

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 533995

(P2003 - 533995A)

(43)公表日 平成15年11月18日(2003.11.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	ZNA A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 51数)

(21)出願番号 特願2001 - 586608(P2001 - 586608)

(86)(22)出願日 平成13年5月18日(2001.5.18)

(85)翻訳文提出日 平成14年11月18日(2002.11.18)

(86)国際出願番号 PCT/US01/16210

(87)国際公開番号 W001/090414

(87)国際公開日 平成13年11月29日(2001.11.29)

(31)優先権主張番号 60/206,016

(32)優先日 平成12年5月19日(2000.5.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ウィリアムズ、 リチャード、 ビー .
WILLIAMS , RICHARD ,
B .
アメリカ合衆国 91030 カリフォルニア州
サウス パサディーナ オレンジ グロ
ープ アヴェニュー 1104

(72)発明者 ウィリアムズ、 リチャード、 ビー .
アメリカ合衆国 91030 カリフォルニア州
サウス パサディーナ オレンジ グロ
ープ アヴェニュー 1104

(74)代理人 弁理士 金田 暢之 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸およびコードされたポリペプチドの *in vitro* での展開

(57)【要約】

本発明は、既知または未知の配列を有する mRNA を翻訳されたタンパク質と連結することにより、同族対合を形成することによって、所望のタンパク質または核酸分子を選択するための方法および試薬に関する。同族対合は、タンパク質または核酸の所望の性質に基づいて選択する。本法は、選択した同族対合の核酸部分を増幅すること、核酸中に変異を導入すること、核酸を翻訳すること、核酸をそのタンパク質と結合することにより第 2 の同族対合を形成すること、およびこの同族対合を所望の性質に基づいて再選択することによる、所望のタンパク質または核酸分子の展開も含む。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望のタンパク質または核酸分子を選択する方法であって、少なくとも2個の候補mRNA分子を提供し、前記mRNA分子の少なくとも1個が停止コドンおよび疑似停止コドンからなる群から選択される少なくとも1個のコドンを含んでいることと、

前記候補mRNA分子の少なくとも2個を翻訳することによって、少なくとも1個の翻訳タンパク質を生成することと、

前記候補mRNA分子の少なくとも1個を対応する翻訳タンパク質に連結することによって、少なくとも1個の同族対合を形成することと、

前記翻訳タンパク質または前記mRNA分子の性質に基づいて前記同族対合の1個または複数個を選択することと、

前記の選択同族対合のmRNA分子、前記mRNA分子に相補的な核酸分子および前記mRNA分子に相同性の核酸分子からなる群から選択された分子を同定することを含んだ、前記翻訳タンパク質または前記の所望核酸分子を選択すること

を含む方法。

【請求項2】 前記候補mRNA分子の少なくとも1個および少なくとも1個の前記翻訳タンパク質を、tRNA、修飾tRNAおよびtRNA類縁体からなる群から選択されるtRNA分子によって連結する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記tRNA分子を、リボソームのペプチジルトランスフェラーゼによって前記翻訳タンパク質に接続する請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記tRNA分子を、前記tRNA分子のアンチコドンとRNAメッセージのコドンとの間の紫外光誘発架橋を介してmRNAに接続する請求項2に記載の方法。

【請求項5】 前記tRNA分子を、チオウラシルによってmRNAに接続する請求項2に記載の方法。

【請求項6】 前記tRNA分子を、ソラーレン架橋によってmRNAに接続する請求項2に記載の方法。

【請求項7】 前記tRNA分子を、ソラーレンー付加体を用いることによ

ってmRNAに接続する請求項2に記載の方法。

【請求項8】 前記ソラーレー付加体を、前記mRNA上に配置する請求項7に記載の方法。

【請求項9】 前記ソラーレー付加体を、前記tRNA分子のアンチコドン上に配置する請求項7に記載の方法。

【請求項10】 前記ソラーレー付加体を、前記tRNA分子の停止アンチコドン上に配置する請求項7に記載の方法。

【請求項11】 前記ソラーレー付加体が、架橋を形成後、前記架橋を光で戻すか、または可視光を用いることによって生成する請求項7に記載の方法。

【請求項12】 前記tRNA分子が、安定なペプチド受容体を有する請求項2に記載の方法。

【請求項13】 ペプチド鎖を受容し、かつ、ペプチジルトランスフェラーゼがその鎖を引き剥がすことができないように、安定に前記鎖を保持するために、前記tRNA分子を修飾する請求項2に記載の方法。

【請求項14】 リボソームに結合し、ペプチド鎖を受容し、その後、次のペプチド転移反応において供与体として作用しない結合を用いることによって、前記tRNA分子を修飾する請求項2に記載の方法。

【請求項15】 前記結合を、3'デオキシアデノシンの2'エステルおよびアミノアシルtRNA_{ox-red}からなる群から選択する請求項14に記載の方法。

【請求項16】 アミノ酸またはアミノ酸類縁体を安定な結合で前記tRNA分子の3'末端に結合することによって、安定なアミノアシルtRNA類縁体を生成する請求項2に記載の方法。

【請求項17】 前記翻訳を*in vitro*で行う請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記翻訳を*in situ*で行う請求項1に記載の方法。

【請求項19】 前記同族対合をリガンド結合性に基づいて選択する請求項1に記載の方法。

【請求項20】 前記の所望核酸分子の選択が、

予め定めた位置に配置した核酸のアレイを有することと、
前記同族対合の少なくとも1個を前記アレイ上にハイブリッド形成させること
と、
タンパク質同定剤との反応に基づいてそのmRNAを同定すること
を含む請求項1に記載の方法。

【請求項21】 タンパク質同定剤との前記反応を、リガンド結合、免疫沈
降および酵素反応からなる群から選択する請求項20に記載の方法。

【請求項22】 未付加の安定なアミノアシルtRNA類縁体に結合した少
なくとも1つのソーレーン付加体、またはオリゴヌクレオチドに結合した少
なくとも1つのソーレーン付加体を含む同族対合生成キット。

【請求項23】 所望のタンパク質配列を展開させる方法であって、
請求項1に記載の方法に従って、前記第1の翻訳タンパク質または前記mRNA
Aの少なくとも1つの所望の特性に基づいて前記第1の同族対合の少なくとも1
つを選択することと、

少なくとも1つの回収同族対合を生成するために、前記の所望特性を有する前
記第1の同族対合の少なくとも1つを回収することと、

前記回収同族対合の1つまたは複数の第1の核酸成分を増幅することと、

1つまたは複数の遺伝的変異を有する前記第1の核酸成分の少なくとも1つを
含む少なくとも1つの第2の核酸成分を産生することと、

前記第2の核酸成分の少なくとも1つを翻訳することによって、少なくとも1
つの第2のタンパク質を産生することと、

1つまたは複数の第2の同族対合を生成するために、前記第2のタンパク質の
少なくとも1つを前記第2の核酸成分の少なくとも1つと連結することと、

少なくとも1つの所望の性質に基づいて、前記第2の同族対合の1つまたは複
数を再選択することにより所望のタンパク質配列を得ることにおいて、前記所望
の性質が前記の所望特性と同じであるか、または異なること

を含む方法。

【請求項24】 前記の所望特性を結合性、酵素反応および化学修飾からな
る群から選択する請求項23に記載の方法。

【請求項25】 前記第1の同族対合の少なくとも1つの選択が、
所望の結合特性を有する第1のリガンドを提供することと、
前記第1の同族対合の1つまたは複数を前記第1のリガンドと接触させること
によって、未結合複合体および結合複合体を生成することと、
結合複合体または未結合複合体のいずれかを回収することと、
回収複合体の少なくとも1つの核酸成分を増幅することと、
前記回収複合体の前記核酸成分の配列に変異を導入することと、
前記核酸成分から1つまたは複数の第2のタンパク質を翻訳することと、
前記第2のタンパク質の少なくとも1つを前記第2の核酸成分の少なくとも1
つと連結することによって、1つまたは複数の第2の同族対合を生成することと
、
前記第2の同族対合の前記少なくとも1つを少なくとも1つの第2のリガンド
と接触させることにより、前記第2の同族対合の1つまたは複数を選択すること
によって所望のタンパク質配列を得ることにおいて、前記第2のリガンドが前記
第1のリガンドと同じであるか、または異なること
を含む請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(技術分野)

本発明は、核酸およびポリペプチドを選択するための組成物および方法に関する。

【0002】

(背景技術)

リガンド - 受容体相互作用は、基礎的な生物学的部位の認識機構の解明から薬物スクリーニングおよび合理的薬物設計に亘る様々な理由から興味深い。選択された標的に優先的に結合する大集団から分子を選択し、次いで、後に再選択するためにそれらの分子を増幅し、かつそれらに変異を起こすことによって、核酸の *in vitro* での展開を推進することが何年も以前から可能となった (Turk and Gold, Science 249:505 (1990))。

【0003】

タンパク質を用いて選択過程を行うことができれば、極めて有用と思われる。これによって、選択されたりガンドに特異的に結合するタンパク質の *in vitro* での設計および生産が可能になると思われる。核酸と比較して、タンパク質の使用はタンパク質中の12種の多様なアミノ酸側鎖が、核酸側部の4種の同様な鎖よりはるかに多数の結合上の可能性を有するので、特に有利である。更に、多くの生物学的ならびに医学的に関連するリガンドがタンパク質に結合する。

【0004】

核酸及びタンパク質いずれの展開法 (Evolution Method) において、試験分子の大きく非常に多様な集団へのアクセス、その集団における所望の性質を示すメンバーを選択するための手法、および、その後の選択のための他の集団を得るための変異で起こる変異を有する選択された分子の再生産を可能にすることが求められている。

【0005】

タンパク質での展開法を開発する従来の試みは、タンパク質に再生産能力がないこと、およびポリペプチドをコードする mRNA をその翻訳産物と連結するこ

とができないことによって、主に制限されていた。その上、大きなペプチドライブラリーの生成およびスクリーニング法のために、その過程が *in vivo* の発現段階を通ることが最近まで要求された。それらの例の中には、酵母2または3ハイブリッド法、酵母ディスプレイ法およびファージディスプレイ法が含まれる (Fields and Song, *Nature* 340:245 (1989); Licitra and Liu, *PNAS* 93:12817 (1996); Boder and Wittrup, *Nat Biotechnol* 15:553 (1997); および Scott and Smith, *Science* 249:386 (1990))。 *in vivo* 法は、ライブラリーの限りある大きさ、面倒なスクリーニング段階を含む様々な欠点を有する。その上、宿主細胞上の制約によって、好ましくない淘汰圧が変異体の生成に掛かる恐れがある。

【0006】

in vitro 法は更に最近になって開発されてきたもので、リボソームディスプレイ等の原核および真核 *in vitro* 翻訳系を用いている (Mattheakis et al., *PNAS* 91:9022 (1994); Hanes and Pluckthun, *PNAS* 94:4937 (1997); Jermutus et al., *Current Opinion in Biotechnology* 9:534 (1998))。これらの方法では、タンパク質およびそれをコードする mRNA がリボソームともに連結され、その複合体全体が選択すべきリガンドに対してスクリーニングされる。この方法の問題点として考えられることには、リボソームのサイズが大きいことが含まれ、それが結合した相対的にかなり小さいタンパク質のスクリーニングを妨害する恐れがある。

【0007】

1997年、2つの研究グループが、リンカーDNAに結合したピューロマイシンと共にリボソームペプチジルトランスフェラーゼ (Ribosomal peptidyl transferase) を用いることによって、翻訳中にタンパク質を、それをコードする配列 (コーディング配列) と結合する *in vitro* の方法を開発した (Szo

stak et al., 国際特許公報WO98/31700; Roberts and Szostak, PNAS 94:12297 (1997); Nemoto et al., FEBS Letters 414:405 (1997) であって、いずれも参考のために本明細書に組み込んである)。コーディング配列とペプチドが一旦結合すると、そのペプチドは選択されたリガンドに曝される。リガンドによるペプチドの選択または結合は、結合しているコーディング配列も選択し、次いでそれを標準的手段によって再生産することができる。RobertsとSzostakおよびNemoto等は、共にDNAリンカーや非翻訳性の他の鎖によって、コーディング配列の3'末端にピューロマイシン分子を結合する技法を用いた。ピューロマイシンは、リボソームペプチジルトランスフェラーゼの作用下で発生時のペプチド鎖を受容し、それを安定かつ不可逆的に結合することによって、翻訳を停止するtRNA受容体幹部の類縁体である。これらの方法はある種の欠点を有する。例えば、各ペプチドをコードするコーディング配列は既知のものであって、最初も各選択の間にも修飾されねばならない。したがって、天然の未知のmRNAを選択するために、RobertsやNemotoの方法を使用することはできない。更に、コードコーディング配列の修飾のために、プロセスに数段の工程が加わることになる。最後に、リンカー分子上の結合ピューロマイシンは、コーディング配列を読むリボソームや近くのリボソーム上のA部位を求めて、翻訳反応において天然tRNAと競合し、したがって、翻訳反応溶液中の未結合ピューロマイシンと全く同様に、翻訳過程を「被毒させる」恐れがある。ピューロマイシンとリボソームとの偶然の相互作用で、2種の反応非特異性、即ち未成熟で短縮したタンパク質および誤ったメッセージに結合したタンパク質が生じ得る。A部位およびペプチジルトランスフェラーゼのピューロマイシンに対する親和性を、 Mg^{++} 濃度によって調節し得ることを示す従来技術における報告がある(参考のために本明細書に組み込んであるRoberts, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268 (1999))。第1種の非特異的な、すなわち翻訳の未成熟終結を制御するために Mg^{++} 濃度が滴定されてもよく、これは、第2型、即ち不正確なmRNA-タンパク質連結に影響することはない。

【0008】

したがって、核酸配列に関する予備知識や核酸の反復化学修飾を必ずしも必要とせず、mRNAをそのタンパク質に正確に連結することのできる、核酸に基づく *in vitro* タンパク質展開システムに対する要求が存在する。

【0009】

(発明の開示)

本発明は、タンパク質および核酸の所望の性質を選択し、展開するための組成物および方法を提供する。様々な実施形態において、本発明は修飾 tRNA および tRNA 類縁体を提供する。他の実施形態には、ポリペプチドを生成する方法、ポリペプチド集団中の所望の特性を有する個々のメンバーの選択を可能にするアッセイ、このような選択されたポリペプチドをコードする核酸を増幅する方法、および強化された性質をスクリーニングで選択するために新しい変異体を生成する方法が含まれる。

【0010】

いくつかの実施形態では、修飾 mRNA をなお使用してもよいが、本発明によって、天然の mRNA の修飾を必要とせずにタンパク質をそのメッセージに結合することができる。本発明の様々な態様において具体化された各方法の特異性は、コドン - アンチコドン相互作用の特異性によって決定される。

【0011】

好ましい実施形態では、本発明によって、核酸がコードするタンパク質の選択によってその核酸の選択が可能となる。翻訳終結時にタンパク質をその同族 mRNA (cognate mRNA) に接続し、その次に、タンパク質と mRNA の両方を tRNA または tRNA 類縁体に接続することによって、これを実現し得る。

【0012】

本発明の好ましい一実施形態には、ポリペプチドをコードする核酸とそのポリペプチドを、tRNA に共有結合で連結することのできる tRNA 分子が含まれるが、その場合に、核酸の連結はポリペプチドの連結以外の tRNA の一部で起こり、tRNA は tRNA のアンチコドンと結合した連結分子を含んでいる。好ましくは、アミノ酸またはアミノ酸類縁体を安定な結合で tRNA 分子の 3' 末

端に結合することによって、安定なアミノアシル tRNA 類縁体 (SATA) を生成する。

【0013】

他の実施形態には、好ましくはリーディングフレームの3'領域、より好ましくはリーディングフレームの大部分の3'コドン、最も好ましくはリーディングフレームの3'停止コドンに配置したソラーレン (psoralen) を含んだ mRNA が含まれる。好ましい実施形態では、tRNA と mRNA の間の連結は架橋ソラーレン分子、より好ましくはフラン側のソラーレン一付加体である。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態には、核酸、tRNA、および mRNA でコードされるポリペプチドと一緒に安定に連結することによって、連結した mRNA - ポリペプチド複合体を形成する方法が含まれる。好ましい一実施形態では、その核酸は mRNA である。更に本法は、複数の相異なる核酸 - ポリペプチド複合体の提供、所望の結合特性を有するリガンドの提供、複合体とリガンドとの接触、未結合複合体の除去、およびリガンドに結合した複合体の回収を含むことができる。

【0015】

本発明のいくつかの方法では、核酸分子および/またはタンパク質の展開を含む。一実施形態では、本発明は、回収複合体の核酸成分の増幅およびその核酸の配列への変異の導入を含む。他の実施形態では、本法は更に、増幅し、変異した核酸からポリペプチドを翻訳すること、tRNA を用いてそれらを連結すること、およびそれらをリガンドと接触させることによって、結合複合体の他の新集団を選択することを含む。本発明のいくつかの実施形態では、in vitro 展開の過程、特に選択された mRNA を変異と共に再生産し、翻訳し、選択のために再び同属のタンパク質に接続する反復過程において選択されたタンパク質 - mRNA 複合体を使用する。

【0016】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明の様々な実施態様は、メッセンジャー RNA (mRNA) をそれから翻

訳されたタンパク質産物に連結し、「同族対合 (cognate pair)」を形成する tRNA 機構を使用する。いくつかの実施形態において、配列の不明な mRNA を発現することができ、そのタンパク質を所望または選択した性質を有するリガンドに対する選択過程を通してそのタンパク質の特性が決定され、かつタンパク質展開を起こすことになる核酸展開が *in vitro* で行なわれることによって、強化された性質を有する分子を得ることができる。同族対合は、連結している tRNA、修飾された tRNA、または tRNA 類縁体を介して結合するのが好ましい。好ましい一実施形態において、その tRNA は、リボソームペプチジルトランスフェラーゼによって発生時のペプチドに接続され、tRNA または tRNA 類縁体のアンチコドンと RNA メッセージのコドンの間の紫外光誘発架橋によって mRNA に接続される。これは例えばチオウラシルによってなし得るが、好ましい一方法では、そのリンカーは、mRNA 上または好ましくは選定された tRNA アンチコドン上に予備配置したソラーレン一付加体から作られるソラーレン架橋である。好ましくは、tRNA 停止アンチコドンを選択する。停止コドン/アンチコドン対合は完全長転写物のために選択される。当業者であれば、停止コドンをもたない mRNA も使用し得るし、いずれかのコドンまたは核酸三塩基連鎖も使用し得ることは理解されよう。天然にないアンチコドンをもつ tRNA は、当分野で知られている方法に従って合成することができる (例えば、図 3)。

【0017】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、任意の形態 (例えば、D または L アミノ酸、ペプチド結合を介して重合し得る合成または修飾アミノ酸等) のアミノ酸からなる 2 単位以上のポリマー分子を意味すると本明細書では定義し、これらの用語は本明細書では相互に入れ替えて使用してよい。

【0018】

「疑似停止コドン」という用語は、当然ナンセンスコドンではないが、メッセージが更に翻訳されるのを防止するコドンを意味するものと本明細書では定義する。疑似停止コドンは、以下に記載のように「安定なアミノアシル tRNA 類縁

体」即ちSATAを用いることによって、創製し得る。このように、疑似停止コドンはSATAによって認識され、SATAに結合するコドンである。疑似停止コドンを創製する他の方法は、疑似コドンに相補性のアンチコドンを有する必要なtRNAが、実質的に消滅する人工の系を創製することである。したがって、tRNAが不在であることが要求されるとき、すなわち、疑似停止コドンにおいて翻訳が停止する。当業者であれば、本明細書に定義する疑似停止コドンを創製する多数の方法があることを認識されよう。

【0019】

mRNAとそのタンパク質産物との接続の形成には、所定の特性を有するtRNAまたはtRNA類縁体が一般に必要とされる。本発明のいくつかの実施形態では、tRNAまたはtRNA類縁体が安定なペプチド受容体を有することになる。この修飾によって、リボソームペプチジルトランスフェラーゼの作用で発生時のペプチド鎖を受容した後、ペプチジルトランスフェラーゼがその鎖を引き剥がすことのないように安定にそれを保持するように、tRNAまたはtRNA類縁体が増化する。これは、3'デオキシアデノシンまたはアミノ「アシルtRNA_{ox-rred}」上の2'エステルのように、リボソームに結合し、ペプチド鎖を受容し、その上次のペプチド転位反応において供与体として作用しない結合を用いることによって、なし得る(Chinali et al., Biochem. 13:3001(1974); Krayevsky and Kukhanova, Prog. Nuc. Acid Res 23:1(1979) and Sprinzl and Cramer, Prog. Nuc. Acid Res 22:1(1979))。

【0020】

好ましい一実施形態において、アミノ酸またはアミノ酸類縁体を安定な結合によってtRNAまたはtRNA類縁体の3'末端に結合する。この安定な結合は、自然の構造中でのこれらの2つをつなぐ不安定で高エネルギーのエステル結合とは対照的である。その安定な結合は、ペプチジルトランスフェラーゼの作用からその結合を保護するだけでなく、その後の段階中でもその構造を保存する。便宜上、この修飾tRNAまたはtRNA類縁体を、「安定なアミノアシルtRNA

A類縁体」またはSATAと呼ぶことにする。本明細書で使用する場合、SATAは、その同族コドンがリボソームの読取り位置内にあるとき、リボソームペプチジルトランスフェラーゼの作用によってペプチド鎖を受容することができるように、選択されたコドンを認識することのできるものである。そのペプチド鎖は、安定に結合され、ペプチジルトランスフェラーゼによって外すことができないように結合される。好ましくは、選択されたコドンは水素結合によって認識される。

【0021】

SATAを創製する一方法は1973年に公表された(Fraser and Rich, PNAS 70:2671(1973))。この方法では、tRNAまたはtRNA類縁体の3'-アミノ-3'-デオキシtRNAへの変換が行われる。これは、蛇毒ホスホジエステラーゼで自然のtRNAからそれに固有のアデノシンを除去した後、その末端にtRNAヌクレオチジルトランスフェラーゼで3'-アミノ-3'-デオキシアデノシンを付加することによって、実現される。次いで、この修飾tRNAに各アミノアシルtRNAシンテターゼ(aARS)によってアミノ酸を加える。FraserおよびRichは、2'ではなく、3'ヒドロキシルでtRNAにアミノ酸が付加されたaARSを使用した。そのアミノ酸は、普通の不安定で高エネルギーのエステル結合ではなく、安定なアミド結合によってtRNAに結合される。こうして、tRNAがリボソームペプチジルトランスフェラーゼからペプチドを受容するとき、それはペプチドを安定に保持し、他の受容体に与えることはできないものとなる。

【0022】

好ましい一方法では、SATAは、コドンとアンチコドンの間のソーレン架橋によって、翻訳されるメッセージに結合されることになる。ソーレン架橋は、相補性の5'ピリミジン-プリン3'配列、特にUAまたはTA配列を含んだ配列の間で選択的に生成する(Cimino et al., Ann. Rev. Biochem. 54:1151(1985))。SATAをコードするコドン、即ち連結コドンは、PYR-PUR-XまたはX-PYR-PURであってよく、したがっていくつかのコドンを連結コドンに使用し得る。都合良いことに、

停止またはナンセンスコドンがこの配置を有している。アミノ酸をコードするコドンを用いると、遺伝暗号に対する小規模の調整が必要となり、応用によっては複雑になる場合があり得る。したがって、好ましい一実施形態では、停止コドンを選択コドンに使用し、SATAは、それが選択コドンを選択するナンセンスサブレッサーとして機能する。しかし、当業者であれば、その系に適切な調節を加えることで、任意のコドンを使用し得ることを認識されよう。

【0023】

FraserおよびRichはE. coliで研究したが、最も有効なin vitro翻訳系は真核細胞を用いた系である。真核翻訳系における原核サブレッサーの使用が可能である(Geller and Rich Nature 283:41(1980); Edwards et al PNAS 88:1153(1991); Hou and Schimmel Biochem 28:6800(1989))。それらは主に常在性のaaRSに限定されている。tRNAまたは類縁体を原核系に導入し、次いで確立された方法(Lucas-Lenard and Haenni, PNAS 63:93(1969))に従って精製することができるので、この制約は本発明の様々な実施形態によって克服される。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態では、tRNAまたは類縁体に使用するのに適した受容体幹部の修飾は、当分野で知られている様々な方法によって生成することができる。このような方法は、例えばSprinzl and Cramer, Prog. Nuc. Acid Res. 22:1(1979)に見出される。他の一実施形態では、「転写tRNA(Transcriptional tRNA)」即ち、転写後プロセッシングの後ではないときに転写されるようなtRNAの配列により、tRNAにおいて共通の非典型的な修飾された塩基が導かれる。これらの転写tRNAは、tRNAとして機能することができる(Dabrowski et al., EMBO J. 14:4872, 1995; およびHarrington et al., Biochem. 32:7617, 1993)。転写tRNAは、転写によって生成することができ、または(Dharmacon Resear

ch Inc.、Boulder, CO.から入手できるもの等の)市販のRNA配列を一緒に、図3のように一片ずつ、または確立された方法の何らかの組合せで接続することによって、作製することができる。例えば、5'リン酸および3'ピューロマイシンは、オリゴヌクレオチドに結合した形で市販されている。これらの断片は、当分野で良く知られているように、T4 DNAリガーゼを用いて一緒に接続することができる(Moore and Sharp, Science 256:992, 1992)。あるいは、好ましい一実施形態では、T4 RNAリガーゼが使用される(Romaniuk and Uhlenbeck, Methods in Enzymology 100:52(1983))。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態では、ソーレン連結オリゴヌクレオチドを含む断片からのtRNA構築(図3)、あるいは自然または修飾tRNAまたは類縁体への一付加(図4)によって、ソーレンはSATAに一付加される。

【0026】

いくつかの実施形態では、発生時のタンパク質がペプチジルトランスフェラーゼによってSATAに結合されると、翻訳が停止する。多数のリボソームがこの位置にあると、SATAとmRNAがUV光で接続される。好ましい一方法では、ソーレン架橋を形成することによって、これが実現されると思われる。ソーレンはフラン側およびピロン側を有しており、それらは二本鎖DNA、二本鎖RNAおよびDNA-RNAハイブリッド中の相補的塩基対の間に容易にインターカレートされる(Cimino et al., Ann. Rev. Biochem. 54:1151(1985))。好ましくは320nmから400nmの範囲のUVで照射すると架橋が起こり、位置ずれしたピリミジン同士が共有結合されたままとなる。架橋を形成し、それらを光で戻すか、または選択した波長を用いることによって、以下にもっと十分に記述する一付加体を形成することが可能である。これらはピロン側、フラン側のいずれかへの一付加体であると思われる。更に照射すると、フラン側一付加体を相補的塩基対に共役結合で架橋することができる。ピロン側一付加体を更に架橋することはできない。フラン側ソー

レンー付加体 (M A f) の形成も確立された方法に従ってなされる。好ましい一方法では、ソラーレンはS A T Aのアンチコドンに結合される。しかし、図4に描かれているように、ソラーレンをメッセージのリーディングフレームの末端で結合することもできる。

【0027】

オリゴヌクレオチド上の精製M A fの大規模生産方法は、資源がより少なくてすむ方法として文献(例えば、Speilmann et al., PNAS 89:4514、1992)に記載されているが、非架橋性ピロン側ソラーレンー付加体によりある程度汚染される(例えば、米国特許第4599303号; Gamper et al., J. Mol. Biol. 197:349(1987); Gamper et al., Photochem. Photobiol. 40:29(1984))。本発明のいくつかの実施形態では、ソラーレン標識はいずれの方を使っても行われる。好ましい一実施形態では、米国特許第5462733号およびGasparro et al., Photochem. Photobiol. 57:1007(1993)に記載の方法に従って、フラン側ー付加体が、好ましくは約400nm~420nmの範囲の可視光を用いて創製される。本発明の一態様では、mRNAの3'末端に配置するための、フラン側ー付加体を有するS A T Aまたは一付加オリゴヌクレオチドが、未付加S A T Aと共にキットの基本として提供される。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態におけるS A T Aおよびー付加体の使用は、in vitro翻訳系にとって特に有利である。しかし、当業者であれば、in situ系も使用することができることを認識されよう。本発明の様々な実施形態は、ウサギ網状赤血球溶解物(RLL)、コムギ胚、E. coli、酵母溶解系の各系等を含むが、それらに限らない任意のin vitro翻訳系に適用し得る。本発明の多くの実施形態は、異なる系の成分を組み合わせるハイブリッド系で使用する場合にも良く適している。

【0029】

3'アミド結合でアミノアシル化されたtRNAは、A部位への結合を促進す

る伸長因子EF-TUと結合しないと報告されている (Sprinzl and Cramer, Prog. Nuc. Acid Res. 22:1 (1979))。しかし、このような修飾tRNAはA部位に結合する。3'修飾tRNAのこの結合は、Mg⁺⁺濃度を変えることによって増加させることができる (Chinali et al., Biochem. 13:3001 (1974))。SATAおよびMg⁺⁺の適当な濃度および/またはモル比は、実験的に決定することができる。SATAの濃度またはA部位親和性が高すぎると、そのSATAは、非同族コドンに対して、自然のtRNAと競合する、即ちピューロマイシンに良く似た機能を示し、翻訳を遅らせる恐れがある。SATAの濃度またはA部位親和性が低すぎると、そのSATAは放出因子と有効に競合しない、即ち有効なナンセンスサプレッサーtRNAとして作用しない。これらの間の均衡は、実験的に決定することができる。

【0030】

伸長因子はコドン-アンチコドン認識のプルーフリーディング (proofreading) を促進するとも考えられている。伸長因子および関連するGTPの加水分解がない場合の誤訳率は、ヌクレオチド1個離れたコドンに対して1/100であると見積られている (Voet and Voet, Biochemistry 2nd ed., 1000~1002ページ (1995), John Wiley and Sons)。好ましい一実施形態では、UAAが連結コドンとして使用される。連結コドンとしてのUAAに対しては、1個のアミノ酸が異なる7個の非停止コドンがある。これは、非停止コドンの7/61、即ち約11.5%である。所与のコドンをミスコードする確率を、1コドン当たり(0.01)(0.115) = 1.15 × 10⁻³個のミスコードと見積ることができる。したがって、本発明の様々な方法の性能に実質的に障害を及ぼさないとと思われる頻度の、約870個のコドン毎に1個のミスコードが予想されよう。他の実施形態では、UAGが連結コドンとして使用される。

【0031】

いくつかの実施形態では、適当な濃度のSATAおよびMg⁺⁺は、プール中のmRNA分子の存在下、in vitro翻訳系、例えばRRL中で使用され、

S A T A がペプチド鎖を受容することを可能にするコドン（前記の連結コドン）にリボソームが到達したときに、翻訳を終結させる。短時間内に、連結コドンの大部分がリボソーム内でS A T A によって占有される。好ましい一実施形態では、次いでその系に好ましくは約320 nmから400 nmのUV光を照射することになる。核酸は、普通この波長領域に透明、即ちそれを吸収しない。照射すると、ソーラーレーン付加体は、安定な共有結合によってアンチコドンとコドンを接続する架橋に変換することになる。

【0032】

好ましい一実施形態では、標的のmRNAが予備選択される。他の実施形態では、標的mRNAが人工的に生産される。他の一実施形態では、その標的が研究中の系で自然生成したメッセージからなるが、それらは未知および/または未同定であってもよい。未知および/または未同定のmRNAを使用し得ることは、本発明のいくつかの実施形態の特別な利点である。

【0033】

いくつかの実施形態では、全ての発生時のタンパク質が同族mRNAに接続されてしまうと、リボソームが放出されるか、変性される。好ましくは、これは、透析、単純な希釈、またはキレート化によるMg⁺⁺の枯渇によって実現される。当業者であれば、イオン強度、pHまたは溶媒系の変化による変性を含むが、それに限らない他の方法も使用し得ることを理解されよう。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態では、同族対合の選択は、アフィニティーカラム、免疫沈降、および多くの高処理量スクリーニング手順を含むが、それらに限らない確立された多様な方法のいずれかによるタンパク質の親和性結合に基づいて行われる。タンパク質、核酸、化学的化合物、ポリマーおよび金属を含むが、それらに限らない多様なリガンドも使用してよい。その上、同族対合を結合させるために、細胞膜または受容体、または細胞全体でさえ使用してもよい。その選択は陽性的の場合も陰性的の場合もある。即ち、選択した同族対合がリガンドに良く結合する場合も、そうでない場合もある。例えば、タンパク質が熱力学的に有利な反応を加速する、即ちその反応の酵素として作用するためには、そのタンパク質

が基質にも遷移状態類縁体にも結合すべきである。しかし、遷移状態類縁体は基質よりはるかに強固に結合すべきである。これは次式によって示され、

【0035】

【数1】

$$\frac{k_{enzyme}}{k_{\phi enzyme}} = \frac{K_{trans}}{K_{subst}}$$

【0036】

式中において、酵素を用いた反応速度 k_{enzyme} の酵素を用いない反応速度 k_{enzyme} に対する比は、遷移状態の酵素への結合 K_{trans} の基質の酵素への結合 K_{subst} に対する比に等しい (Voet and Voet, Biochemistry 第2版、380ページ(1995)、John Wiley and Sons)。

【0037】

好ましい一実施形態では、基質への結合に対して競合性が低く、遷移状態類縁体への結合に対して競合性が高い各タンパク質が選択される。操作上は、基質または基質類縁体を結合したマトリックスから容易に流出し、遷移状態類縁体を結合したマトリックスから除去するのが最も困難な各タンパク質を採取することによって、これを実現し得る。逐次この選択を反復し、同族対合の核酸の複製および翻訳を介して各タンパク質を再生産することによって、改良された酵素が展開するはずである。同じ選択過程におけるある物への親和性および他の物への親和性欠如を、本発明のいくつかの実施形態で使用する。多くの実施形態では、RNAによって選択を行うこともできる。

【0038】

選択によって同族対合の集団が同定されてしまうと、mRNA鎖を再生産するために、SATAからその鎖を引き剥がすのが都合良いかもしれない。これは必ずしも必要ではないが、好ましくは約313nmか、わずかに低いUVでその対

合を照射することによって、実現し得る。この波長は、ソーレン架橋を光でM Afに戻し、核酸には最小限の傷害しか与えない波長と確認された。光戻しに対する核酸傷害の比は、600塩基中の1塩基に対して、1回の光戻しでの障害があると見積られている(Cimino et al., Biochem 25: 3013 (1986))。

【0039】

当業者であれば、RNA依存性RNAポリメラーゼによる方法、または逆転写およびPCRによる方法を含むが、それらに限らない多くの方法で、mRNAを再生産できることを認識されよう。この再生産は、同族対合から分離したmRNAを用いて、例えば自然生成した未知のメッセージのポリAテールにハイブリッド形成するために、例えばポリTまたはポリUを用いて、あるいは、同族対合をそのままにし、既知のメッセージに対するリーディングフレーム中に部分的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドプライマーを用いることによって、行うことができる。あるいは、cDNA末端を急速に増幅するための市販キットを用いてもよい。単にタンパク質を選択するためでなく、タンパク質を展開させるためにこれを用いる場合、タンパク質中の各位置において少なくとも1個のアミノ酸置換を試すのが好ましいと思われる。

【0040】

複製閾値

有効な展開のための名目的な最小複製数(nominal minimum number)は、以下の公式を用いて見積ることができる。長さがn配列で、変異率pを有するr回の変異を経て選択改良をする配列があるとすると、複製時に選択改良を起こす確率は以下のように決定し得る。

【0041】

r = 1 に対しては、正しい点における変異の確率p、掛ける、出発点とは異なる3個のヌクレオチド中の正しい1個に変異が起きる確率1/3、掛ける、その他のn - 1部位が変異を受けないままの確率(1 - p)(n - r)、即ち

【0042】

【数2】

$$P_r = \left(\frac{p}{3}\right)^1 (1-p)^{(n-1)}$$

【0043】

であり、ここでPはr回の変異を経て所与の変化を実現する確率である。もっと一般的には、全てのr値に対して：

【0044】

【数3】

$$P_r = \left(\frac{p}{3}\right)^r (1-p)^{(n-r)}$$

【0045】

1回の優勢変異の経過を見出す確率と、3回の変異を経た確率と比較すると、教示が得られる。これは、3塩基連鎖の遺伝暗号が与えられているとすると、任意の所与のコドンが、1回の変異で他の9種のコドンにしか変化することができないからである。実際には、1回の変異で他の9種のアミノ酸暗号に実際に変化し得るコドンはないことが判明している。1回の変異で入手し得る最大のアミノ酸数は7アミノ酸であり、これをなし得るコドンは64個中8個しかない。大部分のコドンは、1回の変異で他の19アミノ酸からの5または6種のアミノ酸となる。始めのアミノ酸と異なる19種全てのアミノ酸に到達するには、一般に3回の変異が必要である。そのうち2回の割り込む変異は一般に選択的に優勢とは思われないので、これら3回の変異が順次起こることはできない。したがって、20種のアミノ酸全てを使用するためには、少なくとも大きさが3回の変異（ $r = 3$ ）である段階を使用する必要がある。

【0046】

「間違い易いPCR (error - prone PCR)」で報告されている変異率の0.0067に対して、アミノ酸100個の短いタンパク質を与えるヌクレオチド30

0個のメッセージを用いると：

$$P_3 = 1.51 \times 10^{-9}$$

である。したがって、必要と予想される閾値は：

【0047】

【数4】

$$\frac{1}{1.51 \times 10^{-9}} = 6.64 \times 10^8$$

【0048】

の回数の複製が、優勢である次のアミノ酸に到達すると合理的に予想するために、その変異率では必要になる。その二項式への拡張によって、試行の1/3強（実際には約1/e）は選択的に優勢な所与の配列を含まないであろうということが示されているので、これは使用すべき複製ではない。

【0049】

nが例えば 10^9 の桁で、pが 10^{-9} の桁であるときの一般項を算出することができるように、所与の μ に対する大きなnと小さなpに対するポアソン近似を計算することができる。その近似の一般項は：

【0050】

【数5】

$$\frac{\mu^r}{r!e^\mu}$$

【0051】

約6/Pより大きな増幅係数が、全種のアミノ酸の使用と共に展開が進むことになることを保証している。新規なタンパク質の生産が既存のタンパク質の「混ぜ合せ (shuffling)」の使用を排除するときに、これは有用である。

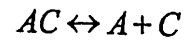
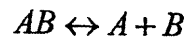
【0052】

精製に関する制限

BとCがAを求めて競合する場合の可逆的結合を仮定すると：

【0053】

【数6】



$$k_B = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad k_C = \frac{[A][C]}{[AC]}$$

$$[B] = k_B \frac{[AB]}{[A]} \quad (1)$$

$$[C] = k_C \frac{[AC]}{[A]} \quad (2)$$

【0054】

全濃度を次のように表すことができる：

$$[B]_T = [B] + [AB] \quad (3)$$

$$[C]_T = [C] + [AC] \quad (4)$$

(3)を(4)で割ると、

【0055】

【数7】

$$\frac{[B]_T}{[C]_T} = \frac{[B] + [AB]}{[C] + [AC]}$$

【0056】

そして [B] および [C] を (1) および (2) で置換して、

【 0 0 5 7 】

【数 8】

$$\frac{[B]_r = k_B \left[\frac{AB}{A} \right] + [AB]}{[C]_r = k_C \left[\frac{AC}{A} \right] + [AC]}$$

【 0 0 5 8 】

整理し直すと、

【 0 0 5 9 】

【数 9】

$$\frac{[B]_r}{[C]_r} = \frac{[AB] \left(\frac{k_B + [A]}{[A]} \right)}{[AC] \left(\frac{k_C + [A]}{[A]} \right)}$$

【 0 0 6 0 】

分子および分母の [A] を消去して、

【 0 0 6 1 】

【数 10】

$$\frac{[B]_r}{[C]_r} = \frac{[AB](k_B + [A])}{[AC](k_C + [A])}$$

【 0 0 6 2 】

最後に整理し直して、

【 0 0 6 3 】

【数 11】

$$\frac{[AB]}{[AC]} = \frac{[B]_T(k_C + [A])}{[C]_T(k_B + [A])}$$

$$\frac{(k_C + [A])}{(k_B + [A])}$$

【0064】

濃縮係数

前記の係数を「濃縮係数(enrichment factor)」と呼ぶ。各成分全量の比にこの係数を掛けることによって、結合型成分の比、即ちCに対するBの濃縮を計算する。最大の濃縮係数は、[A]が k_C または k_B より有意に小さいときの k_C / k_B である。

【0065】

濃縮は結合定数の比によって制限される。競合タンパク質より100倍も強く結合する希少タンパク質を濃縮すると、そのタンパク質対競合タンパク質の比が3回の濃縮で百万倍増加する。競合タンパク質よりほんの2倍だけ強く結合するタンパク質を濃縮すると、10回の濃縮で約1000倍までの濃縮しか得られないであろう。

【0066】

以下の実施例は本発明の様々な実施形態を例示するが、本発明を制限することを意図したものでは決してない。

【0067】

実施例1：SATAの産生

当業者であれば、多数の異なる方法でSATAを生成できることを理解されよう。例えば、好ましい一実施形態では、3個の断片(図1)を市販源から購入する(即ち、Dharmacon Research Inc.、Boulder、CO)。各修飾塩基および3'末端に予備結合したピューロマイシンと3'末端に PO_4 を有する断片3が含まれ、それらは全て市販されている。一付加体の形成において断片2の操作を促進するために、3個の断片を使用する。

【0068】

酵母 tRNA Ala または酵母 tRNA Phe が使用されるが、既知の tRNA から広く配列を選択することができる。好ましくは、断片 2 に相当する部分内に U を限られた数しかもたない配列が使用される。ソラーレンは 5' UA 3' 配列に選択的に結合するので、U を 2 ~ 3 個しか含まない配列の使用は必要ではない (Thompson J. F. et al, Biochemistry 21 : 1363)。しかし、このような配列を用いれば、精製時に除去すべき二付加体産物が減少するであろう。

【0069】

ソラーレンのインターカレートを促進するために、断片 2 はらせんコンホメーションで使用される。したがって、相補鎖が必要になる。RNA または DNA を使用し、一付加体の形成が実現した後の分離および除去を促進するために、一端または両端に対してポリ C 等の配列を添加する。

【0070】

緩衝した 50 mM NaCl 溶液中で、断片 2 および cRNA を混ぜる。深色効果 (hyperchromicity) の変化によって T_m を測定する。その 2 分子を再アニールし、 T_m より約 10 低い温度で選択したソラーレンと 1 時間インキュベートする。使用する配列に基づいてソラーレンを選択する。例えば、8 MOP 等の比較的の不溶性のソラーレンは、より高い配列厳密度 (stringency) を有するが、補給する必要があるかもしれない。AMT 等のもっと可溶性のソラーレンは、より低い厳密度を有するが、大部分の部位を満たすと思われる。好ましくは、HMT を使用する。標的でない U をより多く含んだ断片 2 を選択した場合、厳密度を上げることが望ましい。厳密度を上げるために、温度を下げるか、 Mg^{++} の添加によりイオン強度を増すことも用いる。

【0071】

インキュベーションの後、約 400 nm より長い波長でソラーレンを照射する。照射は、選択した波長および使用するソラーレンに依存する。例えば、HMT に対しては、約 419 nm で 20 ~ 150 J / cm² を使用するのが好ましい。この過程で、ほぼ完全にフラン側の一付加体が形成される。

【0072】

一付加体の精製

次いで、Sastry et al., J. Photochem. B Biol. 14: 65 - 79 に記載のように、その一付加体を HPLC で精製する。一般に、25mer の一付加体の精製は困難であるので (Spielmann et al., PNAS 89: 4514 - 4518)、断片2が断片3と分離されているという事実により、精製段階が促進される。

【0073】

断片2および3の連結

断片2は、T4 RNAリガーゼを用いて断片3に連結する。3'末端上のピユーロマイシンは保護基として作用する。これは、Romaniuk and Uhlenbeck, Methods in Enzymology 100: 52 - 59 (1983) に従って行う。断片2+3の断片1の3'末端への連結は、Uhlenbeck, Biochemistry 24: 2705 - 2712 (1985) に記載の方法に従って行う。断片2+3をポリヌクレオチドキナーゼによって5'リン酸化し、その2個の半分子をアニールする。

【0074】

他の方法では、相当量のフラン側一付加Uが、ポリUA自体のハイブリッド形成および前記のような照射によって形成される。次いで、ポリUAの酵素的消化によってフラン側Uが産生され、それは保護され、ヌクレオシドホスホラミダイト法によってtRNA類縁体中に組み込まれることになる。ソラーレー付加体を形成する他の方法は、Gamper et al., J. Mol. Biol. 197: 349 (1987); Gamper et al., Photochem. Photobiol. 40: 29, 1984; Sastry et al., J. Photochem. Photobiol. B Biol. 14: 65 - 79; Spielmann et al., PNAS 89: 4514 - 4518; 米国特許第4599303号に記載の各方法を含む。

【0075】

前記の方法によって生成したSATAは、UAG (アンチコドンCUA) を読取ることになる。その上、UAAまたはUGAも使用することになる。様々な実

施形態において、「連結コドン」として選択する停止コドンを有する任意のメッセージを使用する。

【0076】

実施例2：CUAGA CUGGAGG RNA断片からのソーレン化フラン側一付加体の産生

RNA：DNAハイブリッドのUV光曝露

共に50mM NaClを含むRNA：cRNAハイブリッドセグメント3ng/mlおよびHMT10μg/mlの同容量を、1.5mlの新しい栓付きポリプロピレン製マイクロ遠心管中に移し、暗所で37℃、30分インキュベートする。次いで、これを新しい清浄な培養皿上に移した。これを、光化学反応器（ピーク419nm、Southern New England Ultraviolet Co.）中で、放射照度が約6.5mW/cm²で60~120分の照射を受けるように約12.5cmの距離に位置決めする。

【0077】

低分子量原始産物の除去

クロロホルム - イソアミルアルコール（24：1）100μlをピペットで採取し、渦巻き混合を行う。混合物を、マイクロ遠心管中15000×gで5分遠心する。クロロホルム - イソアミルアルコール層をマイクロピペットで除く。クロロホルム - イソアミルアルコール抽出をもう1度繰返す。清浄なRNAが溶液から沈殿する。

【0078】

アルコール沈殿

氷冷無水エタノール2容（約1000μl）をその混合物に添加する。そのチューブをマイクロ遠心機中15000×gで15分遠心する。上清をデカントし、廃棄し、沈殿したRNAを100μl DEPC処理水中に再溶解後、RNA + 8-MOPに再び曝した。

【0079】

HPLCを用いたソーレン化RNA断片の分離

RNaseが付かないように、全ての成分、ガラス器具および試薬を整える。

Dionex DNA PA-100パッケージカラムでHPLCを組立てる。ソラーレン化RNA:DNAハイブリッドを4に暖める。ソラーレン化RNAをHPLCに施用した後、「HPLCによるオリゴヌクレオチド分析」と題する次項に記載するように、オリゴヌクレオチド分析を行う。収集した各分画は次のものを示すことになる。

【0080】

a) 5' CUAGA CUGGAGG 3'、ここではプソイドウリジン(配列番号: 1)

b) フラン側5' CUソラーレンAGA CUGGAGG 3' 一付加体(配列番号: 2)

c) 5' XXXXXCCUCCAGAUUCUAGXXXXX 3' (配列番号: 3)

d) 5' XXXXXCCUCCAGAUUCUソラーレンAGXXXXX 3' (配列番号: 4)

各分画を、新しいRNaseの付いていない密栓したマイクロ遠心管中4で保存し、4週間を超える保存が必要な場合は-20で保存する。

【0081】

HPLCで収集した各ピーク分画が示すRNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いた同定

電気泳動装置を4の冷蔵庫内に組立てる。2mmのスペーサーでゲルを選択する。HPLC分画各5 μ lを装填緩衝液で10 μ lに希釈する。各希釈分画10 μ lを適当に標識した試料ウェル中に装填する。追跡用染料を別のレーン中に装填し、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)」と題する次項に記載のように電気泳動を行う。電気泳動の実行完了後、追跡用染料がゲルの端に到達したとき電気泳動を停止する。その装置を分解する。UV光ボックス上にゲル-ガラスパネルユニットを載せる。UV光をつける。RNAバンドを確認する。UV点灯条件下でバンドはより濃い陰影として現れる。

【0082】

ゲルからのRNAの抽出

各バンドを新しい滅菌したRNaseの付いていない外科用メスの刃で切り取り、新しいスナップ栓付き1.5mlマイクロ遠心管中に移す。そのメスの刃の側面で、各ゲルをマイクロ遠心管に押しつけて潰す。試料毎に新しい刃を用いる。0.3M酢酸ナトリウム1.0mlを各管に添加し、4℃で少なくとも24時間の間溶出させる。溶出液をマイクロピペットで新しいスナップ栓付き0.5mlポリプロピレン製マイクロ遠心管に移す。管毎に新しいRNaseの付いていないピペットチップを用い、RNAをエタノールで析出させる。

【0083】

エタノール沈殿

氷冷エタノール2容を各溶出液に添加した後、マイクロ遠心機中15000×gで15分遠心する。上清を排出し、沈殿したRNAを100μlDEPC処理脱イオン水中に再溶解する。必要になるまで、RNAをマイクロ遠心管中4℃で保存する。保存が2週間を超える場合、遠心管を-20℃で保存する。次のものが各断片の移動速度の想定順序で、速いものから遅いものへの順序である。

【0084】

- a) 5' CUAGA CUGGAGG 3'
- b) フラン側5' CUソラーレンAGA CUGGAGG 3' 一付加体
- c) 5' XXXXXCCUCCAGAUUCUAGXXXXX 3'
- d) 5' XXXXXCCUCCAGAUUCUソラーレンAGXXXXX 3'

推定した化学的配列を有する各分画の残りを含んでいる旨の表示を、各遠心管につけ、-20℃で保存する。

【0085】

RNAのエタノール沈殿

RNAオリゴヌクレオチド断片を沈殿させ、「設備上、備品上、および溶液中のRNaseの不活性化」と題する次項に記載のように、痕跡量のRNaseを除くために、全てのガラス器具を清浄にする。全ての溶液をRNaseの付いていないガラス器具中に保存し、ヌクレアーゼの侵入を防止する。無水エタノールを使用するまで0℃で保存する。マイクロ遠心管中に沈殿させる予定の核酸に、氷冷エタノール2容を添加するためにマイクロピペッターを使用する。栓付きミク

口遠心管をマイクロ遠心機中に配置し、 $15000 \times g$ で15分回転する。上清を廃棄し、沈殿したRNAをDEPC処理脱イオン水中に再溶解する。使用の準備ができるまで、RNAをマイクロ遠心管中4で保存する。

【0086】

RNA断片2および3の連結

「設備上、備品上、および溶液中のRNaseの不活性化」と題する次項に記載のように、痕跡量のRNaseを除くために、全てのガラス器具を清浄にする。1.5mlの新しいスナップ栓付きポリプロピレン製マイクロ遠心管に、以下のものを100~1000 μ lのピペットを用いて添加し、その際、各溶液に対して新しい滅菌ピペットチップを使用する。

【0087】

断片2 (3.0 nM)	125.0 μ l
断片3 (3.0 nM)	125.0 μ l
反応緩衝液	250.0 μ l
RNA T4リガーゼ (9~12 U/ml)	42 μ l
反応緩衝液	
RNaseフリー脱イオン水	90.00 ml
Tris-HCl (50 mM)	0.79 g
MgCl ₂ (10 mM)	0.20 g
DTT (5 mM)	0.078 g
ATP (1 mM)	0.55 g

pHを塩酸で7.8に調整

RNaseフリー脱イオン水：十分量の添加で100.00 mlにした。

【0088】

混合物を静かに混合し、温度制御冷蔵チャンバー中16で1時間混合物をインキュベートすることによって、RNAを溶融する。インキュベーション完了後、直ちにRNAが溶液から析出する。

【0089】

アルコール沈殿

氷冷無水エタノール2容(約1000 μ l)を反応混合物に添加する。そのミクロ遠心管をミクロ遠心機中に配し、15000 \times gで15分遠心する。上清をデカントし、廃棄し、沈殿したRNAを100 μ l DEPC処理水中に再溶解する。混合物に対して、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)」と題する次項に記載のように電気泳動を行う。次のものが各断片の移動速度の想定順序で、速いものから遅いものへの順序である。

【0090】

a) 断片2

5' CUAGA CUGGAGG3' - OH

ソラーレン

b) 断片3

5' UCCUGUGT CGAUCCACAGAAUUCGCACC - ピューロマイシン(配列番号:5)

c) 断片2+3

5' CUAGAYCUGGAGGUCCUGUGT CGAUCCACAGAAUUCGCACCピューロマイシン(配列番号:6)

ソラーレン

UVによる陰影形成によって各分画を単離し、各バンドを切出し、各RNAをゲルから溶出し、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)」と題する次項に記載のように、RNA溶出液を析出させる。

【0091】

残存した未連結の断片2と3の分画について、連結手順を繰り返す。

【0092】

連結分画の2と3を集め、小容量のRNaseフリー脱イオン水中4で保存する。

【0093】

RNA断片1と断片2+3との連結

「設備上、備品上、および溶液中のRNaseの不活性化」と題する次項に記載のように、痕跡量のRNaseを除くために、全てのガラス器具を清浄にする

。1.5 mlの新しいスナップ栓付きポリプロピレン製マイクロ遠心管に、以下のものを添加する。100~1000 μ lのピペットおよび新しいチップを各溶液に対して使用する。

【0094】

断片2 + 3 (3.0 nM)	125.0 μ l
反応緩衝液	250.0 μ l
T4ポリヌクレオチドキナーゼ (5~10 U/ml)	1.7 μ l
反応緩衝液	
RNaseフリー脱イオン水	90.00 ml
Tris-HCl (40 mM)	0.63 g
MgCl ₂ (10 mM)	0.20 g
DTT (5 mM)	0.08 g
ATP (1 mM)	0.006 g

pHを塩酸で7.8に調整

RNaseフリー脱イオン水：十分量の添加で100.00 mlにした。

【0095】

RNAを静かに混合後、加熱ブロック中70℃に5分間混合物を加熱することによって溶融する。混合物を2時間かけて室温に冷却し、そのRNAをtRNAとしての配置にアニールさせる。RNAが溶液から析出する。

【0096】

アルコール沈殿

氷冷無水エタノール2容(約1000 μ l)を反応混合物に添加する。そのマイクロ遠心管をマイクロ遠心機中に配し、15000 \times gで15分遠心する。上清をデカントし、廃棄し、沈殿したRNAを100 μ l DEPC処理水中に再溶解する。混合物に対して、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)」と題する次項に記載のように電気泳動を行う。次のものが各断片の移動速度の想定順序で、速いものから遅いものへの順序である。

【0097】

a) 断片1

5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGA
CU3'

b) 断片2 + 3

5' CUAGAYCUGGAGGUCCUGUGT CGAUCCACA
GAAUUCGCACCCピューロマイシン

ソラーレン

c) 断片1 + 2 + 3

5' GCGGAUUUAGCUCAGDDGGGAGAGCGCCAGA
CUCUAGA CUGGAGGUC . . . CUGUGT CGAUCCACA
GAAUUCGCACCCピューロマイシン (配列番号: 7)

ソラーレン

UVによる陰影形成によって各分画を単離し、各バンドを切出し、各RNAをゲルから溶出し、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)」と題する次項に記載のように、RNA溶出液を析出させる。未連結の断片1および2 + 3分画について、連結手順を繰返す。連結分画2 + 3を集め、小容量のRNaseフリー脱イオン水中4 で保存する。

【0098】

最終的RNA連結

1. 5 mlの新しいスナップ栓付きポリプロピレン製マイクロ遠心管に、以下のものを添加する。100 ~ 1000 μ lのピペットおよび新しいチップを各溶液に対して使用する。

【0099】

断片1 + 2 + 3 (3.0 nM)	250 μ l
反応緩衝液	250 μ l
RNA T4リガーゼ (44 μ g/ml)	22 μ g

混合物を温度制御冷蔵庫中17 で4.7時間混合物をインキュベートする。前記の段階6.2に記載のように、インキュベーション直後にRNAが溶液から析出し、「ソラーレン化RNA断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)」と題する次項に記載のように、電気泳動によってtRNAを単離する。そ

の tRNA を小容量の RNase フリー水中に貯め、2 週間までの間 4℃ で保存するか、または 2 週間より長い期間 - 20℃ で保存する。

【0100】

ソラーレン化 RNA 断片のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)
アクリルアミドゲルの調製

「設備上、備品上、および溶液中の RNase の不活性化」と題する次項に記載のように、全ての試薬およびガラス器具は RNase フリーでなければならない。ゲル装置を組立てることによって、厚さ 4 mm で 20 cm × 42 cm 平方のゲルを作製する。RNase フリーで厚壁のエrlenmeyer フラスコ中、アンモニウム架橋剤 1 部を含むアクリルアミド 29 部を適量のアクリルアミド溶液と室温で混合する。

【0101】

アクリルアミド溶液

尿素 (7 M) 420 . 42 g
TBE (1 ×) 十分量で 1 L にした。

【0102】

5 × TBE

0 . 455 M Tris - HCl 53 . 9 g
10 mM EDTA 0 . 5 M を 20 ml
RNase フリー脱イオン水 900 ml

pH をホウ酸で 9 に調整

RNase フリー脱イオン水の十分量で 1 L にした。

【0103】

混合物を真空圧で 1 分脱気する。適量の TEMED を添加し、静かに混合した後、ゲル混合物をガラス板の間に頂部から 0 . 5 cm 以内まで注ぐ。ガラスシートの中のゲル混合物中に、直ちにコーム (comb) を挿入する。RNase フリーのゲルコームを使用する。コームで幅 5 mm の染料レーンと 135 mm の試料レーン用のウェルができるはずである。ゲルを約 30 ~ 40 分重合させた後、コームを注意深く抜取る。新しいピペットチップをつけたマイクロピペットを用い

て、試料ウェルを緩衝液の流れですすぐ。次いで、ウェルを緩衝液の流れで満たす。

【0104】

試料調製

スナップ栓付きマイクロ遠心管中、試料の一分量を装填用緩衝液中で懸濁し、渦流混合する。指示薬染料は試料に加えない。

【0105】

装填用緩衝液

尿素 (7M) 420.42 g

Tris HCl (50mM) 7.85 g

RNAaseフリーD-H₂Oで十分量でLにした。

【0106】

電気泳動の実行

最大容量のRNA / 装填用緩衝溶液を135mm試料ウェル中に装填し、適量の追跡用染料を5mm追跡用レーン中に装填する。試料の電気泳動を5の冷蔵庫中で行う。追跡用染料がゲルの端に到達したら電気泳動を停止する。装置を分解する。ガラスパネルはゲルから取外さない。ゲル-ガラスパネルユニットをUV光ボックス上に載せる。UV遮断用ゴーグルを身につけて、UV光を点灯する。RNAバンドを確認する。UV点灯条件下で各バンドは、より濃い陰影として現れる。RNAをゲルから抽出する。各バンドを新しい滅菌したRNAaseの付いていない外科用メスの刃で切り取り、各バンドを新しいスナップ栓付き1.5mlマイクロ遠心管に移す。そのメスの刃の側面で、各ゲルをマイクロ遠心管に押しつけて潰す。試料毎に新しい刃を用いる。0.3M酢酸ナトリウム1.0mlを各管に添加し、4で少なくとも24時間の間溶出させる。遠心管毎に新しいRNAaseフリーのピペットチップを取付けたマイクロピペットで、溶出液を新しいスナップ栓付き0.5mlポリプロピレン製マイクロ遠心管に移す。氷冷エタノール2容を各溶出液に添加した後、マイクロ遠心機中15000×Gで15分遠心する。上清を廃棄し、沈殿したRNAをDEPC処理脱イオン水100μl中に再溶解する。必要になるまで、RNAをマイクロ遠心管中4で保存する。

【0107】

HPLCによるオリゴヌクレオチド分析

RNAオリゴヌクレオチドのHPLCによる精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて行うのが最良である。2'保護型、2'脱保護型のいずれでもクロマトグラフィーを行うことができる。2'保護型は、二次的構造効果を最小限にするという利点をもたらし、ヌクレアーゼ耐性を提供する。RNAが完全に脱保護されている場合は、精製中に滅菌条件が必要となる。

【0108】

2'-オルトエステル保護RNAの脱保護

チューブを15000×gで30秒、またはRNAペレットが底に沈むまで遠心する。pH3.8の脱保護緩衝液400μlをRNAの各チューブに添加する。

【0109】

脱保護緩衝液

酢酸(100mM)をテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)でpH3.8に調節する。ピペット内外に吸い込み、吐き出しを行うことによって、ペレットを緩衝液中に完全に溶解する。各チューブを10秒間渦流回転させ、15000×gで遠心する。そのチューブを60℃の水浴中30分インキュベートする。各試料を使用する前に凍結乾燥する。

【0110】

HPLCカラム条件

Dionex(800)-DIONEX-0(346-6390)を充填し、260nmで40吸光度単位(ODU)の能力を有する4×250mmカラム(DNAPAC PA、No.043010)を設置する。カラム温度を54℃に設定する。注入容量を5μlが約0.20ODUとなるように調節する。

【0111】

溶出緩衝液

【0112】

【表1】

表1

条件	緩衝液A	緩衝液B
過塩素酸ナトリウム	(5 mM) 2.8 g	(300 mM) 168.0 g
Tris-HCl	2.4 g	2.4 g
アセトニトリル (2%)	80.0 ml	80.0 ml
脱イオン水	3900 ml	900 ml
pH調節	HCLで8.0	HCLで8.0
全体量	4000 ml	4000 ml

【0113】

HPLC勾配

長さ17～32塩基対のオリゴマーに対して、緩衝液Bの30%から60%の勾配を提供する。

【0114】

【表2】

表2

時間 (分)	流速 (ml/分)	%A	%B	カーブ
0	1.5	100	0	*
1	1.5	100	0	6
3	1.5	70*	30*	6
15	1.5	40*	60*	6
15.5	2.5	0	100	6
17	2.5	0	100	6
17.25	2.5	100	0	6
23	2.5	100	0	6
23.1	1.5	100	0	6
24	1.5	100	0	6
25	0.1	100	0	6

*勾配を変えるために変化させることのできる%値。代表的な勾配は、緩衝液Bが0～30%、20～50%、30～60%、および40～70%である。

【0115】

勾配選択

以下のように塩基数に基づいて勾配を選択する。

【0116】

【表3】

表3

塩基数	勾配
0～5	0～30
6～10	10～40
11～16	20～50
17～32	30～60
33～50	40～70
>50	50～80

【0117】

HPLCの後、標的試料を集め、そのRNA濃度を分光計を用いて260nmで決定する。試料は-70℃で保存する。

【0118】

設備上、備品上、および溶液中のRNaseの不活性化

ガラス器具を180℃で少なくとも8時間加熱処理する。プラスチック器具はクロロホルムで濯ぎ処理する。あるいは、全ての物品を0.1%DEPC中に漬ける。

【0119】

0.1%DEPCによる処理

0.1%DEPCを調製する。脱イオン水は0.2μMメンブランフィルターでろ過する。その水を100kPa(15psi)で15分の液サイクルでオートクレーブに掛ける。滅菌ろ過水1リットル当たりDEPC1.0g(wt/v)を添加する。

【0120】

ガラスおよびプラスチック器具

全てのガラスおよびプラスチック器具を、0.1%DEPC中に37℃で2時

間漬ける。ガラス器具を滅菌脱イオン水で少なくとも5回すすぐ。そのガラス器具を100℃、15分加熱するか、または100kPa(15psi)で15分の液サイクルでオートクレーブに掛ける。

【0121】

RNAの電気泳動に用いる電気泳動槽

槽を洗剤で洗浄し、水、次いでエタノールですすぎ、風乾する。その槽を3%(v/v)過酸化水素(30ml/L)で満たし、室温で10分放置する。その槽をDEPC処理水で少なくとも5回すすぐ。

【0122】

溶液

全ての溶液は、Rnaseフリーのガラス器具、プラスチック器具、オートクレーブ処理水、RNA研究用に保存した薬品およびRnaseフリーのスパークを用いて作る。使い捨て手袋を使用する。可能な場合は、溶液を0.1%DEPCで37℃、少なくとも12時間処理し、次いで100℃、15分加熱するか、または100kPa(15psi)で15分の液サイクルでオートクレーブに掛ける。

【0123】

RNA翻訳

濃度20μl/mlの腸阻害ペプチド(GIP)mRNA2μlを250μlのスナップ栓付きポリプロピレン製マイクロ遠心管中に入れる。ウサギ網状赤血球溶解物(Promegaから市販されている)35μlを添加する。メチオニンを含んでいないアミノ酸混合物(Promegaから市販されている)1μlを添加する。1μlの35Sメチオニンまたは未標識メチオニンを添加する。場合により、ルシフェラーゼ2mlを対照に用いる一部の管に添加してもよい。

【0124】

SATAをそれらの各試験管に添加する。SATAを含まない対照管も調製する。使用するSATAの量は、約0.1μgから500μg、好ましくは0.5μgから50μgの間である。40単位/mlのRnasin1μlを添加する。ヌクレアーゼの混入していない水を添加することによって、全量を50μlに

する。

【0125】

約150個のアミノ酸より大きなタンパク質に対しては、tRNA量を補給する必要が生じてよい。例えば、tRNA約10~200 μ gを添加してもよい。一般に、SATAの量は、停止または疑似停止コドンを有効に抑制するのに十分な多さとなるべきである。自然生成のtRNA量は、伸張因子の作用下で動的なブルーフリーディングを受けないSATAとの競合に打ち勝つに十分な多さでなければならない。

【0126】

各管に直ちに栓をし、パラフィルムで封じた後、30℃で90分インキュベートして翻訳反応を行う。毛管作用によって、各反応管の内容物を50 μ lの石英毛細管中に移す。Gasparro等(Photochem. Photobiol. 57:1007(1993))に従って、各管の内容物を2~10J/cm²、約350nm波長の光で照射することによって、SATAをmRNAで架橋する。光架橋後、各管の内容物を新しいスナップ栓付きマイクロ遠心管中に移す。各管に10mM EDTA 2 μ lを添加することによって、カルシウム陽イオンをキレート化し、それによってリボソームを解離する。各段階の間に、添加時にピペットチップで各成分を攪拌することによって、各管を静かに混合する。

【0127】

最終的な実験を行う前に、翻訳に最適なRNAを決定する。5~20 μ g/mlの間のmRNAの最適濃度を見出すために、連続希釈の必要が生じてよい。

【0128】

【表4】

表4

試薬	1	2	3	4
ウサギ網状赤血球溶解物 (35 μ l)	+	+	+	+
アミノ酸混合物からメチオニン除外 (1mMの1 μ l)	+	+	+	+
³⁵ S メチオニン (1,200Ci/mmol)	+	-	-	+
メチオニン (未標識)	-	+	+	-
GIP mRNA (20 μ g/mlの2 μ l)	+	-	-	-
³² P GIP mRNA (20 μ g/mlの2 μ l)	-	+	+	-
Rnasin (40U/ μ lの1 μ l)	+	+	+	+
SATA	-	-	-	
水、ヌクレアーゼ混入なし(十分量で50 μ lにする)	+	+	+	+

【0129】

前記のように、各試料についてSDS-PAGE電気泳動を行う。Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989)に記載のように、オートラジオグラフィーをゲル上で行う。

【0130】

本発明のいくつかの好ましい実施形態およびそれらの変異形態を詳述してきたが、その他の改変および使用方法は、当業者であれば容易に明白であろう。したがって、本発明の精神または請求の範囲から逸脱せずに、様々な応用、改変および代用をなし得ることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【図1】

修飾したtRNAまたは類縁体で連結されるときに、mRNAおよびそのタンパク質産物によって形成される複合体の一例の概略図である。示してあるように、mRNAのコドンは修飾tRNAのアンチコドンと対をなし、UV照射によってソーラーレーン付加体に共有結合で架橋される。翻訳されたポリペプチドは、リボソームペプチジルトランスフェラーゼを介して修飾tRNAに連結される。m

RNAおよび発生時のタンパク質がリボソームによって近くに保持されている間に、両方の連結が起こる。

【図2】

*in vitro*の選択および展開過程の一例の概略図であって、出発物質の各核酸およびそれらのタンパク質産物を（例えば、図1に従って）連結し、タンパク質が示す特定の特性によって選択する図である。特定の特性を示さないタンパク質は廃棄され、その特性を有するタンパク質は、好ましくはmRNAの変異を伴った増幅を介して、変異と共に増幅し、新しい集団を形成する。様々な実施形態においては、非結合性タンパク質が選択される。新しい集団を翻訳し、修飾したtRNAまたは類縁体を介して連結し、その選択過程を反復する。所望する多数回の選択および増幅/変異を行うことによって、タンパク質産物を最適化することができる。

【図3】

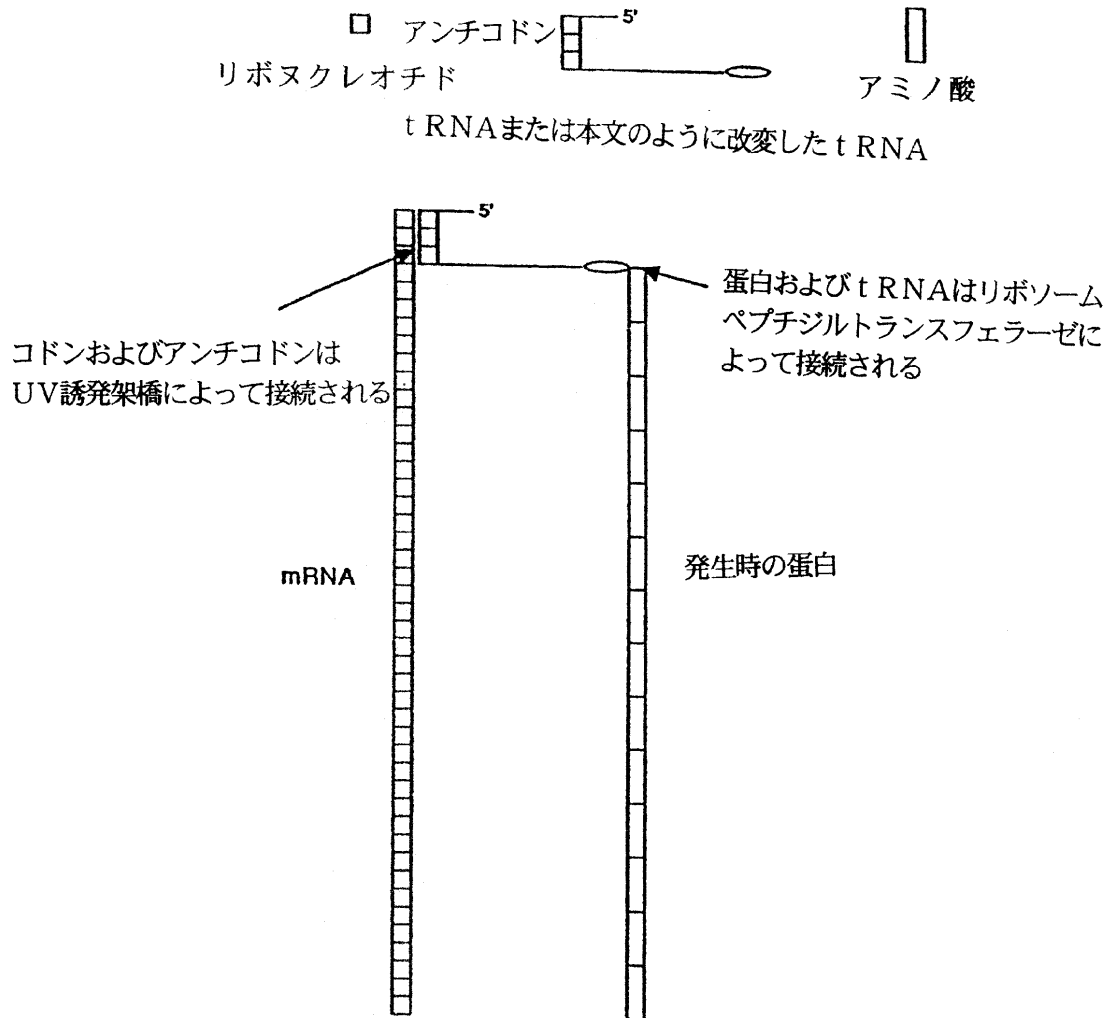
本発明のtRNA分子の一構築法を示す図である。この実施形態では、tRNAの5'末端、アンチコドンループをコードし、かつmRNAに安定に連結することのできる分子（ここでは、ソラーレン）を有する核酸、および末端ピューロマイシン分子で修飾したtRNAの3'末端が連結されることによって、本発明の*in vitro*展開法に使用する完全な修飾tRNAを形成する。

【図4】

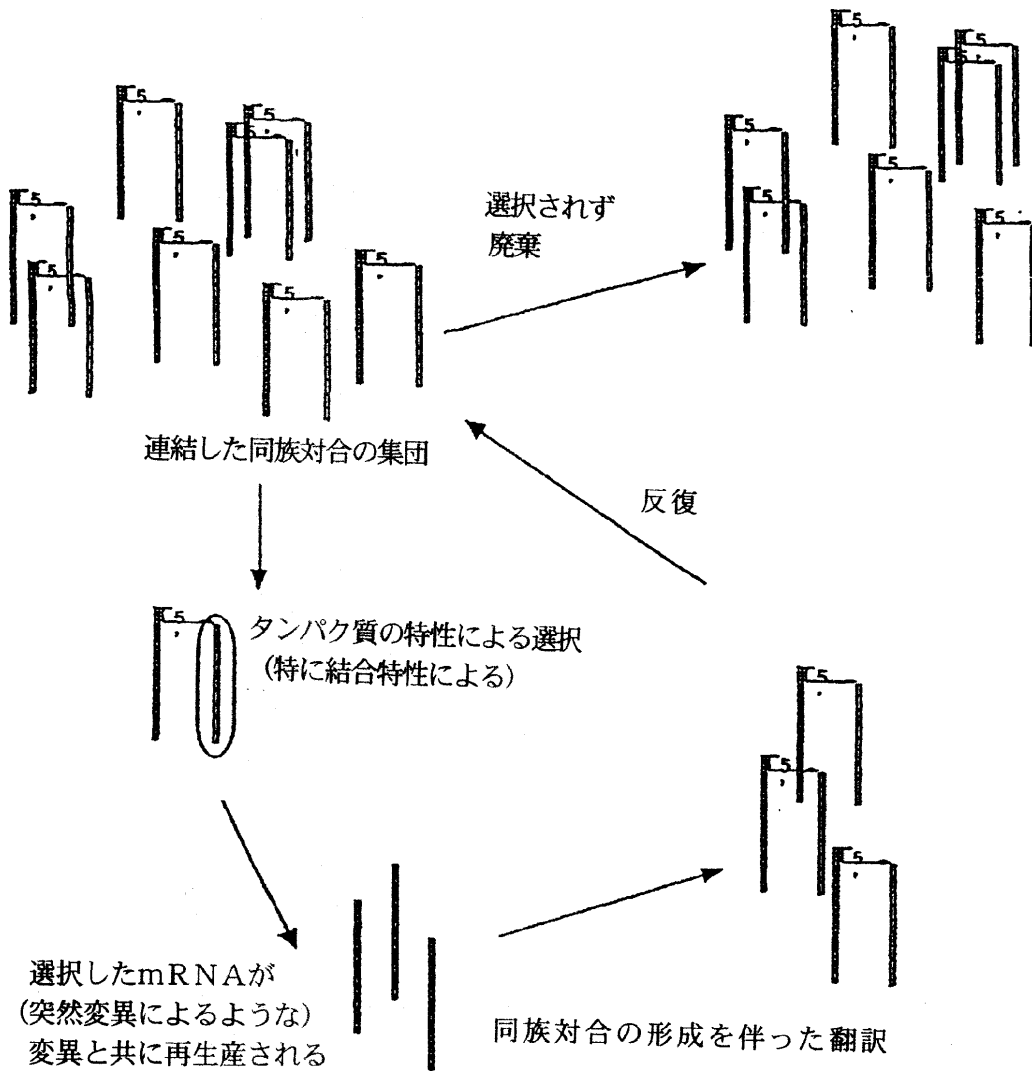
本発明の方法において、mRNAをtRNAと連結することができるように、架橋分子ソラーレンの位置取りをすることのできる2つの代替的实施形態を示す図である。第1の実施形態はソラーレン一付加体をmRNAに連結することを含み、第2の実施形態はソラーレンをtRNAのアンチコドンに連結することを含む。そのアンチコドン、または既知または部分的に既知のメッセージに対するリーディングフレームの3'末端コドンのいずれかに、ソラーレンを一付加することができる。これは、翻訳とは別の手順、即ち翻訳が起こる前にすることができる。

【図1】

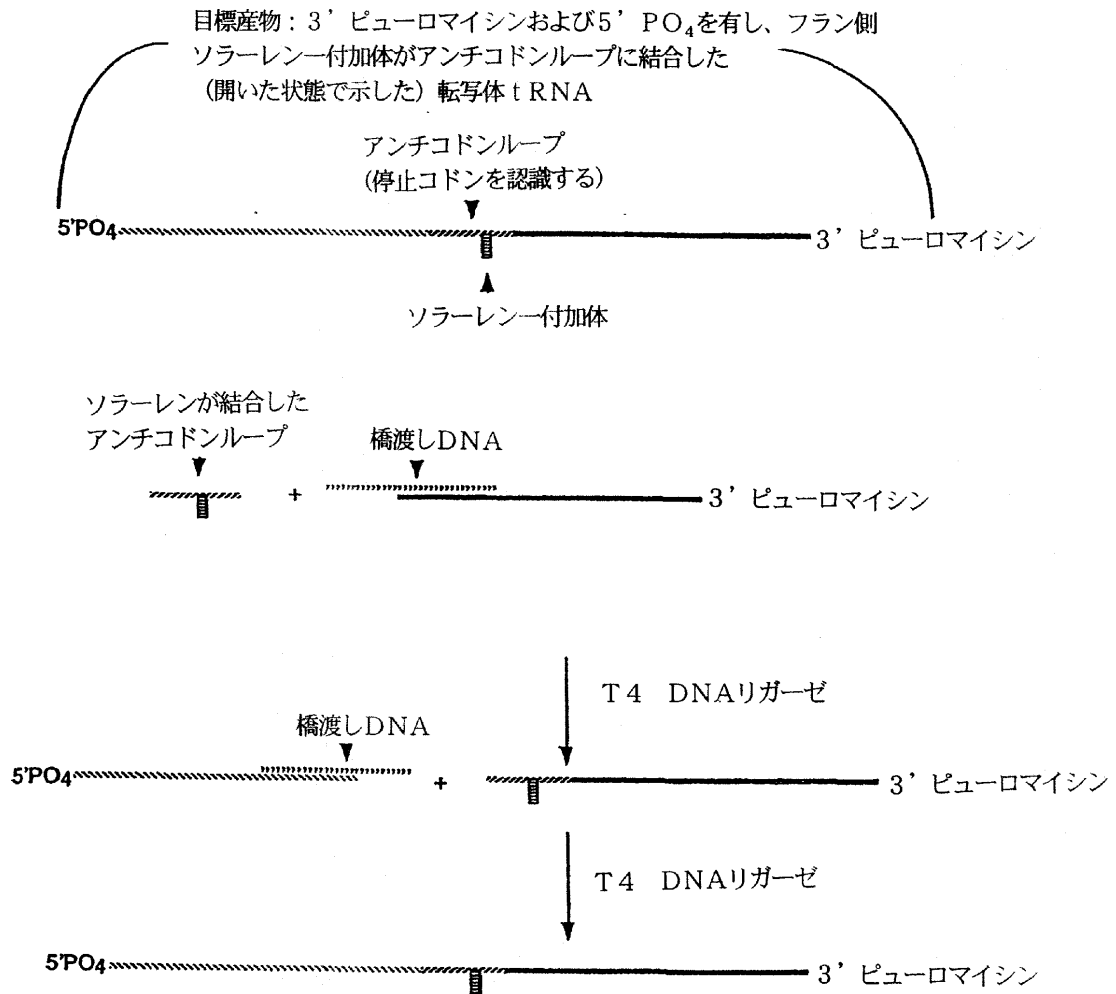
同族対合の形成



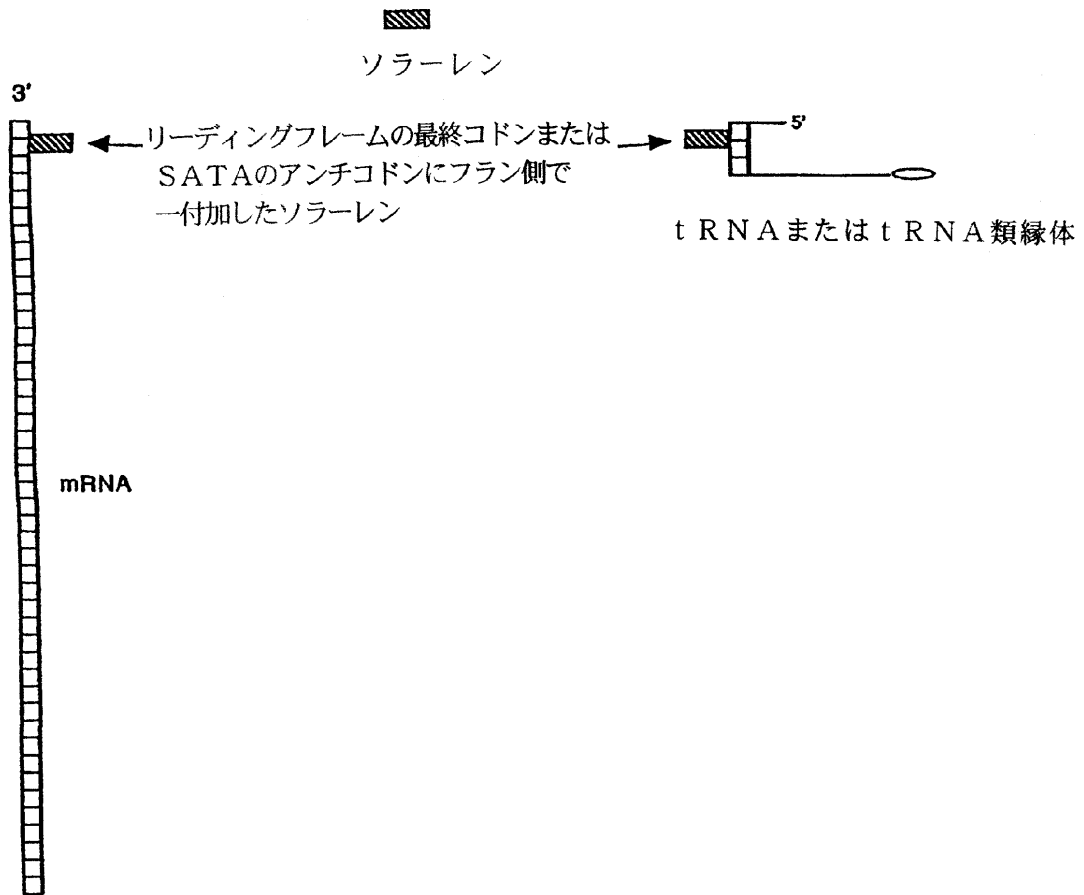
【図2】



【図3】



【図4】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/16210
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68, 1/70 ; C07H 21/02, 21/04; C12P 15/00, 21/02, 21/06 US CL : 435/6, 68.1, 69.1, 287.2, 320.1; 536/23.1, 23.4, 24.2 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) U.S. : 435/6, 68.1, 69.1, 287.2, 320.1; 536/23.1, 23.4, 24.2 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) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US 6,207,446 B1 (SZOSTAK et al) 27 March 2001 (27.03.01), Figures 1-2; column 1, line 55 to column 2, line 28.	1-25
Y,P	US 6,214,553 B1 (SZOSTAK et al) 10 April 2001 (10.4.01), Figures 1-2; column 1, line 55 to column 2, line 28.	1-25
Y	WO 92/02536 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO) 20 February 1992 (20.02.92), see the entire document, especially Figures 1-6 and page 25, lines 23-35.	1-25
Y	US 5,843,701 A (GOLD et al) 1 December 1998 (01.12.98), see the entire patent, especially Figures 1-6 and column 12, lines 21-47.	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "B" earlier document 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) "G" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" 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 "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 JULY 2001		Date of mailing of the international search report 14 AUG 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer TERRY J. DEY GERALD G. LEFFEN PARALEGAL SPECIALIST TECHNOLOGY CENTER 1600 Telephone No. (703) 305-3230

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/16210

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATTHEAKIS et al. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. September 1994, Vol. 91, No. 19, pages 9022-9026, see especially Figure 1 and pages 9023-9024.	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/16210

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

EAST: DERWENT EPO JPO USPAT PGPUBS; STN: MEDLINE EMBASE BIOSIS CAPLUS
inventor, rna with protein/polypeptide with \$link\$, polysome or ribosome with display, screen\$, identifi\$

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA11 CA12 FA07
HA01 HA03 HA14
4B063 QA18 QQ20 QQ53 QQ79 QR06
QR36 QR48 QR55 QR82 QS24
QS25 QS28 QS34 QS36

专利名称(译)	核酸和编码多肽的体外进化		
公开(公告)号	JP2003533995A	公开(公告)日	2003-11-18
申请号	JP2001586608	申请日	2001-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	理查德·威廉姆斯蜂 WILLIAMS RICHARD乙		
申请(专利权)人(译)	威廉姆斯, 理查德, 蜜蜂.		
[标]发明人	ウィリアムズリチャードビー		
发明人	ウィリアムズ、リチャード、ビー.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12N15/10 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/1062		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/FA07 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA14 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36		
优先权	60/206016 2000-05-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及通过将具有已知或未知序列的mRNA与翻译的蛋白质连接以形成同源配对来选择所需蛋白质或核酸分子的方法和试剂。基于蛋白质或核酸的所需特性选择同源配对。该方法通过扩增所选同源对的核酸部分，将突变引入核酸，翻译核酸并将核酸与其蛋白结合而形成第二同源对。通过基于所需属性重新选择此同源配对，开发所需的蛋白质或核酸分子。