

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/106675

発行日 平成17年10月13日 (2005. 10. 13)

(43) 国際公開日 平成15年12月24日 (2003. 12. 24)

(51) Int. Cl.⁷

C12N 15/09
C07K 14/00
C12P 21/02
G01N 21/78
G01N 33/53

F1

C12N 15/00 ZNAA
C07K 14/00
C12P 21/02 Z
G01N 21/78 C
G01N 33/53 D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2004-513488 (P2004-513488)
(21) 国際出願番号 PCT/JP2003/007508
(22) 国際出願日 平成15年6月12日 (2003. 6. 12)
(31) 優先権主張番号 特願2002-172106 (P2002-172106)
(32) 優先日 平成14年6月12日 (2002. 6. 12)
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)
(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, M W, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

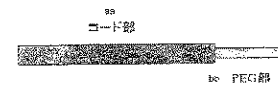
(71) 出願人 899000079
学校法人慶應義塾
東京都港区三田2丁目15番45号
(74) 代理人 100100549
弁理士 川口 嘉之
(74) 代理人 100090516
弁理士 松倉 秀実
(74) 代理人 100089244
弁理士 遠山 勉
(72) 発明者 宮本 悦子
日本国神奈川県横浜市港北区日吉3-1-4
-1 慶應義塾大学理工学部内
(72) 発明者 柳川 弘志
日本国神奈川県横浜市港北区日吉3-1-4
-1 慶應義塾大学理工学部内
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 翻訳テンプレートおよびそのライブラリー、それらから合成される蛋白質および蛋白質のライブラリー、ならびにそれらを構成する要素、ならびにそれらの製造法および利用方法

(57) 【要約】

ポストゲノム研究の構造および機能解析研究をハイスループットに行うツールとして、蛋白質の合成を効率的に行える翻訳テンプレートを提供する。翻訳テンプレートは、コード部のみ、またはコード部とPEG部から構成され、そのコード部の3'末端に、アクセプター領域と、アクセプター領域の5'上流の、配列SNNSを含む翻訳増強配列とを持つ場合は、そのPEG部は蛋白質とペプチジル転移反応により結合できないものであることが蛋白質の合成に用いるのに有利であり、そのコード部の3'末端にアクセプター領域を持つ場合は、そのPEG部は蛋白質とペプチジル転移反応により結合できるものであることが対応付けに用いるのに有利である。これらの翻訳テンプレートによって合成された蛋白質、C末端修飾蛋白質、および対応付け分子も提供し、これらC末端修飾蛋白質の修飾剤および対応付け分子のPEG部に機能性修飾を持たせることも可能である。

A 翻訳テンプレート



B コード分子



C PEGスぺーサー分子



A... TRANSLATIONAL TEMPLATE
aa... CODING PART
bb... PEG PART
cc... 3' END REGION
oe... ORF REGION

B... 3' END REGION
C... PEG SPACER MOLECULE
cc... CCA REGION
pe... DONOR REGION
pe... PEG REGION

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛋白質に翻訳される情報を持つ O R F 領域およびその 3' 末端領域を有し、3' 末端領域は、アクセプター領域と、アクセプター領域の 5' 上流に、配列 S N N S を含む翻訳増強配列とを含むことを特徴とするコード分子。

【請求項 2】

アクセプター領域が、長さ 2 ~ 10 塩基のポリ A 配列を含むことを特徴とする請求項 1 記載のコード分子。

【請求項 3】

X 配列が S N N S 配列であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のコード分子。

10

【請求項 4】

X 配列が X h o I 配列であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載のコード分子。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載されたコード分子のライブラリー。

【請求項 6】

蛋白質に翻訳される情報を持つコード部と少なくともコード部と連結するためのドナー領域を持つ P E G スペース一部を含み、コード部が請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載されたコード分子に由来する翻訳テンプレート。

【請求項 7】

スペース一部が、コード部と連結するためのドナー領域、およびポリエチレングリコールを主成分とした P E G 領域、および 3' 末端に C C A 領域を持つことを特徴とする P E G スペース分子に由来する請求項 6 記載の翻訳テンプレート。

20

【請求項 8】

ポリエチレングリコールの分子量が 400 以上であることを特徴とする請求項 7 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 9】

C C A 領域が、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有しないことを特徴とする請求項 7 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 10】

C C A 領域にピューロマイシンを有することを特徴とする請求項 9 記載の翻訳テンプレート。

30

【請求項 11】

ドナー領域に機能付与ユニット F 1 および / または C C A 領域に機能付与ユニット F 2 を含むことを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の翻訳テンプレート。

【請求項 12】

機能付与ユニット F 1 および / または F 2 が、該翻訳テンプレートを固定化および / または蛍光ラベル化するものであることを特徴とする請求項 11 に記載の翻訳テンプレート。

【請求項 13】

機能付与ユニット F 1 および / または F 2 がビオチンであることを特徴とする請求項 12 記載の翻訳テンプレート。

40

【請求項 14】

機能付与ユニット F 1 および / または F 2 が、フルオレセイン、C y 5、またはローダミングリーンであることを特徴とする請求項 12 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 15】

請求項 6 ~ 14 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートのライブラリー。

【請求項 16】

請求項 6 ~ 14 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートがリボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

【請求項 17】

請求項 15 に記載された翻訳テンプレートのライブラリーがリボソーム上で翻訳されるこ

50

とにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

【請求項 18】

請求項 6 ~ 14 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートが、修飾部と、ピューロマイシンを含むペプチドアクセプター部と、それらを連結するヌクレオチドのリンカーとを含む、蛋白質の C 末端を標識する修飾剤の存在下で、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

【請求項 19】

修飾部において、少なくとも 1 つの機能付与ユニット F 3 を含むことを特徴とする請求項 18 に記載の蛋白質。

【請求項 20】

機能付与ユニット F 3 が、該翻訳テンプレートにより翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とする請求項 19 記載の蛋白質。

【請求項 21】

機能付与ユニット F 3 がビオチンであることを特徴とする請求項 20 記載の蛋白質。

【請求項 22】

機能付与ユニット F 3 が、フルオレセイン, Cy 5, またはローダミンググリーンであることを特徴とする請求項 20 記載の蛋白質。

【請求項 23】

請求項 15 に記載された翻訳テンプレートのライブラリーが、修飾部と、ピューロマイシンを含むペプチドアクセプター部と、それらを連結するヌクレオチドのリンカーとを含む、蛋白質の C 末端を標識する修飾剤の存在下で、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

【請求項 24】

修飾部において、少なくとも 1 つの機能付与ユニット F 3 を含むことを特徴とする請求項 23 に記載の蛋白質のライブラリー。

【請求項 25】

機能付与ユニット F 3 が、該翻訳テンプレートにより翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とする請求項 24 記載の蛋白質のライブラリー。

【請求項 26】

機能付与ユニット F 3 がビオチンであることを特徴とする請求項 25 記載の蛋白質のライブラリー。

【請求項 27】

機能付与ユニット F 3 が、フルオレセイン, Cy 5, またはローダミンググリーンであることを特徴とする請求項 25 記載の蛋白質のライブラリー。

【請求項 28】

蛋白質に翻訳される情報を持つ ORF 領域およびその 3' 末端領域を有し、3' 末端領域は、長さ 2 ~ 10 塩基のポリ A 配列を含むアクセプター領域を含むことを特徴とするコード分子。

【請求項 29】

請求項 28 に記載されたコード分子のライブラリー。

【請求項 30】

蛋白質に翻訳される情報を持つコード部と少なくともコード部と連結するためのドナー領域を持つ PEG スペースャー部を含み、コード部が請求項 28 に記載されたコード分子に由来する翻訳テンプレート。

【請求項 31】

スペースャー部が、コード部と連結するためのドナー領域、およびポリエチレングリコールを主成分とした PEG 領域、および 3' 末端に CCA 領域を持つことを特徴とする PEG スペースャー分子に由来する請求項 30 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 32】

CCA 領域が、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によ

10

20

30

40

50

って結合する機能を有することを特徴とする請求項 3 1 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 3 3】

C C A 領域にピューロマイシンを有することを特徴とする請求項 3 2 記載の翻訳テンプレート。

【請求項 3 4】

請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートのライブラリー。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートが、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載された翻訳テンプレートのライブラリーが、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

【請求項 3 7】

コード部を持たないことを特徴とする請求項 3 5 記載の蛋白質。

【請求項 3 8】

蛋白質がコード部を持たないことを特徴とする請求項 3 6 記載の蛋白質のライブラリー。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 に記載された蛋白質または請求項 3 8 記載のライブラリーにおけるコード部を、R N a s e によって切断することを特徴とする蛋白質またはそのライブラリーの製造法。

【請求項 4 0】

請求項 1 6、1 8 ~ 2 3、3 5 および 3 7 のいずれか 1 項に記載の蛋白質、または、請求項 1 7、2 3 ~ 2 7、3 6 および 3 8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質のライブラリーと物質を相互作用させて相互作用を解析することを含む、蛋白質と物質の相互作用解析方法。

【請求項 4 1】

相互作用の解析が、蛍光相関分光法、蛍光イメージングアナライズ法、蛍光共鳴エネルギー移動法、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光偏光解消法、表面プラズモン共鳴法、または、固相酵素免疫検定法により行われる、請求項 4 0 記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 5 に記載の蛋白質、または、請求項 3 6 記載の蛋白質のライブラリーにおいて、該蛋白質の C 末端に結合したコード部の塩基配列の増幅により蛋白質と物質の相互作用を検出する方法。

【請求項 4 3】

無細胞共翻訳法または無細胞共翻訳スクリーニング法を用いることを特徴とする請求項 4 2 記載の蛋白質と物質の相互作用を検出する方法。

【請求項 4 4】

相互作用の解析において、翻訳テンプレートとそのライブラリーを蛍光ラベル化および/または固定化することを特徴とする、請求項 4 1 記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

【請求項 4 5】

相互作用の解析において、蛋白質とそのライブラリーを蛍光ラベル化および/または固定化することを特徴とする、請求項 4 0 記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

【請求項 4 6】

相互作用の解析において、*in vitro* で蛋白質と物質の相互作用を解析する請求項 4 0 載の蛋白質と物質の相互作用を解析する方法。

【請求項 4 7】

相互作用の解析において、*in vitro* で共翻訳法を利用することを特徴とする請求項 4 6 記載の蛋白質と物質の相互作用を解析する方法。

【請求項 4 8】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 4 および 28 のいずれか 1 項に記載されたコード分子もしくは請求項 6 ~ 14 および 30 ~ 33 のいずれか 1 項に記載された翻訳テンプレートまたはそのライブラリーをリボソーム上で翻訳することを含む蛋白質またはそのライブラリーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

現在、多様な生物のゲノムの塩基配列が解読されようとしている。ゲノムシーケンスの研究では、第 2 幕のポストシーケンスの研究として、解読したゲノム情報からその意味を解析する研究、すなわち、遺伝子や蛋白質の構造や機能解析 (Saegusa A. Japan boosts proteomics and cell biology... Nature 401, 6751 (1999), Dalton R, Abbott A. Can researchers find recipe for proteins and chips? Nature 402, 6763 (1999))、および蛋白質間、核酸 - 蛋白質間相互作用解析などが期待されている (宮本悦子、柳川弘志 (2000) シリーズ・ポストシーケンスのゲノム科学 3 : プロテオミクス, pp. 136 - 145 ; 宮本悦子、柳川弘志 (2001) 蛋白質・核酸・酵素, 46 (2), pp. 138 - 147)。これらの構造および機能解析には、蛋白質の大量発現が重要となってくる。蛋白質の大量発現が可能な無細胞翻訳系とともに、蛋白質の大量発現が可能で安定な翻訳テンプレートの開発が所望されている (白水美香子、木川隆則、横山茂之 (2000) シリーズ・ポストシーケンスのゲノム科学 3 : プロテオミクス, pp. 197 - 205)。

ポストゲノム機能解析によって、重要な生体酵素の発見などによる医薬品の創製など、医療、食料、エネルギー、環境など多くの分野の産業の基本ツールとして積極的に利用可能である。

背景技術

ポストゲノム構造および機能解析研究のツールとして様々なものが開発されてきている。どのような解析方法であっても、蛋白質の解析に共通して欠かせないものは、蛋白質の合成工程であり、さまざまな生物種のゲノムや cDNA から一万種類以上の蛋白質を発現させねばならない。そのためには、ハイスループットで強力な無細胞翻訳系が開発されてきた。大腸菌内での発現方法と比較した利点は、(1) 発現ベクターにクローニングすることなく、直線状 DNA 断片や転写した mRNA から直接目的の蛋白質が発現可能、(2) 短時間の反応で大量発現が可能、(3) 凝集しやすい性質や毒性を持つような発現の難しい蛋白質も生産可能、などが挙げられる。

これまで、無細胞翻訳系として小麦胚芽の系 (Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 18; 97 (2): 559 - 64.)、および大腸菌の系 (Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. Cell-free translation reconstituted with purified components. Nat Biotechnol. 2001 Aug; 19 (8): 751 - 5.) において、蛋白質の大量発現が研究されてきている。それに伴い、蛋白質の大量発現が可能で安定した翻訳テンプレートの開発として、mRNA の安定性向上と翻訳効率向上のために、一般的には 3' UTR が使われるが (Sachs A. B., Sarnow P., and Hentz M. W. Starting at the Beginning, Middle, and End; Translation Initiation in Eukaryotes. (1997) Cell 89, 831 - 838)、mRNA の化学構造の置換や修飾などの方法 (Ueda T, Tohda H, Chika

zumi N, Eckstein F, Watanabe K., Cell-free translation system using phosphorothioate-containing mRNA. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1991; (25): 151-2.) を用いることなどが考案されている。

また、ポストゲノム機能解析研究のために開発されてきたいろいろな解析ツールにも無細胞翻訳系による蛋白質合成が重要な役割を占めている。その主なものを以下に挙げる。いずれも、蛋白質の大量発現が不可欠である。

分子間相互作用の検出方法として、これまで表面プラズモン共鳴法、蛍光共鳴エネルギー移動法、蛍光偏光解消法、エバネッセント場イメージング法、蛍光相関分光法、蛍光イメージング法、固相酵素免疫検定法などが知られている。とりわけ、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS) は、測定に必要な試料量が少なく (およそフェムトリットル)、測定時間が短く (およそ10秒)、HTSのための自動化が容易である (実際にEVOTEC社では1日で10万検体以上のスクリーニングを行うウルトラHTSを目指した装置の開発を行なっている) 等の長所があり、検出系として優れている (金城政孝 (1999) 蛋白質核酸酵素 44: 1431-1438)。さらに2種類の蛍光色素を用いる蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy: FCCS) では、1種類の蛍光色素を用いるFCSでは困難であった同程度の大きさをもつ分子間の相互作用も検出が可能であり、タンパク質相互作用のHTSへの応用が期待されている。

一般に、タンパク質相互作用の検出系では、固相化のためのタグや蛍光色素等のプローブでタンパク質を修飾する必要がある。本発明者等は、ピューロマイシン等の核酸誘導体を用いて翻訳系中でタンパク質のC末端を修飾する方法を先に提案している (特開平11-322781、特開2000-139468)。この方法は、従来の化学修飾法や蛍光タンパク質融合法に比べて、タンパク質の機能を損ないにくい等の利点がある。

一方、進化分子工学のツールとして誕生した「遺伝子 (遺伝子型) と蛋白質 (表現型) の対応付け」を応用して、ポストゲノム機能解析における蛋白質間相互作用を網羅的に解析する方法として、*in vitro virus*法 (Miyamoto-Sato E, et al. The construction of the virus type assignment molecule in evolutionary molecular engineering. *Viva Origino* 25, 35 (1997), Nemoto N, et al. *In vitro virus: Bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro.* *FEBS Lett.* 414, 405 (1997), WO98/16636)、STABLE法 (Doi N, Yanagawa H. STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries *in vitro.* *FEBS Lett.* 457, 227 (1999))、ファージディスプレイ法 (Smith G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 228, 1315 (1985))、リボソーム・ディスプレイ法 (Mattheakis, L. C. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022-9026, Mattheakis, L. C. & Dower, W. J. (1995) WO95/11922)、mRNA-peptide fusion (mRNA display)法 (Roberts R. W, Szostak J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297) などである。

発明の開示

ポストゲノム構造および機能解析研究のツールとして様々なものが開発されてきている。

どのような解析方法であっても、蛋白質の解析に共通して欠かせないものは、蛋白質の合成工程であり、さまざまな生物種のゲノムやcDNAから一万種類以上の蛋白質を発現させねばならない。その目的で、ハイスループットで強力な無細胞翻訳系が開発されてきた。大腸菌内での発現方法と比較した利点は、(1)発現ベクターにクローニングすることなく、直線状DNA断片や転写したmRNAから直接目的の蛋白質が発現可能、(2)短時間の反応で大量発現が可能、(3)凝集しやすい性質や毒性を持つような発現の難しい蛋白質も生産可能、などが挙げられる。ここで、mRNAの安定性向上と翻訳効率向上のために一般的に3'UTRが使われるが(Sachs A.B., Sarnow P., and Hentz M.W. Starting at the Beginning, Middle, and End; Translation Initiation in Eukaryotes. (1997) Cell 89, 831-838)、3'UTRは数百ベースと長いので、PCRで簡単にプライミングでつけることは出来ない。そこで、せっかく無細胞翻訳系を利用するのに3'UTRを持つベクターに組み込んで利用することになる(Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 18; 97(2): 559-64.)。しかしながら、最近の研究で3'UTRの機能は翻訳量の調節にあることがわかってきており(Boucher N. et al. A common mechanism for stage-regulated gene expression in Leishmania mediated by a conserved 3'UTR element. J. Biol. Chem. 2002 Mar 23; [epub ahead of print])、一概に翻訳を増加させるだけではなく抑制する場合も考えられるなどの問題点も抱えている。また、mRNAの化学構造の置換や修飾などの方法(Ueda T, Tohda H, Chikazumi N, Eckstein F, Watanabe K., Cell-free translation system using phosphorothioate-containing mRNA. Nucleic Acids Symp Ser. 1991; (25): 151-2.)では、化学構造を置換した材料が高価であったり、安定性は得られないが、翻訳に支障を来す可能性があるなどの問題点が挙げられる。

本発明の目的は、以上の問題を解決するために、作成方法が簡単で安定でかつ高効率に蛋白合成を行える翻訳テンプレートを提供することである。この翻訳テンプレートによって、ポストゲノム構造および機能解析をハイスループットに行うことが出来る。また、この翻訳テンプレートの利用により、C末端ラベル化蛋白質(Labeled protein and its producing method, labeling compound to be used in the method for analyzing function of genes, 2001, U.S. Patent 6, 228, 994, H. Yanagawa, N. Nemoto, E. Miyamoto)による蛋白質の相互作用解析、および対応付け分子(Molecule that homologizes genotype and phenotype and utilization thereof, 1998, PCT/JP97/03766 (WO98/16636) H. Yanagawa, N. Nemoto, E. Miyamoto, Y. Fusimi)によるゲノム機能解析、進化分子工学への応用などの解析能力を従来よりもいっそう向上させることが出来る。

本発明の第一の発明は、蛋白質に翻訳される情報を含むコード部の3'末端にPEGスペーサー部をライゲーションした翻訳効率の高い翻訳テンプレートとその合成方法であり、そのPEGスペーサー部に機能性修飾物質を持たせることが可能な構成を特徴とし、およびそのテンプレートによって合成された蛋白質やそのライブラリーを提供するものである

10

20

30

40

50

。また、第二の発明は、第一の発明の翻訳テンプレートを用いて合成されたC末端ラベル化蛋白質とその合成方法であり、特に、翻訳テンプレートのコード部の3'末端に特別な配列(XA配列)を用いることが特徴であり、また、そのC末端修飾剤に機能性修飾物質を持たせることが可能な構成を特徴とし、およびそのテンプレートによって合成されたC末端修飾された蛋白質とそのライブラリーを提供するものである。第三の発明は、第一の発明の翻訳テンプレートを用いて合成された翻訳テンプレートC末端修飾された蛋白質(対応付け分子)またはPEGスペーサー部でC末端修飾された蛋白質、とそれらの合成方法であり、特に、翻訳テンプレートのコード部の3'末端に特別な配列(A配列)を用いることが特徴であり、また、そのPEGスペーサー部に機能性修飾物質を持たせることが可能な構成を特徴とし、およびそのテンプレートによって合成されたC末端修飾された蛋白質とそのライブラリーを提供するものである。

10

本発明の第一の発明は、蛋白質に翻訳される情報を持つコード部とPEGスペーサー部からなることを特徴とする翻訳テンプレートに関するものである。コード部は、蛋白質に翻訳される情報であり、どのような配列でも良いが、好ましくは、コード部の3'末端領域にアクセプター領域(A配列)を持つ、または、コード部の3'末端領域にアクセプター領域(A配列)を持ち、かつA配列の5'上流に翻訳増強配列(X配列)を持つことを特徴とする。コード部のA配列として、短いポリA配列を含む。X配列として、C(またはG)NNC(またはG)配列を有する配列、たとえば、XhoI配列を有することを特徴とする。PEGスペーサー部は、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域、コード部と連結するためのドナー領域、および3'末端にCCA領域を持つ。PEGスペーサー部は、ドナー領域のみ、CCA領域のみでもかまわないが、好ましくは、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域を含む構成をとる。CCA領域は、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有しないことを特徴とし得る。PEG領域のポリエチレングリコールの分子量は、400以上であることを特徴とし得る。また、ドナー領域および/またはCCA領域において、少なくとも1つの機能付与ユニット(F)を含むことを特徴とし得る。機能付与ユニット(F1および/またはF2)が、該翻訳テンプレートおよび/または該翻訳テンプレートから翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とし得る。固定化物質としてビオチンなどが考えられ、蛍光性物質として、フルオレセイン, Cy5, またはローダミンググリーン(RhG)などが考えられる。これらのコード分子や翻訳テンプレート、およびそのライブラリー、さらに、リボソーム上で翻訳された蛋白質やそのライブラリーに関するものである。翻訳テンプレートはコード部のみからなるもの(コード分子)であってもよい。

20

30

本発明の第二の発明は、第一の発明の翻訳テンプレートにより翻訳され、修飾剤によってC末端ラベル化された蛋白質に関するものである。翻訳テンプレートは、蛋白質に翻訳される情報を持つコード部とポリエチレングリコールを主成分としたPEGスペーサー部からなる。コード部は、A配列とX配列を有し、A配列として、短いポリA配列を含む。X配列として、C(またはG)NNC(またはG)配列を有する配列、たとえば、XhoI配列を有することを特徴とする。PEGスペーサー部は、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域において、ポリエチレングリコールの分子量が400以上であることを特徴とする、また、ドナー領域および/またはCCA領域において、少なくとも1つの機能付与ユニット(F)を含むことを特徴とし得る。CCA領域は、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有しないことを特徴とし得る。機能性修飾物質(F1および/またはF2)が、該翻訳テンプレートおよび/または該翻訳テンプレートから翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とし得る。固定化物質としてビオチンなどが考えられ、蛍光性物質として、フルオレセイン, Cy5, またはローダミンググリーン(RhG)などが考えられる。また、修飾剤は、蛋白質のC末端を標識する修飾部とピユーロマイシンを含むペプチドアクセプター部、およびそれらを連結するヌクレオチドのリンカー、からなる。また、修飾剤は、修飾部に、機能性修飾物質(F3)を含むことを特徴とし得る。該F3が、該翻訳テンプレ

40

50

ートにより翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とする。固定化物質としてビオチンなどが考えられ、蛍光性物質として、フルオレセイン、Cy5、またはローダミングリン(RhG)などが考えられる。これら、コード部および翻訳テンプレート、およびそのライブラリーが、修飾剤の存在下で、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質および蛋白質のライブラリーに関するものである。

本発明の第三の発明は、翻訳テンプレートによってC末端修飾された蛋白質(=対応付け分子)に関するものである。翻訳テンプレートは、蛋白質に翻訳される情報を持つコード部とPEGスペーサー部からなる。コード部の3'末端にA配列を有し、A配列は、短いポリA配列を含む。PEGスペーサー部は、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域において、ポリエチレングリコールの分子量が400以上であることを特徴とする、また、ドナー領域および/またはCCA領域において、少なくとも1つの修飾物質(F1および/またはF2)を含むことを特徴とし得る。また、CCA領域は、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有することを特徴とし、代表的にはCCA領域にピューロマイシンを有する。また、修飾物質(F1および/またはF2)が、該翻訳テンプレートおよび/または該翻訳テンプレートから翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とし得る。固定化物質としてビオチンなどが考えられ、蛍光性物質として、フルオレセイン、Cy5、またはローダミングリン(RhG)などが考えられる。これら、コード部および翻訳テンプレート、およびそのライブラリーが、リボソーム上で翻訳されることにより合成される蛋白質(=

対応付け分子)および蛋白質(=対応付け分子)のライブラリーに関するものである。これら3つの発明を応用した発明として、コード分子および翻訳テンプレート、およびそのライブラリーを用いて、無細胞翻訳系、および細胞での蛋白質の大量合成が可能であり、蛋白質の構造と機能解析が実現できる。また、リボソーム上で翻訳されることにより合成される蛋白質(=蛋白質、C末端ラベル化蛋白質、対応付け分子)およびそのライブラリーのいろいろな組み合わせを用いて、*in vitro*または*in vivo*で蛋白質と物質の相互作用解析が可能である。たとえば、対応付け分子は、分子進化工学的な機能物質の創製やゲノム機能解析に利用できる(図4)。蛋白質と物質の相互作用解析において、翻訳テンプレートとそのライブラリーおよび/または蛋白質とそのライブラリーを蛍光ラベル化および/または固定化することを特徴とする蛋白質と物質の相互作用解析も可能である(図5)。たとえば、各種のアフィニティー・スクリーニング、マイクロアレイやプロテインチップは、固定化の例であり、FCCS解析などは、蛍光ラベル化の例である(図5)。以上の解析は、*in vitro*における共翻訳や共翻訳スクリーニング法と組み合わせることもできる。

本発明は、より詳細には、以下のものを提供する。

1. 蛋白質に翻訳される情報を持つORF領域およびその3'末端領域を有し、3'末端領域は、アクセプター領域と、アクセプター領域の5'上流に、配列SNNSを含む翻訳増強配列とを含むことを特徴とするコード分子。
2. アクセプター領域が、長さ2~10塩基のポリA配列を含むことを特徴とする1記載のコード分子。
3. X配列がSNNS配列であることを特徴とする1または2記載のコード分子。
4. X配列がXhoI配列であることを特徴とする1または2記載のコード分子。
5. 1~4のいずれか1項に記載されたコード分子のライブラリー。
6. 蛋白質に翻訳される情報を持つコード部と少なくともコード部と連結するためのドナー領域を持つPEGスペーサー部を含み、コード部が1~4のいずれか1項に記載されたコード分子に由来する翻訳テンプレート。
7. スペーサー部が、コード部と連結するためのドナー領域、およびポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域、および3'末端にCCA領域を持つことを特徴とするPEGスペーサー分子に由来する6記載の翻訳テンプレート。
8. ポリエチレングリコールの分子量が400以上であることを特徴とする7記載の翻

10

20

30

40

50

訳テンプレート。

9. CCA領域が、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有しないことを特徴とする7記載の翻訳テンプレート。

10. CCA領域にピューロマイシンを有することを特徴とする9記載の翻訳テンプレート。

11. ドナー領域に機能付与ユニットF1および/またはCCA領域に機能付与ユニットF2を含むことを特徴とする7~10のいずれか1項に記載の翻訳テンプレート。

12. 機能付与ユニットF1および/またはF2が、該翻訳テンプレートを固定化および/または蛍光ラベル化するものであることを特徴とする11に記載の翻訳テンプレート。

13. 機能付与ユニットF1および/またはF2がビオチンであることを特徴とする12記載の翻訳テンプレート。

14. 機能付与ユニットF1および/またはF2が、フルオレセイン、Cy5、またはローダミンググリーンであることを特徴とする12記載の翻訳テンプレート。

15. 6~14のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートのライブラリー。

16. 6~14のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートがリボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

17. 15に記載された翻訳テンプレートのライブラリーがリボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

18. 6~14のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートが、修飾部と、ピューロマイシンを含むペプチドアクセプター部と、それらを連結するヌクレオチドのリンカーとを含む、蛋白質のC末端を標識する修飾剤の存在下で、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

19. 修飾部において、少なくとも1つの機能付与ユニットF3を含むことを特徴とする18に記載の蛋白質。

20. 機能付与ユニットF3が、該翻訳テンプレートにより翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とする19記載の蛋白質。

21. 機能付与ユニットF3がビオチンであることを特徴とする20記載の蛋白質。

22. 機能付与ユニットF3が、フルオレセイン、Cy5、またはローダミンググリーンであることを特徴とする20記載の蛋白質。

23. 15に記載された翻訳テンプレートのライブラリーが、修飾部と、ピューロマイシンを含むペプチドアクセプター部と、それらを連結するヌクレオチドのリンカーとを含む、蛋白質のC末端を標識する修飾剤の存在下で、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

24. 修飾部において、少なくとも1つの機能付与ユニットF3を含むことを特徴とする23に記載の蛋白質のライブラリー。

25. 機能付与ユニットF3が、該翻訳テンプレートにより翻訳された蛋白質を固定化または蛍光ラベル化することを特徴とする24記載の蛋白質のライブラリー。

26. 機能付与ユニットF3がビオチンであることを特徴とする25記載の蛋白質のライブラリー。

27. 機能付与ユニットF3が、フルオレセイン、Cy5、またはローダミンググリーンであることを特徴とする25記載の蛋白質のライブラリー。

28. 蛋白質に翻訳される情報を持つORF領域およびその3'末端領域を有し、3'末端領域は、長さ2~10塩基のポリA配列を含むアクセプター領域を含むことを特徴とするコード分子。

29. 28に記載されたコード分子のライブラリー。

30. 蛋白質に翻訳される情報を持つコード部と少なくともコード部と連結するためのドナー領域を持つPEGスペーサー部を含み、コード部が28に記載されたコード分子に由来する翻訳テンプレート。

31. スペーサー部が、コード部と連結するためのドナー領域、およびポリエチレング

10

20

30

40

50

リコールを主成分としたPEG領域、および3'末端にCCA領域を持つことを特徴とするPEGスパーサー分子に由来する30記載の翻訳テンプレート。

32. CCA領域が、該翻訳テンプレートによって翻訳された蛋白質と、ペプチド転移反応によって結合する機能を有することを特徴とする31記載の翻訳テンプレート。

33. CCA領域にピューロマイシンを有することを特徴とする32記載の翻訳テンプレート。

34. 30～33のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートのライブラリー。

35. 30～33のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートが、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質。

36. 34に記載された翻訳テンプレートのライブラリーが、リボソーム上で翻訳されることにより合成されることを特徴とする蛋白質のライブラリー。

37. コード部を持たないことを特徴とする35記載の蛋白質。

38. 蛋白質がコード部を持たないことを特徴とする36記載の蛋白質のライブラリー。

39. 37に記載された蛋白質または38記載のライブラリーにおけるコード部を、RNaseによって切断することを特徴とする蛋白質またはそのライブラリーの製造法。

40. 16、18～23、35および37のいずれか1項に記載の蛋白質、または、17、23～27、36および38のいずれか1項に記載の蛋白質のライブラリーと物質を相互作用させて相互作用を解析することを含む、蛋白質と物質の相互作用解析方法。

41. 相互作用の解析が、蛍光相関分光法、蛍光イメージングアナライズ法、蛍光共鳴エネルギー移動法、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光偏光解消法、表面プラズモン共鳴法、または、固相酵素免疫検定法により行われる、40記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

42. 35に記載の蛋白質、または、36記載の蛋白質のライブラリーにおいて、該蛋白質のC末端に結合したコード部の塩基配列の増幅により蛋白質と物質の相互作用を検出する方法。

43. 無細胞共翻訳法または無細胞共翻訳スクリーニング法を用いることを特徴とする42記載の蛋白質と物質の相互作用を検出する方法。

44. 相互作用の解析において、翻訳テンプレートとそのライブラリーを蛍光ラベル化および/または固定化することを特徴とする、41記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

45. 相互作用の解析において、蛋白質とそのライブラリーを蛍光ラベル化および/または固定化することを特徴とする、40記載の蛋白質と物質の相互作用解析方法。

46. 相互作用の解析において、*in vitro*で蛋白質と物質の相互作用を解析する40記載の蛋白質と物質の相互作用を解析する方法。

47. 相互作用の解析において、*in vitro*で共翻訳法を利用することを特徴とする46記載の蛋白質と物質の相互作用を解析する方法。

48. 1～4および28のいずれか1項に記載されたコード分子もしくは6～14および30～33のいずれか1項に記載された翻訳テンプレートまたはそのライブラリーをリボソーム上で翻訳することを含む蛋白質またはそのライブラリーの製造方法。

発明を実施するための最良の形態

本発明の翻訳テンプレートがリボソーム上で翻訳されることにより合成される蛋白質のうち、翻訳テンプレートと結合している蛋白質(対応付け分子)、さらに修飾剤の存在下で同様に合成される蛋白質(C末端ラベル化蛋白質)に関して、まず、本発明を説明する。なお、本明細書において塩基を表す記号は、特記しない限り、WIPO Standard ST. 25の定義によるものである。

< 1 > 対応付け分子

本明細書において、対応付け分子とは、表現型と遺伝子型と対応付ける分子を意味する。対応付け分子は、遺伝子型を反映する塩基配列を有する核酸を含む遺伝子型分子と、表現型の発現に關与するタンパク質を含む表現型分子とが結合してなる。遺伝子型分子は、遺

10

20

30

40

50

伝子型を反映する塩基配列を、その塩基配列が翻訳され得るような形態で有するコード分子と、スペーサー部とが結合してなる。

対応付け分子における、表現型分子に由来する部分、スペーサー分子に由来する部分、および、コード分子に由来する部分をそれぞれ、デコード部、スペーサー部およびコード部と呼ぶ。また、遺伝子型分子における、スペーサー分子に由来する部分、および、コード分子に由来する部分をそれぞれ、スペーサー部およびコード部と呼ぶ。

図19に、対応付け分子、スペーサー分子およびコード分子の一例の大きな構成を示す。この対応付け分子は、ピューロマイシンを含むスペーサー（スペーサー部と呼ぶ）と表現型のコードを反映する塩基配列（コード部と呼ぶ）からなる。この対応付け分子は、コード分子に何らかの方法によってピューロマイシンを含むスペーサー部を結合して遺伝子型分子とし、無細胞翻訳系において、リボソーム上で表現型分子と連結した構成をもつ。スペーサー分子は、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域、少なくともピューロマイシンまたはピューロマイシンと1残基以上のDNAおよび/またはRNAからなるCCA領域、少なくとも1残基以上のDNAおよび/またはRNAを含むドナー領域、さらに、少なくとも1残基のDNAおよび/またはRNAの塩基に機能修飾を施した機能付与ユニット(X)からなる。コード分子は、デコード部の一部の配列からなるDNAおよび/またはRNAのポリA配列を含む3'末端領域、および、DNAおよび/またはRNAからなる転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含んだ5'UTR、さらに、主として表現型分子の配列からなるORF領域から構成される。以下、この例を参照して説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

10

20

< 1 - 1 > スペーサー分子

スペーサー分子は、核酸の3'末端に結合できるドナー領域と、ドナー領域に結合した、ポリエチレングリコールを主成分としたPEG領域と、PEG領域に結合した、ペプチド転移反応によってペプチドと結合し得る基を含むペプチドアクセプター領域とを含む。

核酸の3'末端に結合できるドナー領域は、通常、1以上のヌクレオチドからなる。ヌクレオチドの数は、通常には1~15、好ましくは1~2である。ヌクレオチドはリボヌクレオチドでもデオキシリボヌクレオチドでもよい。

ドナー領域の5'末端の配列は、ライゲーション効率を左右する。コード部とスペーサー部をライゲーションさせるためには、少なくとも1残基以上を含むことが必要であり、ポリA配列をもつアクセプターに対しては、少なくとも1残基のdC（デオキシシチジル酸）または2残基のdCdC（ジデオキシシチジル酸）が好ましい。塩基の種類としては、C>UまたはT>G>Aの順で好ましい。

30

PEG領域はポリエチレングリコールを主成分とするものである。ここで、主成分とするとは、PEG領域に含まれるヌクレオチドの数の合計が20bp以下、または、ポリエチレングリコールの平均分子量が400以上であることを意味する。好ましくは、ヌクレオチドの合計の数が10bp以下、または、ポリエチレングリコールの平均分子量が1000以上であることを意味する。

PEG領域のポリエチレングリコールの平均分子量は、通常には、400~30,000、好ましくは1,000~10,000、より好ましくは2,000~8,000である。ここで、ポリエチレングリコールの分子量が約400より低いと、このスペーサー分子に由来するスペーサー部を含む遺伝子型分子を対応付け翻訳したときに、対応付け翻訳の後処理が必要となることがあるが(Liu, R., Barrick, E., Szostak, J.W., Roberts, R.W. (2000) *Methods in Enzymology*, vol. 318, 268-293)、分子量1000以上、より好ましくは2000以上のPEGを用いると、対応付け翻訳のみで高効率の対応付けができるため、翻訳の後処理が必要なくなる。また、ポリエチレングリコールの分子量が増えると、遺伝子型分子の安定性が増す傾向があり、特に分子量1000以上で良好であり、分子量400以下ではDNAスペーサーと性質がそれほどかわらず不安定となることがある。

40

ペプチドアクセプター領域は、ペプチドのC末端に結合できるものであれば特に限定されないが、例えば、ピューロマイシン、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌ

50

クレオシド (3' - N - Aminoacyl puromycin aminonucleoside, PANS - アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンの PANS - Gly、バリンの PANS - Val、アラニンの PANS - Ala、その他、全アミノ酸に対応する PANS - 全アミノ酸が利用できる。また、化学結合として 3' - アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合した結果形成されたアミド結合でつながった 3' - N - アミノアシルアデノシナミノヌクレオシド (3' - Aminoacyl adenosine aminonucleoside, AANS - アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンの AANS - Gly、バリンの AANS - Val、アラニンの AANS - Ala、その他、全アミノ酸に対応する AANS - 全アミノ酸が利用できる。また、ヌクレオシドまたはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども利用できる。その他、ヌクレオシドまたはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質と、アミノ酸またはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質を化学的に結合可能な結合様式のものなら全て利用することができる。

10

ペプチドアクセプター領域は、好ましくは、ピューロマイシンもしくはその誘導体、または、ピューロマイシンもしくはその誘導体と 1 残基もしくは 2 残基のデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドからなることが好ましい。ここで、誘導体とはタンパク質翻訳系においてペプチドの C 末端に結合できる誘導体を意味する。ピューロマイシン誘導体は、ピューロマイシン構造を完全に有しているものに限られず、ピューロマイシン構造の一部が欠落しているものも包含する。ピューロマイシン誘導体の具体例としては、PANS - アミノ酸、AANS - アミノ酸などが挙げられる。

20

ペプチドアクセプター領域は、ピューロマイシンのみの構成でもかまわないが、5' 側に 1 残基以上の DNA および / または RNA からなる塩基配列を持つことが好ましい。配列としては、dC - ピューロマイシン、rC - ピューロマイシンなど、より好ましくは dC dC - ピューロマイシン、rC rC - ピューロマイシン、rC dC - ピューロマイシン、dC rC - ピューロマイシンなどの配列で、アミノアシル - tRNA の 3' 末端を模倣した CCA 配列 (Phillips, G. R. (1969) Nature 223, 374 - 377) が適当である。塩基の種類としては、C > U または T > G > A の順で好ましい。

スペーサー分子は、ドナー領域と PEG 領域との間に、少なくとも 1 つの機能付与ユニットを含むことが好ましい。機能付与ユニットは、好ましくは、少なくとも 1 残基のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの塩基に機能修飾を施したものである。例えば、機能修飾物質として、固定化や蛍光ラベル化のための物質が挙げられる。具体例としては、図 20 に示した蛍光物質、ビオチン、または His - tag など各種分離タグなどを導入したものが可能である。

30

図 20 に、スペーサー分子の一例の詳細な構成を示す。スペーサー分子は、ポリエチレングリコールを主成分とした PEG 領域、ピューロマイシンまたはピューロマイシンと少なくとも 1 残基の DNA および / または RNA からなる CCA 領域、少なくとも 1 残基以上の DNA および / または RNA を含むドナー領域、さらに、少なくとも 1 残基の DNA および / または RNA の塩基に機能修飾を施した機能付与ユニット (X) からなる。ここでは、機能付与ユニット (X) として蛍光物質 T (F1) とビオチン T (Bio) が用いられている。

40

< 1 - 2 > コード分子

コード分子は、転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含む 5' 非翻訳領域と、5' 非翻訳領域の 3' 側に結合した、タンパク質をコードする ORF 領域と、ORF 領域の 3' 側に結合した、アクセプター領域 (通常にはポリ A 配列) および、必要によりその 5' 側に翻訳増強配列 (例えば制限酵素 Xho I が認識する配列) を含む 3' 末端領域を含む核酸である。

コード分子は、DNA でも RNA でもよく、RNA の場合、5' 末端に Cap 構造があってもなくても良い。また、コード分子は任意のベクターやプラスミドに組み込まれたものとしてもよい。

50

3'末端領域は、例えば、XhoI配列とその下流にポリA配列を含む。スパーサー分子とコード分子とのライゲーション効率に影響を与える要素としては3'末端領域のポリA配列が重要であり、ポリA配列は、少なくとも2残基以上のdAおよび/またはrAの混合または単一のポリA連続鎖であり、好ましくは、3残基以上、より好ましくは6以上、さらに好ましくは8残基以上のポリA連続鎖である。

コード分子の翻訳効率に影響する要素としては、転写プロモーターと翻訳エンハンサーからなる5'UTR、および、ポリA配列を含む3'末端領域の組み合わせがある。3'末端領域のポリA配列の効果は通常には10残基以下で発揮される。5'UTRの転写プロモーターはT7/T3またはSP6などが利用でき、特に制限はない。好ましくはSP6であり、特に、翻訳のエンハンサー配列としてオメガ配列やオメガ配列の一部を含む配列を利用する場合はSP6を用いることが特に好ましい。翻訳エンハンサーは好ましくはオメガ配列の一部であり、オメガ配列の一部としては、TMVのオメガ配列(Gallie D. R., Walbot V. (1992) Nucleic Acids Res., vol. 20, 4631-4638)の一部(029)を含んだものが好ましい。

また、翻訳効率に関し、3'末端領域においては、XhoI配列とポリA配列の組み合わせが重要となる。また、ORF領域の下流部分、すなわちXhoI配列の上流に親和性タグがついたものとポリA配列の組み合わせも重要となる。親和性タグ配列としては、抗原抗体反応など、タンパク質を検出できるいかなる手段を用いるための配列であればよく、制限はない。好ましくは、抗原抗体反応によるアフィニティー分離分析用タグであるFlag-tag配列である。ポリA配列効果としては、Flag-tag等の親和性タグにXhoI配列がついたものとそこへさらにポリA配列がついたものの翻訳効率が上昇する。

上記の翻訳効率に関し効果のある構成は、対応付け効率にも有効である。

ORF領域については、DNAおよび/またはRNAからなるいかなる配列でもよい。遺伝子配列、エキソン配列、イントロン配列、ランダム配列、または、いかなる自然界の配列、人為的配列が可能であり、配列の制限はない。また、コード分子の5'UTRをSP6+029とし、3'末端領域を、たとえば、Flag+XhoI+A_n(n=8)とすることで、各長さは、5'UTRで約60bp、3'末端領域で約40bpであり、PCRのプライマーにアダプター領域として組み込める長さである。このため、あらゆるベクターやプラスミドやcDNAライブラリーからPCRによって、5'UTRと3'末端領域をもったコード分子を簡単に作成できる。コード分子において、翻訳はORF領域を超えてされてもよい。すなわち、ORF領域の末端に終止コドンがなくてもよい。

図21に、コード分子の一例の詳細な構成を示す。コード分子は、3'末端領域と、DNAおよび/またはRNAからなる転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含む5'UTRと、デコード部の配列情報からなる、すなわち表現型タンパク質をコードするORF領域とからなる。ここでは、3'末端領域として、DNAおよび/またはRNAからなる親和性タグ配列、XhoI配列、ポリA配列を含み、Flag-tag配列を用いている。5'UTRとして、転写プロモーターのSP6、翻訳エンハンサーのオメガ配列の一部である029を含む配列を用いている。

< 1 - 3 > 遺伝子型分子およびその製造方法

遺伝子型分子(翻訳テンプレート)は、転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含む5'非翻訳領域と、5'非翻訳領域の3'側に結合した、タンパク質をコードするORF領域と、ORF領域の3'側に結合した、ポリA配列を含む3'末端領域を含む核酸であるコード分子の3'末端と、スパーサー分子のドナー領域とが結合してなる。

遺伝子型分子を構成するコード分子は、コード分子について説明したとおりである。しかしながら、必要により発現増強配列を有することが好ましい。

遺伝子型分子は、上記コード分子の3'末端と、スパーサー分子のドナー領域を、通常のリガーゼ反応により結合させることにより製造できる。反応条件としては、通常、4~25で4~48時間の条件が挙げられ、PEG領域を含むスパーサー分子のPEG領域内のポリエチレングリコールと同じ分子量のポリエチレングリコールを反応系に添加する場

合には、15 で0.5～4時間に短縮することも可能である。

スペーサー分子とコード分子の組み合わせはライゲーション効率に重要な効果をもたらす。アクセプターにあたるコード部の3'末端領域において、少なくとも2残基以上、好ましくは3残基以上、さらに好ましくは6～8残基以上のDNAおよび/またはRNAのポリA配列があること、さらに、5'UTRの翻訳エンハンサーとしては、オメガ配列の部分配列(029; 図21)が好ましく、スペーサー部のドナー領域としては、少なくとも1残基のdC(デオキシシチジル酸)または2残基のdCdC(ジデオキシシチジル酸)が好ましい。このことによって、RNAリガーゼを用いることでDNAリガーゼのもつ問題を回避し、かつ効率を60～80%に保つことができる。

遺伝子型分子がRNAである場合には、(a)転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含む5'非翻訳領域と、5'非翻訳領域の3'側に結合した、タンパク質をコードするORF領域と、ORF領域の3'側に結合した、ポリA配列を含む3'末端領域を含むコード分子の3'末端と、(b)上記のスペーサー分子のドナー領域であってRNAからなるものとの、スペーサー分子内のPEG領域を構成するポリエチレングリコールと同じ分子量をもつ遊離のポリエチレングリコールの存在下で、RNAリガーゼにより結合させることが好ましい。

ライゲーション反応時に、PEG領域を含むスペーサー部のPEG領域と同じ分子量のポリエチレングリコールを添加することによって、スペーサー部のポリエチレングリコールの分子量によらずライゲーション効率が80～90%以上に向上し、反応後の分離工程も省略することができる。

<1-4> 対応付け分子およびその製造方法

対応付け分子は、上記の遺伝子型分子を、ペプチド転移反応で、遺伝子型分子内のORF領域によりコードされたタンパク質である表現型分子と連結してなるものである。

対応付け分子は、遺伝子型分子を、リボソーム上で翻訳(例えば無細胞翻訳系で翻訳)することにより、ペプチド転移反応で、遺伝子型分子内のORF領域によりコードされたタンパク質である表現型分子と連結することにより。

無細胞翻訳系は、好ましくは、小麦胚芽またはウサギ網状赤血球のものである。翻訳の条件は通常に採用される条件でよい。例えば、25～37 で15～240分の条件が挙げられる。

無細胞翻訳系については、これまで大腸菌(*E. coli*)、ウサギ網状赤血球、小麦胚芽の系で対応付け分子の形成が検討され、ウサギ網状赤血球の系でのみ対応付け分子が確認されていたが(Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. (1997) *FEBS Lett.* 414, 405; Roberts, R. W., Szostak, J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297)、この態様によれば、PEG領域を含むスペーサー部をもつ対応付け分子として、小麦胚芽の系でも対応付け分子の形成を行うことができる。また、これまでウサギ網状赤血球の系では遺伝子型分子の安定性を欠くために実用性に乏しく、短い鎖長の遺伝子型分子にのみ適用されてきたが(Roberts, R. W., Szostak, J. W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297; Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Yanagawa, H. (1997) *FEBS Lett.* 414, 405)、PEG領域を含むスペーサー部をもつ対応付け分子は、小麦胚芽の系ではより安定であり長い鎖長を取り扱える実用的な系である。

<2> C末端ラベル化蛋白質

C末端ラベル化蛋白質は、C末端が修飾された蛋白質であり、図22のAに示すように、ラベル化剤が蛋白質のC末端に結合した構成をもっている。すなわち、C末端ラベル化蛋白質は、蛋白質とラベル化剤とにより構成される。

C末端ラベル化蛋白質を構成する「蛋白質」とは、その機能が既知または未知である相互作用の解析対象として用いる蛋白質を意味する。本発明のC末端ラベル化蛋白質は、この蛋白質と後述する標的分子との相互作用の有無の測定に使用できる。

この蛋白質は、天然蛋白質またはその変異体、および人工蛋白質またはその変異体の何れでもよい。天然蛋白質は、種々の生物の器官、組織または細胞に由来する cDNA ライブラリーから転写および翻訳される、多様性を有する蛋白質のライブラリーをも含むものである。人工蛋白質は、天然蛋白質の全てもしくは部分配列を組み合わせた配列、またはランダムなアミノ酸配列を含むものである。

C末端ラベル化蛋白質を構成する蛋白質は、全長蛋白質であることが好ましい。本明細書において「全長蛋白質」とは、C末端が完全に翻訳されている蛋白質、すなわち、その蛋白質をコードする塩基配列の終止コドンの一つ前までのコドンが翻訳されて得られた蛋白質を意味する。全長蛋白質のN末端は、シグナルペプチドの切断等何らかのプロセッシングを受けていてもよい。

また、C末端ラベル化蛋白質を構成する蛋白質は親和性タグと融合した蛋白質であってもよい。親和性タグの例としては、ポリヒスチジンペプチドやエピトープペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインA、マルトース結合蛋白質、カルモジュリン結合ペプチド等が挙げられる。

C末端ラベル化蛋白質は、ラベル化剤存在下で、翻訳テンプレートを翻訳系で発現させて蛋白質合成を行わせ、合成された蛋白質を精製することにより製造することができる。以下、ラベル化剤、翻訳テンプレートおよび製造の例について説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

< 2 - 1 > ラベル化剤

ラベル化剤は、図22のBに示すように、蛋白質の翻訳系でのペプチド転移反応、すなわち、リボソーム上でのペプチド転移反応によって蛋白質と結合し得る基(残基を含む)をもつペプチドアクセプター部が、ヌクレオチドリinkerを介して修飾部と結合した構成をもつ。このラベル化剤の存在下で蛋白質合成を行い、得られるC末端ラベル化蛋白質を精製し、分子間相互作用の検出系を用いることによって、蛋白質相互作用の検出が可能となる。

修飾部に含まれる修飾物質の具体例としては、蛍光性、非蛍光性修飾物質等が挙げられる。蛍光性物質としては、フルオレセイン系列、ローダミン系列、Cy3、Cy5、エオシン系列、NBD系列等の蛍光色素や、緑色蛍光蛋白質(GFP)等の蛍光性蛋白質がある。また、非蛍光性物質としては、ビオチンのような補酵素、蛋白質、ペプチド、糖類、脂質類、色素、ポリエチレングリコール等、何らかの目印となり得る化合物であればいかなるものでもよい。

C末端ラベル化剤においては、修飾部が蛍光基、蛋白質と結合する基(例えばビオチニル基やイミノビオチニル基)、または、その両方をもつことが好ましい。特に、ビオチニル基やイミノビオチニル基を有することは、本発明C末端ラベル化剤による修飾の効率が上昇するため、好ましい。

ペプチドアクセプター部は、蛋白質の翻訳系で、ペプチド転移反応によって蛋白質と結合し得る基をもち、好ましくはピューロマイシンまたはその誘導体の残基をもつ。

ピューロマイシンはアミノアシルtRNAと類似した構造をもち、蛋白質合成を阻害する抗生物質として知られているが、低濃度では蛋白質のC末端に結合することが知られている(Miyamoto-Sato, E. et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 1176-1182)。本発明で用いることができるピューロマイシン誘導体は、ピューロマイシンと類似した構造を有し、蛋白質のC末端に結合することができる物質であればいかなるものでもよい。具体例としては、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド等が挙げられる。

修飾部とペプチドアクセプター部との間をつなぐヌクレオチドリinkerとは、具体的には、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドが1個ないし複数個つながった核酸または核酸誘導体であり、特に好ましい例として、シトシン塩基を含むリボヌクレオチド(-rC-)またはデオキシリボヌクレオチド(-dC-)が1個ないし複数個つながった化合物が挙げられる。その他、修飾部とペプチドアクセプター部との間に挿入すること

10

20

30

40

50

によって修飾蛋白質の収量を上げることができる物質であればいかなるものでもよい。ラベル化剤においては、ヌクレオチドリンカーが2'-デオキシシチジル酸、2'-デオキシシチジル-(3',5')-2'-デオキシシチジル酸、リボシチジル酸、または、リボシチジル-(3',5')-リボシチジル酸であることが好ましい。

ラベル化剤は、上記修飾部とペプチドアクセプター部とを所望のヌクレオチドリンカーを介して、それ自体既知の化学結合方法によって結合させることにより製造することができる。具体的には、例えば、適当な保護基で保護された上記ペプチドアクセプター部を固相担体上に結合させ、核酸合成機等を用いてヌクレオチドリンカーとしてヌクレオチドホスホアミダイト、およびデオキシヌクレオチドホスホアミダイト、修飾物質として蛍光物質やビオチンなどを結合したヌクレオチドホスホアミダイトを順次結合させた後、脱保護を行うことによって作製することができる。上記各部の種類、または結合の種類によっては液相合成法で結合させるかまたは両者を併用することもできる。また、修飾物質としてニッケル等の金属イオンを用いる場合には、金属イオンが配位しうるニトリロトリ酢酸やイミノジ酢酸等のキレート性の試薬を結合させ、次いで金属イオンを配位させることができる。

10

< 2 - 2 > 翻訳テンプレート

翻訳テンプレートは、本発明修飾蛋白質を製造する際に利用できる翻訳テンプレートであり、図22のCに示すように、ポリA配列を含む3'末端領域、転写プロモーターを含んだ5'非翻訳領域(5'UTR)、および、蛋白質のコードされたORF領域から構成される。翻訳テンプレートはDNAでもRNAでもよい。

20

さらに詳細には、翻訳テンプレートは、蛋白質をコードするORF領域と、ORF領域の5'側に位置する、転写プロモーターおよび翻訳エンハンサーを含んだ5'UTRと、ORF領域の3'側に位置する、ポリA配列(polyA)を含んだ3'末端領域から構成される。

さらに好ましい翻訳テンプレートは、5'UTRの転写プロモーターとしてSP6RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含み、翻訳エンハンサーとしてタバコモザイクウイルス(TMV)のオメガ配列の一部(029)を含む。また、ORF領域がその下流部分に親和性タグ配列を含むことが好ましい。親和性タグ配列は、上述の親和性タグをコードする配列であり、好ましくはHis-tag(ポリヒスチジンタグ)配列を含む。本発明翻訳テンプレートを用いて製造された本発明修飾蛋白質をポリヒスチジンタグを用いて製造する場合には、ポリヒスチジンタグは長い方が、ニッケルキレート樹脂による回収率が向上するため、好ましい。ポリヒスチジンタグの好ましい長さの範囲は、修飾される蛋白質の種類や標識の種類により変化し得るが、通常には、8~12残基である。

30

なお、本明細書において「上流」および「下流」とは、転写または翻訳の方向におけるものを意味する。

翻訳テンプレートは、DNAである場合、上記の領域を適当なDNAベクターまたはプラスミドに導入することにより得られたDNAベクターまたはプラスミドであってもよい。また、翻訳テンプレートは、RNAである場合、5'末端にCap構造があってもなくてもよい

< 2 - 3 > C末端ラベル化蛋白質の製造

40

C末端ラベル化蛋白質の製造に用いられる翻訳系としては、無細胞蛋白質合成系や細胞発現系が挙げられる。無細胞蛋白質合成系の具体例としては、小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、大腸菌S30抽出液等が挙げられる。これらの無細胞蛋白質合成系の中に、上記翻訳テンプレートを加え、同時に1~100μMの修飾剤を加え、25~37で1~数時間保温することによってC末端修飾蛋白質が合成される。合成された修飾蛋白質は、そのまま次の精製プロセスまたは検出プロセスに供することができる。一方、細胞発現系の具体例としては、大腸菌、枯草菌、好熱菌、酵母等の細菌から、昆虫細胞、哺乳類等の培養細胞、さらに線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス等の細胞に至るまで、遺伝子導入が可能な細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞の中に、上記本発明翻訳テンプレートを導入し、同時に1~100μMの本発明修飾剤を電気穿孔

50

法、マイクロインジェクション法等により細胞の中に導入し、細胞の至適生育温度で数時間保温することによって修飾蛋白質が合成される。合成された修飾蛋白質は、細胞を破砕することによって回収し次の精製プロセスまたは検出プロセスに供することができる。また、そのまま細胞の中で検出プロセスに供することも可能である。翻訳テンプレートは、用いる翻訳系に合わせて適切なものを選択する。

C末端ラベル化蛋白質を精製する方法としては、アフィニティー、ゲルろ過、イオン交換等のクロマトグラフィーや、電気泳動、沈澱、透析等、一般に蛋白質の精製に用いられるあらゆる方法が利用可能である。好ましくは、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過、イオンクロマトグラフィー、電気泳動、沈殿、透析、および、それらの任意の組合せが挙げられる。特に好ましい例として、ポリヒスチジンペプチドやエピトープペプチド、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインA、マルトース結合蛋白質、カルモジュリン結合ペプチド等の親和性タグを融合した修飾蛋白質を親和性樹脂で精製し、さらに未反応の修飾剤を完全に除去するためにゲルろ過カラムに数回かける方法がある。また、上記の親和性タグを融合した修飾蛋白質を親和性樹脂で予め精製した後、修飾部のビオチニル基またはイミノビオチニル基とアビジンまたはストレプトアビジンの親和性を利用して、未修飾蛋白質を完全に除き、100%修飾された蛋白質を得る方法もある。

10

< 3 > 本発明のより具体的な態様の説明

第一の発明の翻訳テンプレート(図1のA)は、コード分子(図1のB)に由来するコード部とPEGスペーサー分子(図1のC)に由来するPEGスペーサー部からなる。本発明は、基本的にはコード部の配列によらず、コード部にPEGスペーサー部を連結(ライゲーション)することでその安定性が向上して翻訳効率を向上出来る。しかしながら、さらにコード部の構成やPEGスペーサー部の種類によって、その翻訳効率をより向上させることが可能である。以下にその詳細を記載する。

20

本発明コード部(図1のB)は、5'末端領域、ORF領域、3'末端領域からなり、5'末端にCap構造があってもなくてもよい。また、コード部の配列には特に制限はなく、あらゆるベクターやプラスミドに組み込まれた遺伝子やランダム配列などの利用が考えられる。また、コード部の3'末端領域には、A配列としてポリA_x8配列、またはX配列としてXhoI配列や4塩基以上で(CまたはG)NN(CまたはG)の配列を持つもの(すなわち、XhoI配列およびその他の4塩基以上でSNN Sの配列を持つもの)、およびA配列とX配列の組み合わせとしてのXA配列がある。A配列、X配列、またはXA配列の上流に親和性タグ配列としてFlag-tag配列、からなる構成が考えられる。ここで、親和性タグ配列としてはHA-tagやIgGのprotein A(zドメイン)などの抗原抗体反応を利用したものやHis-tagなど、蛋白質を検出または精製できるいかなる手段を用いるための配列でもかまわない。ここで、翻訳効率に影響する範囲としては、XA配列の組み合わせが重要であり、X配列のなかで、最初の4塩基が重要であり、SNN Sの配列を持つものが好ましい。X配列の長さの上限は、翻訳増強の効果が得られる限り特に限定されないが、通常には、15塩基以下、好ましくは6塩基以下である。また、5'末端領域は、転写プロモーターと翻訳エンハンサーからなり、転写プロモーターはT7/T3またはSP6などが利用でき、特に制限はないが、小麦の無細胞翻訳系では、翻訳のエンハンサー配列としてオメガ配列やオメガ配列の一部を含む配列

30

40

本発明PEGスペーサー部(図1のC)は、CCA領域、PEG領域、ドナー領域からなる。最低限必要な構成は、ドナー領域である。翻訳効率に影響する範囲としては、ドナー領域のみならずPEGスペーサー部を持つものが好ましく、さらにアミノ酸との結合能力

50

のないピューロマイシンを持つことが好ましい。PEG領域のポリエチレングリコールの分子量の範囲は、400~30,000で、好ましくは1,000~10,000、より好ましくは2,000~6,000である。また、CCA領域にはピューロマイシンを含む構成と含まない構成が可能であり、ピューロマイシンについては、ピューロマイシン(Puromycin)、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオシド(3'-N-Aminoacylpuromycin aminonucleoside, PANS-アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンのPANS-Gly、バリンのPANS-Val、アラニンのPANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するPANS-全アミノ酸が利用できる。また、化学結合として3'-アミノアデノシンのアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合した結果形成されたアミド結合でつながった3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオシド(3'-Aminoacyladenosine aminonucleoside, AANS-アミノ酸)、例えばアミノ酸部がグリシンのAANS-Gly、バリンのAANS-Val、アラニンのAANS-Ala、その他、全アミノ酸に対応するAANS-全アミノ酸が利用できる。また、ヌクレオシドまたはヌクレオシドとアミノ酸のエステル結合したものなども利用できる。その他、ヌクレオシドまたはヌクレオシドに類似した化学構造骨格を有する物質と、アミノ酸またはアミノ酸に類似した化学構造骨格を有する物質を化学的に結合可能な結合様式のものなら全て利用することができる。本翻訳テンプレートでは、以上のピューロマイシン誘導体のアミノ基がアミノ酸と結合する能力を欠いたあらゆる物質、およびピューロマイシンを欠いたCCA領域も考えられるが、リボソーム上で蛋白質と結合不能なピューロマイシンを含むことで、より翻訳効率を高められる。その理由は定かではないが、蛋白質と結合不能なピューロマイシンがリボソームを刺激することでターンオーバーが促進される可能性がある。CCA領域(CCA)の5'側に1残基以上のDNAおよび/またはRNAからなる塩基配列を持つことが好ましい。塩基の種類としては、C>UまたはT>G>Aの順で好ましい。配列としては、dC-ピューロマイシン、rC-ピューロマイシンなど、より好ましくはdCdC-ピューロマイシン、rCrC-ピューロマイシン、rCdC-ピューロマイシン、dCrC-ピューロマイシンなどの配列で、アミノアシル-tRNAの3'末端を模倣したCCA配列(Phillips G.R.(1969) Nature 223, 374-377)が適当である。第一の発明では、これらのピューロマイシンが何らかの方法でアミノ酸と結合不可能となっている。

10

20

30

本発明PEGスペーサー部は修飾物質(F1および/またはF2)を有する構成が可能である。このことによって、翻訳テンプレートを回収、精製による再利用、または固定化などのためのタグとして利用することが出来る。少なくとも1残基のDNAおよび/またはRNAの塩基に修飾物質として、蛍光物質、ビオチン、またはHis-tagなど各種分離タグなどを導入したものが可能である。また、コード部の5'末端領域をSP6+029とし、3'末端領域を、たとえば、Flag+XhoI+An(n=8)とすることで、各長さは、5'末端領域で約60bp、3'末端領域で約40bpであり、PCRのプライマーにアダプター領域として設計可能な長さである。これによって新たな効果が生み出された。すなわち、あらゆるベクターやプラスミドやcDNAライブラリーからPCRによって、本発明の5'末端領域と3'末端領域をもったコード部を簡単に作成可能となり、このコード部に、3'UTRの代わりとしてPEGスペーサー部をライゲーションすることで、翻訳効率の高い翻訳テンプレートを得られる。

40

本発明PEGスペーサー部とコード部のライゲーションは、その方法については、一般的なDNAリガーゼを用いるものや光反応による連結など何でもよく、特に限定されるものではない。RNAリガーゼを用いるライゲーションでは、コード部でライゲーション効率に影響を与える範囲としては3'末端領域のA配列が重要であり、少なくとも2残基以上のdAおよび/またはrAの混合または単一のポリA連続鎖であり、好ましくは、3残基以上、より好ましくは6から8残基以上のポリA連続鎖である。PEGスペーサー部のドナー領域の5'末端のDNAおよび/またはRNA配列は、ライゲーション効率を左右する。コード部とPEGスペーサー部を、RNAリガーゼでライゲーションするためには、

50

少なくとも1残基以上を含むことが必要であり、ポリA配列をもつアクセプターに対しては、少なくとも1残基のdC(デオキシシチジル酸)または2残基のdCdC(ジデオキシシチジル酸)が好ましい。塩基の種類としては、C>UまたはT>G>Aの順で好ましい。さらに、ライゲーション反応時に、PEG領域と同じ分子量のポリエチレングリコールを添加することが好ましい。

第二の発明は、修飾剤の存在下で、第一の発明の翻訳テンプレートをを用いた翻訳によって合成された、修飾剤でC末端修飾された蛋白質(図2のA)であり、翻訳テンプレート(図2のB)と、修飾剤(図2のC)からなる。ここでの特徴は、特に翻訳テンプレートのコード部の構成にある。以下詳細に記述する。

本発明翻訳テンプレート(図2のB)のPEGスペーサー部は、ピューロマイシンがアミノ酸と連結出来ないことを特徴とし、第一の発明と同様である。また、コード部も第一の発明と同様であるが、特に、C末端ラベル化に適した構成としては、3'末端領域が、XA配列であることが重要であり、X配列のなかで、最初の4塩基が重要で、SNN Sの配列を持つものが好ましい。ここでも、コード部の5'末端領域をSP6+029とし、3'末端領域を、たとえば、Flag+XhoI+A_n(n=8)とすることで、各長さは、5'末端領域で約60bp、3'末端領域で約40bpであり、PCRのプライマーにアダプター領域として設計できる長さである。これによって、あらゆるベクターやプラスミドやcDNAライブラリーからPCRによって、本発明の5'末端領域と3'末端領域をもったコード部を簡単に作成可能となり、このコード部に3'UTRの代わりとしてPEGスペーサー部をライゲーションすることで、C末端ラベル化に適した翻訳効率の高い翻訳テンプレートを得られる。

本発明修飾剤(図2のC)は、タンパク質の翻訳系でのペプチド転移反応、すなわち、リボソーム上でのペプチド転移反応によってタンパク質と結合し得る基(残基を含む)をもつペプチドアクセプター部が、ヌクレオチドリンカーを介して修飾部と結合した構成をもつ。この修飾剤の存在下でタンパク質合成を行い、得られるC末端修飾タンパク質を精製し、分子間相互作用の検出系を用いることによって、タンパク質相互作用の検出が可能となる。修飾部には、第一の発明のPEGスペーサー部と同様に修飾物質(F3)が含まれる。修飾物質として、非放射性修飾物質の具体例としては、蛍光性、非蛍光性修飾物質等が挙げられる。蛍光性物質としては、フルオレセイン系列、ローダミン系列、Cy3、Cy5、エオシン系列、NBD系列等の蛍光色素や、緑色蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光性タンパク質がある。また、非蛍光性物質としては、ビオチンのような補酵素、タンパク質、ペプチド、糖類、脂質類、色素、ポリエチレングリコール等、何らかの目印となり得る化合物であればいかなるものでもよい。本発明修飾剤においては、修飾部が蛍光基、タンパク質と結合する基、または、その両方をもつことが好ましい。ペプチドアクセプター部は、タンパク質の翻訳系で、ペプチド転移反応によってタンパク質と結合し得る基をもち、好ましくはピューロマイシンまたはその誘導体の残基をもつ。ピューロマイシンはアミノアシルtRNAと類似した構造をもち、タンパク質合成を阻害する抗生物質として知られているが、低濃度ではタンパク質のC末端に結合することが知られている(Miyamoto-Sato, E. et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: 1176-1182)。本発明で用いることができるピューロマイシン誘導体は、ピューロマイシンと類似した構造を有し、タンパク質のC末端に結合することができる物質であればいかなるものでもよい。具体例としては、3'-N-アミノアシルピューロマイシンアミノヌクレオチド、3'-N-アミノアシルアデノシンアミノヌクレオチド等が挙げられる。修飾部とアクセプター部との間をつなぐヌクレオチドリンカーとは、具体的には、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドが1個ないし複数個つながった核酸または核酸誘導体であり、特に好ましい例として、シトシン塩基を含むリボヌクレオチド(-rC-)またはデオキシリボヌクレオチド(-dC-)が1個ないし複数個つながった化合物が挙げられる。その他、修飾部とアクセプター部との間に挿入することによって修飾タンパク質の収量を上げることができる物質であればいかなるものでもよい。本発明修飾剤においては、ヌクレオチドリンカーが2'-デオキシシチジル酸、2'

10

20

30

40

50

-デオキシチジル - (3' , 5') - 2' - デオキシチジル酸、リボチチジル酸、または、リボチチジル - (3' , 5') - リボチチジル酸であることが好ましい。

本発明の修飾剤は、上記修飾部とアクセプター部とを所望のヌクレオチドリンカーを介して、それ自体既知の化学結合方法によって結合させることにより製造することができる。具体的には、例えば、適当な保護基で保護された上記アクセプター部を固相担体上に結合させ、核酸合成機を用いてヌクレオチドリンカーとしてヌクレオチドホスホアミダイト、およびデオキシヌクレオチドホスホアミダイト、機能性修飾物質として蛍光物質やビオチンなどを結合したホスホアミダイトを順次結合させた後、脱保護を行うことによって作製することができる。上記各部の種類、または結合の種類によっては液相合成法で結合させるかまたは両者を併用することもできる。また、機能性修飾物質としてニッケル等の金属イオンを用いる場合には、金属イオンが配位しうるニトリロトリ酢酸やイミノジ酢酸等のキレート性の試薬を結合させ、次いで金属イオンを配位させることができる。

第三の発明は、第一の発明の翻訳テンプレートをを用いた翻訳によって合成された、翻訳テンプレートでC末端修飾された蛋白質(図3のA; 対応付け分子)と翻訳テンプレート(図3のB)を除去した、PEGによってC末端修飾された蛋白質(図3のC)の構成を持つ。以下詳細に記述する。

翻訳テンプレート(図3のB)のPEGスペーサー部は、ピューロマイシンがアミノ酸と連結できることを特徴とする以外は第一の発明と同様である。また、コード部も第一の発明と同様であるが、特に、対応付けに適した構成としては、3'末端領域をA配列にすることが重要であり、トータル蛋白の対応付けの効率が著しく向上してフリー蛋白質の量が激減することが確認された。ここでも、コード部の5'末端領域をSP6+029とし、3'末端領域を、たとえば、Flag+XhoI+An(n=8)とすることで、各長さは、5'末端領域で約60bp、3'末端領域で約40bpであり、PCRのプライマーにアダプター領域として設計できる長さである。これによって、あらゆるベクターやプラスミドやcDNAライブラリーからPCRによって、本発明の5'末端領域と3'末端領域をもったコード部を簡単に作成可能となり、PEGスペーサー部をライゲーションすることで、対応付け効率の高い翻訳テンプレートが得られる。また、本発明のPEGによってC末端修飾された蛋白質(図3C)は、蛋白質の相互作用検出などにおいて、コード部を利用しない場合、たとえば、FCFS測定、蛍光リーダー、プロテインチップなどに適用する場合は、RNase Aなどで意図的に切断することが好ましい。切断することによって、コード部の妨害による蛋白質間相互作用の検出の困難性が解消出来る。

対応付け分子は、進化分子工学として、ダーウィン進化機構を利用して、「変異(Mutation)」、「選択(Selection)」、「増幅(Amplification)」の3つの単位操作を繰り返すことで、ランダムライブラリーなどから、漸進的に進化させ、所望の機能を獲得した物質を創製することで工学的に応用することが可能である(図4)。また、ゲノム機能解析への応用として、cDNAライブラリーから所望の物質や蛋白質と相互作用を持つ一群の遺伝子配列を網羅的に解析可能である(図4)。さらに、図4のスクリーニングを一次スクリーニング後に、二次スクリーニングとして、図5に示したように物質や蛋白質と相互作用の詳細をFCFSやマイクロアレイなどにより解析することが可能である。以上の解析は、in vitroにおける共翻訳や共翻訳スクリーニング法と組み合わせて利用することもできる。また、一次スクリーニングで対応付け分子を利用するときはA配列のコード部を利用し、二次スクリーニングでは、対応付け分子を利用するときはA配列のコード部、C末端ラベル化蛋白質を利用するときはXA配列のコード部をプライミングによって変更して使用することで、それぞれの効果を使い分けることが出来る。

無細胞タンパク質合成系の具体例としては、小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、大腸菌S30抽出液等が挙げられる。これらの無細胞タンパク質合成系の中に、上記翻訳テンプレートを加え、C末端ラベル化の場合は、同時に1~100μMの修飾剤を加え、25~37℃で1~数時間保温することによってC末端修飾タンパク質が合成される。対応付けの場合は、上記翻訳テンプレートを加えて、25~37℃で1~数時間保温するだ

10

20

30

40

50

けで対応付け分子が合成される。合成された両修飾タンパク質は、そのまま次の精製プロセスまたは検出プロセス、または直接細胞への導入に供することができる。細胞発現系の具体例としては、大腸菌、枯草菌、好熱菌、酵母等の細菌から、昆虫細胞、哺乳類等の培養細胞、さらに線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス等に至るまでいかなる細胞でもよい。これらの細胞の中に、上記C末端ラベル化または対応付けされた両修飾タンパク質を直接導入することもできるし、または、上記本発明翻訳テンプレートを導入し、C末端ラベル化の場合は、同時に1~100 μ Mの本発明修飾剤を電気穿孔法、マイクロインジェクション法等により細胞の中に導入し、細胞の至適生育温度で数時間保温することによって修飾タンパク質が合成される。対応付けの場合は、上記本発明翻訳テンプレートを導入し、細胞の至適生育温度で数時間保温することによって対応付け分子が合成される。合成された両修飾タンパク質は、細胞を破碎することによって回収し次の精製プロセスまたは検出プロセスに供することができる。また、そのまま細胞の中で検出プロセスに供することも可能である。翻訳テンプレートは、用いる翻訳系に合わせて適切なものを選択する。

10

本発明は、本発明翻訳テンプレートから合成されたC末端修飾タンパク質（修飾剤でC末端修飾された蛋白質（図2のA）、翻訳テンプレートでC末端修飾された蛋白質（図3のA；対応付け分子）、PEGによってC末端修飾された蛋白質（図3C））を利用したタンパク質と標的分子との間の相互作用の解析方法、すなわち、タンパク質と標的分子との間の相互作用を解析する方法であって、該タンパク質を含む本発明修飾タンパク質を用いることを特徴とする方法を提供する（図5）。

20

< 4 > 解析方法

本発明の解析方法においては、通常には、上記で得られた本発明修飾タンパク質と標的分子を、修飾物質の種類や反応系の種類などにより適宜組み合わせさせて接触せしめ、該本発明修飾タンパク質または該標的分子が発する信号において両分子間の相互作用に基づいて発生される上記信号の変化を測定することにより相互作用を解析する。相互作用の解析は、例えば、蛍光相関分光法、蛍光イメージングアナライズ法、蛍光共鳴エネルギー移動法、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光偏光解消法、表面プラズモン共鳴法、または、固相酵素免疫検定法により行われる。以下これらの方法の詳細については記述する。

「標的分子」とは、本発明修飾タンパク質と相互作用する分子を意味し、具体的にはタンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物などが挙げられる。タンパク質としては、本発明修飾タンパク質と相互作用する能力を有する限り特に制限はなく、タンパク質の全長であっても結合活性部位を含む部分ペプチドでもよい。またアミノ酸配列、およびその機能が既知のタンパク質でも、未知のタンパク質でもよい。これらは、合成されたペプチド鎖、生体より精製されたタンパク質、またはcDNAライブラリー等から適当な翻訳系を用いて翻訳し、精製したタンパク質等でも標的分子として用いることができる。合成されたペプチド鎖はこれに糖鎖が結合した糖タンパク質であってもよい。これらのうち好ましくはアミノ酸配列が既知の精製されたタンパク質か、またはcDNAライブラリー等から適当な方法を用いて翻訳および精製されたタンパク質を用いることができる。

30

核酸としては、本発明修飾タンパク質と相互作用する能力を有する限り、特に制限はなく、DNAまたはRNAも用いることができる。また、塩基配列または機能が既知の核酸でも、未知の核酸でもよい。好ましくは、タンパク質に結合能力を有する核酸としての機能、および塩基配列が既知のものか、またはゲノムライブラリー等から制限酵素等を用いて切断単離してきたものを用いることができる。糖鎖としては、本発明修飾タンパク質と相互作用する能力を有する限り、特に制限はなく、その糖配列または機能が、既知の糖鎖でも未知の糖鎖でもよい。好ましくは、既に分離解析され、糖配列または機能が既知の糖鎖が用いられる。低分子化合物としては、本発明修飾タンパク質と相互作用する能力を有する限り、特に制限はない。機能が未知のものでも、またはタンパク質に結合する能力が既に知られているものでも用いることができる。

40

これら標的分子が本発明修飾タンパク質と行う「相互作用」とは、通常は、タンパク質と標的分子間の共有結合、疎水結合、水素結合、ファンデルワールス結合、および静電力に

50

よる結合のうち少なくとも1つから生じる分子間に働く力による作用を示すが、この用語は最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。共有結合としては、配位結合、双極子結合を含有する。また静電力による結合とは、静電結合の他、電気的反発も含有する。また、上記作用の結果生じる結合反応、合成反応、分解反応も相互作用に含有される。

相互作用の具体例としては、抗原と抗体間の結合および解離、タンパク質レセプターとリガンドの間の結合および解離、接着分子と相手方分子の間の結合および解離、酵素と基質の間の結合および解離、核酸とそれに結合するタンパク質の間の結合および解離、情報伝達系におけるタンパク質同士の間での結合と解離、糖タンパク質とタンパク質との間の結合および解離、または糖鎖とタンパク質との間の結合および解離が挙げられる。

10

用いられる標的分子は、態様に応じて修飾物質により修飾して用いることができる。修飾物質は、通常、蛍光性物質などの非放射性修飾物質から選択される。蛍光物質としては、フリーの官能基（例えばカルボキシル基、水酸基、アミノ基など）を持ち、タンパク質、核酸等の上記標的物質と連結可能な種々の蛍光色素、例えばフルオレセイン系列、ローダミン系列、Cy3、Cy5、エオシン系列、NBD系列などのいかなるものであってもよい。その他、色素など修飾可能な化合物であれば、その化合物の種類、大きさは問わない。

これらの修飾物質は、標的分子と本発明修飾タンパク質との間の相互作用に基づいて発生される信号の変化の測定または解析方法に適したものが適宜用いられる。

上記修飾物質の標的分子への結合は、それ自体既知の適当な方法を用いて行うことができる。具体的には、例えば、標的分子がタンパク質の場合、上記に記載したC末端を修飾する方法等を用いることができる。また標的分子が核酸の場合は、予め修飾物質を共有結合などで結合させたオリゴDNAプライマーを用いたPCRを行う方法などによって簡単に修飾することができる。

20

また、本発明修飾タンパク質または本発明に用いられる標的分子は態様に応じて、固相に結合させる場合があるが、固相に結合させる方法としては、修飾物質を介して結合させるものと、それ以外の部分により結合させるものが挙げられる。

修飾物質を介して結合させる場合に用いられる修飾物質は、通常には、特定のポリペプチドに特異的に結合する分子（以下、「リガンド」と称することがある。）であり、固相表面には該リガンドと結合する特定のポリペプチド（以下、「アダプタータンパク質」と称することがある）を結合させる。アダプタータンパク質には、結合タンパク質、受容体を構成する受容体タンパク質、抗体なども含まれる。

30

アダプタータンパク質/リガンドの組み合わせとしては、例えば、アビジンおよびストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質/ビオチン、マルトース結合タンパク質/マルトース、Gタンパク質/グアニンヌクレオチド、ポリヒスチジンペプチド/ニッケルまたはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/グルタチオン、DNA結合タンパク質/DNA、抗体/抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン/カルモジュリン結合ペプチド、ATP結合タンパク質/ATP、またはエストラジオール受容体タンパク質/エストラジオールなどの各種受容体タンパク質/そのリガンドなどが挙げられる。

40

これらの中で、アダプタータンパク質/リガンドの組み合わせとしては、アビジンおよびストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質/マルトース、ポリヒスチジンペプチド/ニッケルまたはコバルト等の金属イオン、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/グルタチオン、抗体/抗原分子（エピトープ）、などが好ましく、特にストレプトアビジン/ビオチンの組み合わせが最も好ましい。これらの結合タンパク質は、それ自体既知のものであり、該タンパク質をコードするDNAは既にクローニングされている。

アダプタータンパク質の固相表面への結合は、それ自体既知の方法を用いることができるが、具体的には、例えば、タンニン酸、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ピルビクアルデヒド、ビス-ジアゾ化ベンジゾン、トルエン-2,4-ジイソシアネート、アミノ基

50

、活性エステルに変換可能なカルボキシル基、またはホスホアミダイドに変換可能な水酸基またはアミノ基などを利用する方法を用いることができる。

修飾物質以外の部分により固相に結合させる場合は、通常タンパク質、核酸、糖鎖、低分子化合物を固相に結合させるのに用いられる既知の方法、具体的には例えば、タンニン酸、ホルマリン、グルタルアルデヒド、ピルビクアルデヒド、ビス-ジアゾ化ベンジゾン、トルエン-2,4-ジイソシアネート、アミノ基、活性エステルに変換可能なカルボキシル基、またはホスホアミダイドに変換可能な水酸基またはアミノ基などを利用する方法を用いることができる。

「測定」とは解析のために用いられる信号の変化を収集するための手段であり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。用いられる測定法としては、例えば、蛍光相関分光法、蛍光共鳴エネルギー移動法、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光偏光解消法、蛍光イメージングアナライズ法、表面プラズモン共鳴法、固相酵素免疫検定法など、分子間相互作用を検出できるあらゆる系が利用可能である。

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS): Eigen, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5740-5747 (1994)) は、共焦点レーザー顕微鏡等の下で、粒子の流動速度、または拡散率、容積収縮等を測定する方法であり、本発明においては、本発明修飾タンパク質 (C末端修飾タンパク質) と標的分子間の相互作用により元の修飾分子1分子の並進ブラウン運動の変化を測定することにより、相互作用する分子を測定することができる。具体的には試料粒子が励起光により励起されて、試料液容積の一部において蛍光を放射し、この放射光を測定し光子割合を得る。この値は、特定の時間に観測されている空間容積中に存在する粒子の数と共に変化する。上述した種々のパラメータは自己相関関数を使用してこの信号の変動から算出され得る。このFCSを行うための装置もカールツァイス (Zeiss) 社等から市販されており、本方法においてもこれらの装置を用いて解析を行うことができる。この方法を用いてタンパク質-標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、C末端修飾タンパク質または標的分子のいずれも溶液として供することが必要である (液相法)。標的分子は修飾の必要はない。また相互作用を調べようとするC末端修飾タンパク質より非常に分子量の小さい分子は、C末端修飾タンパク質のブラウン運動に影響を及ぼさないため本方法においてはふさわしくない。しかし、2種類の蛍光色素を用いる蛍光相互相関分光法 (FCCS) は、1種類の蛍光色素を用いるFCSでは困難であった同じくらいの分子量をもつタンパク質間の相互作用も検出できる。2種類の蛍光色素を用いる他の方法としては蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法が知られているが、FRETが生じるためには2つの蛍光色素が40~50以内で近接する必要があり、タンパク質の大きさや蛍光色素の付いている位置によっては、相互作用していてもFRETが観測されない危険性がある。FCCS法では相互相関の検出は蛍光色素間の距離に依存しないので、そのような問題がない。一方、他の検出系である蛍光偏向解消法と比較すると、FCCS法は必要なサンプル量が少なく、検出時間が短く、HTSのための自動化が容易等の長所がある。さらにFCCS法では蛍光標識された分子の大きさや数というきわめて基本的な情報が得られるので、表面プラズモン共鳴法のように汎用的な用途に利用できる可能性がある。両者の違いは、表面プラズモン共鳴法ではタンパク質が固定化された状態で相互作用を検出するのに対して、FCCS法ではより天然の状態に近い溶液中の相互作用を見ることが出来る点にある。FCCS法では、タンパク質の固定化が必要ないかわりに、タンパク質を蛍光色素で標識する必要があるが、本発明により、この課題を克服することが可能となった。

本方法においてC末端修飾タンパク質に標的分子を接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であれば如何なるものであってもよいが、好ましくは市販のFCS用装置の測定用ウェルに通常生化学的に用いられる緩衝液等に適当な濃度でC末端修飾タンパク質溶解した溶液を投入し、さらに同緩衝液に適当な濃度で標的分子を溶解した溶液を投入する方法によって行われる。

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記FCS用測定装置

10

20

30

40

50

の各測定用ウェルにそれぞれ異なる複数のC末端修飾タンパク質を投入し、これに特定の標的分子溶液を投入するか、または特定のC末端修飾タンパク質を投入し、各ウェルに互いに異なる複数種の標的分子溶液を投入する方法が用いられる。

蛍光イメージングアナライズ法は、固相化された分子に、修飾分子を接触せしめ、両分子の相互作用により、固相化された分子上にとどまった修飾分子から発せられる蛍光を、市販の蛍光イメージングアナライザーを用いて測定または解析する方法である。

この方法を用いてタンパク質 - 標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、C末端修飾タンパク質または標的分子のいずれか一方は上記した方法により固相化されていることが必要である。標的分子は固相化して用いる場合には修飾されているものと、されていないものどちらも利用可能である。また、固相化しないで用いる場合には上記した修飾物質により修飾されていることが必要である。C末端修飾タンパク質は、修飾部を介して固定化されているものも、修飾部以外の部分で固定化されているものも用いることができる。

C末端修飾タンパク質、または標的分子を固相化するための基板としては、通常タンパク質や核酸等を固定化するのに用いられるニトロセルロースメンブレンやナイロンメンブレン、またはプラスチック製のマイクロプレート等も用いることができる。

本方法において修飾標的分子またはC末端修飾タンパク質を固相化分子へ接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であればいかなるものであってもよいが、好ましくは修飾標的分子またはC末端修飾タンパク質を生化学的に通常使用される緩衝液に適当な濃度で溶解した溶液を作成し、これを固相表面に接触させる方法が好ましい。

両分子を接触せしめた後、好ましくは過剰に存在する修飾標的分子またはC末端修飾タンパク質を同緩衝液等により洗浄する工程を行い、固相上にとどまった標的分子またはC末端修飾タンパク質の修飾物質から発せられる蛍光信号、または固相化されている修飾分子から発せられる蛍光と固相上にとどまった修飾分子から発せられる蛍光が混ざり合った信号を、市販のイメージングアナライザーを用いて測定または解析することにより、固相化された分子と相互作用する分子を同定することができる。

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記固相表面に、複数のC末端修飾タンパク質または修飾もしくは非修飾標的分子を番地付けして固相化する方法、または1種類のC末端修飾タンパク質または修飾もしくは非修飾標的分子に固相化されていない複数種のC末端修飾タンパク質または修飾標的分子を接触させる方法等が用いられる。複数種のC末端修飾タンパク質または修飾標的分子を接触させる場合には、固相にとどまった該分子を緩衝液の濃度の差等により解離させて取得し、これを既知の方法により分析することにより同定できる。

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法は、2種類の蛍光色素を用いる他の分子間相互作用検出法としてよく知られている。FRETとは、2種類の蛍光色素の一方(エネルギー供与体)の蛍光スペクトルと、もう一方(エネルギー受容体)の吸収スペクトルに重なりがあるとき、2つの蛍光色素間の距離が十分小さいと、供与体からの発光が起こらないうちに、その励起エネルギーが受容体を励起してしまう確率が高くなる現象をいう。したがって、相互作用を検出したい2つのタンパク質を、それぞれ供与体および受容体となる蛍光色素で標識しておき、供与体を励起すれば、2つのタンパク質が相互作用しない場合は、蛍光色素間の距離が大きいためFRETは起こらず、供与体の蛍光スペクトルが観察されるが、2つのタンパク質が相互作用して蛍光色素間の距離が小さくなると、FRETにより受容体の蛍光スペクトルが観察されるので、蛍光スペクトルの波長の違いからタンパク質間相互作用の有無を判別することができる。蛍光色素としては、供与体がフルオレセイン、受容体がローダミンという組み合わせがよく用いられている。また最近では、蛍光緑色タンパク質(GFP)の波長の異なる変異体の組み合わせにより、細胞の中でFRETを観察し相互作用を検出する試みがなされている。この方法の欠点としては、FRETが生じるために2つの蛍光色素が40~50以内で近接する必要があるため、タンパク質の大きさや蛍光色素の付いている位置によっては、相互作用していてもFRETが観測

10

20

30

40

50

されない危険性があるという点が挙げられる。

エバネッセント場分子イメージング法とは、Funatsu, T., et al., Nature, 374, 555-559 (1995)等に記載されている方法で、ガラス等の透明体に固相化した分子に溶液として第2の分子を接触せしめ、これにエバネッセント場が発生する角度でレーザー光等の光源を照射し、発生したエバネッセント光を検出器によって測定または解析する方法である。これらの操作は、それ自体既知のエバネッセント場蛍光顕微鏡装置を用いて行うことができる。

この方法を用いてタンパク質 - 標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、C末端修飾タンパク質または標的分子のいずれか一方は上記した方法により固相化されていることが必要である。標的分子は固相化する場合は修飾の必要はないが、固相化しないで用いる場合には上記した修飾物質により修飾されていることが必要である。

10

C末端修飾タンパク質、または標的分子を固相化するための基板としては、ガラス等の材質の基板が用いられ、好ましくは石英ガラスが用いられる。また、レーザー光の散乱等を防ぐために表面を超音波洗浄したものが好ましい。

本方法において固相化していないC末端修飾タンパク質または修飾標的分子を固相化分子へ接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であればいかなるものであってもよいが、好ましくは固相化していないC末端修飾タンパク質または修飾標的分子を生化学的に通常使用される緩衝液に適当な濃度で溶解した溶液を作成し、これを固相表面に滴下する方法が好ましい。

両分子を接触せしめた後、エバネッセント場照明により励起された蛍光をCCDカメラ等の検出器を用いて測定することにより、固相化された分子と相互作用する分子を同定することができる。

20

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記基板に、複数のC末端修飾タンパク質または修飾標的分子を番地付けして固相化する方法等が用いられる。蛍光偏光法(Perran, J., et al., J. Phys. Rad., 1, 390-401 (1926))は、蛍光偏光で励起された蛍光分子が、励起状態の間、定常状態を保っている場合には同一の偏光平面で蛍光を放射するが、励起された分子が励起状態中に回転ブラウン運動等を行った場合に、放射された蛍光は励起光とは異なった平面になることを利用する方法である。分子の運動はその大きさに影響を受け、蛍光分子が高分子である場合には、励起状態の間の分子の運動はほとんどなく、放射光は偏光を保ったままになっているのに対して、低分子の蛍光分子の場合は、運動速度が速いために放射光の偏光が解消される。そこで、平面偏光で励起された蛍光分子から放射される蛍光の強度を、元の平面とそれに垂直な平面とで測定し、両平面の蛍光強度の割合からこの分子の運動性およびその存在状態に関する情報が得られるものである。この方法によれば、夾雑物があってもこれに影響されることなく、蛍光修飾された分子と相互作用する標的分子の挙動を追跡できる。これは蛍光修飾された分子と標的分子が相互作用するときのみ、偏光度の変化として測定されるからである。

30

この方法を行うための装置としては例えばBECON(Panyera社製)等が市販されており、本方法もこれらの装置を用いることにより行うことができる。

この方法を用いてタンパク質 - 標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、C末端修飾タンパク質または標的分子のいずれも溶液として供する必要がある。標的分子は修飾の必要はない。また相互作用を調べようとするC末端修飾タンパク質より非常に分子量の小さい分子は、C末端修飾タンパク質のブラウン運動に影響を及ぼさないため本方法においてはふさわしくない。

40

本方法においてC末端修飾タンパク質に標的分子を接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であれば如何なるものであってもよいが、好ましくは市販の蛍光偏光解消装置の測定用ウェルに通常生化学的に用いられる緩衝液等に適当な濃度でC末端修飾タンパク質溶解した溶液を投入し、さらに同緩衝液に適当な濃度で標的分子を溶解した溶液を投入する方法によって行われる。

本方法において測定するC末端修飾タンパク質および標的分子との間の相互作用は、必ず

50

しも抗原抗体方法ほど特異性は高くないことが考えられるため、最適の組み合わせを検出するためには、相互作用の程度を数値化することが有効である。相互作用の程度を示す指標としては、例えば一定濃度のC末端修飾タンパク質に対して、極大蛍光偏光度を与える最小標的物濃度の値等を用いることができる。

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記蛍光偏光解消法測定装置の各測定用ウェルにそれぞれ異なる複数のC末端修飾タンパク質を投入し、これに特定の標的分子溶液を投入するか、または特定のC末端修飾タンパク質を投入し、各ウェルに互いに異なる複数種の標的分子溶液を投入する方法が用いられる。

表面プラズモン共鳴法とは、金属/液体界面で相互作用する分子によって表面プラズモンが励起され、これを反射光の強度変化で測定する方法である (Cullen, D. C., et al., Biosensors, 3(4), 211-225 (1987-88))。この方法を用いてタンパク質-標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、C末端修飾タンパク質は上記した方法により固相化されていることが必要であるが、標的分子の修飾は必要ない。

10

C末端修飾タンパク質を固相化するための基板としては、ガラスの等の透明基板上に金、銀、白金等の金属薄膜が構成されたものが用いられる。透明基板としては、通常表面プラズモン共鳴装置用に用いられるものであればいかなるものであってもよく、レーザー光に対して透明な材料からなるものとして一般的にはガラス等からなるものであり、その厚さは0.1~5mm程度のものが用いられる。また金属薄膜の膜厚は100~2000程度が適当である。このような表面プラズモン共鳴装置用固基板として市販されているものも用いることができる。C末端修飾タンパク質の上記基板への固相化は前述した方法により行うことができる。

20

本方法において標的分子をC末端修飾タンパク質へ接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であればいかなるものであってもよいが、好ましくは標的分子を生化学的に通常使用される緩衝液に適当な濃度で溶解した溶液に固相化されたC末端タンパク質を接触させる方法を用いることができる。

これらの行程は市販の表面プラズモン共鳴装置、例えばBIAcore 2000 (Pharmacia Biosensor社製)によってもよい。両分子を接触せしめた後、それ自体既知の表面プラズモン共鳴装置を用いて、それぞれの反射光の相対強度の時間的変化を測定することにより、固相化されたC末端修飾タンパク質と標的分子の相互作用が解析できる。

30

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記表面プラズモン共鳴装置に用いられる基板に、複数のC末端修飾タンパク質を番地付けして固相化するか、または1種類の固相化されたC末端修飾タンパク質に複数種の標的分子を接触させる方法等が用いられる。

固相酵素免疫検定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42 (1995)) は、固相上に固定化した抗原に対し、抗体を含む溶液を接触せしめ、両分子の相互作用 (抗原抗体反応) により、固相化された抗原上にとどまった抗体をこれと特異的に結合する修飾分子 (IgG等) から発せられる蛍光、または修飾分子を基質とする色素から発せられる信号を、市販の検出器 (ELISAリーダー) を用いて測定または解析する方法である。

40

この方法を用いてタンパク質-標的分子間相互作用の測定または解析を行う場合、抗原となるC末端修飾タンパク質を上記した方法により固相化されていることが必要である。また抗体となる標的分子は上記した修飾物質により修飾されていることが必要である。

抗原となるC末端修飾タンパク質を固相化するための基板としては、通常ELISAに用いられるプラスチック製のマイクロプレート等も用いることができる。

本方法において抗体となる修飾標的分子を固相分子へ接触せしめる方法としては、両分子が相互作用するに十分な程度に接触する方法であればいかなるものであってもよいが、好ましくは修飾標的分子を生化学的に通常使用される緩衝液に適当な濃度で溶解した溶液を

50

作成し、これをマイクロプレートに注入する方法が好ましい。

両分子を接触せしめた後、好ましくは過剰に存在する固相化分子に結合していない修飾分子を同緩衝液等により洗浄する工程を行い、固相上にとどまった修飾分子から発せられる蛍光を、市販のELISAリーダー等を用いて測定または解析することにより、固相化された抗原分子と相互作用する分子を同定することができる。

この方法において、同時に多数の解析を行う方法としては、例えば上記マイクロプレートの各穴にそれぞれ異なる複数の修飾標的分子を固相化する方法が用いられる。

相互作用する分子の同定方法としては、上記のそれぞれの方法により測定されC末端修飾タンパク質との間に相互作用が認められた標的分子は、該分子の一次構造が未知の場合、それ自体既知の適当な方法により、その一次構造を解析することができる。具体的には、相互作用を認められた標的分子がタンパク質の場合、アミノ酸分析装置等によりアミノ酸配列を解析し、一次構造を特定することができる。また、標的分子が核酸の場合には、塩基配列決定方法により、オートDNAシーケンサーなどを用いれば塩基配列を決定することができる。

C末端修飾タンパク質の固相化のための装置としては、上記に記載したC末端修飾タンパク質の修飾部を介した固相への固定化方法を行うために、既知の適切な手段を組み合わせることもできる。本装置における各手段自体はそれぞれ既知のものであり、これらの手段における、基板の保持、C末端修飾タンパク質溶液の添加、洗浄等の各操作は、それ自体既知の方法により行えばよい。これらの操作を組み合わせ、全自動または半自動の、C末端修飾タンパク質の固相化のための装置を構築することができる。

タンパク質 - 標的分子間相互作用測定のための装置としては、上記に記載したタンパク質 - 標的分子間相互作用測定を行うために、既知の適切な手段を組み合わせることもできる。本装置における各手段自体はそれぞれ既知のものであり、これらの手段における、基板の保持、標的分子の添加、洗浄、信号検出等の各操作は、それ自体既知の方法により行えばよい。これらの操作を組み合わせ、全自動または半自動の、タンパク質 - 標的分子間相互作用測定のための装置を構築することができる。

実施例

以下、具体的に本発明の翻訳テンプレート、C末端修飾蛋白質、翻訳テンプレートによるC末端ラベル化法および対応付け方法についての実施例を記述するが、下記の実施例は本発明についての具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものでない。

実施例1 翻訳テンプレートの作成とその翻訳(C末端ラベル化)

コード分子は、マウス由来のc-junまたはc-fos(Gentz R, Rauscher FJ 3d, Abate C, Curran T(1989) Science 243:1695-9; Neuberger M, Schuermann M, Hunter JB, Muller R(1989) Nature 338:589-90)の組み込まれているプラスミド(c-junは、pEU-T7JunFlag(配列番号1); c-fosは、pCMVFosCBPzz(配列番号2))からPCRで作成した。PCRのプライマーとしては、c-junでは5'UTR領域について1種類(プライマー; 5'SP6-029(配列番号3))と3'末端領域については13種類(プライマー; 3'A8=A(配列番号6)、3'X(CTCGAG)(配列番号7)、3'X(CTCGAG)A8=XA(配列番号8)、3'X(CTCGCC)A8(配列番号9)、3'X(CTCG)A8(配列番号10)、3'X(CTC)A8(配列番号11)、3'X(CTCT)A8(配列番号12)、3'X(TTCG)A8(配列番号13)、3'X(GTCC)A8(配列番号14)、3'X(CATG)A8(配列番号15)、3'X(CTCC)A8(配列番号16)、3'X(GTCG)A8(配列番号17)、3'none(配列番号5))、c-fosでは5'UTR領域について1種類(プライマー; 5'T7(0')-bait(配列番号4))と3'末端領域については2種類(プライマー; 3'baitFosD(配列番号18)、3'baitFosDA(配列番号19))を用い、計15種類のDNAテンプレートを調製し、QIAquick PCR Pu

rification Kits (QIAGEN)で精製した。これらのDNAテンプレートを、RiboMAXTM Large Scale RNA Production Systems (Promega)をもちいて転写(37℃, 2h)し、合成したmRNAをRNeasy Mini Kits (QIAGEN)で精製し、mRNAテンプレート(コード分子)を得た。

まず、得られたmRNAテンプレートを翻訳テンプレートとして用いて、翻訳を行った。翻訳テンプレート2 pmolを用いて、Wheat Germ Extract (Promega)の10 μlの系で翻訳(26℃, 60min)を行い、翻訳と同時に、修飾剤として240 pmolのFluor-dCpPuroを用いて、蛋白質のラベル化(Miyamoto-Sato, E., Nemoto, N., Kobayashi, K., and Yanagawa, H. (2000) Nucleic Acids Res. 28: 1176-1182; Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E. and Yanagawa, H. (1999) FEBS Lett., 462: 43-46)を行い、15% SDS-PAGEで電気泳動し、バンドの蛍光(フルオレセイン)をマルチ画像解析装置、Molecular Imager FX (Bio-Rad)で測定した。その結果をまとめたグラフを図6に示す。

10

図6から、ポリA配列(A配列)よりSNNS配列(X配列)を有する場合に、さらにSNNS-ポリA配列(XA配列)を有する場合に、翻訳量が増加することが示された。このことから、XA配列を持つ翻訳テンプレートは、一般的な翻訳やC末端ラベル化により好ましいといえる。また、X配列を変えたときの翻訳結果から、X配列がA配列と組み合わせると効果を示すには、最低4塩基からなることが必要であり、第一番目と第四番目の塩基はCかGであることが要求され、SNNS(SはCまたはG)の構成が必要であることが示された。

20

さらに、mRNAテンプレートの3'側にPEGスペーサー分子(下記製造例1~4参照)をライゲーションした翻訳テンプレートを作成した。ここでは、T4 RNAリガーゼ(宝酒造)をもちいて、PEGスペーサー部((dC)₂(T)₂, PEG4000, PEG4000Puro-Boc)と、コード分子(Jun-X(CTCGAG)A8=Jun-XA(プライマー3'X(CTCGAG)A8=XAを用いて得られたもの)またはコード分子(Fos-D(-A)または3'baitFos-DA(+A)(プライマー3'baitFosDまたは3'baitFosDAを用いて得られたもの)とのライゲーション(15℃, 20h)を行い、RNeasy Mini Kits (QIAGEN)で精製し、8M尿素4%PAGEで電気泳動し、エチレンブロマイド(EtBr)で染色し、バンドの蛍光(EtBrとフルオレセイン)をマルチ画像解析装置、Molecular Imager FX (Bio-Rad)で検出した。ライゲーションした2 pmolの翻訳テンプレートを用いて、Wheat Germ Extract (Promega)または、PROTEIOS (Toyobo)を用いて、10 μlの系で翻訳(26℃; 1, 3, 6, 20hr)を行い、翻訳と同時に、修飾剤として240 pmolのFluor-dCpPuroを用いて、蛋白質のラベル化(Miyamoto-Sato, E., Nemoto, N., Kobayashi, K., and Yanagawa, H. (2000) Nucleic Acids Res. 28: 1176-1182; Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E. and Yanagawa, H. (1999) FEBS Lett., 462: 43-46)を行い、15% SDS-PAGEで電気泳動し、バンドの蛍光(Fluorescein)をマルチ画像解析装置、Molecular Imager FX (Bio-Rad)で測定した。RNAの安定性実験は、PEGスペーサー部の蛍光を用いて、RNAの残量をマルチ画像解析装置、Molecular Imager FX (Bio-Rad)で測定した。対照としてライゲーションしていない翻訳テンプレートを用いて同様の手順を行った。それらの結果をまとめたグラフを図7および図8に示す。

30

40

図7から、コード部の配列は基本的にはどのような配列でもPEGスペーサー部をライゲーションすることで翻訳量が増加することが示された(図7のA)。また、XA配列を持

50

つコード部をもつ翻訳テンプレート (X A) では、 X A 配列も P E G スペーサー部も持たないコード分子 (N o n e) に比べて、翻訳量が約 3 ~ 4 倍増加していることが示された。また、 X A 配列を持つコード部では、 P E G 4 0 0 0 P u r o - B o c の構成が最も翻訳量が増加することが示された (図 7 の B)。よって、一般的な翻訳や C 末端ラベル化には P E G スペーサー部がライゲーションされた X A 配列を持つ翻訳テンプレートを用いることが適しているといえる。図 8 から、 X A 配列を持つコード分子 (; X A)、 X A 配列を持たないコード分子 (; N o n e) は 3 時間で翻訳量は飽和に達したが、 P E G 4 0 0 0 P u r o - B o c をもつ翻訳テンプレート (; X A + P E G 4 0 0 P u r o - B o c) は、 6 時間でも翻訳の増加が見られた (図 8 の A)。また、その翻訳量は、 6 時間で比較すると、 P E G 4 0 0 0 P u r o - B o c をもつ翻訳テンプレート () は、 X A 10
 配列を持つコード分子 (; X A) の約 2 倍、 X A 配列を持たないコード分子 (; N o n e) の約 4 倍であった (図 8 の A)。コード分子と、 P E G スペーサー部をもつ翻訳テンプレートとの安定性を比較すると、コード分子 (; X A) は、その m R N A が 1 時間で 5 0 % 減るのに対して、 P E G スペーサー部をもつ翻訳テンプレート () は、 1 3 時間でようやく 5 0 % 減ることから、 P E G スペーサー部をもつコード分子 () の安定性が非常によいことがわかる (図 8 の B)。以上から、翻訳テンプレート () の翻訳量が増加したのは、ライゲーションされた P E G 4 0 0 0 P u r o - B o c による安定性向上が原因と考えられる。

実施例 2 翻訳テンプレートを用いた対応付け

コード分子 (m R N A テンプレート) に P E G スペーサー分子 (下記製造例 1 ~ 4 参照) をライゲーションしたものを翻訳テンプレートとして用いた。ここでは、実施例 1 で得たコード分子の m R N A テンプレート (J u n - X A , J u n - A) と P E G スペーサー部 (P E G 2 0 0 0 P u r o) を実施例 1 と同様の方法でライゲーションした。ライゲーションした m R N A テンプレートを小麦胚芽の無細胞翻訳系として W h e a t G e r m E x t r a c t (P r o m e g a) をもちいて、実施例 1 と同様の方法で翻訳し、対応付け分子を 8 M 尿素 1 0 % S D S - P A G E で電気泳動し、蛍光 (フルオレセイン) によってマルチ画像解析装置、 M o l e c u l a r I m a g e r F X (B i o - R a d) で検出した。また、フリー蛋白質の量は、翻訳と同時に、修飾剤として F l u o r - d C p P u r o を用いて、蛋白質のラベル化 (M i y a m o t o - S a t o , E . , N e m o t o , N . , K o b a y a s h i , K . , a n d Y a n a g a w a , H . (2 0 0 0) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 8 : 1 1 7 6 - 1 1 8 2 ; N e m o t o , N . , M i y a m o t o - S a t o , E . a n d Y a n a g a w a , H . (1 9 9 9) F E B S L e t t . , 4 6 2 : 4 3 - 4 6) を行い、 8 M 尿素 1 0 % S D S - P A G E および 1 5 % S D S - P A G E で電気泳動し、バンドの蛍光 (フルオレセイン) をマルチ画像解析装置、 M o l e c u l a r I m a g e r F X (B i o - R a d) で測定し、あわせて、 T 7 - t a g による抗体を用いたウエスタンブロットで総蛋白質量を決定した。それらの結果をまとめたグラフを図 9 に示す。

図 9 から、対応付け分子は、 X A 配列を持つコード部と A 配列を持つコード部について比較すると、添加する R N A 量を変化させたときの対応付け効率は両方とも 7 0 % でほとんど変わらないことが示された (図 9 の A)。しかしながら、添加した R N A テンプレートから合成された蛋白質総量 (フリー蛋白質 + 対応付け分子 = 1 0 0 %) に対する対応付け効率については、添加する R N A 量を変化させたとき、 A 配列を持つコード部の場合は 9 0 % (フリー蛋白質 1 0 %) を超える高い効率を示すことが示された (図 9 の B)。一方、 X A 配列を持つコード部の場合は、フリー蛋白質の生成割合が高い (図 9 の B)。よって、対応付け分子には X A 配列よりも A 配列を持つコード部が適しているといえる。

製造例 1 P E G スペーサー分子 (1 1) の合成

P E G スペーサー分子 (1 1) は、図 1 0 に示す試薬を用い、図 1 1 に示す方法で合成した。図 1 0 中アミダイト試薬 (1 ~ 5) はグレンリサーチ社 (アメリカ合衆国、バージニア州) より購入した。平均分子量 1 0 0 0、 2 0 0 0、 3 0 0 0 の P E G は日本油脂 (東京都渋谷区) より購入した。平均分子量 4 0 0 0 の P E G はフルカ社 (スイス) より購入

10

20

30

40

50

した。それらを原料にしてアミダイト試薬(6)を、Jaschkeらが報告した方法(Jaschke, A. et al. (1993) Tetrahedron Lett. 34: 301-304)を用い合成した。図11中10はIkedaらが報告した方法(Ikeda, S. et al. (1998) Tetrahedron Lett. 39: 5975-5978)で合成した。なお、図10中DMTrは4,4'-ジメトキシトリチル基を、図11中Fmocは9-フルオレンメトキシカルボニル基を示す。

10(400mg, ピューロマイシン10 μ mol含有)に対し、以下のA~Dの処理を所定の配列に従い、所定数のヌクレオチドおよびPEGが導入されるまで繰り返し行なった。

A. 3%トリクロロ酢酸-塩化メチレン溶液を1mL加え室温で3分間放置後、塩化メチレン5mLで3回洗浄する。再度同じ操作を繰り返した後、無水アセトニトリル5mLで5回洗浄する。

10

B. ヌクレオチドアミダイト30 μ mol、0.457Mテトラゾール-無水アセトニトリル溶液100 μ L、および無水アセトニトリル1mLを加え、室温で15分間振盪する。アセトニトリル5mLで5回洗浄する。

C. 50mMヨウ素溶液(テトラヒドロフラン-ピリジン-水=75:20:5)1mLを加え室温で3分間放置後、ピリジン5mLで3回洗浄する。再度同じ操作を繰り返した後、無水ピリジン5mLで5回洗浄する。

D. 10%無水酢酸-ピリジン溶液1mLおよび触媒量の4,4'-ジメチルアミノピリジンを加え室温で20分間放置後、ピリジン5mLで5回、塩化メチレン5mLで5回洗浄する。

20

上記の処理をし所定の配列および所定数のヌクレオチドが導入された10に濃アンモニア水1.5mLおよびエタノール0.5mLを加え、室温で14時間震盪した。ろ過により固相担体(CPG)を取り除き、ろ液を凍結乾燥した。残査をHPLC[カラム: YMC社(京都府)製 YMC pack ODS-A SH-343-5, 溶離液10-60%アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.0)の30分間の直線濃度勾配、流速: 10mL/分]で精製後、PEGスパーサー分子(11)を得た。得られたPEGスパーサー分子(11)の構造および収率を以下に示す。

p(dCp) ₂ PEG(1000)p(dCp) ₂ Puro	収率8.7%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(1000)pdCpPuro	収率62%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(1000)p(dCp) ₂ Puro	収率14%
p(dCp) ₂ PEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率7%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(2000)pdCpPuro	収率30%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率27%
p(dCp) ₂ T(Bio)pPEG(2000)pdCpPuro	収率9%
p(dCp) ₂ T(Bio)pPEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率8%
p(dCp) ₂ T(Bio)pT(Fl)pPEG(2000)pdCpPuro	収率2%
p(dCp) ₂ T(Bio)pT(Fl)pPEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率8%
p(dCp) ₂ PEG(3000)pdCpPuro	収率2%
p(dCp) ₂ PEG(3000)p(dCp) ₂ Puro	収率22%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(3000)pdCpPuro	収率29%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(3000)p(dCp) ₂ Puro	収率23%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(4000)pdCpPuro	収率16%
p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(4000)p(dCp) ₂ Puro	収率17%

製造例2 PEGスペーサー分子(14)の合成

PEGスペーサー分子(14)は、図10に示す試薬を用い、図11および12に示す方法で合成した。図10中、ローダミングリン(RhodG)活性エステル(7)はモレキュラプローブ社(アメリカ合衆国、オレゴン州)より、Cy5活性エステル(8)およびCy3活性エステル(9)はアマシャムファルマシアバイオテク社(イギリス、バッキンガムシャー)より、購入した。図12中、12はIkedaらが報告した方法(Ikeda, S. et al. (1998) Tetrahedron Lett. 39: 5975-5978)を応用し合成した。なお、図10中、Bocはtert-ブトキシカルボニル基を示す。

12(400mg, ピューロマイシン10μmol含有)に対し、PEGスペーサー分子(11)の合成の場合と同様のA~Dの処理を所定の配列に従い、所定数のヌクレオチドおよびPEGが導入されるまで繰り返し行なった。

上記の処理を行ない、所定の配列および所定数のヌクレオチドが導入された12に濃アンモニア水1.5mLおよびエタノール0.5mLを加え、室温で14時間震盪した。ろ過により固相担体(CPG)を取り除き、ろ液を凍結乾燥した。残渣をHPLC[カラム: YMC社(京都府)製YMC pack ODS-A SH-343-5, 溶離液: 10-60%アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.0)の30分間の直線濃度勾配、流速: 10mL/分]で精製後、13を得た。13を30%アセトニトリル-水0.1mLに溶かし、7, 8または9を10μmol、および1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH8.3)を10μL加え室温で2時間放置した。反応液を同上の条件のHPLCで精製後、産物を含む画分を濃縮した。残渣を60%トリフルオロ酢酸-水1mLにて室温で30分処理後、濃縮乾固した。残渣を濃アンモニア水1mLにて室温で15分処理後、濃縮乾固した。残渣を同上の条件のHPLCで精製後、産物を含む画分を濃縮し、PEGスペーサー分子(14)を得た。なお、図13中、RhodGは図

10中7の、Cy5は図10中8の、Cy3は図10中9の、蛍光色素残基部をそれぞれ示す。得られたPEGスペーサー分子(14)の構造および収率を以下に示す。

p(dCp) ₂ T(Bio)pT(RhodG)pPEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率11%
p(dCp) ₂ T(Bio)pT(Cy5)pPEG(2000)p(dCp) ₂ Puro	収率8%
p(dCp) ₂ T(Bio)pT(RhodG)pPEG(4000)p(dCp) ₂ Puro	収率12%
p(dCp) ₂ T(Bio)pT(Cy5)pPEG(4000)p(dCp) ₂ Puro	収率10%
p(dCp) ₂ T(Cy3)pPEG(4000)p(dCp) ₂ Puro	収率9%

製造例3 Boc保護PEGスペーサー分子(15)の合成

図14に示したように、12(400mg, ピューロマイシン10 μ mol含有)より、PEGスペーサー部(11)と同じ方法を用いてBoc保護PEGスペーサー部(15)を合成した。得られたBoc保護PEGスペーサー分子(15)の構造と収率を以下に示す。

p(dCp) ₂ T(Fl)pPEG(4000)p(dCp) ₂ Puro(Boc)	収率41%
--	-------

製造例4 ピューロマイシン非含有PEGスペーサー分子(16)の合成

Jaschkeらが報告した方法(Jaschke, A. et al. (1993) Tetrahedron Lett. 34:301-304)に従い合成した。得られたピューロマイシン非含有PEGスペーサー分子(16)の構造と収率を以下に示す。

p(dCp) ₂ T(Fl)pTpPEG(4000)	収率55%
---------------------------------------	-------

製造例5 修飾剤1~7の合成

修飾剤1~7は、図15および図16に示した試薬を用い、図17および18にその概略を示す方法を用いて合成した。図15中、アミダイト試薬(15~19)はグレンリサーチ社(アメリカ合衆国、バージニア州)より、スクシンイミド試薬(20~22)はピアス社(アメリカ合衆国、イリノイ州)より購入した。

10または12(400mg, ピューロマイシン10 μ mol含有)に対し、PEGスペーサー分子(11)の合成に関して示したA~Dの処理を所定数のアミダイト試薬が導入されるまで繰り返し行なった。その後、50mM炭酸ナトリウム-水を2mLまたは濃アンモニア水1.5mLおよびエタノールを0.5mL加え、室温で14時間震盪した。ろ過により固相担体(CPG)を取り除き、ろ液を減圧濃縮した。残渣をHPLC[カラム: YMC社(京都府)製YMC pack ODS-ASH-343-5, 溶離液: 10-60%アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.0)の30分間の直線濃度勾配、流速: 10mL/分]で精製後、凍結乾燥した。その後、修飾剤によっては、残渣を30%アセトニトリル-水1mLに溶解させ、1M炭酸水素ナトリウム-水(pH8.3)を0.1mL、およびスクシンイミド試薬(7, 8または20)0.1mmolをN, N'-ジメチルホルムアミド0.5mLに溶解させた液を加え、室温で2時間放置した。その後、減圧濃縮し、残渣をHPLC[カラム: YMC社(京都府)製YMC pack ODS-ASH-343-5, 溶離液: 10-60%アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.0)の30分間の直線濃度勾配、流速: 10mL/分]で精製後、凍結乾燥した。その後、修飾剤によっては、残渣を80%酢酸-水2mLに溶解させ、室温で4時間放置後、減圧濃縮した。残渣を30%アセトニトリル-水1mLに溶解させ、1M炭酸水素ナトリウム-水(pH8.3)を0.1mL、およびスクシンイミド試薬(21または22)0.1mmolをN, N'-ジメチルホルムアミド0.5mLに溶解させた液を加え、室温で2時間放置した。その後、Poly-Pak II(グレンリサーチ社)で脱塩し減圧濃縮した。その後、上記の残渣に60%トリフルオロ酢酸-水2mLを加え、室温で30分間放置後、減圧濃縮した。残渣をHPLC[カラム: YMC社(京都府)製YMC pack ODS-ASH-343-5, 溶離液: 10-60%アセトニトリル-0.1M酢酸トリエチルアンモニウム水溶液(pH7.0)の30分間の直線濃度勾配、流速: 10mL/分]で精製後、凍

20

30

40

50

結乾燥した。得られた修飾剤 1 ~ 7 の物性データを以下に示す。

修飾剤 1 : 収率 44%、UV (50% MeOH-H₂O) λ_{\max} 558 nm; MS m/z 2037 (M-H)⁻

修飾剤 2 : 収率 32%、UV (H₂O) λ_{\max} 558 nm; MS m/z 2035 (M-H)⁻

修飾剤 3 : 収率 8%、UV (H₂O) λ_{\max} 506 nm; MS m/z 2093 (M-H)⁻

修飾剤 4 : 収率 8%、UV (H₂O) λ_{\max} 506 nm; MS m/z 1979 (M-H)⁻

修飾剤 5 : 収率 13%、UV (H₂O) λ_{\max} 649 nm; MS m/z 2375 (M-H)⁻

修飾剤 6 : 収率 13%、UV (H₂O) λ_{\max} 649 nm; MS m/z 2261 (M-H)⁻

修飾剤 7 : 収率 22%、UV (H₂O) λ_{\max} 646 nm; MS m/z 1977 (M-H)⁻

産業上の利用の可能性

本発明の一態様によれば、翻訳系における翻訳テンプレートの安定性が向上し、翻訳の絶対量が増加する。

また、本発明の別の態様によれば、翻訳系を用いる対応付け分子の製造において、翻訳により生じる総蛋白質に対する目的の対応付け分子の割合が向上し、効率的に対応付け分子を得ることができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 学校法人慶應義塾(Keio University)

<120> 翻訳テンプレートおよびそのライブラリー、それらから合成される蛋白質および蛋白質のライブラリー、ならびにそれらを構成する要素、ならびにそれらの製造法および利用方法

<130> P321-OP1590

<150> JP 2002-172106

<151> 2002-06-12

<160> 19

<210> 1

<211> 3464

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> pEU-T7JunFlag: vector having 5' UTR and 3' UTR regions of in vitro virus and a part of c-jun

<400> 1

```

atttaggtga cactatagaa tacacggaat tcgcgtttta tttttaattt totttcaaat      60
acttctagct agagtatttt tacaacaatt accaacaaca acaacaaca acaacaacat      120
tacattttac attctacaac tacccatggc tagcatgact ggtggacagc aaatgggtgc      180
ggccgcgccc gagatgccgg gagagacgcc gccctgtcc cctatcgaca tggagtctca      240
ggagcggatc aaggcagaga ggaagcgcac gaggaaccgc attgccgcct ccaagtgcgc      300
gaaaaggaag ctggagcggg tcgctcggct agaggaaaaa gtgaaacct tgaaagcgcg      360
aaactccgag ctggcatcca cggccaacat gtcagggaa caggtggcac agcttaagca      420
gaaagtcacg aaccacgtta acagtgggtg ccaactcatg ctaacgcagc agttgcaaac      480
gtttagaccg cgggactaca aggacgatga cgacaagctc gagaaaaaaaa aagcttggcg      540
taatcatggt catagctggt tcctgtgtga aattgttate cgctcacaat tccacacaac      600
atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca      660
ttaattgctg tgcgctcact gccgccttcc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat      720
taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc gttttgcgta ttgggcgctc ttcgcttcc      780
tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca      840
aaggcggtaa tacggttate cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca      900
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg      960
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgc     1020
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctggt     1080

```

cggaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	1140
tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcgggttagg	tcgttcgctc	caagctgggc	1200
tgtgtgcacg	aaccccccg	tcagcccgac	cgctgcgcct	tatecggtaa	ctatcgtctt	1260
gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	1320
agcagagcga	ggtatgtagg	cgggtctaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	1380
tacactagaa	ggacagtatt	tggatctctg	gcctctctga	agccagttac	cttcggaaaa	1440
agagttggta	gctcttgatc	cggcaaacia	accaccgctg	gtagcgggtg	tttttttgtt	1500
tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	1560
acggggctctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggatttttgt	catgagatta	1620
tcaaaaagga	tcttcaccta	gaccccttta	aattaaat	gaagttttaa	atcaatctaa	1680
agtatatatg	agtaaacttg	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	1740
tcagcgatct	gtctatctcg	ttcatccata	gttgectgac	tccccgctgt	gtagataact	1800
acgatacggg	agggcttacc	atctggcccc	agtctgcaa	tgataccgcg	agacccacgc	1860
tcaccggctc	cagatttate	agcaataaac	cagccagccg	gaaggccga	ggcagaagt	1920
ggctctgcaa	ctttatecgc	ctccatccag	tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	1980
agtagttcgc	cagttaatag	tttgcgcaac	gttggtgcca	ttgctacagg	catcgtgggtg	2040
tcacgctcgt	cgtttggtat	ggcttcattc	agctccggtt	cccaacgate	aaggcgagtt	2100
acatgatecc	ccatgtttgtg	caaaaaagcg	gtagctctct	tcggctctcc	gatcgtttgc	2160
agaagtaagt	tgcccgagct	ggtatcactc	atggttatgg	cagcaactgca	taattctctt	2220
actgtcatgc	catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggt	agtactcaac	caagtcattc	2280
tgagaatagt	gtagcggcg	accgagttgc	tcttgccccg	cgtaataacg	ggataatacc	2340
gcgccacata	gcagaacttt	aaaagtgtct	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	2400
ctctcaagga	tcttaccgct	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccactcgc	tgcacccaac	2460
tgatcttcag	catcttttac	tttcaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaae	aggaaggcaa	2520
aatgcgcaa	aaaagggaat	aaggcgca	cggaaatgtt	gaatactcat	actcttctct	2580
ttcaatatt	attgaagcat	ttatcagggt	tattgtctca	tgagcggata	catatttgaa	2640
tgtatttaga	aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgccacct	2700
gacgtctaag	aaaccattat	tatcatgaca	ttaacctata	aaaataggcg	tatcagcagg	2760
ccctttcgtc	tcgocggttt	cgggtgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	2820
gagacgggtca	cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	2880
tcagcgggtg	ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	2940
ctgagagtgc	accatatcga	egctctccct	tatgcgactc	ctgcattagg	aagcagccca	3000
gtagtaggtt	gaggccgttg	agcaccgccc	ccgcaaggaa	tggtgeatgc	aaggagatgg	3060
cgcccaacag	tcccccgccc	acggggcctg	ccaccatacc	cacgccgaaa	caagcgtca	3120
tgagcccgaa	gtggcgagcc	cgatcttccc	catcggtgat	gtcggcgata	taggcgccag	3180
caaccgcacc	tgtggcgccg	gtgatgccgg	ccacgatgcg	tccggcgtag	aggatctggc	3240
tagcgatgac	cctgctgatt	ggttcctctg	ccatttccgg	ggtgcggaac	ggcgttacca	3300
gaaactcaga	aggttcgtcc	aaccaaaacc	actctgacgg	cagtttacga	gagagatgat	3360
agggtctgct	tcagtaagcc	agatgctaca	caattaggct	tgtacatatt	gtcgttagaa	3420
cgcggctaca	attaatacat	aaccttatgt	atcatacaca	tacg		3464

<210> 2

<211> 5172

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> pCMV-FosCBPzz: vector having a part of c-jun

<400> 2

```

atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga      60
gttccgcggt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg      120
cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg      180
acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca      240
tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tgccccgect ggcatatgac      300
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc      360
tattaocatg gtgatgcggt tttggcagta cataaatggg cgtggatagc ggtttgactc      420
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtaaatggg agtttgtttt ggcacccaaa      480
tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaaaa ctccgcccc ttgacgcaaa tgggcggtag      540
gogtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta      600
gagattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaaggga acaaaagctg gagctccacc      660
goggtggcgg ccgctctagc cggggcggat cagcatcccg cgaaattaat acgactcact      720
ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc cctctagaaa taattttgtt taactttaag      780
aaggagatat accatggcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgcg gatccggcag      840
agcgcagagc atcggcagaa ggggcaaatg agagcagcta tctcctgaag aggaagagaa      900
acggagaatc cgaagggaac ggaataagat ggctgcagcc aagtgcgga atcggaggag      960
ggagctgaca gatacactcc aagcggagac agatcaactt gaagatgaga agtctgcggt      1020
gcagactgag attgccaatc tgctgaaaga gaaggaaaaa ctggagtta ttttggcagc      1080
ccaccgacct goctgcaaga tccccgatga ccttggcctc gagctcaaga gaagatggaa      1140
aaagaatttc atagccgtct cagcagccaa ccgctttaag aaaatctcat cctccggggc      1200
acttggatca gattatgata ttccaactac tgctagcgag aatttgtatt ttcagggtgg      1260
taccaaaacc gcggtctctg cgcaaacagc tgaagccgta gacaacaaat tcaacaaaaga      1320
acaacaaaac gogttctatg agatcttaca ttacctaac ttaaacgaag aacaacgaaa      1380
cgcttctatc caaagtttaa aagatgacce aagccaaagc gctaaccctt tagcagaage      1440
taaaaageta aatgatgctc aggcgcgaa agtagacaac aaattcaaca aagaacaaca      1500
aaacgcgttc tatgagatct tacatctacc taacttaaac gaagaacaac gaaacgectt      1560
catccaaagt ttaaaagatg acccaagcca aagcgcetaac ctttttagcag aagctaaaaa      1620
gctaaatgat gctcaggcgc cgaaagtaga cgcgaaattct agctctgtac cccatcacca      1680
tcaccateac taagtcgact tegatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga      1740
atggagatcc aatttttaag tgtataatgt gttaaactac tgattctaata tgtttgtgta      1800
ttttagatcc acagtcccaa ggctcatttc aggcacctca gtcctcacag tctgttcatg      1860
atcataatca gccataccac attttagtag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac      1920
ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca      1980
gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatc tcaaaaataa agcatttttt      2040
tcaactgact ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaacg cgtaaattgt      2100
aagcgtaaat attttgtaaa aattcgcggt aaatttttgt taaatcagct cattttttaa      2160

```

ccaataggcc	gaaatcggca	aatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agatagggtt	2220
gagtgttgtt	ccagtttggg	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	2280
agggcgaaaa	accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	2340
ttttttgggg	tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	gccccgatt	2400
tagagcttga	cggggaagc	cggcgaacgt	ggcgagaaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	2460
agcgggcgct	agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacacccgc	2520
cgcgcttaat	gcgcccgtac	agggcgcgtc	agggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	2580
aaccctatt	tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	2640
ccctgataaatgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagaat	cctgaggcgg	aaagaaccag		2700
ctgtggaatg	tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtccccag	gctcccagc	aggcagaagt	2760
atgcaaagca	tgcatctcaa	ttagtcagca	accagggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	2820
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgcacctta	2880
actccgcca	tcccgcacct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgce	ccatggctga	2940
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gcccctcgg	cctctgagct	attccagaag	3000
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	tttgcaaag	atcgatcaag	agacaggatg	3060
aggatcgttt	cgcatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	3120
ggagaggcta	ttcgctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	3180
gttccggctg	tcagcgcagg	ggcgcgccgt	tcttttgc	aagaccgacc	tgccgggtgc	3240
cctgaatgaa	ctgcaagacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cggcggttcc	3300
ttgcgcagct	gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	3360
agtgcggggg	caggatctcc	tgcatctca	ccttctctcc	gcccagaaag	tatccatcat	3420
ggctgatgca	atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccat	tcgaccacca	3480
agcgaacat	cgcatcgagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggtcttg	tcgatcagga	3540
tgatctggac	gaagaacatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	3600
gagcatgecc	gacggcgagg	atctctctgt	gacctatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	3660
catggtggaa	aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	3720
ccgctatcag	gacatagcgt	tggtaccgcg	tgatattgct	gaagaacttg	gcggcgaatg	3780
ggctgaccgc	ttcctctgtc	tttacggtat	cgcgcctccc	gattcgcagc	gcacgcctt	3840
ctatgcctt	cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	3900
gagcgcacca	acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	3960
ggcttoggaa	tcgttttccg	ggacgcccgc	tggatgatec	tcagcgcgg	ggatctcatg	4020
ctggagttct	tcgcccaccc	tagggggagg	ctaactgaaa	cacggaagga	gacaataaccg	4080
gaaggaaccc	gcgctatgac	ggcaataaaa	agacagaata	aaacgcacgg	tgttgggtcg	4140
ttgttcata	aacgcggggg	tcggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	4200
ccccattggg	gccaaatcgc	ccgcgtttct	tccttttccc	caccccaccc	cccagttcg	4260
ggtgaaggcc	cagggctcgc	agccaacgtc	ggggcggcag	gccctgccat	agcctcaggt	4320
tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	4380
aagatccttt	ttgataatct	catgacaaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	4440
gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	4500
atctgtgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	4560
gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	4620
gtcctctag	tgtagccgta	gtagggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	4680
tacctcgtct	tgtaatcct	gtagaccgtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	4740

```

accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 4800
ggttctgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 4860
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta 4920
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgctgggtat 4980
ctttatagtc ctgtcggggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 5040
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 5100
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat ccctgattc tgtggataac 5160
cgtattaccg cc 5172

```

```

<210> 3
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> 5' SP6-029: PCR primer

```

```

<400> 3
atttaggtga cactatagaa caacaacaac aacaacaac aacaaaatgg ctagcatgac 60
tggtagacag caaatg 76

```

```

<210> 4
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> 5' T7(0')-bait: PCR primer

```

```

<400> 4
ttctaatacg actcaactata gggacaatta ctatttaca ttacaatgac tagcatgact 60
ggtggacag 69

```

```

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

```

```

<220>
<223> 3' None: PCR primer

```

```

<400> 5
cttctctca tcgtccttgt agtcccg 27

```

<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3' A8=A: PCR primer

<400> 6
tttttttct tgtcgtcatc gtcctttag tcccg 35

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3' X(CTCGAG): PCR primer

<400> 7
ctcgagcttg tgcgtcatcgt cctttag 28

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3' X(CTCGAG)A8=AX: PCR primer

<400> 8
tttttttct cgagcttgtc gtcgtcatc ttag 36

<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3' X(CTCGCC)A8: PCR primer

<400> 9

tttttttgg cgagcttgtc gtcacgtcc ttgtag

36

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 3' X(CTCG)A8: PCR primer

<400> 10

tttttttgc agcttgctgt catcgtcctt gtag

34

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 3' X(CTC)A8: PCR primer

<400> 11

tttttttga gcttgctgtc atcgtccttg tag

33

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 3' X(CTCT)A8: PCR primer

<400> 12

tttttttag agcttgctgt catcgtcctt gtag

34

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> 3' X(TTCG)A8: PCR primer

<400> 13
ttttttttcg aacttgctgt catcgctcctt gtag 34

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3'X(GTCC)A8: PCR primer

<400> 14
ttttttttgg accttgctgt catcgctcctt gtag 34

<210> 15
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3'X(CATG)A8: PCR primer

<400> 15
ttttttttca tgcttgctgt catcgctcctt gtag 34

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3'X(CTCC)A8: PCR primer

<400> 16
ttttttttgg agcttgctgt catcgctcctt gtag 34

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> 3'X(GTCG)A8: PCR primer

<400> 17
 ttttttttcg accttgctgt catcgtcctt gtag 34

<210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> 3' baitFosD: PCR primer

<400> 18
 ttagggtaca gagctagaat acgcgctc 27

<210> 19
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> 3' baitFosDA: PCR primer

<400> 19
 tttttttttt agggtacaga gctagaatac gcgctc 35

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明の翻訳テンプレート (A) ならびにその構成要素であるコード分子 (B) およびスパーサー分子 (C) の構成を示す。翻訳テンプレートは、コード分子由来のコード部とスパーサー分子由来のスパーサー部からなる。F 1 および F 2 は蛍光色素をす。

図 2 は、C 末端修飾された蛋白質 (C 末端ラベル化蛋白質) (A)、本発明の翻訳テンプレート (B)、および、修飾剤 (C) の構成を示す。

図 3 は、C 末端修飾された蛋白質 (対応付け分子) (A)、本発明の翻訳テンプレート (B)、および、修飾剤 (C) の構成を示す。

図 4 は、本発明の対応付け分子による物質や蛋白質の相互作用解析の一次スクリーニングの説明図を示す。対応付け分子は、進化分子工学として、ランダムライブラリーなどから、漸進的に進化させ、所望の機能を獲得した物質を創製することに応用できる。また、ゲノム機能解析への応用として、cDNAライブラリーから所望の物質や蛋白質と相互作用を持つ一群の遺伝子配列を網羅的に解析できる。ここでは、無細胞共翻訳スクリーニング法を利用することもできる。

図 5 は、本発明の対応づけ分子やC末端ラベル化法による物質や蛋白質の相互作用解析の一次スクリーニングと二次スクリーニングの説明図を示す。本発明翻訳テンプレートから合成されたC末端修飾タンパク質 (修飾剤でC末端修飾された蛋白質、翻訳テンプレートでC末端修飾された蛋白質 (対応付け分子)、PEGによってC末端修飾された蛋白質を利用したタンパク質を、標的分子との間の相互作用の解析に利用可能である。図 4 のスクリーニングを一次スクリーニングとして物質や蛋白質と相互作用の詳細をFCCSやマイクロアレイなどによりさらに解析することが可能である。

図 6 は、コード分子の 3 ' 末端配列の違いによる翻訳量の比較を示す。c - j u n の遺伝子配列を有する、異なる 1 2 種類の 3 ' 末端配列を持つコード分子 (A 8 = A 配列) の翻訳量の比較。X 配列のバリエーションと必要な条件を示した。詳細は、実施例 1 参照。

30

40

50

図7は、翻訳テンプレートがPEGスペーサー部を持たない場合および異なるPEGスペーサー部を持つ場合の翻訳量の比較を示す。

A : c - f o s の遺伝子配列を有するA配列もX配列も持たないコード分子 (None (mRNA)) と、A配列を持つコード分子 (A (mRNA))、および d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c をライゲーションした翻訳テンプレート (+ P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c ,) の翻訳量の比較。詳細は、実施例1参照。

B : c - j u n の遺伝子配列を有するA配列もX配列も持たないコード分子 (None (mRNA))、X A配列を持つコード分子 (X A (mRNA))、およびコード分子 (X A (mRNA)) に (d C)₂T (F l u) T (X A + (d C)₂T₂)、d C d C T (F l u) T P E G 4 0 0 0 (X A + P E G 4 0 0 0)、d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c (X A + P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c) をライゲーションした翻訳テンプレートの翻訳量の比較 (電気泳動の結果 (写真) も示す)。詳細は、実施例1参照。

図8は、翻訳テンプレートの翻訳量と安定性を示す。

A : c - j u n の遺伝子配列を有するX A配列を持つコード分子 (; X A配列)、A配列もX配列も持たないコード分子 (; None配列)、およびコード分子 (X A配列) と d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c をライゲーションした翻訳テンプレート () の翻訳量のタイムコース。詳細は、実施例1参照。

B : c - j u n の遺伝子配列を有するコード分子 (; X A配列) と、およびコード分子 (X A配列) と d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c をライゲーションした翻訳テンプレート () の安定性のタイムコース。詳細は、実施例1参照。

図9は、本発明の翻訳テンプレートが異なるPEGスペーサー部を持つ場合の翻訳量の比較 (電気泳動の結果 (写真) も示す) を示す。

A : c - j u n の遺伝子配列を有するコード分子 (X A配列、A配列) と d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c をライゲーションした場合の翻訳テンプレートの添加量の違いによる対応付け分子の形成効率。I V V ; 対応付け分子、L i g a t e d mRNA ; コード部にPEGスペーサー部がライゲーションされた翻訳テンプレート。レーン1 ~ 6 ; RNA添加量が10, 25, 50, 100, 200, 400 nM。詳細は、実施例2参照。

B : c - j u n の遺伝子配列を有するコード分子 (X A配列、A配列) と d C d C T (F l u) P E G 4 0 0 0 d C d C P u r o - B o c をライゲーションした場合の翻訳テンプレートの添加量の違いによるフリー蛋白質 (F r e e p r o t e i n) の合成率 (対応付け分子の形成量 + フリー蛋白質の合成量 = 100%)。レーン1 ~ 6 ; RNA添加量が10, 25, 50, 100, 200, 400 nM。詳細は、実施例2参照。

図10 ~ 14は、本発明に使用されるPEGスペーサー分子とその合成スキームを示す。

図15 ~ 18は、本発明に使用される修飾剤とその合成スキームを示す。

図19は、対応付け分子、スペーサー分子およびコード分子の構造の概略を示す。

図20は、スペーサー分子の一例の詳細な構成を示す。D : ドナー領域、X2およびX1 : 機能付与ユニット、PEG : PEG領域、A : ペプチドアクセプター領域。Bio : ビオチン、F1 : 蛍光色素。

図21は、コード分子の一例の詳細な構成を示す。

図22は、C末端修飾蛋白質 (A)、修飾剤 (B)、および、翻訳テンプレート (C) の構成を示す図である。

【 図 1 】

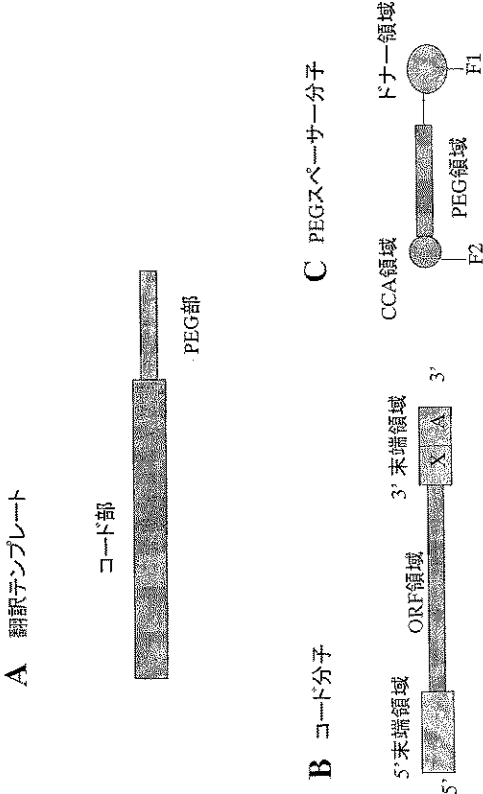


図 1

【 図 2 】

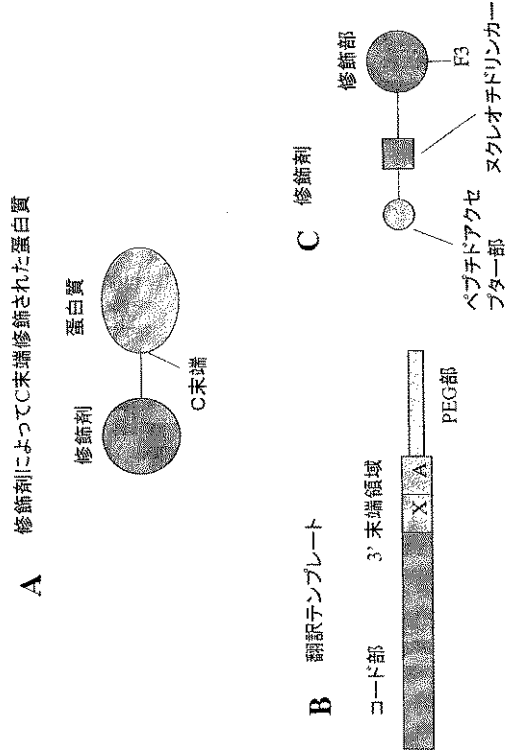


図 2

【 図 3 】

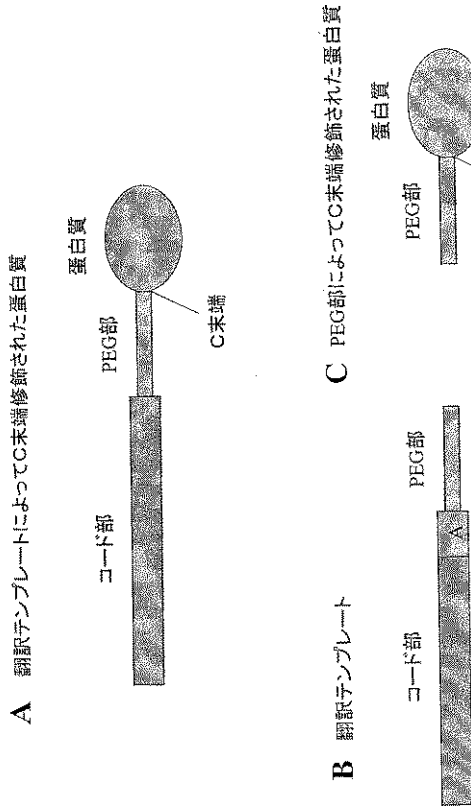


図 3

【 図 4 】

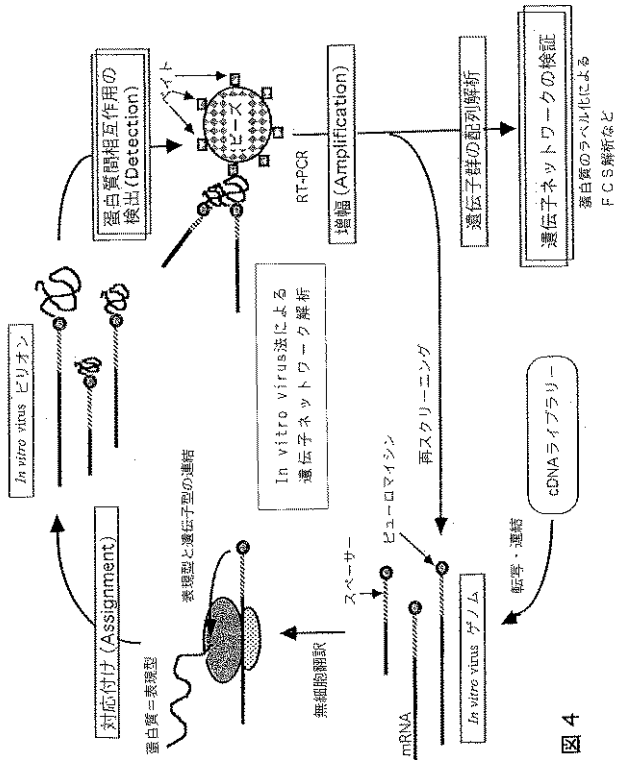
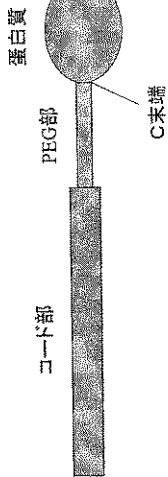


図 4

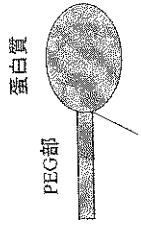
A 翻訳テンプレートによってC末端修飾された蛋白質



B 翻訳テンプレート



C PEG部によってC末端修飾された蛋白質



In vitro virus ビリオン

対応付け (Assignment)

無細胞翻訳

表現型と遺伝子型の連絡

In vitro virus法による

遺伝子ネットワーク解析

増幅 (Amplification)

RT-PCR

遺伝子群の配列解析

遺伝子ネットワークの検証

蛋白質のラベル化による

FCS解析など

cDNAライブラリー

転写・連結

【 図 5 】

IVVIによる遺伝子ネットワーク解析法

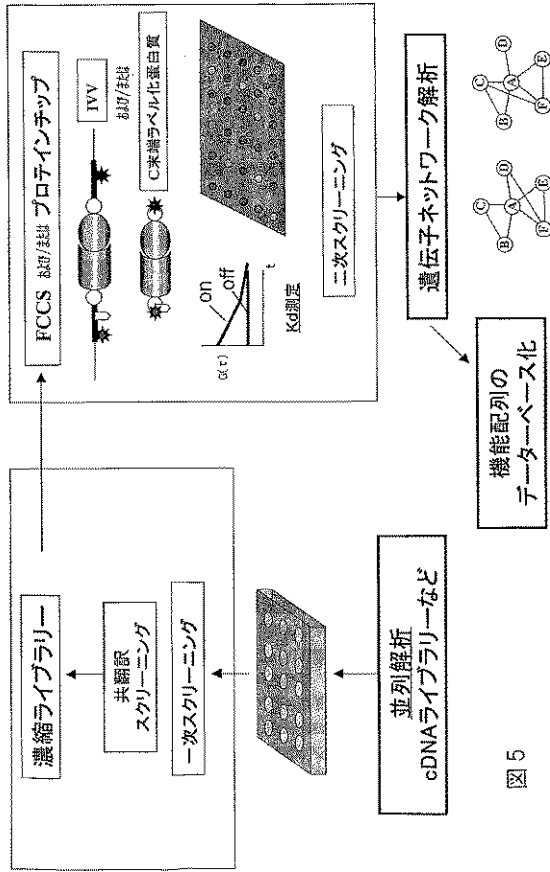


図 5

【 図 6 】

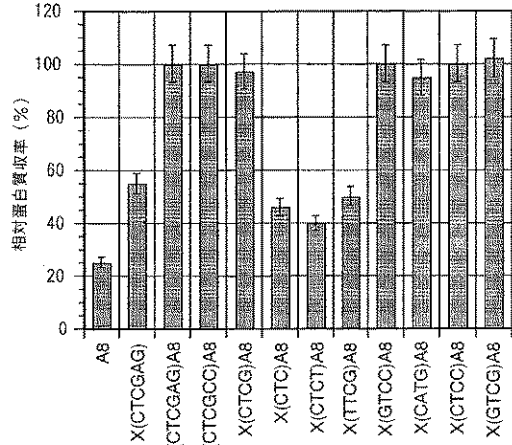


図 6

【 図 7 】

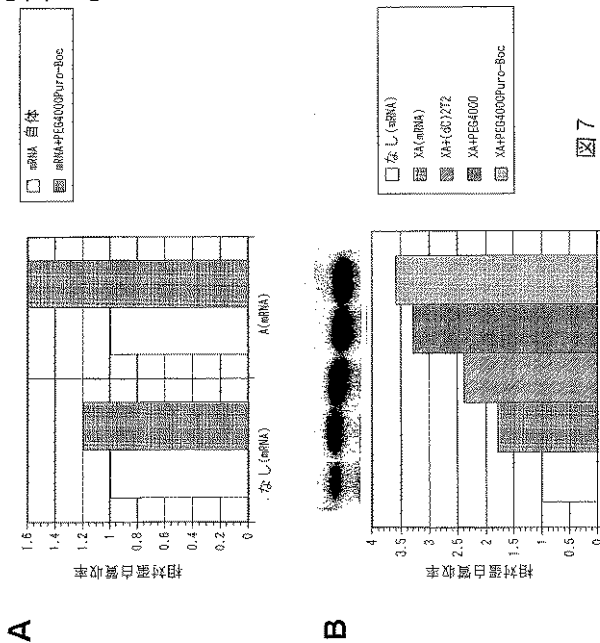


図 7

【 図 8 】

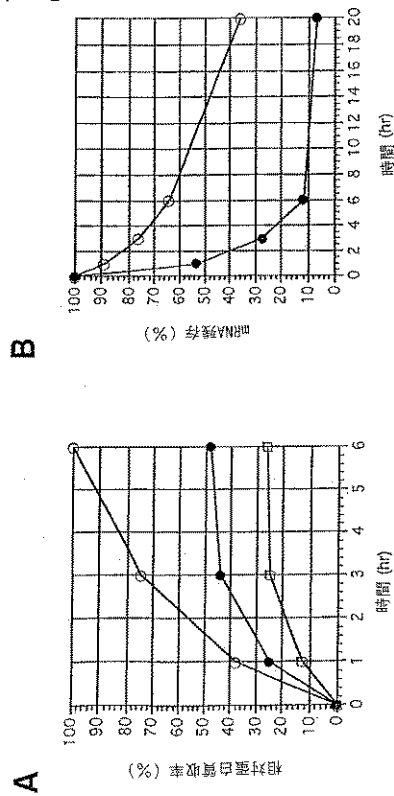
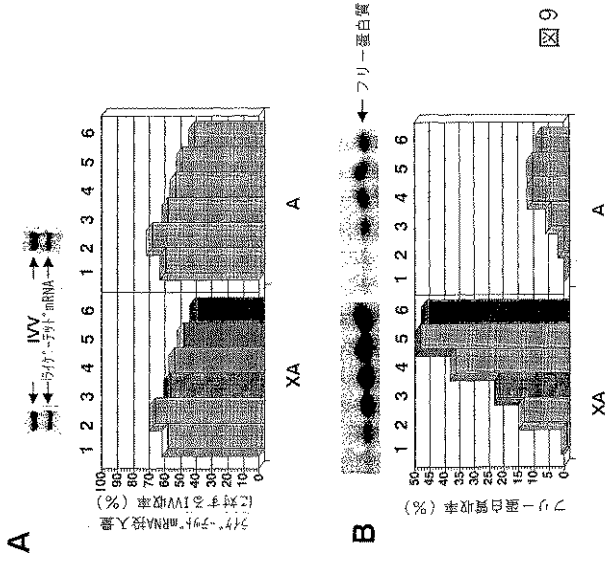
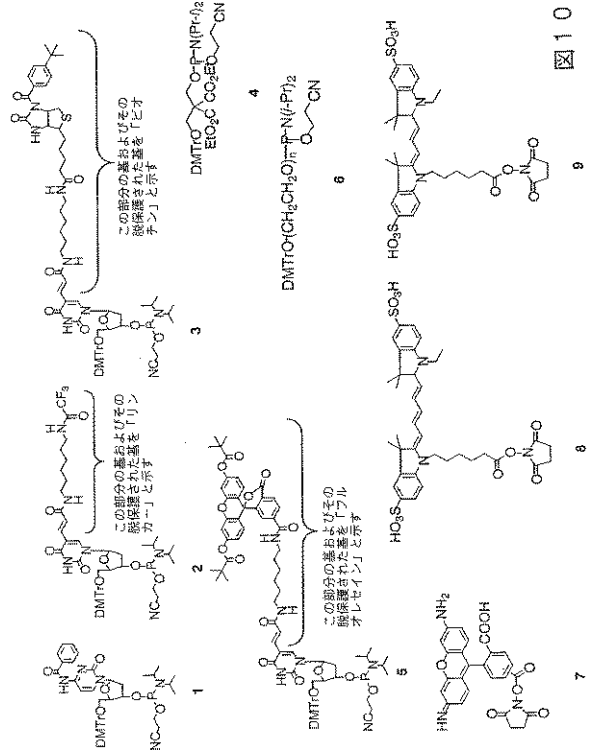


図 8

【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】

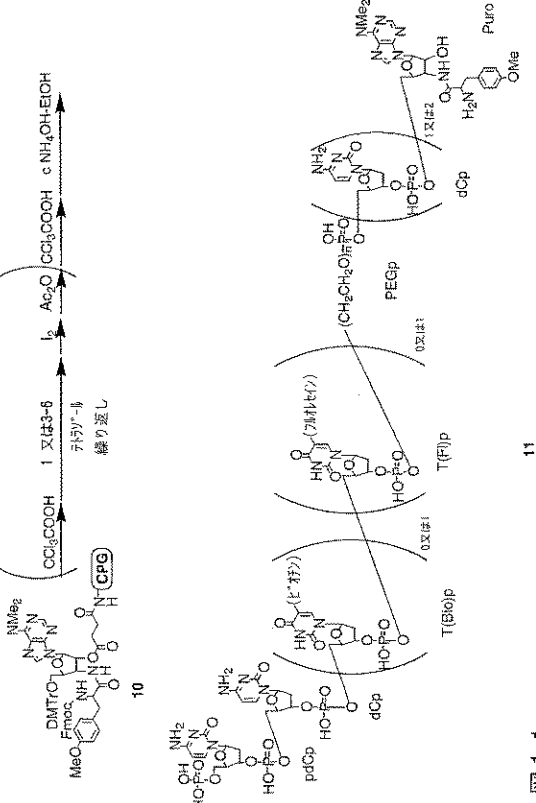


図 11

【 図 12 】

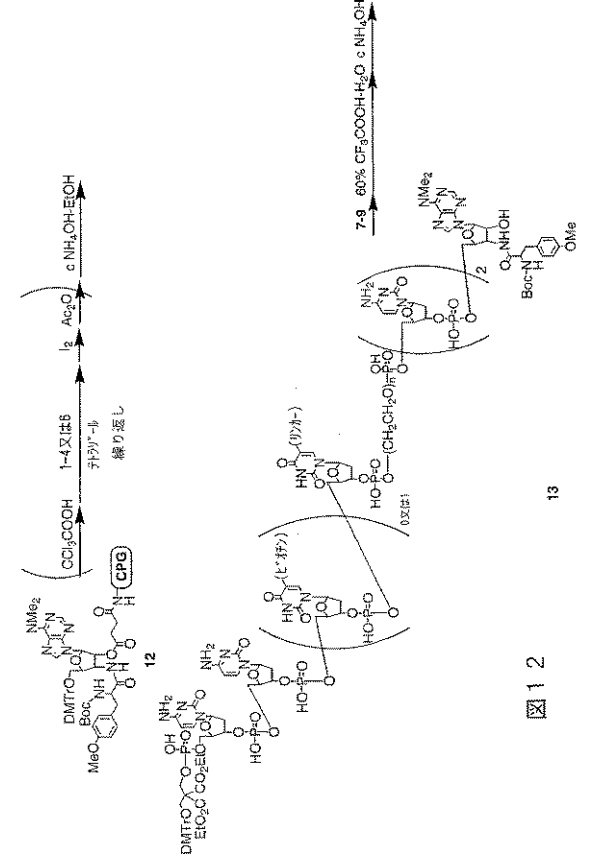


図 12

【 図 1 3 】

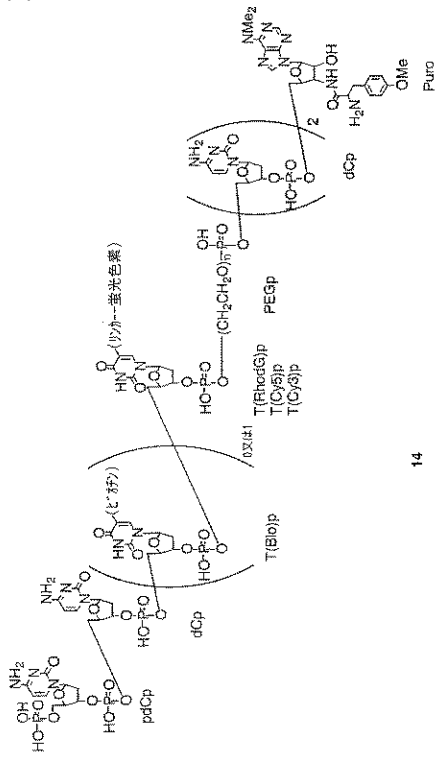


図 1 3

【 図 1 4 】

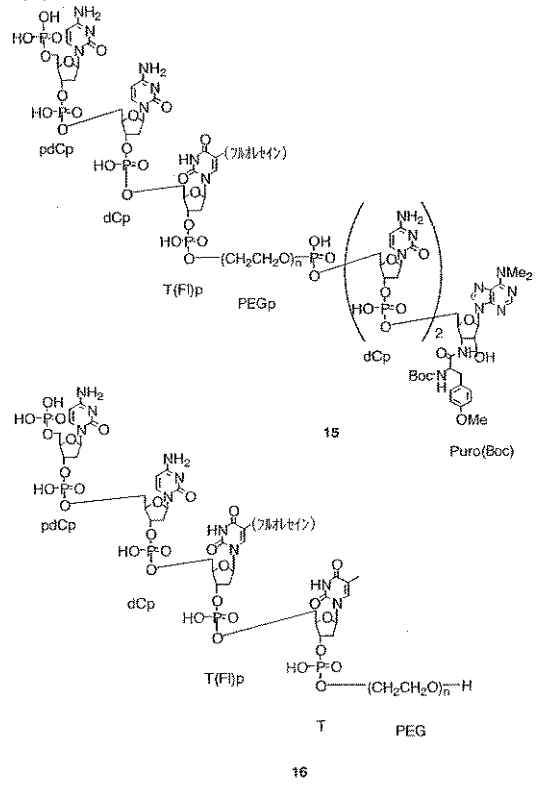


図 1 4

【 図 1 5 】

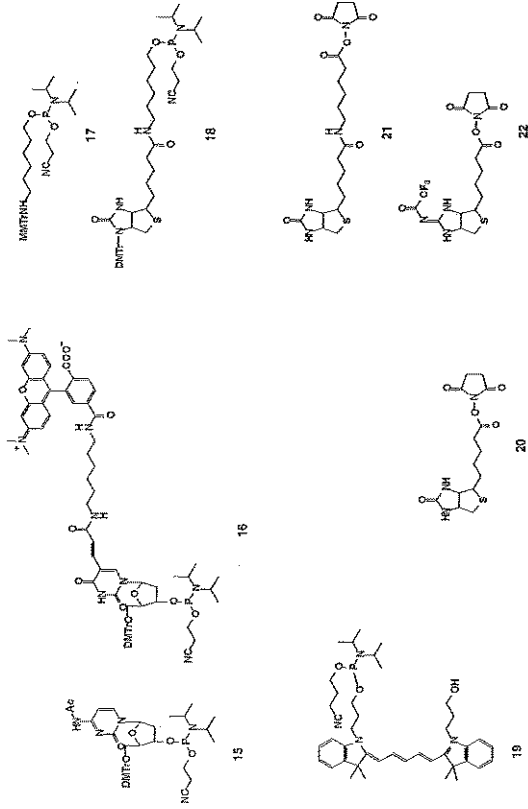


図 1 5

【 図 1 6 】

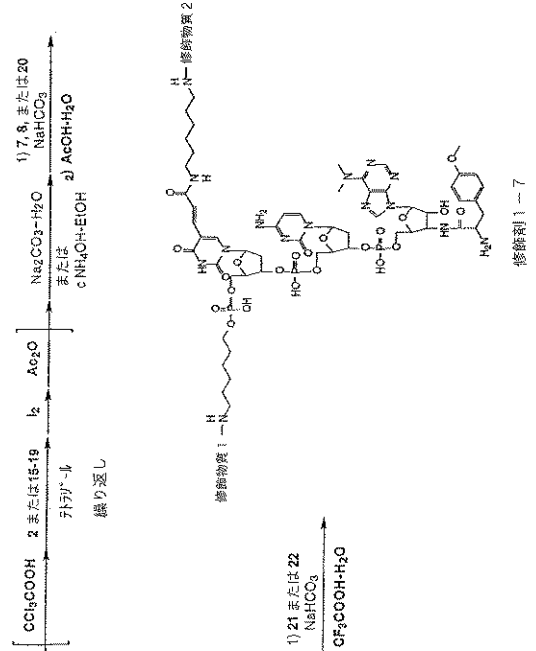


図 1 6

【 図 17 】

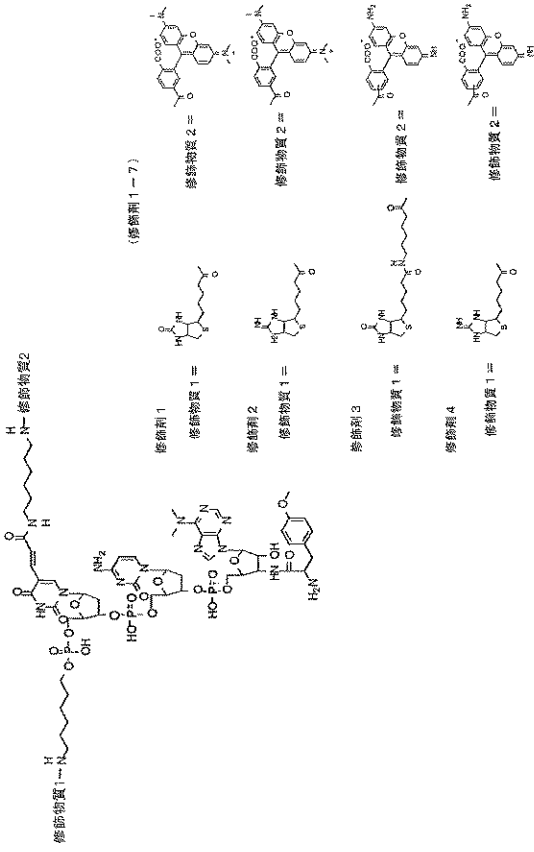


図 17

【 図 18 】

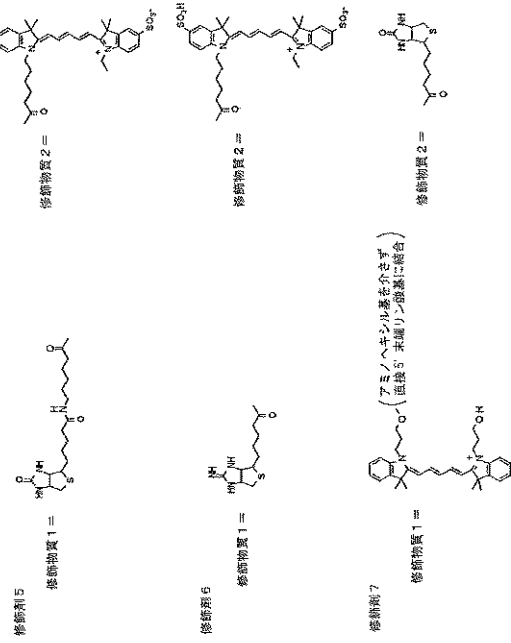


図 18

【 図 19 】

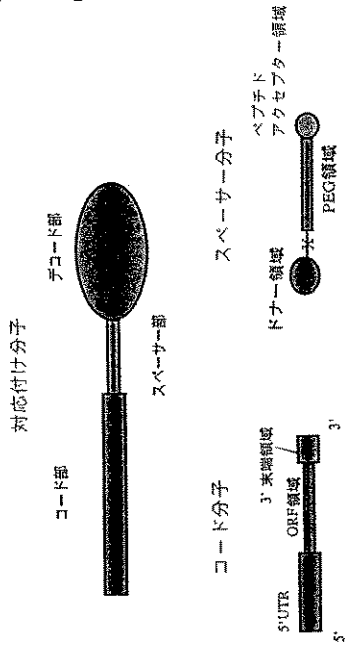


図 19

【 図 20 】

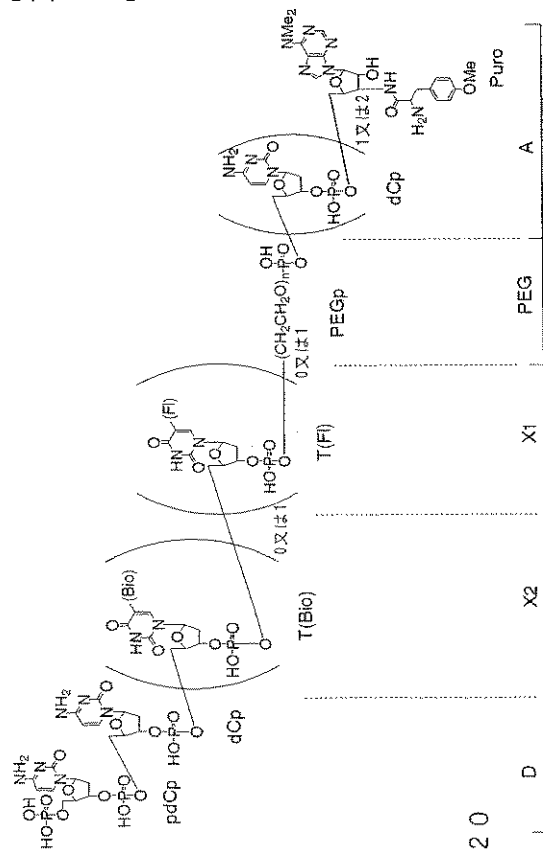


図 20

【 図 2 1 】



転写プロモーター
 SP6: ATTAGGTGACACTATA
 翻訳エンハンサー
 O29(Omega29): GAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAATG

親和性タグ
 Flag-tag: GACTACAAGGACGATGACGACAAG
 XhoI: CTCGAG
 ポリA配列: An (n=2 bp~)

図 2 1

【 図 2 2 】

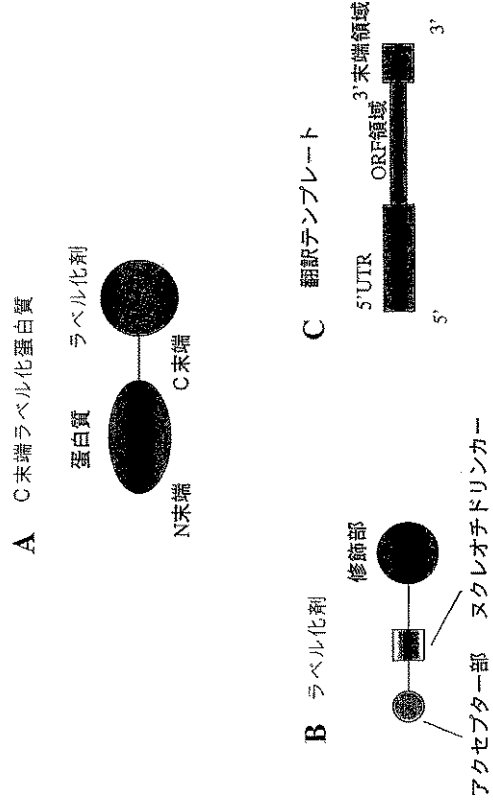


図 2 2

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/09, C12Q1/68, C12P21/02		
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) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, C12Q1/68, C12P21/02		
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) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02/48347 A1 (Keio University), 20 June, 2002 (20.06.02), & JP 2002-176987 A	1-48
X A	WO 98/16636 A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 April, 1998 (23.04.98), & JP 10-518202 A & EP 962527 A1 & US 6361943 B1 & US 2002/0072087 A1 & US 2002/0022230 A1	16-27, 35-47 1-15, 28-34, 48
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 03 September, 2003 (03.09.03)	Date of mailing of the international search report 16 September, 2003 (16.09.03)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/07508	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68, C12P 21/02			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C12N 15/09, C12Q 1/68, C12P 21/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P, X	WO 02/48347 A1 (学校法人慶應義塾) 2002.06.20 & JP 2002-176987 A	1-48	
X A	WO 98/16636 A1 (三菱化学株式会社) 1998.04.23 & JP 10-518202 A & EP 962527 A1 & US 6361943 B1 & US 2002/0072087 A1 & US 2002/0022230 A1	16-27, 35-47 1-15, 28-34, 48	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー			
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日	03.09.03	国際調査報告の発送日	15.09.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高畑 栄二	4B 9281
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

(出願人による申告) 産業再生法第 3 0 条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 高嶋 秀昭

日本国神奈川県横浜市港北区日吉 3 - 1 4 - 1 慶應義塾大学理工学部内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	翻译模板及其文库，蛋白质文库和由其合成的蛋白质，及其组成元件，以及制备和使用它们的方法		
公开(公告)号	JPWO2003106675A1	公开(公告)日	2005-10-13
申请号	JP2004513488	申请日	2003-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	宫本悦子 柳川弘志 高嶋秀昭		
发明人	宫本悦子 柳川弘志 高嶋秀昭		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/00 C12N15/10 C12P21/02 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	C12N15/1062		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/00 C12P21/02.Z G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/543.575 G01N33/566		
代理人(译)	川口义行 远山勉		
优先权	2002172106 2002-06-12 JP		
其他公开文献	JP4747292B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

作为在基因组后研究中进行高通量结构和功能分析研究的工具，我们提供有效蛋白质合成的翻译模板。翻译模板仅由编码部分或编码部分和PEG部分组成，并且在编码部分的3'末端，受体区域和翻译增强序列包含受体区域上游的序列5'。有利于在蛋白质合成中使用PEG部分不能通过肽基转移反应结合蛋白质，并且如果其在编码部分的3'末端具有受体区域，则PEG部分是蛋白质。用于匹配的有利之处在于可以与肽基转移反应结合。还可以提供由这些翻译模板合成的蛋白质，C-末端修饰的蛋白质和相应的分子，并且对C-末端修饰的蛋白质的修饰物和相应分子的PEG部分添加功能修饰。

(10) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2003/106675
発行日 平成17年10月13日 (2005. 10. 13)	(43) 国際公開日 平成15年12月24日 (2003. 12. 24)	
(61) Int. Cl. ⁷ C12N 15/09 C07K 14/00 C12P 21/02 G01N 21/78 G01N 33/53	F I C12N 15/00 Z N A A C07K 14/00 C12P 21/02 Z G01N 21/78 C G01N 33/53 D	
出願番号 特願2004-513488 (P2004-513488)	(71) 出願人 89000079	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2003/007508	学校法人慶應義塾	
(22) 国際出願日 平成15年6月12日 (2003. 6. 12)	東京都港区三田2丁目15番45号	
(31) 優先権主張番号 特願2002-172106 (P2002-172106)	(74) 代理人 100100549	
(32) 優先日 平成14年6月12日 (2002. 6. 12)	弁理士 川口 嘉之	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100090516	
(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, N M, NX, NZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人 100089244 弁理士 遠山 勉	
	(72) 発明者 宮本 悦子 日本国神奈川県横浜市港北区日吉3-1-4 -1 慶應義塾大学理工学部内	
	(72) 発明者 柳川 弘志 日本国神奈川県横浜市港北区日吉3-1-4 -1 慶應義塾大学理工学部内	
(54) [発明の名称] 翻訳テンプレートおよびそのライブラリー、それらから合成される蛋白質および蛋白質のライブラリー、ならびにそれらを作成する要素、ならびにそれらの製造法および利用方法		