（黄色の星、及び黄色の六角形）を認識し、アンチコドン同一性を問わず、内在性ｔＲＮＡをアミノアシル化しないが、その同族ｔＲＮＡを効率的にアミノアシル化し、ＰｙｌｔＲＮＡは、内在性アミノアシル－ｔＲＮＡシンセターゼの基質ではない。アンチコドンが変化された、直交性ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ$_{XXX}$対（ＸＸＸは、黄色の、アンチコドンの選択を示す）は、天然アミノ酸を指示するための天然シンセターゼ及びｔＲＮＡ（紺青色及びピンク色）により用いられたものに直交性である経路を介したセンスコドン（紺青色及びピンク色）のデコードについて競合する。ＳＯＲＴは、多様なコドンに応答した、多様な化学基のプロテオームへの取り込みを可能にする。直交性シンセターゼの活性部位における競合は存在しないので、飢餓及び最少培地は要求されない。加えて、直交性プロテオームタグ付けシステムの発現パターンは遺伝学的に指示され得、これは、組織特異的プロテオーム標識を可能にする。選択的圧取り込みアプローチは、ＳＯＲＴとの比較について補足図１において示される。（ｂ）ＳＯＲＴを介してプロテオームを横切ったアミノ酸をコードする組合せ（１～３）、並びに３のテトラジンプローブでの化学選択的修飾（４ａ～ｇ、５、６、及び７）は、翻訳の確率直交性再コード化及び化学選択的修飾（ＳＯＲＴ－Ｍ，stochastic orthogonal recoding of translation and chemoselective modification）を介した標識されたタンパク質の検出を可能とする。アミノ酸構造：Ｎ$^{\varepsilon}$－（（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン　１、Ｎ$^{\varepsilon}$－（１－プロピニルオキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン　２、及びＮ$^{\varepsilon}$－（（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン。
【図２】大腸菌において発現されたタンパク質への３の定量的部位特異的取り込み及びテトラジンプローブによるその迅速で定量的標識を示す図（補足図２）である。Ａ．ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対は、１５０位においてアンバー終止コドンを有するｓｆＧＦＰへの３の効率的な部位特異的取り込みを指示する。３の取り込みは、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対の十分に確立された優れた基質である１より効率的である。Ｂ．３を有するｓｆＧＦＰ　２ｎｍｏｌのテトラジンフルオロフォア　４ａ　１０当量での特異的及び定量的標識。ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対及びＳｆＧＦＰ１５０ＴＡＧを有する、１ｍＭの３と共に増殖させた大腸菌から精製されたｓｆＧＦＰ－３のＥＳＩ－ＭＳ分析は、３の取り込みを確かにした。ｓｆＧＦＰ１５０－３、予測質量：２７９５１．５Ｄａ、実測された質量：２７９５０±１．０Ｄａ、Ｎ末端のメチオニンの損失に対応する最小ピーク２７８２０。ｓｆＧＦＰ１５０－３の４ａでの標識は、標識反応であるＥＳＩ－ＭＳにより判断されるとおり、定量的である。予測質量：２８７５８．４Ｄａ、実測された質量：２８７５８±１．０Ｄａ、Ｎ末端のメチオニンの損失に対応する最小ピーク２８６２７。Ｃ．４ａ

１０当量での、ｓｆＧＦＰ－３（１０．６μＭ、１５０位において３を取り込むｓｆＧＦＰ）の標識についての速度定数の決定。精製されたｓｆＧＦＰ－３（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４中１０．６μＭ）２ｎｍｏｌを、テトラジン色素複合体４ａ（ＤＭＳＯ中２ｍＭ溶液１０μｌ）２０ｎｍｏｌとインキュベートした。異なる時点において、アリコート８μＬを溶液から採取し、７００倍の過剰のＢＣＮでクエンチし、液体窒素に投入した。試料を、５％β－メルカプトエタノールを添加したNuPAGE LDS試料緩衝液と混合し、１０分間９０℃まで加熱し、４～１２％ＳＤＳ　ｐａｇｅにより分析した。標識されたタンパク質の量は、蛍光バンドをTyphoon Trio phosphoimager（GE Life Sciences社）でスキャンすることにより定量した。バンドは、ラバーバンドバックグラウンド減算を用いたImageQuant（商標）TLソフトウェア（GE Life Sciences社）で定量した。速度定数は、データを単一の指数方程式に適合させることにより決定した。計算した観察した速度ｋ’を、４ａの濃度で割り、反応についての速度定数ｋを得た。測定を三連で行った。全てのデータ処理は、Kaleidagraphソフトウェア（Synergy Software社、Reading、ＵＫ）を用いて行った。Ｎε－５－ノルボルネン－２－イルオキシカルボニル－Ｌ－リジン（ＮｏｒＫ）を有するｓｆＧＦＰ標識の速度の比較のため、ＰｙｌＲＳの公知の基質を、１５０位においてＮｏｒＫを有する、１１．２５μＭ　ｓｆＧＦＰ、及び４ａ　２０当量を用いた同様の方法で決定した。

【図３】補足表１－プライマーを示す図である。

【図４】ＳＯＲＴ－Ｍが、大腸菌においてコドン特異的プロテオームタグ付け及び標識を可能にすることを示す図（補足図３）である。Ａ．示されたＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＸＸＸ}$対を介した３でのプロテオーム標識。細胞は、２つのプラスミド、一方はＭｂＰｙｌＲＳをコードし、他方はＴ４リゾチーム及び示されたｔＲＮＡ$_{ＸＸＸ}$をコードする、を含有した。細胞は、０．１ｍＭ　３の存在下でＯＤ$_{６００}$＝０．２から増殖させ、Ｔ４リゾチーム発現は、０．２ｍＭアラビノースの添加により、１時間後に誘導した。さらに３時間後、細胞を採取した。溶解物中のタグ付けされたタンパク質は、取り込まれた３とテトラジンフルオロフォア４ａ（２０ｍＭ、１時間、室温の間の逆電子要求型ディールス－アルダー反応）を介して検出した。括弧内のアミノ酸は、対応するアンチコドンを有する内在性ｔＲＮＡによりコードされる天然アミノ酸である。Ｂ．各コドンについてのレーンプロファイル分析

【図５】ＥＳＩ－ＭＳにより示されるＳＯＲＴにおける特異的アミノ酸置き換えを示す図（補足図４）である。　１ｍＭ　３の存在下、ＵＵＵ（Ｌｙｓ）でのＳＯＲＴ後単離されたＴ４リゾチーム。予測質量ＷＴ　Ｔ４リゾチーム：１９５１２．２Ｄａ、実測された質量：１９５１０±２．０Ｄａ。予測質量ＷＴ　Ｔ４リゾチーム、Ｌｙｓから３への単一変異：１９６２２．３Ｄａ、実測された質量：１９６２０±２．０Ｄａ。

【図６】ＳＯＲＴ－Ｍを介した３（０．１ｍＭ）の取り込みは細胞に毒性でないことを示す図（補足図５）である。　化学的コンピテントＤＨ１０Ｂ細胞は、２つのプラスミド、ＰｙｌＲＳの発現に必須のｐＢＫｗｔＰｙｌＲＳ、及びＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＸＸＸ}$の発現に要求され、アラビノース制御下でリゾチームを発現するpBAD_wtT4L_MbPyfT$_{XXX}$プラスミドで形質転換された。細胞は、ＬＢ－ＫＴ（５０μｇ／ｍｌカナマイシン及び２５μｇ／ｍｌテトラサイクリンを含むＬＢ培地）１０ｍｌへの等分に先立ち、ＳＯＢ培地１ｍｌにおいて１時間３７℃において回収し、一晩インキュベートした（３７℃、２５０ｒｐｍ、１２時間）。一晩培養物（ＯＤ$_{６００}$は３にほぼ等しい）は、異なる濃度、０、０．１、０．５ｍＭの３を添加されたＬＢ－ＫＴ$_{1/2}$（２５μｇ／ｍｌカナマイシン及び１２．５μｇ／ｍｌテトラサイクリンを含むＬＢ培地）１０ｍＬ中ＯＤ$_{６００}$約３まで希釈した。これらの培養物のアリコート２００μＬを、９６ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー、Infinite 200 Pro（TECAN社）を用いて、ＯＤ$_{６００}$を測定した。測定値間で直線的に１ｍｍ振盪しながら、各試料について１０分毎に、ＯＤ$_{６００}$を測定した。

【図７】ＡＡＡコドンに応答した、異なる濃度の３におけるＳＯＲＴ－Ｍを介したプロテオームでの３の取り込みの時間依存性バリエーションの測定を示す図（補足図６）である。　化学的コンピテントＤＨ１０Ｂ細胞は、２つのプラスミド、ＰｙｌＲＳの発現に必須

のpBKwtPylRS、及びＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＵＵＵ}$の発現に要求されるpBAD_wtT4L_MbPylT$_{UUU}$プラスミドで形質転換された。pBAD_wtT4L_MbPylT$_{UUU}$プラスミドはまた、アラビノースで誘導可能なプロモーターの下流にある、Ｔ４リゾチームの発現のための遺伝子も含有する。形質転換後、細胞を、ＬＢ－ＫＴ（５０μｇ／ｍｌカナマイシン及び２５μｇ／ｍｌテトラサイクリンを含むＬＢ培地）１０ｍｌにおけるインキュベーションに先立ち、ＳＯＢ培地１ｍｌにおいて１時間３７℃において回収した。培養物を、一晩（３７℃、２５０ｒｐｍ、１２時間）インキュベートし、続いて、異なる濃度、０、０．１、０．５ｍＭの３を添加されたＬＢ－ＫＴ$_{1/2}$（２５μｇ／ｍｌカナマイシン及び１２．５μｇ／ｍｌテトラサイクリンを含むＬＢ培地）３０ｍＬ中ＯＤ$_{６００}$約３まで希釈した。ＯＤ$_{６００}$がおよそ０．６に達したとき、培養物を、（３７℃、２５０ｒｐｍ）１時間インキュベートした。培養物アリコート２ｍｌを、３種の培養物のそれぞれについて別々のチューブにおいて回収した。これが前誘導培養物（ゲル画像において１と標識されたレーン）である。続いて、アラビノースを０．２％（ｖ／ｖ）の終濃度で添加して、Ｔ４リゾチームの発現を誘導し、培養物アリコート２ｍＬを１時間毎に回収した（誘導後１、２、及び３時間培養物回収に対応する、２、３、及び４と標識されたレーン）。回収された培養物のそれぞれについて、細菌細胞を、４℃における遠心分離によりペレット化し、氷冷ＰＢＳ（３×１ｍＬ）で洗浄し、続いて、ペレットを、凍結し、－２０℃において保存した。次に、ペレットを氷冷ＰＢＳ　２００μＬにおいて解凍し、超音波処理（９×１０秒間のオン／２０秒間のオフ、出力７０％）により溶解させた。溶解物を、１５，０００ＲＰＭ、４℃において３０分間遠心分離することにより、清澄化した。上清は、新しい１．５ｍＬチューブに移した。上清５０μＬは、標識反応のため新たなチューブに移し、残りは液体窒素中で凍結し、－８０℃において保存した。上清５０μＬに、２ｍＭの4a　０．５μＬを添加し、溶解物は２５℃において１時間インキュベートした。１時間後、４×（６ｍＭ　ＢＣＮ及び５％ＢＭＥ）添加ＬＤＳ試料緩衝液１７μＬを添加し、優しくボルテックスすることにより混合した。試料は、９０℃において１０分間沸騰させる前に、１０分間インキュベートした。試料は、４～１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、蛍光画像を、Typhoon Trio phosphoimager（GE Life Sciences社）を用いて取得した。

【図８】ヒト細胞における、多様なコドンにおける３のタンパク質への部位特異的取り込み及びＳＯＲＴ－Ｍを用いた特異的プロテオーム標識を示す図である。（ａ）ウエスタンブロット分析は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞においてＣ末端ＨＡタグを有するアンバー終止コドンにより分離されたｍＣｈｅｒｒｙ－ＥＧＦＰ融合タンパク質（ｍＣｈ－ＴＡＧ－ＥＧＦＰ－ＨＡ）の効率的なアミノ酸依存性発現を示す。抗ＦＬＡＧは、タグ付けされたＰｙｌＲＳを検出した。（ｂ）４ａ（ＰＢＳ　５０μＬ中２０μＭ、１時間、室温）でのｍＣｈ－ＴＡＧ－ＥＧＦＰ－ＨＡ（10^{6}細胞から免疫沈降された）の特異的標識は、ＨＥＫ２９３細胞において３のタンパク質への取り込みを確かにする。（ｃ）０．５ｍＭ　３を用いて６種の異なるＰｙｌＲＳ／ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＸＸＸ}$変異体により指示される、哺乳動物細胞の全プロテオームを横切って新たに合成されたタンパク質に統計的に取り込まれる、３のＳＯＲＴ－Ｍ標識。４ｇ（上のとおり、ＰＢＳ中２０μＭ、１時間、室温）での標識。括弧内のアミノ酸は、対応するアンチコドンを有する内在性ｔＲＮＡによりコードされる天然アミノ酸である。

【図９】Ａ．図８由来の全ブロット、Ｂ．図１０由来の全ブロットを示す図（補足図１１）である。

【図１０】キイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）において生産されるタンパク質へのアミノ酸３の部位特異的取り込みを示す図である。（ａ）２重のルシフェラーゼレポーターにより示される３の取り込み。１０ｍＭ　１若しくは１０ｍＭ　３の存在下又は非存在下でＴｒｉｐｌｅ－Ｒｅｐ－Ｌを発現する、１０匹のメスのハエ由来の卵巣抽出物における２重ルシフェラーゼアッセイ。データは、３種の生物学的複製物のうちの１種由来の代表的な例を示す。エラーバーは、単一の生物学的複製物由来の３種の技術的複製物の標準偏差を示す。（ｂ）ＰｙｌＲＳ／ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$を発現するハエにおけるＧＦＰ＿ＴＡＧ＿ｍＣｈｅｒｒｙ－ＨＡへの３（又は１）の部位特異的取り込み。非

天然アミノ酸取り込みから生じる全長タンパク質は、抗ＨＡウエスタンブロットにより検出される。（ｃ）テトラジンプローブでコードされる３の特異的標識。ハエに、アミノ酸、アミノ酸１（５００匹のハエ）又はアミノ酸３（１００匹のハエ）を与えなかった。５倍より多くのハエに、匹敵する量のレポータータンパク質を生成するために、１を与えた。非天然アミノ酸を含有する全長タンパク質は、溶解された卵巣から抗ＧＦＰビーズで免疫沈降した。ビーズを、標識（４ｇ、４μＭ、２００μＬ　ＰＢＳ、室温、２時間）し、洗浄した。全長タンパク質を、抗ＨＡブロットにより検出し、蛍光スキャナーにおいて画像化された同一のゲルは、３を取り込むが、１を取り込まない、タンパク質の特異的蛍光標識を示し、これは、取り込まれたアミノ酸の同一性を確かにする。

【図１１】遺伝学的にコードされる非天然アミノ酸１及び２における特異的タンパク質標識を示す図（実施例６）である。（ａ）カルモジュリンにおける、２ではない、遺伝学的にコードされる１は、プローブ３で特異的に標識される。クーマシー及び蛍光画像は、標識の特異性を示し、標識前のＥＳＩ　ＭＳ（黒色、予測質量：１７８７５、実測された質量：１７８７４）、及び標識後のＥＳＩ　ＭＳ（赤色、予測質量：１８５５３、実測された質量：１８５５２）は、反応が定量的であることを示す。（ｂ）カルモジュリンにおける、１ではない、遺伝学的にコードされる２は、プローブ４で特異的に標識される。クーマシー及び蛍光画像は、標識の特異性を示し、標識前のＥＳＩ　ＭＳ（黒色、予測質量：１７９３０、実測された質量：１７９３０）、及び標識後のＥＳＩ　ＭＳ（緑色、予測質量：１８４８４、実測された質量：１８４８５）は、反応が定量的であることを示す。未処理（逆重畳積分前）のＥＳＩ－ＭＳスペクトルは、示されない。

【図１２】カルモジュリンの１位及び４０位における１並びに２の取り込み、並びに特異的標識の動態学を示す図（実施例６）である。（ａ）発現は、ｒｉｂｏ－Ｑ１、Ｏ－ｇｓｔ－ｃａｍ$_{1TAG-40AGTA}$、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{UACU}$対、及びＭｊＰｒｐＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対を有する大腸菌において行われた。アミノ酸１及び２は、それぞれ、４及び１ｍＭにおいて用いられた。（ｂ）３及び４でのＣａＭ$1_{2_{40}}$の反応のための標識時間経過。各反応はゲル蛍光及び移動度シフトにより２時間続いた。

【図１３】３０分間におけるカルモジュリンの協調した、定量的ワンポット２重標識を示す図（実施例６）である。（ａ）ＣａＭ$1_{2_{40}}$の色素依存性標識、レーン４における第１の標識後精製での逐次的標識、レーン５における精製のない逐次的標識、レーン６におけるワンポット２重標識。（ｂ）標識前のワンポットタンパク質標識のＥＳＩ－ＭＳ（黒色、予測質量：１８０００、実測された質量：１８０００）、標識後のワンポットタンパク質標識のＥＳＩ－ＭＳ（金色、予測質量：１９２３３、実測された質量：１９２３４）。未処理（逆重畳積分前）のＥＳＩ－ＭＳスペクトルは、示されない。

【図１４】スキームＡを示す図である。

【図１５】ショウジョウバエＧＦＰ－ａｍｂｅｒ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＨＡのアミノ酸及びＤＮＡ配列を示す図（補足図１５）である。　ＧＦＰ（アミノ酸残基１～２３８）、２４８位のアンバーコドン、ｍＣｈｅｒｒｙ（アミノ酸残基２５５～４８９）、ＨＡタグ（アミノ酸残基４９１～４９９）、Ｍｙｃタグ（アミノ酸残基５００～５０９）、Ｈｉｓタグ（アミノ酸残基５１０～５１５）、及びＳＶ４０　ＮＬＳ（アミノ酸残基５２３～５２８）。

【図１６】例示的なアミノ酸Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－ｌ－リジンの構造を示す図である。

【０１３４】

［実施例］

実施形態の説明

本発明の例示的な実施形態が、添付の図面を参照して、本明細書において詳細に開示されているが、本発明が正確な実施形態に制限されないこと、並びに種々の変更及び修飾が、添付の特許請求の範囲及びそれらの均等物により定義される本発明の範囲から逸脱することなく、当業者によりここでもたらされ得ることが理解される。

【０１３５】

化学合成－一般的な方法

全ての化学物質及び溶媒を、Sigma-Alrich社、Alfa Aesar社、又はFisher Scientific社から購入し、別段述べられない限り、さらに精製することなく用いた。薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）による定性分析を、シリカでコーティングされたアルミニウムシート（Merck TLC 60F－254）上で行った。スポットを、短い波長の紫外線ランプ（２５４ｎｍ）下で可視化するか、又は塩基性、水性過マンガン酸カリウム、エタノール性ニンヒドリン、若しくはバニリンで染色した。フラッシュカラムクロマトグラフィーを、シリカゲル６０（メッシュ２３０～４００）上で特定の溶媒系で行った。ＬＣ－ＭＳ分析を、Agilent 1200機械上で行った。用いた溶媒は、水中０．２％ギ酸（緩衝液Ａ）、及びアセトニトリル中０．２％ギ酸（緩衝液Ｂ）からなった。ＬＣを、Phenomenex Jupiter C18カラム（１５０×２ｍｍ、５μｍ）を用いて行い、可変波長を用いてモニターした。保持時間（R_t）を、最短０．１分まで、及びｍ／ｚ比を最少０．０１質量単位まで記録した。小分子ＬＣ勾配のための次のプログラム：０～１分（Ａ：Ｂ　１０：９０～１０：９０、０．３ｍＬ／分）、１～８分（Ａ：Ｂ　１０：９０～９０：１０、０．３ｍＬ／分）、８～１０分（Ａ：Ｂ　９０：１０～９０：１０、０．３ｍＬ／分）、１０～１２（Ａ：Ｂ　９０：１０～１０：９０、０．３ｍＬ／分）を用いた。

【０１３６】

ＬＣ後に質量分析を、6130 Quadrupole分光計上ＥＳＩモードにおいて行い、陽イオン及び陰イオンモード両方で記録した。ＮＭＲ分析を、Bruker 400MHz機器にて行った。ＴＭＳと比較した全ての報告した化学シフト（δ）は、用いた重水素化溶媒において残りのプロトンに言及した：d_1－クロロホルム（^{1}Ｈδ＝７．２６ｐｐｍ、^{13}Ｃδ＝７７．１６ｐｐｍ）、d_6－ジメチルスルホキシド（^{1}Ｈδ＝２．４９ｐｐｍ、^{13}Ｃδ＝３９．５２ｐｐｍ）、D_2O（^{1}Ｈδ＝４．７０）。ＡＰＴ又は２次元実験（ＣＯＳＹ、ＨＳＱＣ）を常に行い、必要である分析に用いるためのさらなる情報を得た。結合定数をＨｚで与え、次のとおり記載する：一重項－ｓ、二重項－ｄ、三重項－ｔ、四重項－ｑ、広域一重項－ｂｒ、多重項－ｍ、二重項の二重項－ｄｄなど、及びそれらの組合せ。

【０１３７】

大腸菌における部位特異的に取り込まれた３のタンパク質発現、精製、及び標識

大腸菌エレクトロコンピテント大腸菌ＤＨ１０Ｂ細胞由来のｓｆＧＦＰ－３の発現及び精製を、ｐＢＫ－ＭｂＰｙｌＲＳ及びｐｓｆＧＦＰ１５０ＴＡＧ　ＰｙｌＴで同時形質転換した（Lang, K.; Davis, L.; Torres-Kolbus, J.; Chou, C.; Deiters, A.; Chin, J. W. Nat Chem, 2012, 4, 298、Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 10600）。形質転換した細胞を、Ｓ．Ｏ．Ｂ．（１ｍＬ、０．２％グルコースを添加）中、１時間、３７℃において回収し、５０μｇ／ｍＬカナマイシン及び２５μｇ／ｍＬテトラサイクリンを含有するＬＢ（ＬＢ－ＫＴ）に播種するために用いた。細胞を、一晩、３７℃、２５０ｒ．ｐ．ｍで振盪しながらインキュベートした。一晩培養物１ｍＬを用いて、ＬＢ－ＫＴ$_{1/2}$　１００ｍＬに播種し、次に、一日培養物をインキュベートした（３７℃、２５０ｒ．ｐ．ｍ）。$O.D._{600}$約０．３において、培養物を等しく分け、３（１ｍＭ）又はH_2O（５００μＬ）いずれかを添加し、さらにインキュベートした（３７℃、２５０ｒ．ｐ．ｍ）。$O.D._{600}$約０．６において、アラビノース（０．２％）の添加により、タンパク質発現を誘導し、４時間後、細胞を遠心分離（４０００ｒ．ｐ．ｍ、２０分）により採取し、さらに使用するまで、ペレットを凍結した。

【０１３８】

凍結した細菌ペレットを氷上で解凍し、溶解緩衝液（Bugbuster（登録商標）、Novagen（登録商標）社の５０μｇ／ｍＬ　ＤＮＡｓｅ１、Roche社の阻害剤カクテル、及び２０ｍＭイミダゾール）２．５ｍＬ中に再懸濁した。細胞をインキュベート（４℃、３０分）し、次に、遠心分離（１６０００ｇ、４℃、３０分）により清澄化した。清澄化した溶解物を新しいチューブに移し、Ni－NTAスラリー１００μＬを添加した。混合物を撹拌しながらインキュベート（４℃、１時間）し、次に、遠心分離（１０００ｇ、４℃、５分）に

より回収した。ビーズを洗浄緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ、４０ｍＭイミダゾール、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８）５００μＬ中に３回再懸濁し、遠心分離（１０００ｇ、４℃、５分）により回収した。最後に、ビーズを溶出緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ、３００ｍＭイミダゾール、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ８）１００μＬ中に再懸濁し、遠心分離（１０００ｇ、４℃、５分）によりペレット化し、上清を新しいチューブに回収した。溶出緩衝液１００μＬで溶出を３回繰り返した。精製したタンパク質を、４～１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及びＬＣ－ＭＳにより分析した。

【０１３９】

タンパク質質量分析

Agilent 1200LC－MSシステムを用いて、ＥＳＩ－ＭＳを、6130 Quadrupole分光計でさらに行った。溶媒系は、緩衝液ＡとしてのＨ$_2$Ｏ中０．１％ギ酸、及び緩衝液Ｂとしてのアセトニトリル中０．１％ギ酸（ＭｅＣＮ）からなった。タンパク質ＵＶ吸光度を、２１４及び２８０ｎｍにおいてモニターした。陽イオンモードでタンパク質ＭＳ取得を行い、MS Chemstationソフトウェア（Agilent Technologies社）内での逆重畳積分により、総タンパク質質量を計算した。

【０１４０】

精製したｓｆＧＦＰ１５０－３のインビトロ標識

ｓｆＧＦＰ１５０－１又はｓｆＧＦＰ１５０－３タンパク質（約３０μＭ、溶出緩衝液中）を精製するために、４ａ（１０モル当量、ＤＭＳＯ中２ｍＭストック溶液由来）を添加した。数回吸引することにより、反応物を混合し、次に、混合物を室温で２時間インキュベートし、試料をＥＳＩ－ＭＳにより分析した。インキュベーション後、タンパク質を４～１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分離させ、Typhoon Trio phosphoimager（GE Life Sciences社）を用いることにより分析した。

【０１４１】

ｓｆＧＦＰ１５０－３及びｓｆＧＦＰ１５０－ＮｏｒＫ標識の時間経過、及び速度定数決定

テトラジン色素複合体４ａ（ＤＭＳＯ中２ｍＭ溶液１０μｌ）２０ｎｍｏｌを添加することにより、ｓｆＧＦＰ－３（１０．６μＭ）２ｎｍｏｌを室温で標識し、数回吸引することにより、試料を混合した。異なる時点において、アリコート８μＬを溶液から採取し、７００倍過剰のビシクロ［６．１．０］ノナ－４－イン－９－イルメタノール（ＢＣＮ）でクエンチし、液体窒素に投入した。試料を、５％β－メルカプトエタノールを添加したNuPAGE LDS試料緩衝液と混合し、１０分間９０℃まで加熱し、４～１２％ＳＤＳ　ｐａｇｅにより分析した。標識したタンパク質の量を、蛍光バンドをTyphoon Trio phosphoimager（GE Life Sciences社）でスキャンすることにより、定量した。バンドを、ラバーバンドバックグラウンド減算を用いたImageQuant（商標）TLソフトウェア（GE Life Sciences社）で定量した。速度定数を、データを単一指数方程式に適合させることにより決定した。計算した観察した速度ｋ’を、４ａの濃度で割り、反応についての速度定数ｋを得た。測定を三連で行った。全てのデータ処理を、Kaleidagraphソフトウェア（Synergy Software社、Reading、ＵＫ）を用いて行った。Ｎε－５－ノルボルネン－２－イルオキシカルボニル－Ｌ－リジン（ＮｏｒＫ）を有するｓｆＧＦＰ標識の速度の比較のため、ＰｙｌＲＳの公知の基質を、１５０位においてＮｏｒＫを有する、１１．２５μＭ　ｓｆＧＦＰ（－ＮｏｒＫ）、及び４ａ　２０当量を用いた同様の方法で決定した。

【０１４２】

pBAD_wtT4L_MbPylT$_{XXX}$のためのプラスミド構築

pBAD_T4L83TAG_MbPylT$_{CUA}$を、NcoI及びKpnI制限酵素で消化した。同じ制限酵素を、（Ｄ６７）pBAD_wtT4L由来の野生型Ｔ４リゾチームを消化するためにも用いた。挿入物及び骨格を、３：１の比でＴ４　ＤＮＡリガーゼ（室温、２時間）を用いてライゲーションし、化学的コンピテントＤＨ１０Ｂ細胞に形質転換し、テトラサイクリン寒天プレート上で増殖させた（３７℃、１８時間）。単一のコロニーを採集し、正しい配列を、ＤＮＡ配列決定（GATC Gmbh.社）により確認し、このステップにより、pBAD_wtT4L_MbPylT$_{CUA}$を創出

した。全ての最終構築物をＤＮＡ配列決定により確認した。

【０１４３】

Ｔ４リゾチームを発現する大腸菌におけるＳＯＲＴを介した３のプロテオミクス取り込み

エレクトロコンピテント大腸菌ＤＨ１０Ｂ細胞（５０μＬ）を、pBAD_wtT4L_MbPylT$_{XXX}$プラスミド（２μＬ、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＸＸＸ}$の発現に必須であり、アラビノース制御下でＴ４リゾチームを発現する）及びpBKwtPylSプラスミド（２μＬ、ＰｙｌＲＳの発現に必須）で２重に形質転換、又はpBAD_wtT4L_MbPylT$_{XXX}$単独で１重に形質転換した。形質転換した細胞をＳ．Ｏ．Ｂ．（０．２％グルコースを添加した）１ｍＬ中、１時間、３７℃において回収した。回収物１００μＬを用いて、ＬＢ－ＫＴ（５０μｇ／ｍＬカナマイシン及び２５μｇ／ｍＬテトラサイクリン）５ｍＬ、又はＬＢ－Ｔ（２５μｇ／ｍＬテトラサイクリン）に播種した。培養物を一晩インキュベート（３７℃、２５０ｒ．ｐ．ｍ．）した。各一晩培養物１ｍＬを用いて、１／２強度の抗生物質を含有する培地ＬＢ－Ｔ又はＬＢ－ＫＴ１５ｍＬに播種した。Ｏ．Ｄ．$_{６００}$約０．３に到達するまで、培養物を３７℃でインキュベートし、この時点で、各培養物をアリコート５ｍＬに分け、３（終濃度０．１ｍＭ）又はＨ$_{２}$Ｏ（５０μＬ）のいずれかを添加した。次に、培養物をインキュベート（３７℃、２５０ｒ．ｐ．ｍ．）した。Ｏ．Ｄ．$_{６００}$　０．６において、アラビノース（終濃度０．２％）の添加により、Ｔ４リゾチーム発現を開始させ、培養物をさらに４時間インキュベートした。細胞を遠心分離（４０００ｒｐｍ、４℃、２０分）により採取し、次に、氷冷ＰＢＳ　１ｍＬにおいて３回再懸濁し、遠心分離（４０００ｒｐｍ、４℃、２０分）により回収した。最終の細菌ペレットを保存のため直ちに凍結した。

【０１４４】

大腸菌：テトラジン色素複合体を有する３でタグ付けした化学選択的標識プロテオーム

凍結した細菌ペレットを、ＰＢＳ　５００μＬに再懸濁し、バス超音波処理機（エネルギー出力７．０、総超音波処理時間９０秒、粉砕１０秒及び休憩２０秒、Misonix Sonicator 3000）を用いて溶解した。溶解物を遠心分離（４℃、１４０００ｒ．ｐ．ｍ．、３０分）により清澄化し、上清を新しいチューブに吸引した。清澄化した細胞溶解物５０μＬに、４ａ（２ｍＭ、ＤＭＳＯ中ストック、終濃度２０μＭ）を添加した。数回吸引することにより、反応物を混合し、次に、試料を暗所でインキュベート（室温、１時間）した。この時間の後、（６ｍＭ　ＢＣＮ及び５％ＢＭＥ）を添加した４×ＬＤＳ試料緩衝液１７μＬを添加し、優しくボルテックスすることにより、混合した。試料を１０分間インキュベートし、その後、９０℃において１０分間沸騰させた。試料を４～１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより分析し、Typhoon Trio phosphoimager（GE Life Sciences社）を用いて、蛍光画像を取得した。

【０１４５】

大腸菌タンパク質の蛍光標識の同一のプロトコールを、全てのテトラジン色素複合体に適用した。

【０１４６】

ＨＥＫ２９３細胞における３の部位特異的取り込み、及びテトラジンプローブでの化学選択的標識

ＨＥＫ細胞における３の部位特異的取り込み

ＨＥＫ２９３細胞（ATCC CRL－1573）を２４ウェルプレートに蒔き、ほぼ集密状態まで増殖させた。Lipofectamine 2000（Invitrogen社）を用いて、ｐＭｍＰｙｌＳ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＴＡＧ－ＥＧＦＰ－ＨＡ構築物及びｐ４ＣＭＶＥ－Ｕ６－ＰｙｌＴ構築物で、細胞をトランスフェクトした（Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816）。１ｍＭ　３あり、若しくはなしで、又は１ｍＭ　１ありでの１６時間増殖後、ＲＩＰＡ緩衝液（Sigma社）を用いて氷上で、細胞を溶解した。溶解物を遠心沈殿させ、上清を４×ＬＤＳ試料緩衝液（Life technologies社）に添加した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより、試料を流し出し、ニトロセルロース膜に移し、１次ラット抗ＨＡ抗体（クローン3F10、Roche社、番号１　８６７　４２３）、及びマウス抗ＦＬＡＧ抗体（クローンG191、Abnova社、カタログ番号ＭＡＢ８１８３）を用いてブロットし、２次抗体

は、抗ラット抗体（Invitrogen社、Ａ１１０７７）、及び抗マウス抗体（Cell Signaling Technologies社、番号７０７６Ｓ）であった。

【０１４７】

ＨＥＫ２９３細胞由来の部位特異的に取り込まれた３の標識

接着ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ATCC CRL－11268、１回の免疫沈降当たり４×１０^{6}）を、製造元のプロトコールに従い、TransIT－293トランスフェクション試薬を用いて、p4CMVE－U6－PylT７．５μｇ、及びpPylRS－mCherry－TAG－EFGP－HA７．５μｇ（Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816）でトランスフェクトし、示した場合、０．５ｍＭ　１又は２ｍＭ　３を添加した、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳにおいて４８時間培養した。細胞を、ＰＢＳで２回洗浄し、氷上において、３０分間、溶解緩衝液（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％Triton X－100、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣ１（ｐＨ８．０））１ｍＬ中で溶解した。遠心分離（１６０００ｇにおいて１０分間）により溶解物を清澄化させた後、ＨＡタグ付けされたタンパク質を、１回のトランフェクション当たりμMACS HA－tag MicroBeads（Milltenyl Biotec社）５０μＬを用いて捕獲し、ＲＩＰＡ（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％Igepal CA－630、０．５％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ＨＣ１（ｐＨ８．０））０．５ｍＬ、及びＰＢＳ（ｐＨ７．４）０．５ｍＬで洗浄した。MicroBeadsの懸濁液を、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）５０μＬ、２０μＭ　4aと１時間インキュベートし、続いて、ＲＩＰＡ　０．５ｍＬで洗浄して、過剰な色素を除去した。ＨＡタグ付けされたタンパク質を、ＳＤＳ試料緩衝液を用いて、ビーズから溶出させ、４～１２％Bis－Tris PAGEゲル（Invitrogen社）で分離させ、Typhoon imager（GE Healthcare社）を用いて画像化し、続いて、DirectBlueで染色するか、又は抗ＨＡタグpAb－HRP－DirecT（ＭＢＬ）でのウエスタンブロッティングのために移した。

【０１４８】

哺乳動物細胞由来のｓｆＧＦＰの発現及び精製

ＰＥＩを用いて、ＤＮＡ　１５μｇで、１０ｃｍの組織培養皿において、ＨＥＫ２９３Ｔをトランスフェクトし、３（０．５μＭ）と共に７２時間インキュベートした。細胞を、ＰＢＳで２回洗浄し、ＲＩＰＡ緩衝液１ｍＬにおいて溶解した。清澄化した溶解物を、GFP－Trap（登録商標）M（ChromoTek社）５０μＬに添加し、４時間インキュベートした。ＲＩＰＡ　１ｍＬ、ＰＢＳ　１ｍＬ、ＰＢＳ　１ｍＬ＋５００ｍＭ　ＮａＣＬ、ｄｄＨ$_{2}$Ｏ　１ｍＬで、ビーズを洗浄し、１％酢酸／ｄｄＨ$_{2}$Ｏにおいて溶出した。精製したタンパク質を、２μＭ　４ａで４時間標識し、４～１２％Bis－Tris PAGEゲル上に添加した。４ａで標識されたｓｆＧＦＰの蛍光を、Typhoon imagerで検出し、ゲルを、DirectBlueで続いて染色した。

【０１４９】

ハエプラスミド、遺伝子導入ハエ、及び培養

この研究における全てのハエ実験は無作為化も盲検も使用しなかった。

【０１５０】

遺伝子導入ハエ系統生成のためのプラスミド構築

QuikChange mutagenesisキット、及びpSG108（pJet 1.2－U6－PylT、S. Greissより贈呈）を鋳型として用いて、PyltRNA$_{CUA}$アンチコドンを変異させた。これは、ショウジョウバエU6－bプロモーターに融合させた、３’末端のＣＣＡを欠くPylT遺伝子を含有する。プライマーＦＭＴ１９及びＦＭＴ２０を用いて、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＴＧＣ}$を生成して、アラニンコドンをデコードし（pFT18を創出する）、プライマーＦＭＴ２３及びＦＭＴ２４を用いて、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＧＣＴ}$を生成して、セリンコドンをデコードし（pFT20を創出する）、プライマーＦＭＴ２７及びＦＭＴ２８を用いて、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＣＡＧ}$を生成して、ロイシンコドンをデコードし（pFT22を創出する）、プライマーＦＭＴ２９及びＦＭＴ３０を用いて、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＣＡＴ}$を生成して、メチオニンコドンをデコードした（pFT23を創出する）。変異させたｔＲＮＡ発現カセットを、EcoRI及びHinDIIIを用いて、pFT18、pFT20、pFT22、及びPFT23からpUC18にサブクローニングし、次に、AsiSI、BamHI、及

びBglIIを用いてマルチマー化して、２つのコピー、次に、４つのコピーのｔＲＮＡを創出した。４つのコピーのバージョンのｔＲＮＡカセットを、AsiSI及びMluIを用いてpSG118にサブクローニングし、pFT58（Ａｌａ）、pFT60（Ｓｅｒ）、pFT62（Ｌｅｕ）、及びpFT63（Ｍｅｔ）を創出した。pSG118は、メタノサルシナ・マゼイＰｙｌＲＳ遺伝子を含有する（Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518）。

【０１５１】

ハエ系統及び培養条件

ショウジョウバエ胚インジェクションサービス（BestGene Inc.社）を用いて、Ｐエレメント挿入により、遺伝子導入系統を創出した。次のプラスミド：pFT58（Ａｌａ）、pFT60（Ｓｅｒ）、pFT62（Ｌｅｕ）、及びpFT63（Ｍｅｔ）を用いて、系統を生成した。nos－Gal4－VP16（Bloomington 4937）、及びMS1096－Gal4（Bloomington 8860）を、ＧＡｌ４ドライバーとして用いた。全てのハエを、２５℃において、標準的イベリアン培地にて成長させた（grown）。乾燥酵母を、ｄＨ$_2$Ｏにおいて希釈した、適切な濃度のアミノ酸（通常、１０ｍＭ）と混合して、ペーストを製造することにより、非天然アミノ酸をハエに与えた。アミノ酸を含む、又は含まない酵母ペーストを添加したイベリアハエ食餌において、最短４８時間成長させたメスから、卵巣を調製した。プロテオーム標識実験のため、構築物ＦＴ５８、ＦＴ６０、ＦＴ６２、及びＦＴ６３の遺伝子導入オスのハエを、nos－vp16－GAL4処女バエと交配させて、それぞれ、FT58/nos－vp16－GAL4、FT60/nos－vp16－GAL4、FT62/nos－vp16－GAL4、及びFT63/nos－vp16－GAL4を生成した。

【０１５２】

キイロショウジョウバエにおける３の部位特異的取り込み

ルシフェラーゼアッセイ

３、１を与えた、又はアミノ酸を与えていない、ｎｏｓ－Ｇａｌ４－ＶＰ１６で組み換えられた、１０匹のメスの３重Ｒｅｐ－Ｌハエ由来の卵巣を、１×受動的溶解緩衝液１００μＬ中で解体し、従前に記載されたとおり、ルシフェラーゼアッセイのため処理した（Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518）。

【０１５３】

部位特異的に取り込まれた３の免疫沈降及び標識

１００匹（対照及び３について）、又は５００匹（１について）のメス由来の卵巣を、ＰＢＳ中で解体し、次に、１×完全プロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche社）を含有するRIPA緩衝液３００又は１５００μｌにおいて溶解した。試料を、総溶解対照として４×ＬＤＳ緩衝液に入れ、次に、残りを、製造元の指示に従い、GFP－TRAPアガロースビーズ（Chromotek社）での免疫沈降のため用いた。ＩＰの総体積は、３ｍｌであった。一晩インキュベーション後、ビーズを、RIPA緩衝液で２回、次に、ＰＢＳで２回洗浄した。テトラジン標識のため、ビーズを、ＰＢＳ　２００μｌ＋４μＭ　４ｇにおいて再懸濁し、２時間、ローラー上、室温でインキュベートした。ビーズを、洗浄緩衝液５００μＬで３回洗浄し、次に、４×ＬＤＳ試料緩衝液において再懸濁した。

【実施例１】

【０１５４】

Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－ｌ－リジン３の合成

タンパク質標識において有用な種類の反応は、歪んだアルケン（又はアルキン）とテトラジンの間の非常に迅速で特異的な逆電子要求型ディールス－アルダー反応である（Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2012, 134, 10317、Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiesler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. ChemBioChem 2012, 13, 2094、Schoch, J.; Staudt, M.; Samanta, A.; Wiessler, M.; Jaschke, A. Bioconjug Chem 2012, 23, 1382、Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 920、Bianco, A.; Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Pisa, R.; Davis, L.; Elsasser

, S. J.; Ernst, R. J.; Lang, K.; Sachdeva, A.; Chin, J. W. Under Review）。

【０１５５】

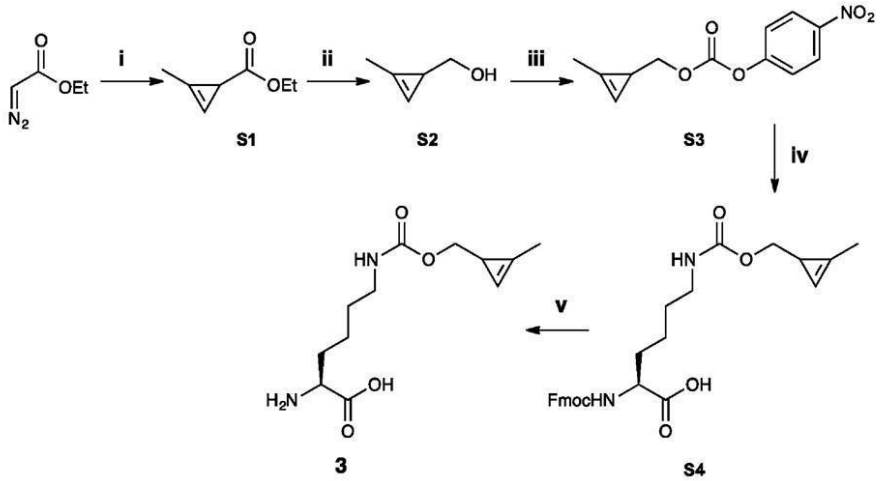
本発明者ら、及び他の者は、遺伝子コード拡張を介して、歪んだアルケン、アルキン、及びテトラジンを有する非天然アミノ酸を従前にコードし、逆電子要求型ディールス－アルダー反応を介した部位特異的タンパク質標識のためのそれらの使用を示した（Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 10600、Kamber, D. N.; Nazarova, L. A.: Liang, Y.; Lopez, S. A.; Patterson, D. M.; Shih, H. W.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. J Am Chem Soc 2013, 135, 13680、Wang, K.; Schmied, W. H.; Chin, J. W. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 2288、Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W. Nature biotechnology 2007, 25, 770、Rackham, O.; Chin, J. W. Nature chemical biology 2005, 7, 159）。一方、これまで用いられた全ての分子はやや巨大である。本発明者らは、リジンの様々なカルバメート誘導体が、ＰｙｌＲＳの良好な基質であることを従前に示し（Deiters, A.; Schultz, P. G. Bioorganic & amp; Medicinal Chemistry Letters 2005, 15, 1521）、１，３二置換シクロプロペンが、３，３二置換シクロプロペン（参考文献３２、Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 920）と異なり、テトラジンと効率的に反応することが示された（Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiesler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. ChemBioChem 2012, 13, 2094）。それ故、本発明者らは、タンパク質への取り込み及びテトラジンでの標識のための、１，３二置換シクロプロペン（Ｎ$^{\varepsilon}$－［（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル］－ｌ－リジン３、図１ｂ）を有する、リジンのカルバメート誘導体を設計し、合成した。

【０１５６】

Ｎ$^{\varepsilon}$－［（｛２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル｝メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン（３）の合成

【０１５７】

【化４】



【０１５８】

スキーム１．Ｎ$^{\varepsilon}$－［（｛２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル｝メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン３の合成。試薬及び条件：ｉ．$Rh_2(OAc)_4$、プロピン、CH_2Cl_2、４℃～室温、収率７５％、ii. DIBAL－H、CH_2Cl_2、０℃～室温、iii. ４－ニトロフェニルクロロホルメート、ヒューニッヒ塩基、CH_2Cl_2、室温、収率７３％、iv. Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨ、ヒューニッヒ塩基、ＴＨＦ／ＤＭＦ、４℃～室温、収率８２％、ｖ．ＮａＯＨ、ＴＨＦ／H_2O、室温、収率６８％。

【０１５９】

ｉ．エチル２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－カルボキシレートＳ１

１００ｍＬの２首丸底フラスコにCH_2Cl_2（２ｍＬ）及び酢酸ロジウム（４４２ｍｇ、１ｍｍｏｌ、０．０５当量）を充填し、ドライアイス冷却器を装着した。プロピン（約１０ｍＬ）を、酢酸ロジウム懸濁液に凝縮し、フラスコを水浴（２０℃）に下ろし、プロピンの一定の環流を達成した。ジアゾ酢酸エチル（２．１ｍＬ、２０ｍｍｏｌ、１当量）を、シリンジポンプを用いて、１時間かけて、撹拌プロピン溶液に滴下添加した。反応物を室温でさらに１０分間撹拌し、これにより、ＴＬＣ分析は、反応がこの時間の後完了したことを示した。次に、シクロプロペン産物を、ペンタン及びジエチルエーテル（９０：１０）で溶出する、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製した。これにより、所望の生成物Ｓ１を無色の揮発性液体として得た（１．９ｇ、収率７５％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析　δ_H（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）６．３５（１Ｈ，ｔ，Ｊ１．４）、４．１８～４．０９（２Ｈ，ｍ）、２．１６（３Ｈ，ｄ，Ｊ１．３）、２．１２（１Ｈ，ｄ，Ｊ１．６）、１．２６（３Ｈ，ｔ，Ｊ７．１）；ＬＲＭＳ　ｍ／ｚ（ES^+）１２７．２［Ｍ＋Ｈ］$^+$。

【０１６０】

これらの値は、文献｛Liao，2004 #1｝と良好に一致する。

【０１６１】

ii．及びiii．（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メチル（４－ニトロフェニル）カーボネートＳ３

DIBAL－Ｈ（CH_2Cl_2中１Ｍの溶液２２．５ｍＬ、２２．５ｍｍｏｌ、１．５当量）を、－１０℃において、CH_2Cl_2中のシクロプロペンエステルＳ１（１．９ｇ、１５ｍｍｏｌ、１当量）の撹拌溶液（１５ｍＬ）に滴下添加した。反応物を、－１０℃において２０分間撹拌した後、H_2O（１ｍＬ）、次に、ＮａＯＨ（H_2O中の１Ｍの溶液１ｍＬ）及びH_2O（２．３ｍＬ）を注意深く添加して、クエンチした。混合物をさらに2時間室温で撹拌し、その後、乾燥（Na_2SO_4）させ、濾過した。ヒューニッヒ塩基（３．９ｍＬ、２２．５ｍｍｏｌ、１．５当量）を濾液（粗シクロプロペンアルコールＳ２を含有する）に添加し、続いて、４－ニトロフェニルクロロホルメート（３．３ｇ、１６．５ｍｍｏｌ、１．１当量）を添加した。室温で１８時間撹拌後、有意な無色の沈殿物が形成され、ＴＬＣ分析は、粗シクロプロペンアルコールＳ２の完全な消費を示した。反応物をCH_2Cl_2で希釈し、次に、シリカゲル上に乾燥添加し、これにより、活性化されたカーボネートＳ３を、酢酸エチル及びヘキサン（２０：８０）で溶出する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。これにより、所望のシクロプロペンカーボネートＳ３を無色の油状物として得た（２．７ｇ、２つのステップに渡り収率７３％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析　δ_H（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）８．２８（２Ｈ，ｄ，Ｊ９．２）、７．３９（２Ｈ，ｄ，Ｊ９．２）、６．６２（１Ｈ，ｓ）、４．２１（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ１０．９，５．３）、４．１４（１Ｈ，ｄｄ，Ｊ１０．９，５．３）、２．１８（３Ｈ，ｄ，Ｊ１．３）、１．７８（１Ｈ，ｔｄ，Ｊ５．３，１．３）。

【０１６２】

iv．N^{α}－（Ｆｍｏｃ）－N^{ε}－（（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンＳ４

Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ－ＯＨ・ＨＣｌ（６．７ｇ、１６．５ｍｍｏｌ、１．５当量）を、ＴＨＦ（３０ｍＬ）及びＤＭＦ（１０ｍＬ）に溶解し、この溶液に、ヒューニッヒ塩基（９．０ｍＬ、５５．０ｍｍｏｌ、５当量）、続いて、シクロプロペンカーボネートＳ３（２．７ｇ、１１．０ｍｍｏｌ、１当量）を添加し、炭酸塩を添加すると直ぐに黄色の着色を観察した。反応物を室温で６時間撹拌し、ＴＬＣ分析が示したとおり、この時間後、出発材料の消費が完了したと判断した。粗反応混合物をシリカゲル上に乾燥添加し、酢酸エチル、ヘキサン、及び酢酸（５０：４９：１、次に９９：０：１）で溶出する、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、主要な生成物を精製した。これにより、所望の生成物Ｓ４を無色のゴムとして得た（４．３ｇ、収率８２％）。^{1}Ｈ　ＮＭＲ分析　δ_H（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）７．７７（２Ｈ，ｔ，Ｊ７．６）、７．６５～７．５５（２Ｈ，ｍ）、７．３９（２Ｈ，ｔ，Ｊ７．６）、７．３１（２Ｈ，ｔ，Ｊ７．３）、６．５４（

１Ｈ，ｓ）、５．６８～５．５７（１Ｈ，ｍ）、４．８４（１Ｈ，ｂｒ－ｓ）、４．４４～４．３２（２Ｈ，ｍ）、４．２２（１Ｈ，ｔ，Ｊ７．０）、３．９８～３．８７（１Ｈ，ｍ）、３．１７～３．０９（２Ｈ，ｍ）、２．１５～２．０６（６Ｈ，ｍ）、１．９９～１．８６（１Ｈ，ｍ）、１．８４～１．７０（１Ｈ，ｍ）、１．６８～１．５９（１Ｈ，ｍ）、１．５８～１．３４（２Ｈ，ｍ）；ＬＲＭＳ　ｍ／ｚ（ＥＳ$^{+}$）４７９．３［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$、５０１．３［Ｍ＋Ｎａ］$^{+}$、ｍ／ｚ（ＥＳ$^{-}$）４７７．２［Ｍ－Ｈ］$^{-}$。

【０１６３】

ｖ．Ｎ$^{\varepsilon}$－［（｛２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル｝メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン３

Ｎ$^{\alpha}$－（Ｆｍｏｃ）－Ｎ$^{\varepsilon}$（（（２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル）メトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンＳ４（３．５ｇ、７．０ｍｍｏｌ、１当量）を、ＴＨＦ及びH_2O（３：１　４０ｍＬ）に溶解し、この溶液に、水酸化ナトリウム（０．９ｇ、２２．６ｍｍｏｌ、３．１当量）を添加した。反応物を室温で８時間撹拌し、その後、ＬＣ－ＭＳ分析により、反応は完了したと判断した。反応混合物をH_2O（１００ｍＬ）で希釈し、ＨＣｌ（１Ｍ）の添加により、ｐＨを約５に調節した。水溶液をEt_2O（５×１００ｍＬ）で洗浄し、次に、濃縮乾固して、無色の固体を得た。固体を、分取ＨＰＬＣにより精製し、生成物分画を合わせ、溶媒を凍結乾燥により除去した。これにより、Ｎ$^{\varepsilon}$－［（｛２－メチルシクロプロパ－２－エン－１－イル｝メトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン３を無色の固体として得た。δ_H（４００ＭＨｚ，D_2O）６．４５（１Ｈ，ｓ）、３．９０～３．６１（２Ｈ，ｍ）、３．０９（１Ｈ，ｔ，Ｊ６．４）、２．９８～２．８６（２Ｈ，ｍ）、１．９２（３Ｈ，ｓ）、１．５２～１，３７（２Ｈ，ｍ）、１．３７～１．２２（２Ｈ，ｍ）、１．２１～１．０８（２Ｈ，ｍ）、０．８３（１Ｈ，ｄ，Ｊ５．２）。ＬＲＭＳ　ｍ／ｚ（ＥＳ$^{+}$）２５７．２［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$、ｍ／ｚ（ＥＳ$^{-}$）２５５．２［Ｍ－Ｈ］$^{-}$。δ_C（１００ＭＨｚ，D_2O）１０１．１（ＣＨ）、７２．３（CH_2）、５５．９（ＣＨ）、４０．２（CH_2）、３４．３（CH_2）、２８．９（CH_2）、２０．３（CH_2）、１６．６（CH_3）、１０．８（ＣＨ）ＨＲＭＳ（ＥＳ$^{+}$）実測値：（Ｍ＋Ｎａ）$^{+}$２７９．１３０２。$C_{12}H_{20}O_4N_2Na$計算値Ｍ$^{+}$、２７９．１３１５。

【実施例２】

【０１６４】

大腸菌における３の部位特異的取り込みのコード化

本発明者らは、３が、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対、及び１５０位においてアンバーコドンを有するｓｆＧＦＰ遺伝子を用いて、アンバーコドンに対応して、組換えタンパク質に効率的及び部位特異的に取り込まれることを示した（補足図２ａ）。タンパク質の収量は、培養物１リットル当たり８ｍｇであり、それは、ＰｙｌＲＳ　Ｎ$^{\varepsilon}$－［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン１の十分に確立された効率的な基質について得られるもの（培養物１リットル当たり４ｍｇ）より多い（参考文献３３）。１５０位において３を有するｓｆＧＦＰ（－３）のエレクトロスプレーイオン化質量分析により、非天然アミノ酸の取り込みを確認する（補足図２ｂ）。ＳｆＧＦＰ－３を、蛍光テトラジンプローブ４ａで特異的に標識し、一方、ＳｆＧＦＰ－１は標識しないままであった（補足図２ｂ）。蛍光イメージング及び質量分析両方を用いて判断したとおり、ＳｆＧＦＰ－３　２ｎｍｏｌを、４ａ　１０当量で３０分で定量的に標識した（補足図２ｂ）。４ａでのＳｆＧＦＰ－３の標識についての２次速度定数は、２７±１．８$M^{-1}s^{-1}$であった（補足図２ｃ）（Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 10600）。

【０１６５】

ＰｙｌＲＳは、その同族ｔＲＮＡ（参考文献３４）のアンチコドンを認識しないので、このｔＲＮＡのアンチコドンを変更して異なるコドンをデコードすることが可能である。本発明者らは、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{CUA}$のアンチコドンを、ＣＵＡからＵＵＵへと変換して、一連のリジンコドンをデコードして、新規ｔＲＮＡを創出した（補足表１）。本発明者

らは、ＰｙｌＲＳ、ＰｙｌｔＲＮＡ$_{ＵＵＵ}$、及びＴ４リゾチームの遺伝子を含有する細胞に０．１ｍＭ　３を添加した。Ｔ４リゾチームの発現後、本発明者らは、３を有する溶解物中のタンパク質をテトラジンプローブ４ａで検出した（２０μＭ、１時間、補足図３）。対照実験は、観察した標識が、シンセターゼ及びｔＲＮＡの存在を要求することを示し、エレクトロスプレーイオン化質量分析は、Ｔ４リゾチームのリジンに代わる３の取り込みを示す（補足図４）。３（０．１、又は０．５ｍＭ）の添加は、細胞増殖に対してわずかな効果を有するか、又は効果を有さず（補足図５）、これは、アミノ酸が、使用した濃度において毒性ではないこと、及びアミノ酸添加の１時間以内に実質的な標識が存在することを示唆する（補足図６）。

【実施例３】

【０１６６】

ヒト細胞における３の遺伝子コード化

ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対及びｍＣｈｅｒｒｙ－ＴＡＧ－ＥＧＦＰ－ＨＡ（アンバー終止コドン（ＴＡＧ）により分離した、ｍＣｈｅｒｒｙ遺伝子とＣ末端のＨＡタグ有するＥＧＦＰ遺伝子の融合物）を有するＨＥＫ２９３細胞において、全長ｍＣｈｅｒｒｙ－３－ＧＦＰ－ＨＡを発現させた（Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816）。全長タンパク質を、３の存在下でのみ検出した（図８ａ、補足図１１における全ゲル）。ｍＣｈｅｒｒｙ－３－ＥＧＦＰ－ＨＡを４ａで選択的に標識し、一方、ｍＣｈｅｒｒｙ－１－ＥＧＦＰ－ＨＡを標識せず（図８ｂ）（Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816）、これは、ヒト細胞における３のＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対での部位特異的取り込みを示している。

【実施例４】

【０１６７】

キイロショウジョウバエにおける３の遺伝子コード化

本発明者らは、３が、キイロショウジョウバエにおいて、タンパク質に部位特異的に取り込まれ得ることを示した。これを達成するために、本発明者らは、（Ｕ６プロモーターから一様に発現されたｔＲＮＡ、及びｎｏｓ－ｖｐ１６－ＧＡＬ４ドライバーを用いて卵巣に指示されたＵＡＳ－ＰｙｌＲＳ発現を有する）ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対、並びにホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの間にアンバーコドンを有する２重ルシフェラーゼレポーターを含有するハエを用いた（Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518）。本発明者らは、１又は３の添加に依存する強いルシフェラーゼシグナルを観察し、２重ルシフェラーゼシグナルは３との方がより大きい。これらの実験は、３がハエにより取り込まれ、ＰｙｌＲＳの公知の優れた基質である１より、アンバーコドンに応答して、インビボでより効率的に取り込まれることを示す（図１０ａ）。１０ｍＭのアミノ酸３を添加した餌を与えることにより、３を供給し得る。追加実験において、本発明者らは、ウエスタンブロットにより、卵巣において発現させたＧＦＰ－ＴＡＧ－ｍＣｈｅｒｒｙ－ＨＡ構築物（補足図１５）への３の効率的な取り込み（Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518）（図１０ｂ）、４ｇでの、取り込まれたアミノ酸の特異的蛍光標識（図１０ｃ）を示した。

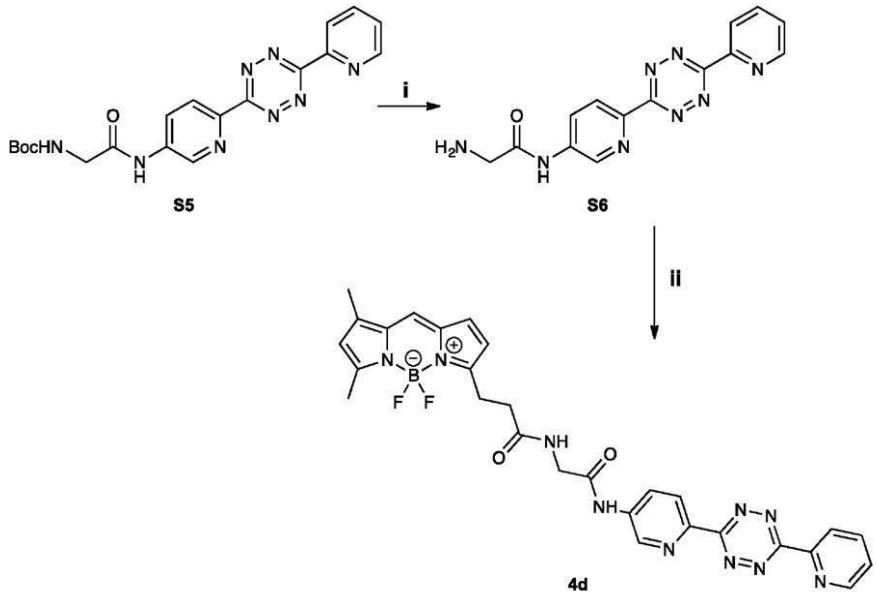
【実施例５】

【０１６８】

テトラジン－ＢＯＤＩＰＹ　ＦＬ　４ｄの合成

【０１６９】

【化５】



【０１７０】

スキーム３．テトラジン－ビオチン４ｄの合成。試薬及び条件：ｉ．ＨＣｌジオキサン、室温、収率１００％、ii．Ｂｏｄｉｐｙ－ＦＬ－ＮＨＳエステル、ヒューニッヒ塩基、ＤＭＦ、室温。

【０１７１】

ｉ．Ｓ６

以前に報告された手順を用いて、Ｂｏｃ－保護テトラジンＳ６を合成した（Lang, K. et al. Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction. Nat Chem 4, 298-304 (2012)）。ジオキサン中の４Ｍ　ＨＣｌ（５００μＬ、２．０ｍｍｏｌ）を、ＤＣＭ（５００μＬ）中のテトラジンＳ５（８ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）の撹拌溶液に添加した。反応を、２時間、室温で行い、続いて、溶媒を減圧下で除去して、第１級アミン塩酸塩Ｓ６をピンク色の固体として得た（６ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ、１００％）。さらに精製することなく、化合物を次のステップにおいて直接用いた。

【０１７２】

ii．４ｄ

ＢＯＤＩＰＹ　ＦＬスクシンイミジルエステル（５ｍｇ、０．０１３ｍｍｏｌ、Life technologies社）、及びヒューニッヒ塩基（５０μｌ、２．８ｍｍｏｌ）を、乾燥ＤＭＦ（１ｍＬ）中のテトラジン－アミンＳ２（６ｍｇ、０．０２ｍｍｏｌ）の溶液に添加した。反応混合物を、室温で１６時間撹拌した。反応混合物を、水４ｍｌで希釈し、１０％～９０％の勾配の緩衝液Ａ中の緩衝液Ｂ（緩衝液Ａ：H_2O、緩衝液Ｂ：アセトニトリル）を用いた、半分取逆相ＨＰＬＣにより、生成物を精製した。テトラジンＢＯＤＩＰＹ　ＦＬ複合体４ｄの同一性及び純度を、ＬＣ－ＭＳにより確認した。ＥＳＩ－ＭＳ：［Ｍ－Ｈ］$^-$、計算値５８１．３８、実測値５８１．２。

【０１７３】

実施例１～５の要約

本発明者らは、アミノ酸３を含有するシクロプロペンの合成、遺伝学的にコードされる、部位特異的取り込みを特徴付け、大腸菌、哺乳動物細胞、及びキイロショウジョウバエにおいて発現されたタンパク質中の、テトラジンプローブでの３の定量的標識を示し、これにより、本発明の幅広い実用性及び産業上の適用が示されている。

【０１７４】

実施例１～５に対する補足参考文献

１．Gautier, A. et al. Genetically Encoded Photocontrol of Protein Localization in Mammalian Cells. Journal of the American Chemical Society 132, 4086－4088 (2010).
２．Karp, N.A., Kreil, D.P. & Lilley, K.S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair－wise comparison using two－dimensional difference gel electrophoresis. Proteomics 4, 1421－1432 (2004).
３．Karp, N.A. & Lilley, K.S. Design and analysis issues in quantitative proteomics studies. Proteomics 7 Suppl 1, 42－50 (2007).
４．Lilley, K.S. in Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
５．Von Stetina, J.R., Lafever, K.S., Rubin, M. & Drummond－Barbosa, D. A Genetic Screen for Dominant Enhancers of the Cell－Cycle Regulator alpha－Endosulfine Identifies Matrimony as a Strong Functional Interactor in Drosophila. G3 (Bethesda) 1, 607－613 (2011).
６．Lang, K. et al. Genetically encoded norbornene directs site－specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction. Nat Chem 4, 298－304 (2012).

【実施例６】

【０１７５】

タンパク質の２重標識

タンパク質中のプログラム化された部位に２つの異なる分子を結合させる能力は、タンパク質の構造、立体構造、及び動態学を研究するためのＦＲＥＴを含む、様々な適用（Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2002, 3, 906、Kajihara, D.; Abe, R.; Iijima, I.; Komiyama, C.; Sisido, M.; Hohsaka, T. Nat Methods 2006, 3, 923）を促進する。タンパク質を２重に標識するいくつかのアプローチが報告されている。１つのアプローチは、システインチオール標識との組合せで特異的に標識される、１つの非天然アミノ酸の導入に頼るが、このアプローチは、遊離チオールを含有しないタンパク質に一般的に制限される（Brustad, E. M.; Lemke, E. A.; Schultz, P. G.; Deniz, A. A. J Am Chem Soc 2008, 130, 17664、Nguyen, D. P.; Elliott, T.; Holt, M.; Muir, T. W.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2011, 133, 11418）。化学的ライゲーションアプローチは、タンパク質標識のための単一の非天然アミノ酸の遺伝子コード化と組み合わされ得るが（Wissner, R. F.; Batjargal, S.; Fadzen, C. M.; Petersson, E. J. J Am Chem Soc 2013, 135, 6529）、これは、標識され得るサイズ及び／又は部位を制限し得る。恐らく、タンパク質２重標識の最も一般的に適用可能なアプローチは、所望の遺伝子中のユーザーが定義した部位において導入された２つの異なるコドンに応答した、２つの異なるアミノ酸の遺伝子取り込みに基づく。

【０１７６】

２重標識の理想的な戦略は、ｉ）相互に直交性の反応において標識され得るタンパク質への２つの異なる非天然アミノの効率的な、細胞の、取り込み、並びにii）生理的ｐＨ、温度、及び圧力において、水性媒体中でのタンパク質の迅速な、定量的標識のため、タンパク質への２つの分子の同時添加を可能にする、相互に直交性の反応の開発を要求する。

【０１７７】

スキームＡ（図１４）は、生理的ｐＨ及び温度において、水性媒体中でのタンパク質の協調した、迅速なワンポット定量的２重標識を示す。（ａ）この例において用いた、非天然アミノ酸及びフルオロフォア。（ｂ）相互に直交性の環化付加を介した、コードされた末端のアルキン及びコードされたシクロプロペンにおける協調した標識。

【０１７８】

アンバー及び４塩基コドン（Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441）、２つの異なる終止コドン（Wan, W.; Huang, Y.; Wang, Z.; Russell, W. K.; Pai, P. J.; Russell, D. H.; Liu, W. R. Angew Chem Int

Ed Engl 2010, 49, 3211、Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P. G. Biochemistry 2013）、又は２つの異なる３塩基コドン（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）に応答した、タンパク質への２つの異なる非天然アミノ酸の細胞の、遺伝学的に指示された取り込みを示した。本発明者らは、それぞれ、同族の拡張されたアンチコドンｔＲＮＡ、又はアンバー抑制剤を用いて、直交性ｍＲＮＡ上の４塩基コドン及びアンバーコドンを効率的に読み取る、直交性リボソーム（ｒｉｂｏ－Ｑ１）の進化を従前に示した（Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441）。本発明者らは、ピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ／ｔＲＮＡ対、及びＭｊＴｙｒＲＳ／ｔＲＮＡ対の合成で進化した誘導体が、それらのアミノアシル化特異性において相互に直交性であり、アンバー及び４塩基コドンに応答して、非天然アミノ酸の対の取り込みを指示するために用いられ得ることを示した（Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441）。本発明者らは、進化した直交性翻訳機械を用いて、４塩基コドンに応答して、非天然アミノ酸の取り込みを効率的に指示するピロリジル－ｔＲＮＡシンセターゼ（ＰｙｌＲＳ）／ｔＲＮＡ対に基づいて、ｔＲＮＡをデコードする一連の４塩基の進化を含む、この系におけるいくつかの主要な進歩を最近記載した（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）。本発明者らは、ＴＡＧ及びＡＧＴＡコドン、並びにｒｉｂｏ－Ｑ１を有する直交性メッセージを有する、進化したＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{UAC U}$対、及びＭｊＴｙｒＲＳ／ｔＲＮＡ$_{C U A}$対の誘導体を用いた、非天然アミノ酸の対のマトリックスの非常に効率的な取り込みを示した（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）。

【０１７９】

限られた範囲の化学が、非天然アミノ酸の対を含有するタンパク質の２重標識について調査された。アジド及びアルキン含有アミノ酸の取り込み、並びにアルキン及びアジドベースのフルオロフォアでのそれらの非定量的標識が報告されているが（Wan, W.; Huang, Y.; Wang, Z.; Russell, W. K.; Pai, P. J.; Russell, D. H.; Liu, W. R. Angew Chem Int Ed Engl 2010, 49, 3211）、これは、タンパク質の２重標識にとって理想ではない。コードされるアジド及びアルキンが、それらが反応して、タンパク質においてトリアゾールを形成し得る近さにあったとしても、遺伝学的に指示されるタンパク質結合を可能にする戦略（Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441）は、プローブでの標識により妨害される。さらに、効率的なワンポット反応は、互いにアジド及びアルキンを有するプローブ間の反応のため、実行可能ではない。アミノ酸を含有するケトン及びアジドの取り込みが報告されており（Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P. G. Biochemistry 2013、Wu, B.; Wang, Z.; Huang, Y.; Liu, W. R. Chembiochem : a European journal of chemical biology 2012, 13, 1405）、それは、コードされたケトンのアルファ効果ヌクレオフィルとの、及びアジドのアルキンプローブとのワンポット反応を可能にする（Wu, B.; Wang, Z.; Huang, Y.; Liu, W. R. Chembiochem : a European journal of chemical biology 2012, 13, 1405）。しかしながら、このアプローチは、コードされるアジドが、大腸菌において発現されるとき、多くのタンパク質の低減にさらされ、それは、定量的標識を妨げるので、問題がある（Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P. G. Biochemistry 2013、Sasmal, P. K.; Carregal-Romero, S.; Han, A. A.; Streu, C. N.; Lin, Z.; Namikawa, K.; Elliott, S. L.; Koster, R. W.; Parak, W. J.; Meggers, E. ChemBioChem 2012, 13, 1116）。さらに、アルファ効果ヌクレオフィルでのケトン標識は、非常に遅く（速度定数約$１０^{－４}Ｍ^{－１}ｓ^{－１}$）、ｐＨ４～５．５における反応が最適であり（Rotenberg, S. A.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J. S.; Weinstein, I. B.; Rideout, D. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991, 88, 2490）、それは、酸性条件下で長期間維持されるとき、変性又は沈殿する、多くのタンパク質に対するその有用性を制限する。本発明者らは、本

発明者らの最適化した直交性翻訳システムを用いて、アミノ酸を含有する非活性化テトラジン（Seitchik, J. L.; Peeler, J. C.; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C.; Fox, J. M.; Mehl, R. A. J Am Chem Soc 2012, 134, 2898）、及びアミノ酸を含有するノルボルネン（Lang, K.; Davis, L.; Torres-Kolbus, J.; Chou, C.; Deiters, A.; Chin, J. W. Nat Chem, 2012, 4, 298、Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C; Szymanski, J.; Mueller, R.; Wiesler, M.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 4166、Kaya, E.; Vrabel, M.; Deiml, C.; Prill, S.; Fluxa, V. S.; Carell, T. Angewandte Chemie International Edition 2012, 57, 4466）をタンパク質に、最近、遺伝学的に導入した（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）。非活性化テトラジンとノルボルネン間の逆電子要求型ディールスーアルダー反応の速度は非常に遅いが、テトラジンは、ビシクロノニンベースのプローブと反応することができ、ノルボルネンは、活性化テトラジンプローブと反応することができるので、本発明者らは、このアプローチを特異的で定量的な２重標識タンパク質に用いることができた（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）。このアプローチは、生理的ｐＨ、温度、及び圧力における水性媒体中で進行させるという利点を有する一方、それは、（プローブ間での逆電子要求型反応を避けるために）逐次的な標識ステップを要求し、それぞれが、ステップ間での精製を伴い、数時間かかる。遺伝学的にコードされる非天然アミノ酸におけるタンパク質の２重標識について今日までに報告された全てのアプローチは、完了に至るまで数十時間から数日を要する。

【０１８０】

２重標識タンパク質への理想的なアプローチは、生理的ｐＨ、温度、及び圧力において水性媒体中で迅速に進められ、部位特異的に取り込まれた生体直交基を有する組換えタンパク質に標識試薬を添加することにより単純に実行される、遺伝学的に導入された生体直交官能基の迅速なワンポット標識を可能にする。生理的ｐＨにおける水性条件下でのワンポット標識のための相互に直交性の反応の見込みのある対は、アジドと末端のアルキンの間のＣｕ（Ｉ）により触媒される３＋２環化付加（Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G, J Am Chem Soc 2003, 125, 3192）、及び歪んだアルケンとテトラジンの逆電子要求型ディールスーアルダー反応（Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816、Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Angewandte Chemie International Edition 2012, 57, 7476、Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518、Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2012, 134, 10317、Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiesler, M.; Schultz, C.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. ChemBioChem 2012, 13, 2094、Schoch, J.; Staudt, M.; Samanta, A.; Wiessler, M.; Jaschke, A. Bioconjug Chem 2012, 23, 1382）である（図１１）。歪んだアルキンとアジドの反応はまた、歪んだアルケンテトラジン反応と直交性であり得るが、テトラジンは歪んだアルキンと反応するので、このアプローチは、それぞれの反応についての速度定数の注意深い調整を要求する（Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 920）。３＋２環化付加と逆電子要求型ディールスーアルダー反応の組合せは、タンパク質標識について示されていない。

【０１８１】

本発明者らは、実施例１～５において、アミノ酸を含有する１，３二置換シクロプロペン、２（実施例１～５において、及び本文書において他の所で３と称する）が、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$対を用いて、タンパク質に効率的及び部位特異的に取り込まれ得ることを示した（Bianco, A.; Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Pisa, R.; Davis, L.; Elsasser, S. J.; Ernst, R. J.; Lang, K.; Sachdeva, A.; Chin, J. W. Under Review）

。このアミノ酸は、光クリック反応のため取り込まれる３，３二置換シクロプロペン（Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 10600）と異なり、タンパク質上の速度定数２７$M^{-1}s^{-1}$（Bianco, A.; Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Pisa, R.; Davis, L.; Elsasser, S. J.; Ernst, R. J.; Lang, K.; Sachdeva, A.; Chin, J. W. Under Review）でテトラジンと反応する（Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. Angewandte Chemie International Edition 2012, 57, 7476、Kamber, D. N.; Nazarova, L. A.: Liang, Y.; Lopez, S. A.; Patterson, D. M.; Shih, H. W.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. J Am Chem Soc 2013, 135, 13680）。ここで、本発明者らは、単一のタンパク質への、アミノ酸を含有する末端のアルキン１、及びアミノ酸を含有するシクロプロペン２の効率的な遺伝子コード化、並びにアジド及びテトラジンプローブでのそれらの迅速な、定量的ワンポット標識を示す（図１１）。この研究は、生理的ｐＨにおいて水性条件下でのワンポットプロセスにおけるタンパク質の協調した２重標識への第１のアプローチを提供し、従前の研究において数日から、ここで報告したアプローチにおいて３０分まで、２重標識のスピードの変革をもたらす。

【０１８２】

１又は２いずれかを含有するタンパク質を過剰発現させて、提案した標識反応の直交性の特異性を調べた。グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼと、カルモジュリン中の１位においてアミノ酸１を有するカルモジュリンの融合タンパク質（ＧＳＴ－ＣａＭ）を、１（４ｍＭ）の存在下で増殖させた、ｒｉｂｏ－Ｑ１（進化した直交性リボソーム（Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia-Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441、Wang, K.; Schmied, W. H.; Chin, J. W. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 2288、Wang, K.; Neumann, H.; Peak-Chew, S. Y.; Chin, J. W. Nature biotechnology 2007, 25, 770））、Ｏ－ｇｓｔ－ｃａｍ$_{1TAG}$（直交性メッセージ上でのグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ｇｓｔ）と、カルモジュリン（ｃａｍ）の間の融合遺伝子（Rackham, O.; Chin, J. W. Nature chemical biology 2005, 7, 159）、ここで、ｃａｍの最初のコドンがＴＡＧコドンで置き換えられる）、及びＭｊＰｒｐＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$（ＴＡＧコドンに応答して、１を取り込むために開発されたシンセターゼ／ｔＲＮＡ対）（Deiters, A.; Schultz, P. G. Bioorganic & amp; Medicinal Chemistry Letters 2005, 15, 1521）を含有する細胞から発現させた。ＧＳＴとＣａＭの間の操作されたトロンビン切断部位におけるトロンビンを用いた切断により、ＧＳＴタグを続いて削除した。Ｃｕ（Ｉ）により触媒されるクリック反応において、ＣａＭ1_1（１位において１を含有するＣａＭ、約１００ｐｍｏｌｅ）を、フルオロフォアを含有するアジド３（２ｎｍｏｌｅ）で標識した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）による、蛍光的に標識したタンパク質の定量的シフト両方により判断したとおり、反応は定量的であった（図１１ａ）。

【０１８３】

アミノ酸を含有するシクロプロペン、２は、カルモジュリンの４０位において部位特異的に取り込まれた。２（１ｍＭ）の存在下で増殖させた、ＰｙｌＲＳ／ｔＲＮＡ$_{CUA}$（２の部位特異的取り込みを効率的に指示する）（Bianco, A.; Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Pisa, R.; Davis, L.; Elsasser, S. J.; Ernst, R. J.; Lang, K.; Sachdeva, A.; Chin, J. W. Under Review）、ｒｉｂｏ－Ｑ１、及びＱ－ｇｓｔ－ｃａｍ$_{40TAG}$を有する細胞において、修飾されたタンパク質を発現させた。ＣａＭ2_{40}（約１００ｐｍｏｌ）（ＧＳＴタグのトロンビン切断後に得られた）を、フルオロフォアを含有するテトラジン４（２ｎｍｏｌｅ）で標識した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）による、蛍光的に標識したタンパク質の定量的シフト両方により判断したとおり、反応は定量的であった（図１１ｂ）。ＣａＭ1_1の３での定量的標識を導く条件下で、ＣａＭ2_{40}を３で標識しなかった（図１１ａ）。同様に、ＣａＭ2_{40}を４で定量的に標識する条件下で、ＣａＭ1_1を４で標識しなかった。これらの実験は、２種の標識試薬は、それらの標的アミノ酸と定量的に反応するが、タンパク質中の

それらの標的ではない非天然アミノ酸と反応しないことを示す。

【０１８４】

次に、本発明者らは、同一タンパク質内での標識１及び２を調べた。本発明者らは、カルモジュリンの１及び４０位において１及び２を部位特異的に取り込ませて、$CaM1_{12_{40}}$を生産させた（図１２）。本発明者らは、$MjPrpRS/tRNA_{CUA}$対でのアミノ酸１の取り込み、及び進化した$PylRS/tRNA_{UACU}$対でのアミノ酸２の取り込みを指示し、それは、ｒｉｂｏ－Ｑ１を用いて、直交性メッセージにおいて、４塩基ＡＧＴＡコドンを効率的にデコードする（Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted）。直交性メッセージ（Ｏ－ｇｓｔ－ｃａｍ$_{1TAG4OAGTA}$）上でのＧＳＴ－カルモジュリン遺伝子内において、カルモジュリン中１及び４０位におけるＵＡＧ及びＡＧＴＡコドンに応答して、非天然アミノ酸を取り込ませた。全長$GST-CaM1_{12_{40}}$の発現は、アミノ酸１及び２の大腸菌への添加に依存し、ＥＳＩ－ＭＳは、アミノ酸１及び２の遺伝学的に指示された取り込みを示した（図１２ｃ）。全長$GST-CaM1_{12_{40}}$の収量は、培養物１Ｌ当たり約２ｍｇであった。

【０１８５】

アジド３又はテトラジン４で$CaM1_{12_{40}}$を定量的に標識するために要求される時間を決定するために、本発明者らは、$CaM1_{12_{40}}$ １００ｐｍｏｌを３又は４いずれか２ｎｍｏｌとインキュベートし、続いて、それぞれを、標識の際のＳＤＳ－ＰＡＧＥにおける移動度シフト、及び蛍光イメージング両方により反応させた（図１２ｂ）。これらの実験は、フルオロフォア標識が３０分で完了することを示す。

【０１８６】

次に、本発明者らは、$CaM1_{12_{40}}$の３及び４両方での標識を調べた（図１３）。本発明者らは、４（２ｎｍｏｌ）の$CaM1_{12_{40}}$（１００ｐｍｏｌ）への添加をまず試験し、続いて、遊離４を除去するために精製し、３（２ｎｍｏｌ）で続いて標識した（図１３ａ、レーン４）。これは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ移動度シフト、及び蛍光イメージングにより判断したとおり、効率的な２重標識を導いた。次に、本発明者らは、$CaM1_{12_{40}}$を４と３０分間インキュベートし、次に、３及びクリック試薬を添加し、さらに３０分間インキュベートすることにより、精製することなく、逐次標識を行った（図１３ａ、レーン５）。これはまた、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ移動度シフト、及び蛍光イメージングにより判断したとおり、効率的な２重標識を導いた。最後に、本発明者らは、４（２ｎｍｏｌ）、３（２ｎｍｏｌ）、及びクリック試薬を$CaM1_{12_{40}}$（１００ｐｍｏｌ）に同時に添加し、３０分間インキュベートした（図１３ａ、レーン６）。これは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ移動度シフト、及び蛍光イメージングにより判断したとおり、効率的な２重標識を再度導いた。全ての２重標識されたタンパク質において、本発明者らは、４８８ｎｍにおける励起の際、単独に標識された対照と比較して（図１３ａにおけるレーン４、５、及び６をレーン３と比較する）、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ蛍光の低減を観察し、これは、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬとＢＯＤＩＰＹ－ＴＭＲ－Ｘの間のゲルフェルスター共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）においてと一致する。ＥＳＩ－ＭＳは、この協調した、ワンポットプロトコールが、タンパク質の遺伝学的に指示された効率的、迅速及び定量的な２重標識を導くことをさらに示す。

【０１８７】

要約すると、この実施例において、本発明者らは、部位特異的に取り込まれたアルキン、及び部位特異的に取り込まれたシクロプロペンを有する組換えタンパク質の発現についての、効率的で迅速なプロトコールを示す。本発明者らは、コードされる１，３二置換シクロプロペンとテトラジンプローブの逆電子要求型ディールス－アルダー反応、及びコードされるアルキンとアジドプローブの３＋２環化付加反応が、互いに、及びタンパク質中の官能基に相互に直交性であることを示す。単一のタンパク質中のアルキン及びシクロプロペンの遺伝子コード化を組み合わせ、相互に直交性の反応で標識することにより、本発明者らは、生理的ｐＨ及び温度における、水性媒体中でのタンパク質の協調した、ワンポ

ット迅速２重標識を示す。この戦略は、様々な研究及び適用のため、タンパク質を２重に標識するための有用性を有し、多様な細胞及び生物における多様な分子の２重標識まで拡張され得る。

【０１８８】

実施例６についての注意：実施例６、及び実施例６において考察した対応する図（図面）中の化学の記号表示は自己完結し、実施例６にのみ適用する。この文書の残りの部分における化学の記号表示の考察は、実施例６を除き、一致する。例えば、熟練の読者は、実施例６の化合物２が、この文書の残りの部分における化合物３に対応すること（すなわち、本発明の典型的なシクロプロペンアミノ酸）を直ぐに理解する。実施例６の化合物３及び４は、テトラジン化合物である。

【０１８９】

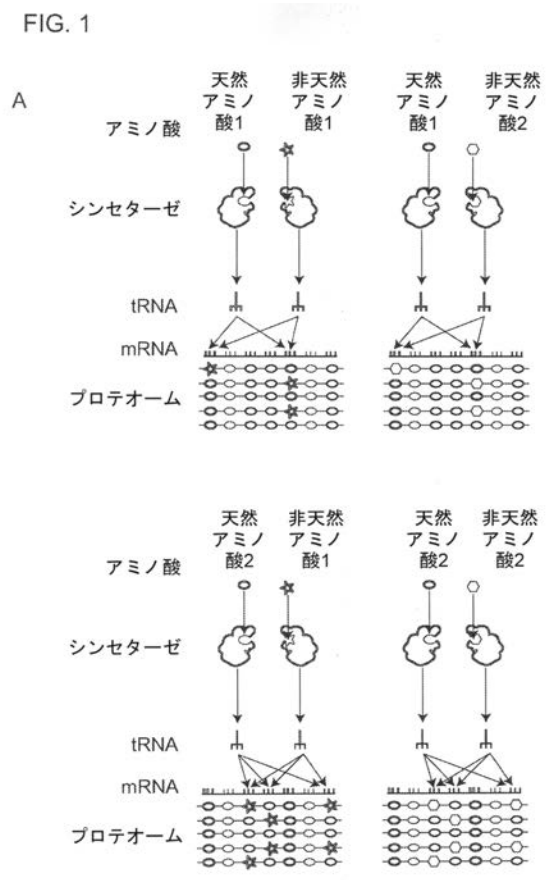
実施例６に対する参考文献

(1)Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2002, 3, 906.
(2)Kajihara, D.; Abe, R.; Iijima, I.; Komiyama, C; Sisido, M.; Hohsaka, T. Nat Methods 2006, 3, 923.
(3)Brustad, E. M.; Lemke, E. A.; Schultz, P. G.; Deniz. A. A. J Am Chem Soc 2008, 130, 17664.
(4)Nguyen, D. P.; Elliott, T.; Holt, M.; Muir, T. W.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2011, 133. 11418.
(5)Wissner, R. F.; Batjargal, S.; Fadzen, C. M.; Petersson, E. J. J Am Chem Soc 2013, 135, 6529.
(6)Neumann, H .: Wang, K.; Davis, L.: Garcia－Alai, M.; Chin, J. W. Nature 2010, 464, 441.
(7)Wan, W.; Huang, Y.; Wang, Z.; Russell, W. K.; Pai, P. J.; Russell, D. H.; Liu, W. R. Angew Chem Int Ed Engl 2010, 49, 3211.
(8)Chatterjee, A.; Sun, S. B.; Furman, J. L.; Xiao, H.; Schultz, P, G. Biochemistry 2013.
(9)Wang, K.; Sachdeva, A.; Cox, D. J.; Wilf, N. W.; Wallace, S.; Mehl, R, A.; Chin, J. W. submitted.
(10)Wu, B.; Wang, Z.; Huang, Y.; Liu W. R. Chembiochem: a European journal of chemical biology 2012, 13, 1405.
(11)Sasmal, P. K.; Carregal－Romero, S.; Han, A. A.; Streu, C. N.; Lin, Z.; Namikawa, K.; Elliott, S. L.; Koster, R. W.; Parak, W. J.; Meggers, E. ChemBioChem 2012, 13, 1116.
(12)Rotenberg, S. A.; Calogeropoulou, T.; Jaworski, J. S.; Weinstein, I. B.; Rideout, D. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991, 88, 2490.
(13)Seitchik, J. L.; Peeler, J. C; Taylor, M. T.; Blackman, M. L.; Rhoads, T. W.; Cooley, R. B.; Refakis, C; Fox, J. M.; Mehl, R. A. J Am Chem Soc 2012, 134, 2898.
(14)Lang, K.; Davis, L.; Torres－Kolbus, J.; Chou, C; Deiters, A.; Chin, J, W. Nat Chem, 2012, 4, 298.
(15)Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C; Szymanski, J.; Mueller, R.; Wiessler, M.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 4166.
(16)Kaya, E.: Vrabel, M.; Deiml, C.; Prill, S.; Fluxa, V. S.; Carell, T. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 4466.
(17)Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. J Am Chem Soc 2003, 125, 3192.

(18)Devaraj, N. K.; Weissleder, R. Accounts of Chemical Research 2011, 44, 816.
(19)Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C M.; Devaraj, N. K. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 7476.
(20)Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. J Am Chem Soc 2008, 130, 13518.
(21)Lang, K.; Davis, L.; Wallace, S.; Mahesh, M.; Cox, D. J.; Blackman, M. L.; Fox, J. M.; Chin, J. W. J Am Chem Soc 2012, 134, 10317.
(22)Borrmann, A.; Milles, S.; Plass, T.; Dommerholt, J.; Verkade, J. M. M.; Wiessler, M.; Schultz, C; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L.; Lemke, E. A. ChemBioChem 2012, 13, 2094.
(23)Schoch, J.; Staudt, M.; Samanta, A.; Wiessler, M.; Jaschke, A. Bioconjug Chem 2012, 23, 1382.
(24)Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 920.
(25)Bianco, A.; Elliott, T. S.; Townsley, F. M.; Pisa, R.; Davis, L.; Elsasser, S. J.; Ernst, R. J.; Lang, K.; Sachdeva, A.; Chin, J. W. Under Review.
(26)Yu, Z.; Pan, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lin, Q. Angewandte Chemie International Edition 2012, 51, 10600.
(27)Kamber, D. N.; Nazarova, L. A.; Liang, Y; Lopez, S. A.; Patterson, D. M.; Shih, H. W.; Houk, K. N.; Prescher, J. A. J Am Chem Soc 2013, 135, 13680.
(28)Wang, K.; Schmied, W. H.; Chin, J. W. Angew Chem Int Ed Engl 2012, 51, 2288.
(29)Wang, K.; Neumann, H.; Peak－Chew, S. Y.; Chin, J. W. Nature biotechnology 2007, 25, 770.
(30)Rackham, O.; Chin, J. W. Nature chemical biology 2005, 1, 159.
(31)Deiters, A,; Schultz, P. G. Bioorganic & amp; Medicinal Chemistry Letters 2005, 15, 1521.

【図１Ａ】

FIG. 1



【図１Ｂ】

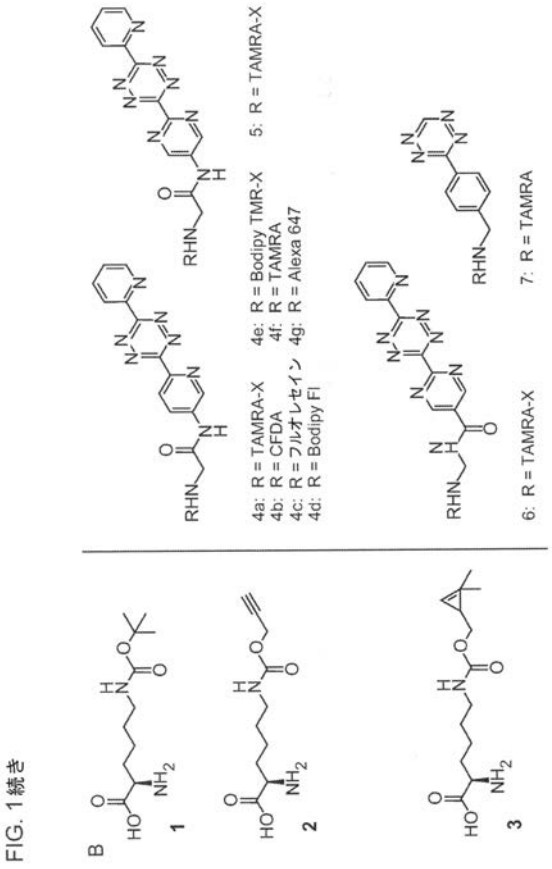
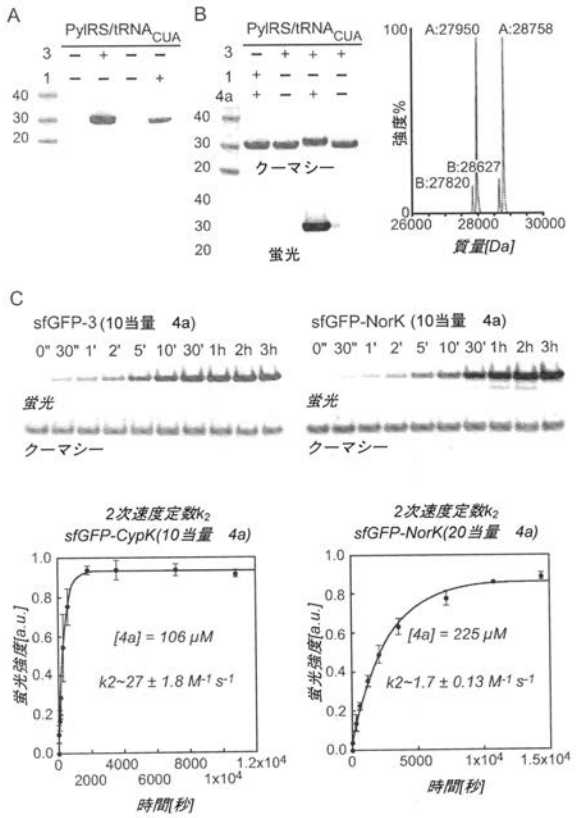


FIG. 1続き

【図２】

FIG. 2



【図３－１】

FIG. 3

名称	配列	注釈
FMT17	CATGTAGATCGAATGGACTATAAATCC GTTCAGCCGGG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT18	CCCGGCTGAACGGATTTATAGTCCATT CGATCTACATG	CTA → ATA (Tyr)
FMT19	CATGTAGATCGAATGGACTTGCAATCC GTTCAGCCGGGTTAG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT20	CTAACCCGGCTGAACGGATTGCAAGTC CATTCGATCTACATG	CTA → TGC (Ala)
FMT21	GTAGATCGAATGGACTAGAAATCCGTT CAGCCGGG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT22	CCCGGCTGAACGGATTTCTAGTCCATT CGATCTAC	CTA → AGA (Ser)
FMT23	CATGTAGATCGAATGGACTGCTAATCC GTTCAGCCGGGTTAG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT24	CTAACCCGGCTGAACGGATTAGCAGTC CATTCGATCTACATG	CTA → GCT (Ser)
FMT25	GTAGATCGAATGGACTTAAAATCCGTT CAGCCGGG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT26	CCCGGCTGAACGGATTTTAAGTCCATT CGATCTAC	CTA → TAA (Leu)
FMT27	GTAGATCGAATGGACTCAGAATCCGTT CAGCCGGG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT28	CCCGGCTGAACGGATTCTGAGTCCATT CGATCTAC	CTA → CAG (Leu)
FMT29	GTAGATCGAATGGACTCATAATCCGTT CAGCCGGG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT30	CCCGGCTGAACGGATTATGAGTCCATT CGATCTAC	CTA → CAT (Met)
FMT31	CATGTAGATCGAATGGACTTTTAATCC GTTCAGCCGGGTTAG	D.m.PylTのための変異誘発プライマー
FMT32	CTAACCCGGCTGAACGGATTAAAAGTC CATTCGATCTACATG	CTA → TTT (Lys)
MAM01	GTAGATCGAATGGACTCATAATCCGTT CAGCCGGG	CTA→CAT(Met)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM02	CCCGGCTGAACGGATTATGAGTCCATT CGATCTAC	CTA→CAT(Met)のためのリバース変異誘発プライマー

【図３－２】

FIG. 3 続き

名称	配列	注釈
MAM03	GATCGAATGGACTCACAATCCGTTCAG CCGG	CTA→CAC(Val)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM04	CCGGCTGAACGGATTGTGAGTCCATTC GATC	CTA→CAC(Val)のためのリバース変異誘発プライマー
MAM05	GATCGAATGGACTCTTAATCCGTTCAG CCG	CTA→CTT(Lys)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM06	CGGCTGAACGGATTAAGAGTCCATTCG ATC	CTA→CTT(Lys)のためのリバース変異誘発プライマー
MAM07	GATCGAATGGACTCTCAATCCGTTCAG CCG	CTA→CTC(Glu)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM08	CGGCTGAACGGATTGAGAGTCCATTCG ATC	CTA→CTC(Glu)のためのリバース変異誘発プライマー
MAM09	GTAGATCGAATGGACTGTAAATCCGTT CAGCCG	CTA→GTA(Tyr)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM10	CGGCTGAACGGATTTACAGTCCATTCG ATCTAC	CTA→GTA(Tyr)のためのリバース変異誘発プライマー
MAM11	GATCGAATGGACTCCAAATCCGTTCAG CCG	CTA→CCA(Trp)のためのフォワード変異誘発プライマー
MAM12	CGGCTGAACGGATTTGGAGTCCATTCG ATC	CTA→CCA(Trp)のためのリバース変異誘発プライマー

【図４Ａ】

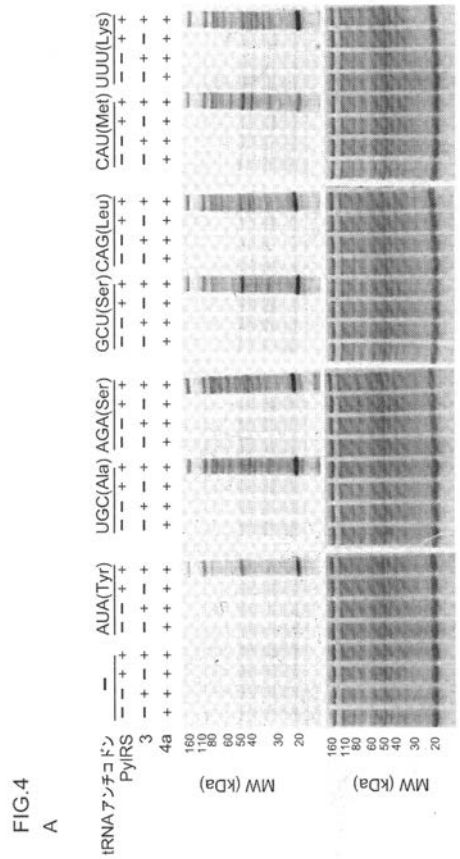
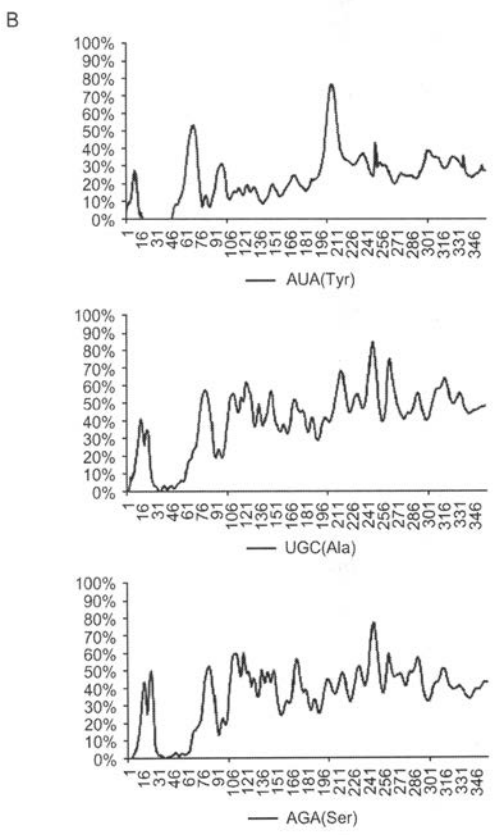


FIG.4
A

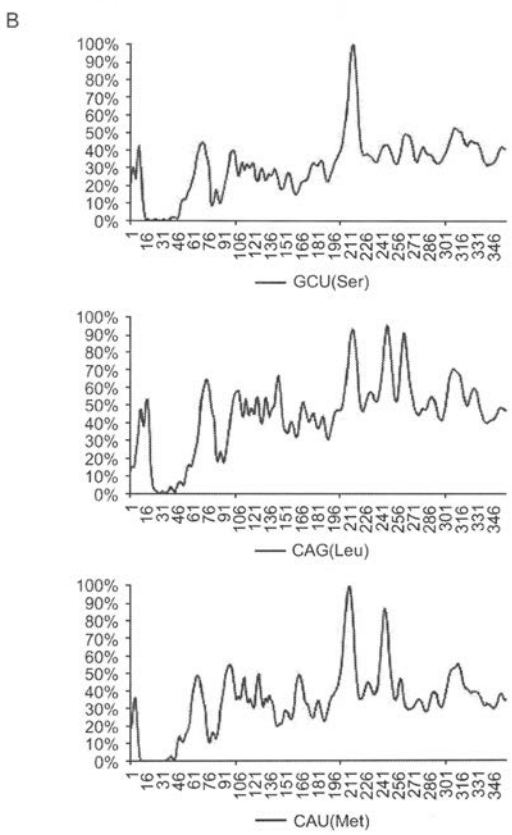
【図４Ｂ－１】

FIG. 4



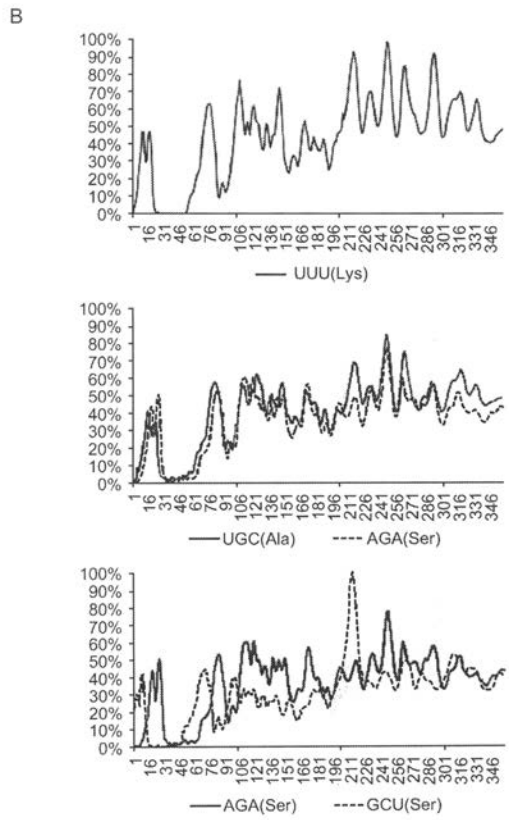
【図４Ｂ－２】

FIG. 4 続き



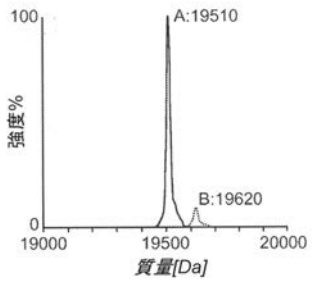
【図４Ｂ－３】

FIG. 4 続き



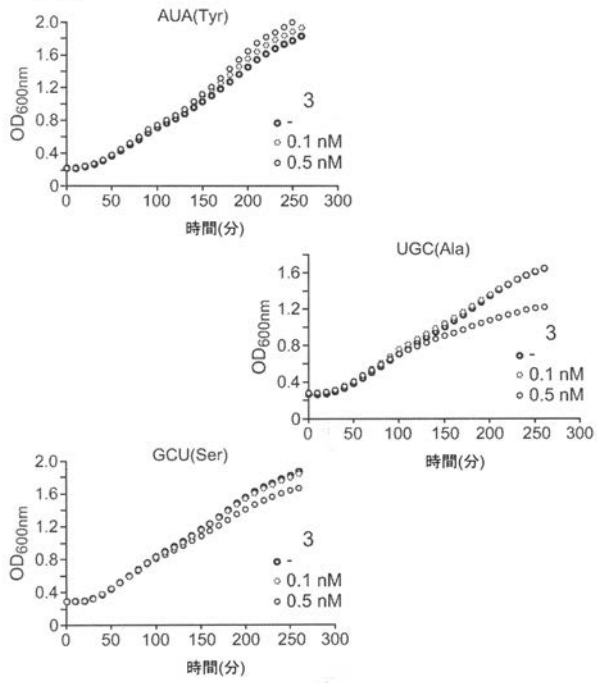
【図５】

FIG. 5



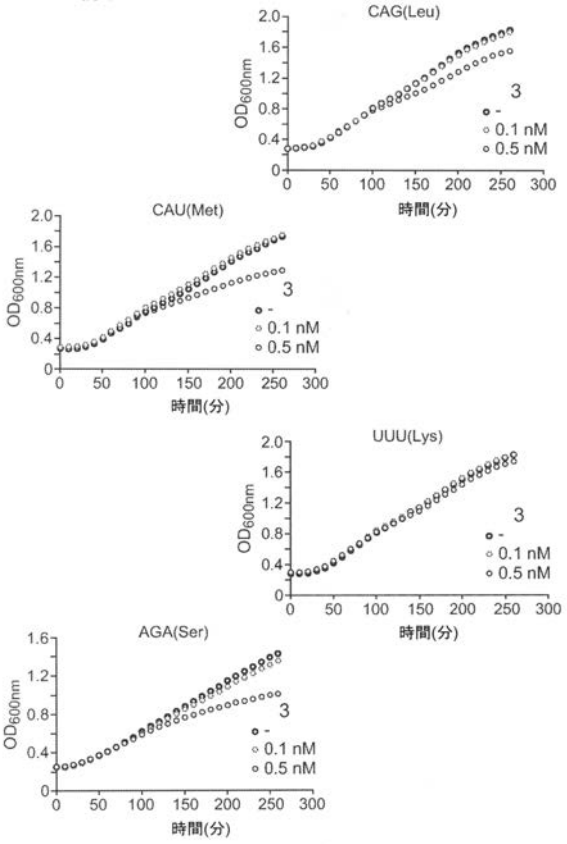
【図６－１】

FIG. 6



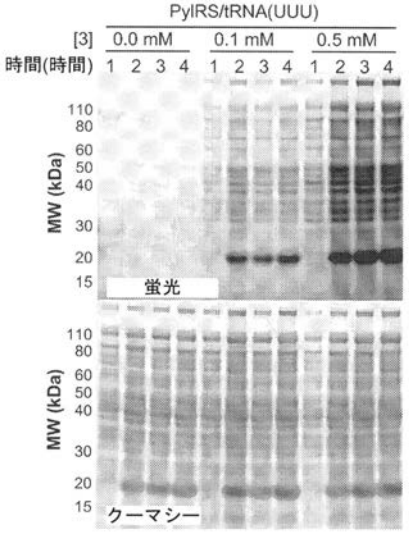
【図６－２】

FIG. 6 続き



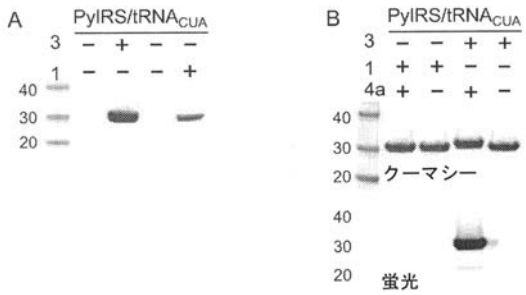
【図７】

FIG. 7

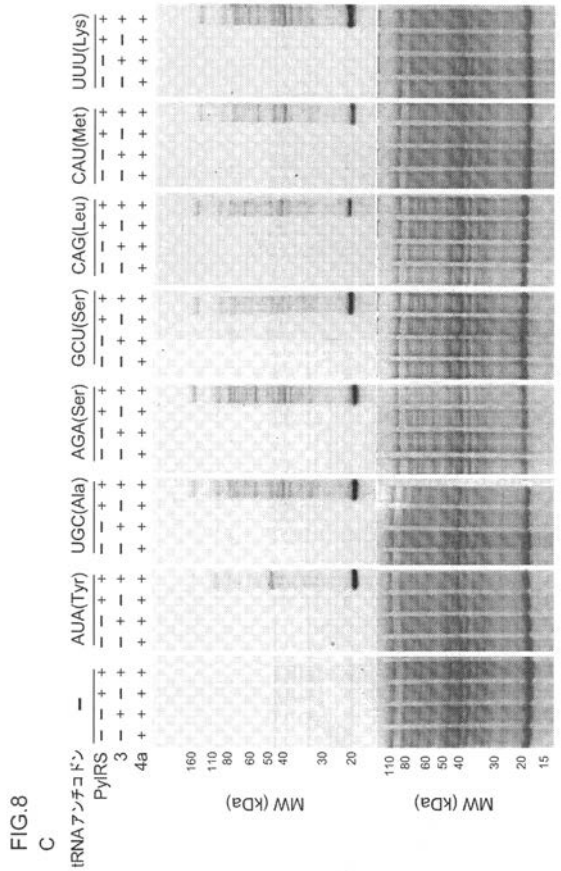


【図８Ａ－Ｂ】

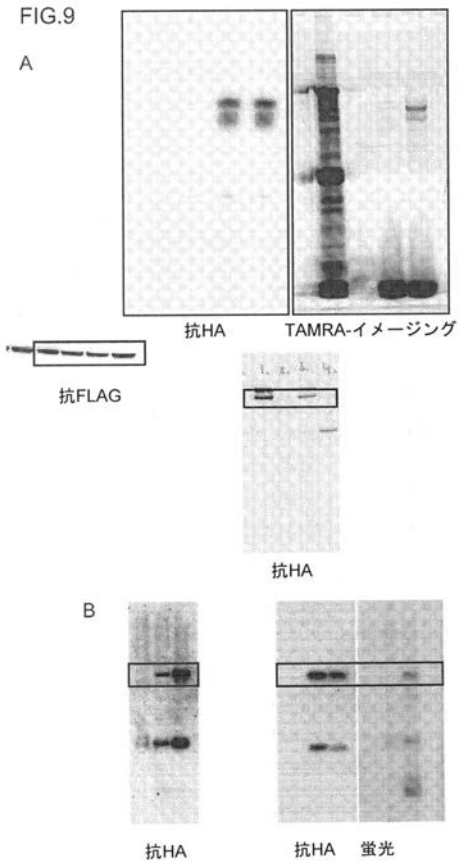
FIG. 8



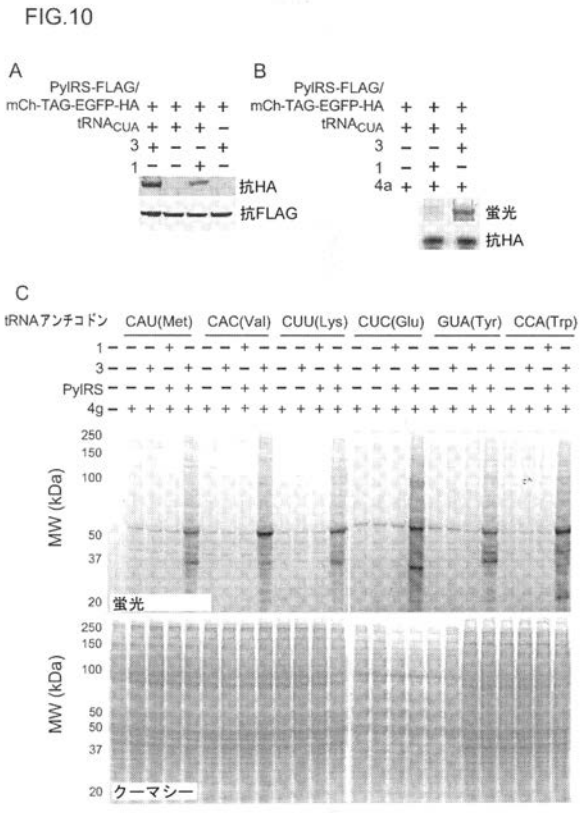
【図８Ｃ】



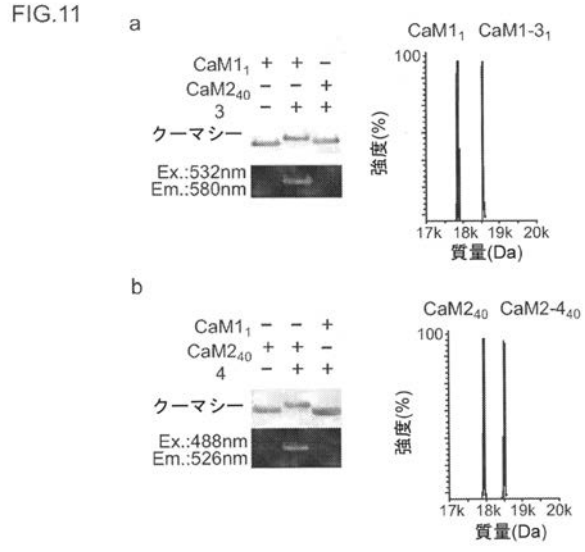
【図９】



【図１０】

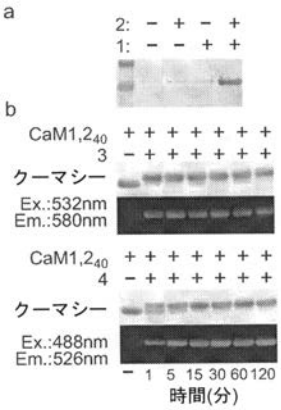


【図１１】



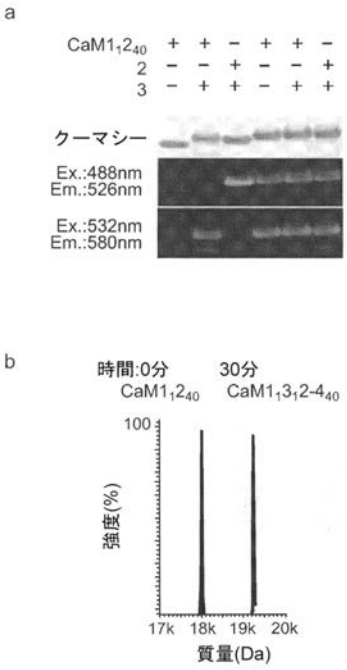
【図１２】

FIG.12



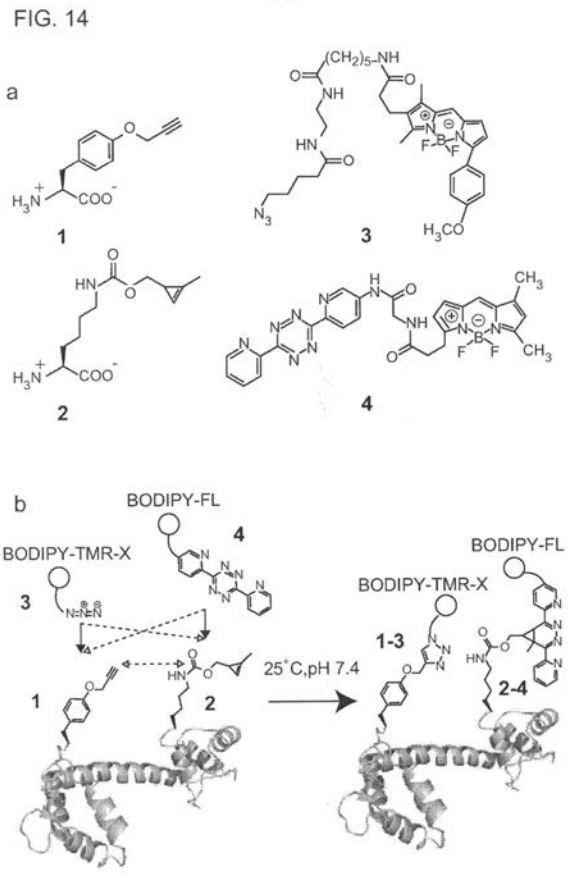
【図１３】

FIG.13



【図１４】

FIG. 14



【図１５－１】

FIG. 15

```
atggtgtccaagggcgaggagctgtttaccggcgtggtgcccattctggtggagctggat
 M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  I  L  V  E  L  D
ggcgacgtgaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgacgccacctat
 G  D  V  N  G  H  K  F  S  V  S  G  E  G  E  G  D  A  T  Y
ggaaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccatggccaacc
 G  K  L  T  L  K  F  I  C  T  T  G  K  L  P  V  P  W  P  T
ctcgtgaccaccctgacctatggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgatcacatgaag
 L  V  T  T  L  T  Y  G  V  Q  C  F  S  R  Y  P  D  H  M  K
cagcacgatttcttcaagagcgccatgcccgagggctacgtgcaggagcgcaccatcttt
 Q  H  D  F  F  K  S  A  M  P  E  G  Y  V  Q  E  R  T  I  F
ttcaaggatgacggcaactacaagacccgcgccgaagtgaagttcgagggcgataccctc
 F  K  D  D  G  N  Y  K  T  R  A  E  V  K  F  E  G  D  T  L
gtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgatttcaaggaggatggaaacatcctgggccac
 V  N  R  I  E  L  K  G  I  D  F  K  E  D  G  N  I  L  G  H
aagctggagtacaactacaacagccacaacgtgtacatcatggccgacaagcagaagaac
 K  L  E  Y  N  Y  N  S  H  N  V  Y  I  M  A  D  K  Q  K  N
ggcatcaaagtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggatggcagcgtgcagctggcc
 G  I  K  V  N  F  K  I  R  H  N  I  E  D  G  S  V  Q  L  A
gatcactaccagcagaacaccccaatcggcgacggcccagtgctgctgcccgataaccat
 D  H  Y  Q  Q  N  T  P  I  G  D  G  P  V  L  L  P  D  N  H
tacctgagcacccagagcgccctgagcaaggaccccaacgagaagcgcgaccacatggtg
 Y  L  S  T  Q  S  A  L  S  K  D  P  N  E  K  R  D  H  M  V
ctgctggagtttgtgaccgccgccggcattaccctgggcatggatgagctgtacaagcgc
 L  L  E  F  V  T  A  A  G  I  T  L  G  M  D  E  L  Y  K  R
gcccagatccacgatctggtgtaggtgggaggatcgacccgcgtgtcgaagggcgaggag
 A  Q  I  H  D  L  V  -  V  G  G  S  T  R  V  S  K  G  E  E
gataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtg
 D  N  M  A  I  I  K  E  F  M  R  F  K  V  H  M  E  G  S  V
aatggacacgagttcgagattgagggcgagggcgagggacgcccatatgagggaaccag
 N  G  H  E  F  E  I  E  G  E  G  E  G  R  P  Y  E  G  T  Q
accgccaagctgaaagtgaccaagggcggacccctgcccttcgcctgggatattctgagc
 T  A  K  L  K  V  T  K  G  G  P  L  P  F  A  W  D  I  L  S
ccccagtttatgtacggcagcaaggcctacgtgaagcaccccgccgatatccccgattac
 P  Q  F  M  Y  G  S  K  A  Y  V  K  H  P  A  D  I  P  D  Y
ctgaagctgagcttcccagagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaatttcgaggacggc
 L  K  L  S  F  P  E  G  F  K  W  E  R  V  M  N  F  E  D  G
ggagtcgtgaccgtgacccaggatagcagtttgcaggatggcgagttcatctacaaagtg
 G  V  V  T  V  T  Q  D  S  S  L  Q  D  G  E  F  I  Y  K  V
aagctgcgcggcaccaacttcccgtccgatggcccagtgatgcagaagaagaccatgggc
 K  L  R  G  T  N  F  P  S  D  G  P  V  M  Q  K  K  T  M  G
```

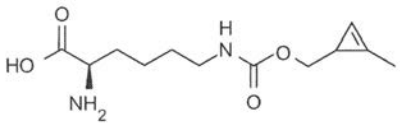
【図１５－２】

FIG. 15続き

```
tgggaggccagcagcgagcgcatgtatccagaggatggcgccctgaagggcgagatcaag
 W  E  A  S  S  E  R  M  Y  P  E  D  G  A  L  K  G  E  I  K
cagcgcctgaagctgaaggatggcggccactacgatgccgaagtgaagaccacctacaag
 Q  R  L  K  L  K  D  G  G  H  Y  D  A  E  V  K  T  T  Y  K
gccaagaagccggtgcagctgccaggcgcctacaatgtgaacatcaagctggatatcacc
 A  K  K  P  V  Q  L  P  G  A  Y  N  V  N  I  K  L  D  I  T
tcccacaacgaggactacaccatcgtggagcagtatgagcgcgccgagggccgccatagt
 S  H  N  E  D  Y  T  I  V  E  Q  Y  E  R  A  E  G  R  H  S
accggcggaatggacgagctgtataagatgtacccctacgatgtgcccgattacgccgag
 T  G  G  M  D  E  L  Y  K  M  Y  P  Y  D  V  P  D  Y  A  E
cagaagctgatctccgaggaggacctgcaccatcaccaccaccacggaagtggcagcggc
 Q  K  L  I  S  E  E  D  L  H  H  H  H  H  H  G  S  G  S  G
tccccaaagaagaagcgcaaggtgtaa
 S  P  K  K  K  R  K  V  -
```

【図１６】

FIG. 16



【配列表】

2017510259000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/050694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/36 C07K14/435 C07K1/13
ADD.

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)
C12N C07K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	THOMAS S ELLIOTT ET AL: "Proteome labeling and protein identification in specific tissues and at specific developmental stages in an animal", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 5, 13 April 2014 (2014-04-13) , pages 465-472, XP055188555, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.2860 the whole document ----- -/--	1-20

[X] 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	Date of mailing of the international search report
18 May 2015	22/05/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fuhr, Christian

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/050694

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	AMIT SACHDEVA ET AL: "Concerted, Rapid, Quantitative, and Site-Specific Dual Labeling of Proteins", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 136, no. 22, 4 June 2014 (2014-06-04) , pages 7785-7788, XP055188528, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja4129789 scheme 1; figure 1	1-20
T	WOLFGANG H. SCHMIED ET AL: "Efficient Multisite Unnatural Amino Acid Incorporation in Mammalian Cells via Optimized Pyrrolysyl tRNA Synthetase/tRNA Expression and Engineered eRF1", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 136, no. 44, 5 November 2014 (2014-11-05), pages 15577-15583, XP055188529, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja5069728 chart 1	1-20
A	ZHIPENG YU ET AL: "Genetically Encoded Cyclopropene Directs Rapid, Photoclick-Chemistry-Mediated Protein Labeling in Mammalian Cells", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 51, no. 42, 15 October 2012 (2012-10-15), pages 10600-10604, XP055069973, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201205352 page 10600 - page 10601	1-20

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2015/050694

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 21, 22
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2015/050694

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 21, 22

The subject matter of claims 21 and 23 is devoid of any technical features, and thus unclear (Article 6 PCT) and unsupported by the description (Article 5) PCT, in a way that they cannot be searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C07C 271/22	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｃ	271/22		４Ｈ０４５
A61K 47/50	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/48		
A61K 47/42	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	47/42		
A61K 39/395	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｍ	
Ｃ１２Ｎ 9/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(74)代理人 100145920
弁理士 森川 聡
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 エリオット トーマス
イギリス国 シービー２ ０キューエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ ケンブリッジバイオメディカルキャンパス フランシスクリックアベニュー エムアールシーラボラトリーオブモレキュラーバイオロジー

Ｆターム(参考) 4B050 CC04 DD02 DD07 LL05
4B064 AG01 CA02 CA10 CA19 CC24 CD13 DA01 DA13
4C076 AA95 CC41 EE41 EE59
4C085 AA14 AA21 AA25 EE01
4H006 AA01 AB46 RA16
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA50 CA40 EA20 EA50 FA74