明　細　書

発明の名称 ：

翻訳促進剤、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法

技術分野

[0001] 本出願における開示は、翻訳促進剤、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質を無細胞で合成する合成系は、タンパク質合成に関わる細胞内要素を含む媒体を準備して、鋳型ＤＮＡの転写から翻訳まで無細胞で行う、タンパク質合成系である。こうした無細胞タンパク質合成系は種々知られている。かかる合成系として、転写鋳型である鋳型ＤＮＡを媒体に適用して最終産物であるタンパク質を合成する系と、翻訳鋳型であるｍＲＮＡを媒体に適用してタンパク質を合成する系とがある。

[0003] これらいずれの系においても、最初の原料として転写鋳型ＤＮＡを合成する必要がある。転写鋳型ＤＮＡの合成は、通常、まず、合成しようとするタンパク質をコードするｃＤＮＡをクローニングし、クローニングしたｃＤＮＡをプラスミドに組み込んで、プロモーター、コード領域、ターミネーター等を含む発現のためのＤＮＡ領域を構築する。その後、プラスミドからかかるＤＮＡ領域を切り出すか、あるいはプラスミドに対して直接ＰＣＲを実施して、鋳型ＤＮＡとする。

[0004] 鋳型ＤＮＡの構造は、無細胞タンパク質合成系における発現効率について影響を及ぼすと考えられ、発現カセットを構築するベクターについて種々の試みがなされている。例えば、５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）に特定の翻訳促進配列を導入することが報告されている（特許文献１、２）。また、３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）を長くすることで翻訳鋳型であるｍＲＮＡが長寿命化したり、翻訳効率が向上することも記載されている（特許文献３）。ｍ

ＲＮＡの３’ＵＴＲは、１０００塩基以上であることが好ましいことも報告されている（特許文献４、５）。

[0005] また、酵母抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系についても、３’ＵＴＲの利用について言及されている（非特許文献１）。

[0006] 一方、２００塩基以下の３’ＵＴＲで転写鋳型ＤＮＡを核酸増幅反応により取得でき、この転写鋳型ＤＮＡを無細胞タンパク質合成系に適用することでｍＲＮＡおよびタンパク質を効率的に取得できることも知られている（特許文献６参照）。

[0007] ところで、無細胞タンパク質合成では、転写鋳型ＤＮＡから翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する必要がある。ｍＲＮＡの合成効率の観点からは、目的タンパク質の合成とは関係の無い３’ＵＴＲは短い方が好ましい。しかしながら、目的タンパク質の合成効率は高い方が好ましい。そのため、（１）目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の３’末端に隣接して連結される３’ＵＴＲの核酸として、（２）前記コード領域の３’末端に隣接する、１０～４０個の核酸配列からなる第１領域と、前記第１領域に連結する２～４０個のＡが連続するポリＡ配列からなる第２領域と、を含み、（３）前記第１領域が、ヘアピン構造を有することで、（４）比較的短い３’ＵＴＲにもかかわらず、目的タンパク質の合成効率が向上することも知られている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開２００９－７２２０７号公報

特許文献2：特開２０１３－１５８３４２号公報

特許文献3：特開２００７－９７４３８号公報

特許文献4：特開２００８－３５７０１号公報

特許文献5：特開２００５－２４７８５７号公報

特許文献6：国際公開第２０１６／１４３７９９号

特許文献7：特許第６７３８１１１号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｒｕｉ Ｇａｎ ｅｔ ａｌ．，“Ａ ｃｏｍｂｉｎｅｄ ｃｅｌｌ－ｆｒｅｅ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ－ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ ｆｒｏｍ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ ｆｏｒ ｒａｐｉｄ ａｎｄ ｒｏｂｕｓｔ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｙｎｔｈｅ”，Ｂｉｏｔｅｃｈｏｎｏｌｏｇｙ Ｊｏｕｒｎａｌ，２０１４，９，６４１－６５１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 上記特許文献１～７および非特許文献１に記載のとおり、無細胞タンパク質合成の分野では、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲについて、様々な研究がなされている。しかしながら、特許文献１および２に記載されているように、５’ＵＴＲに特定の翻訳促進配列を導入することは知られているが、５’ＵＴＲを短くする方法は知られていない。

[0011] 本出願における開示は、上記従来の問題点を解決するためになされたものであり、鋭意研究を行ったところ、（１）目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の５’末端側のＵＴＲである第１配列および３’末端側のＵＴＲである第２配列の組合せに着目し、（２）第１配列および第２配列が接合部を形成できるように設計することで、５’ＵＴＲを短くできることを新たに見出した。

[0012] すなわち、本出願の開示の目的は、比較的短い５’ＵＴＲにもかかわらず、目的タンパク質を合成できる翻訳促進剤、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本出願の開示は、以下に示す、翻訳促進剤、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法に関

する。

[0014] （１）無細胞タンパク質合成系に用いる翻訳促進剤であって、

該翻訳促進剤は、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の５’末端に隣接して連結される５’非翻訳領域としての核酸である第１配列と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の３’末端に隣接して連結される３’非翻訳領域としての核酸である第２配列と、

の組合せであり、

第１配列および第２配列は、接合部を形成する相補配列を有する

翻訳促進剤。

（２）第１配列の核酸の長さが３以上である

上記（１）に記載の翻訳促進剤。

（３）第２配列の核酸の長さが２０以上である

上記（１）または（２）に記載の翻訳促進剤。

（４）第２配列が接合部より３’側にＡ（アデニン）が連続するポリＡ配列を更に含む

上記（１）～（３）の何れか一つに記載の翻訳促進剤。

（５）第１配列および／または第２配列が、１個以上のステムまたはステムループを含む

上記（１）～（４）の何れか一つに記載の翻訳促進剤。

（６）第１配列の接合部より３’側の核酸の数および第２配列の接合部より５’側の核酸の数の和が２５以下である

上記（１）～（５）のいずれか一つに記載の翻訳促進剤。

（７）上記（１）～（６）の何れか一つに記載の翻訳促進剤と、

第１配列と第２配列との間に配置される目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と

を含む翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（８）無細胞タンパク質合成系に用いる転写鋳型ＤＮＡであって、

該転写鋳型ＤＮＡは、

プロモーター領域と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と、

上記（１）～（６）の何れか一つに記載の翻訳促進剤と、

を含み、

翻訳促進剤の第１配列はプロモーター領域とコード領域との間に配置され、

翻訳促進剤の第２配列はコード領域の３’末端に隣接して連結されている

転写鋳型ＤＮＡ。

（９）無細胞タンパク質合成系に用いる翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で上記（８）に記載の転写鋳型ＤＮＡを用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、

を備える、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法。

（１０）タンパク質の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡをタンパク質に翻訳するための要素の存在下で、上記（７）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡまたは上記（９）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法で生産した翻訳鋳型ｍＲＮＡを用いてタンパク質を合成する工程、

を備える、タンパク質の生産方法。

[0015] また、本出願の開示は、以下に示す、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法に関する。

（１）翻訳促進剤と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と、

を含む翻訳鋳型ｍＲＮＡであって、

翻訳促進剤は、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の５’末端に隣接して連結される５’非翻訳領域としての核酸である第１配列と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の３’末端に隣接して連結される３’非翻訳領域としての核酸である第２配列と、

の組合せであり、

翻訳鋳型ｍＲＮＡをＭＸｆｏｌｄで解析した際に、第１配列および第２配列は、接合部を形成し、

第１配列の接合部より３’側の核酸の数および第２配列の接合部より５’側の核酸の数の和が２５以下である

翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（２）第１配列の核酸の長さが３以上である

上記（１）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（３）第２配列の核酸の長さが２０以上である

上記（１）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（４）第２配列の核酸の長さが２０以上である

上記（２）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（５）第２配列が接合部より３’側にＡ（アデニン）が連続するポリＡ配列を更に含む

上記（１）～（４）の何れか一つに記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（６）第１配列および／または第２配列が、１個以上のステムまたはステムループを含む

上記（１）～（４）の何れか一つに記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（７）第１配列および／または第２配列が、１個以上のステムまたはステムループを含む

上記（５）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

（８）無細胞タンパク質合成系に用いる転写鋳型ＤＮＡであって、

該転写鋳型ＤＮＡは、

上記（１）～（７）の何れか一つに記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡをコードす

る領域と、

第１配列の５’末端に配置されるプロモーター領域と

を含む、転写鋳型ＤＮＡ。

（９）無細胞タンパク質合成系に用いる翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で上記（８）に記載の転写鋳型ＤＮＡを用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、

を備える、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法。

（１０）タンパク質の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡをタンパク質に翻訳するための要素の存在下で、上記（１）～（７）の何れか一つに記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡまたは上記（９）に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法で生産した翻訳鋳型ｍＲＮＡを用いてタンパク質を合成する工程、

を備える、タンパク質の生産方法。

発明の効果

[0016] 本出願で開示する翻訳促進剤を用いると、比較的短い５’ＵＴＲにもかかわらず、目的タンパク質を合成できる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図１は、翻訳促進剤１および翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の概略を説明する概略図である。

[図2]図２は、翻訳促進剤１および翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の接合部Ｃの概略を説明する概略図である。

[図3]図３は、翻訳促進剤１および翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の核酸の数について説明する概略図である。

[図4]図４は、翻訳促進剤１および翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の任意付加的な構成を説明する概略図である。

[図5]図５は、転写鋳型ＤＮＡ１００の概略を説明する概略図である。

[図6]図６は、実施例１～１９および比較例１で合成したＧＦＰ－ＨＩＳの蛍光測定結果を、比較例１のΩの測定値を１００とし比較例１に対する相対値で表したグラフである。

[図7A]図７Ａは、実施例１および３の翻訳鋳型ｍＲＮＡを２次構造予測ソフト　ＭＸｆｏｌｄを用いて解析し、ｆｏｒｎａを用いて２次構造を可視化した図である。

[図7B]図７Ｂは、実施例１８および１９の翻訳鋳型ｍＲＮＡを２次構造予測ソフト　ＭＸｆｏｌｄを用いて解析し、ｆｏｒｎａを用いて２次構造を可視化した図である。

[図8]図８は、実施例２０、２１および２９の翻訳鋳型ｍＲＮＡを２次構造予測ソフト　ＭＸｆｏｌｄを用いて解析し、ｆｏｒｎａを用いて２次構造を可視化した図である。

[図9]図９は、実施例２０～２９で合成したＧＦＰの蛍光測定結果を、比較対象の実施例２９の測定値を１００とし、実施例２９に対する相対値で表したグラフである。

[図10]図１０は、実施例２９、３０および比較例２で合成したＧＦＰの蛍光測定結果を、比較例２の測定値を１００とし、比較例２に対する相対値で表したグラフである。

発明を実施するための形態

[0018]　以下に、本出願で開示する、翻訳促進剤、翻訳鋳型ｍＲＮＡ、転写鋳型ＤＮＡ、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法、および、タンパク質の生産方法について詳しく説明する。なお、以下の説明は、理解を容易にするためのものであり、本出願で開示する技術事項の範囲は、以下の説明に限定されない。以下の例示以外にも、本出願で開示する趣旨を損なわない範囲で適宜変更できることは言うまでもない。

[0019]（翻訳促進剤）

図１および図２を参照して、翻訳促進剤の実施形態について説明する。図１は、翻訳促進剤の概略を説明する概略図である。図２は翻訳促進剤の接合

部の概略を説明する概略図である。翻訳促進剤１は、５’非翻訳領域としての核酸である第１配列２と、３’非翻訳領域としての核酸である第２配列３と、の組合せである。第１配列２は、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４の５’末端（ｓｔａｒｔコドン）に隣接して連結される。第２配列３は、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４の３’末端（ｓｔｏｐコドン）に隣接して連結される。なお、「ｓｔｏｐコドン」はアミノ酸に翻訳されないことから３’非翻訳領域として考えられる場合もあるが、本明細書において「第２配列３」には「ｓｔｏｐコドン」は含まれない。換言すると、「ｓｔｏｐコドン」はコード領域４の配列と規定する。ただし、ｓｔｏｐコドンの一部が相補対を形成することを妨げるものではない。第１配列２および第２配列３は、接合部Ｃを形成する相補配列ＣＳを有する。

[0020] 第１配列２の核酸の長さは、第２配列３と接合部が形成されれば特に制限はない。第１配列２の核酸の長さは、例えば、１以上、２以上、３以上、４以上、５以上とすればよい。なお、翻訳鋳型であるｍＲＮＡを核酸合成により作製する場合は、上記のとおり第１配列２の長さは１以上であればよい。一方、転写鋳型ＤＮＡから転写により翻訳鋳型ｍＲＮＡを作製する場合は、プロモーターより３’側の転写開始点からｍＲＮＡの転写が開始される。したがって、転写鋳型ＤＮＡから翻訳鋳型ｍＲＮＡを作製する場合、第１配列２はプロモーターの種類に応じた転写開始点の配列を少なくとも含む長さとすればよい。

[0021] 第１配列２は、第２配列３と接合部を形成することができ、且つ、目的タンパク質を合成できる範囲内であれば長さに上限はない。なお、本出願で開示する翻訳促進剤１は、第１配列２および第２配列３が接合部を形成する相補配列ＣＳを有するように設計することで、従来の５’ＵＴＲより第１配列２を短くできることが特徴である。コスト的観点から、目的タンパク質を合成することができればＵＴＲは短い方が好ましい。したがって、第１配列２の核酸の長さは、限定されるものではないが、例えば、７０以下、６５以下

、６０以下、５５以下、５０以下、４５以下、４０以下、３５以下、３０以下、２５以下、２０以下、１５以下、１０以下としてもよい。

[0022] 第２配列３の核酸の長さは、第１配列２と接合部が形成されれば特に制限はない。第２配列３の核酸の長さは、例えば、１以上、２以上、３以上、４以上、５以上とすればよい。なお、特許文献３～７に記載されているように、３’ＵＴＲの長さは目的タンパク質の合成効率に影響を与える旨の報告が多い。したがって、目的タンパク質の合成効率の向上との観点では第２配列３の核酸を更に長くしてもよく、例えば、２０以上、２５以上、３０以上としてもよい。どの程度の長さとするのかは、目的タンパク質の種類および第１配列２の長さ等に応じて適宜調整すればよい。

[0023] 第２配列３は、第１配列２と接合部を形成することができ、且つ、目的タンパク質を合成できる範囲内であれば長さに上限はない。しかしながら、第１配列２と同様、コスト的観点から、目的タンパク質を合成することができればＵＴＲは短い方が好ましい。したがって、第２配列３の核酸の長さは、限定されるものではないが、例えば、５５以下、５０以下、４５以下、４０以下、３５以下、３０以下、２５以下としてもよい。

[0024] 次に、図２を参照して接合部の具体例についてより詳しく説明する。先ず、本明細書において「接合部」とは、第１配列２および第２配列３が相補対を形成する領域を意味する。また、「接合部」は、第１配列２をコード領域４の５’末端側に連結し第２配列３をコード領域４の３’末端側に連結して翻訳鋳型ｍＲＮＡを作製した時に、翻訳鋳型ｍＲＮＡが環状構造を形成するための接着部分と言うこともできる。

[0025] 接合部Ｃを形成する相補対（塩基対）の数に特に制限はない。第１配列２および／または第２配列３に含まれる全ての核酸（塩基）が接合部を形成してもよいし、一部の核酸が接合部を形成してもよい。例えば、図２（ａ）に示す例では、隣接する２組の相補対で接合部Ｃが形成されている。また、図２（ａ）に示す例では、第１配列２の５’末端の端部２つの核酸が相補対を形成しているが、相補対を形成する核酸は５’末端から下流側であってもよ

い。換言すると、第１配列２は接合部Ｃより５’側（上流側）に相補対を形成しない核酸を含んでいてもよい。第２配列３に関しても第１配列２と同様、相補対を形成する核酸は３’末端の端部からでもよいし、図２（ａ）に示す例のように、３’末端より上流側（５’側）から相補対を形成してもよい。

[0026] 図２（ｂ）に示すように、接合部Ｃは相補対を形成しない核酸配列を含んでいてもよい。その場合、「接合部」は相補対を形成する核酸の端部から端部までの領域を意味する。図２（ｂ）に示す例では、第１配列２は５個の核酸を有し、５’末端から２個の核酸と３’末端から１個の核酸が第２配列３の核酸と相補対を形成している。したがって、図２（ｂ）に示す例では、第１配列２は全ての核酸が接合部Ｃを形成し、接合部Ｃ中に相補対を形成しない配列が含まれている。一方、図２（ｂ）に示す例では、第２配列３は一部の核酸が接合部Ｃを形成し、接合部Ｃ中に相補対を形成しない配列が含まれている。

[0027] 図２（ｃ）に示すように、接合部Ｃは１以上のループＬを含んでいてもよい。図２（ｃ）に示す例では、第１配列２に１つのループＬが形成されているが、ループＬの数は２以上であってもよい。また、図示は省略するが、第２配列３のみにループＬが形成されてもよいし、第１配列２および第２配列３の両方にループＬが形成されてもよい。

[0028] 図２（ｄ）に示すように、接合部Ｃは１以上のステムループＳＬを含んでいてもよい。図２（ｄ）に示す例では、第１配列２に１つのステムループＳＬが形成されているが、ステムループＳＬの数は２以上であってもよい。また、図示は省略するが、第２配列３のみにステムループＳＬが形成されてもよいし、第１配列２および第２配列３の両方にステムループＳＬが形成されてもよい。

[0029] 図２（ａ）～図２（ｄ）に示す例は、接合部Ｃの配置の例示に過ぎず、例示した配置に限定されるものではない。例えば、第１配列２がループＬを有し、第２配列３がステムループＳＬを有する等、図２（ａ）～図２（ｄ）に

記載の例を組合わせてもよい。また、図２（ａ）～図２（ｄ）に示す例は、接合部Ｃの配置である。例えば、第１配列２が接合部Ｃを形成する以外の配列を有する場合には、接合部Ｃの形成に関与しない配列部分がループまたはステムループを含んでいてもよい。同様に、第２配列３が接合部Ｃを形成する以外の配列を有する場合には、接合部Ｃの形成に関与しない配列部分がループまたはステムループを含んでいてもよい。接合部Ｃを形成し、且つ、翻訳促進剤１として機能する範囲であれば、第１配列および第２配列３の配列に特に制限はない。

[0030] また、図２（ａ）に示す例のように、第１配列２および第２配列３が相補対を形成しない核酸を含む場合、相補対を形成しない核酸の数を調整してもよい。図３を参照して核酸の数について説明する。第１配列２の接合部Ｃより３’側の核酸、換言すると、ｓｔａｒｔコドンの直前までの核酸配列を配列Ａ（ＳＱ．Ａ）と規定する。第２配列３の接合部Ｃより５’側の核酸、換言すると、ｓｔｏｐコドンの直前までの核酸配列を配列Ｂ（ＳＱ．Ｂ）と規定する。図３に示す例では、配列Ａ＝２、配列Ｂ＝３である。後述する実施例に示すとおり、タンパク質の発現には配列Ａ＋配列Ｂの数が少ない方が好ましい。限定されるものではないが、例えば、配列Ａ＋配列Ｂは、２５以下、２０以下、１５以下、１３以下、１１以下、１０以下、６以下とすることが望ましい。

[0031]（翻訳促進剤１の任意付加的な構成）

図１および図４を参照し、翻訳促進剤１の任意付加的な構成について説明する。図４は、翻訳促進剤１の任意付加的な構成を説明する概略図である。第２配列３は、３’末端側にＡ（アデニン）が連続するポリＡ配列３ａを更に含んでもよい。ポリＡ配列３ａは、図４（ａ）に示すように第２配列３の接合部Ｃの直後に連結してもよいし、図４（ｂ）に示すように接合部Ｃの後に続く第２配列３の３’末端に連結してもよい。

[0032] ポリＡ配列３ａをｍＲＮＡの３’末端側に連結すると、目的タンパク質の翻訳効率の向上が期待できる。ポリＡ配列３ａの長さは目的タンパク質の翻

訳効率が向上する範囲で適宜設定すればよい。限定されるものではないが、ポリＡ配列３ａの長さ（個数）は、例えば、２以上、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、１０以上、１１以上、１２以上、１３以上、１４以上、１５以上とすればよい。一方、上限に関しては、目的タンパク質を合成できる範囲内であれば特に制限はないが、プライマー設計上の観点やコストの観点から、ポリＡ配列３ａの長さ（個数）は、５０以下、４５以下、４０以下、３５以下、３０以下、とすればよい。

[0033]（翻訳鋳型ｍＲＮＡの実施形態）

図１乃至図４を参照して翻訳鋳型ｍＲＮＡの実施形態について説明する。翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０は、図１乃至図４に示す翻訳促進剤１の第１配列２と第２配列３との間に目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４が配置されている。本出願で開示する翻訳促進剤１を含むことで、翻訳鋳型ｍＲＮＡの５’ＵＴＲを短くできる。図示は省略するが、コード領域４はループおよびステムループから選択される１以上の構造を含んでいてもよい。

[0034] また、第１配列２の接合部Ｃより３’側に接合部Ｃを形成しない核酸配列を有する場合は、接合部Ｃを形成しない核酸配列とコード領域４とが共同してループおよびステムループから選択される１以上の構造を形成してもよい。第２配列３の接合部Ｃより５’側に接合部Ｃを形成しない核酸配列を有する場合も同様に、接合部Ｃを形成しない核酸配列とコード領域４とが共同してループおよびステムループから選択される１以上の構造を形成してもよい。

[0035] 翻訳促進剤１が翻訳鋳型ｍＲＮＡに適用される場合には、コード領域４の５’末端側および３’末端側に一本鎖の核酸として備えられる。一方、翻訳促進剤１が後述する転写鋳型ＤＮＡに適用される場合には、コード領域４の５’末端側および３’末端側に二本鎖の核酸として備えられる。

[0036]（転写鋳型ＤＮＡ）

図５を参照して、転写鋳型ＤＮＡの実施形態について説明する。図５は、

転写鋳型ＤＮＡの概略を説明する概略図である。転写鋳型ＤＮＡ１００は、プロモーター領域５と、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４と、翻訳促進剤１（第１配列２および第２配列３、並びに、必要に応じてポリＡ配列３ａ）と、を含む。翻訳促進剤１は、既に説明済みであることから、プロモーター領域５とコード領域４について、以下により詳しく説明をする。

[0037] プロモーター領域５は、遺伝子の転写が行われるときの転写開始部分として機能すれば、配列は特に制限はなく、当該技術分野で公知のプロモーター配列を採用することができる。プロモーター領域５を構成する配列としては、例示であって限定するものではないが、公知のＴ７プロモーター配列、ＳＰ６プロモーター配列、Ｔ３プロモーター配列などが挙げられる。

[0038] コード領域４は、目的タンパク質のアミノ酸をコードする核酸配列であり、且つ、プロモーター領域５によって作動可能となるように連結されていれば特に制限はない。また、翻訳促進剤１の第１配列２は、プロモーター領域５とコード領域４との間に配置される。

[0039] なお、図５に示す例では、第１配列２の直後にコード領域４が連結しているが、コード領域４の第１配列２側に、コード領域４により合成される目的タンパク質に付加するプロテインタグ（Ｎ末端プロテインタグ）をコードする配列を連結してもよい。プロテインタグ配列を含むことで、目的タンパク質をタグ付きの融合タンパク質として合成できる。同様に、コード領域４の第２配列３側に、コード領域４により合成される目的タンパク質に付加するプロテインタグ（Ｃ末端プロテインタグ）をコードする配列を連結してもよい。Ｃ末端プロテインタグ配列およびＮ末端プロテインタグ配列は、いずれか一方のみ連結してもよいし、両方を連結してもよい。

[0040] Ｃ末端プロテインタグおよびＮ末端プロテインタグは、例えば、Ｈｉｓタグ、ＧＳＴタグ、ＭＢＰタグ、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、ＢＣＣＰタグが挙げられる。また、視覚的に検出可能なものとしては、例えば、ＧＦＰ（Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＢＦＰ（Ｂｌｕｅ

Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＣＦＰ（Ｃｙａｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＲＦＰ（Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＹＦＰ（Ｙｅｌｌｏｗ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＧＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＣＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｃｙａｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＲＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＹＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｙｅｌｌｏｗ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＴＭＲ（ＴｅｔｒａＭｅｔｈｙｌ－Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）、ルシフェラーゼ等が挙げられる。なお、上記Ｃ末端プロテインタグおよびＮ末端プロテインタグは、単なる例示で、その他のプロテインタグであってもよい。

[0041] なお、Ｃ末端プロテインタグ配列およびＮ末端プロテインタグ配列は、任意のタンパク質配列のＮ末端および／またはＣ末端に対して直接連結されてもよいし、適当なリンカー配列を介して連結されてもよい。

[0042] 転写鋳型ＤＮＡ１００は、後述する無細胞タンパク質合成系に用いる要素の一つである。転写鋳型ＤＮＡ１００は、ＰＣＲ等で合成された直鎖状の他、プラスミドなどの環状体であってもよい。転写鋳型ＤＮＡ１００がＤＮＡ二本鎖の形態の場合、センス鎖が翻訳促進剤１としてポリＡ配列３ａを有しているとき、アンチセンス鎖は対応してポリＴ配列を有していることになる。

[0043] 転写鋳型ＤＮＡ１００は、公知の化学的又は遺伝子工学的方法により取得できるが、後述するように、ＰＣＲ等の核酸増幅反応を利用して遺伝子やｃＤＮＡを鋳型として取得することもできる。また、翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０は、ツーステップ法等に適用される公知の翻訳鋳型ｍＲＮＡの合成方法により取得することができる。

[0044] （転写鋳型ＤＮＡの生産方法）

無細胞タンパク質合成系のための転写鋳型ＤＮＡ１００の生産方法は、目的タンパク質のコード領域４を含むＤＮＡに対して核酸増幅反応を実施して

、転写鋳型ＤＮＡ１００を合成する工程、を備えることができる。転写鋳型ＤＮＡ１００は、例えば、適宜設計したプライマーセットを用いて、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４を含むＤＮＡに対して、ＰＣＲの核酸増幅反応により得ることができる。

[0045] また、転写鋳型ＤＮＡ１００は、ベクターを用いて取得することもできる。タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域４を少なくとも含むＤＮＡをベクターに挿入することによって鋳型核酸を取得できる。こうして作製したベクターは、それ自体を転写鋳型ＤＮＡとして用いることができるし、ベクターから転写鋳型ＤＮＡに相当するＤＮＡ断片を切り出して用いることもできる。

[0046] 転写鋳型ＤＮＡ１００は、例えば、ＰＣＲ反応液（すなわち、転写鋳型ＤＮＡ１００を精製することなく）として、無細胞タンパク質合成系に適用してもよいし、適宜精製等して無細胞タンパク質合成系に適用してもよい。

[0047]（翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法）

無細胞タンパク質合成系のための翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法は、細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で転写鋳型ＤＮＡ１００を用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を合成する工程、を備えることができる。より具体的には、転写鋳型ＤＮＡ１００を含むＰＣＲ反応液又はベクターに由来する転写鋳型ＤＮＡ１００に対して、転写鋳型ＤＮＡ１００が備えるプロモーター領域５に適合するＲＮＡポリメラーゼおよびＲＮＡ合成用の基質（４種類のリボヌクレオシド３リン酸）等を転写反応に必要な成分を含む組成の下で、例えば、約２０℃～６０℃、好ましくは、約３０℃～４２℃で適当な時間インキュベートすることにより翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を得ることができる。なお、上記の例は、転写鋳型ＤＮＡ１００から翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を合成する手順を示している。代替的に、ｍＲＮＡの長さにもよるが、核酸合成により翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を直接合成してもよい。

[0048] 翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の生産方法は、無細胞タンパク質合成系としての転

写／翻訳系の一部として実施することができるし、翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０の翻訳系への適用に先立つ工程として実施することもできる。こうして得られた翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０は、その反応液を、翻訳系に適用することができる。

[0049]（タンパク質の生産方法）

タンパク質の生産方法は、細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡからタンパク質に翻訳するための要素の存在下で、翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を用いてタンパク質を合成する工程、を備えることができる。タンパク質の生産方法は、また、細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で転写鋳型ＤＮＡ１００を用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０を合成する工程も備えることができる。さらに、タンパク質の生産方法は、目的タンパク質のコード領域４を含むＤＮＡに対して核酸増幅反応を実施して、前記転写鋳型ＤＮＡ１００を合成する工程を備えることもできる。本出願で開示するタンパク質の生産方法は、翻訳促進剤１を含む翻訳鋳型ｍＲＮＡ１０、転写鋳型ＤＮＡ１００を用いるために、５’ＵＴＲを短くできる。

[0050] 以下に実施例を掲げ、本出願で開示する実施形態を具体的に説明するが、この実施例は単に実施形態の説明のためのものである。本出願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

実施例

[0051]＜実施例１～１９、比較例１＞

（１）転写鋳型ＤＮＡの構造

図５を参照して、実施例１～１９および比較例１で用いた転写鋳型ＤＮＡの概略について説明する。転写鋳型ＤＮＡは、図５に示すように、

・５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）：Ｔ７プロモーター５＋第１配列２

・コード領域４：ＧＦＰ－Ｈｉｓ

・３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）：第２配列３（核酸の長さ２０個）＋ポリＡ配列３ａ（Ａの長さ１５）

から構成されている。

[0052] 実施例１～１９および比較例１では、翻訳促進剤（ＴＲＡＮＳＬＡＴＩＯＮ　ＥＮＨＡＮＣＥＲ）の第１配列２の長さおよび種類を変えて実験を行った。第１配列２を除く配列は、以下のとおりである。

[0053] [表1]

NAME	SEQUENCE	SEQ ID.
T7 promoter	CCCGCCAAAT TAATACGACT CACTATA	1
GFP-His	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAA ATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCAT ATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGA CGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTG ATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCA GACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGA CCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTG CCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACAT GGCATGGATGAACTATACAAAGGTCTCCAGCAGGGAGGTACTCATCATCATCATCATCATTAG	2
3'UTR	AATAA GTGCTCGGGCGGGCCC AAAAAAAAAA AAAAA	3

[0054] 実施例１～１９および比較例１の第１配列２（Ｆｉｒｓｔ　ＳＥＱ）を表２に示す。実施例１～１９では、第１配列２の長さを５～３３まで変化させた。なお、比較例１のΩは、タバコモザイクウイルス由来の公知の５’ＵＴＲ（核酸の長さ６６個）翻訳促進剤であり、詳細は特表２０１３－５０３６４０号公報に記載されている。

[0055]

[表2]

NAME	SEQUENCE of first SEQ of TRANSLATION ENHANCER （5' to 3'）	SEQ.ID.
1-1-A(実施例1)	666CC	4
1-2-A(実施例2)	GGGCCTGA	5
1-3-A(実施例3)	GGGCCAAGA	6
1-4-A(実施例4)	GGGCCAAAGA	7
1-5-A(実施例5)	GGGCCAAAAGA	8
1-6-A(実施例6)	GGGCCCAAAACA	9
1-7-A(実施例7)	GGGCCGGAAAAGA	10
1-8-A(実施例8)	GGGCCAGGAAAAGA	11
1-9-A(実施例9)	GGGCCGAGGAAAAGA	12
1-10-A(実施例10)	GGGCCAGAGGAAAAGA	13
1-11-A(実施例11)	GGGCCGAAGAAGAGGAAAAGA	14
1-12-A(実施例12)	GGGCCTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	15
1-13-A(実施例13)	GGGCCCTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	16
1-14-A(実施例14)	GGGCCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	17
1-15-A(実施例15)	GGGCCCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	18
1-16-A(実施例16)	GGGCCTCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	19
1-17-A(実施例17)	GGGCCGGTCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	20
1-18-A(実施例18)	GGGCCAGGTCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	21
1-19-A(実施例19)	GGGCCGAGGTCACTTTTCAAGAAGAGGAAAAGA	22
Ω(比較例1)	GGGTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACAACATTACAATTACTATTTACAATTACA	23

[0056] （２）ＰＣＲによる転写鋳型ＤＮＡの作製

転写鋳型ＤＮＡは、実施例１では表３に示される１組のプライマー（フォワード側：ＦＷ－１－１Ａ、リバース側：ＲＶ）を設計し、転写鋳型ＤＮＡをＰＣＲにより作製した。なお、プライマーは、受託合成サービス（ユーロフィンジェノミクス株式会社）により作製した。実施例２～１９のフォワードプライマーは、下記表３のＦＷ－１－１－Ａの太字アンダーライン部分（ＧＧＧＣＣ）を、それぞれ、表２の実施例２～１９の配列に置き換えたものを使用した。実施例２～１９のリバースプライマーは、実施例１と同様のＲＶを使用した。比較例１のΩは、フォワードプライマーにＦＷ－Ω（ＳＥＱ．ＩＤ．２５）を用いた以外は実施例１と同様に作製した。

[0057] [表3]

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
FW-1-1-A	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATA**GGGCC**ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGT	24
FW-Ω	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACAACATTACA ATTACTATTTACAATTACAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGT	25
RV	TTTTT TTTTTTTTTT GGCCCGCCGAGCAC TTATT	26

[0058] ＰＣＲの反応溶液組成を表４に示す。また、反応サイクルを表５に示す。なお、使用した試薬および機械は以下のとおり。

・ＰＣＲ酵素：東洋紡株式会社　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ

・Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ：ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ社製　Ｍａｓｔｅｃｙｃｌｅｒ　Ｘ５０ｓ

[表4]

Reagents	Volume
10x PCR buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
10 μM Fw primer	1 μL
10 μM Rv primer	1 μL
plasmid	1 ng
KOD Polymerase DNA	1 μL
Ultra pure water	50 μL

[0059] [表5]

1.Predenature	94℃, 2min
2.Denature	98℃ 10 sec
3. Annealing	55℃ 30 sec
4. Extension	68℃ 1m30 sec (2-4を30サイクル)

[0060] （３）転写反応

次に、作製した転写鋳型ＤＮＡを用いて、翻訳鋳型ｍＲＮＡを作製した。転写反応は、ＮＵＰｒｏｔｅｉｎ社製ＰＳＳ４０５０の以下の表５に示す反応液を用い、先に作製したＰＣＲ反応溶液（転写鋳型ＤＮＡ含有）２．５μｌを用いて、３７℃で３時間行った。

[0061]

[表6]

Reagents	Volume
10x Transcription buffer	2.5 µl
25 mM NTP Mix	2.5 µl
100 mM DTT	1.25 µl
T7 RNA Polymerase	1 µl
PCR Product	2.5 µl
RNAase free water	15.25 µl

[0062] 転写反応液２５μｌに対して１０μｌの４Ｍ 酢酸アンモニウムを加えてよく混合し、さらに、１００μｌの１００％エタノールを加え転倒混和し、卓上遠心機で数秒間遠心分離した後、－２０℃で１０分静置した。その後、遠心分離（１２，０００ｒｐｍ、１５分、４°Ｃ）した。上清を除去後、卓上遠心機を用い数秒間遠心した。再度上清を除去し、沈殿が乾燥するまで静置した。その後、転写反応液２５μｌに対して４０μｌのＲＮａｓｅ ｆｒｅｅ水（ＤＥＰＣ水）を加え、チップで沈殿をよく懸濁した。ＰＳＳ４０５０プロトコルに従い、１１０μｌ翻訳溶液中のｍＲＮＡ量を３５μｇとなるように核酸濃度測定を行い、８０μｌにフィルアップし、これを翻訳鋳型ｍＲＮＡ溶液とした。

[0063] （４）翻訳反応

次に、以下の組成の翻訳反応液を用いて、１６℃のインキュベーターにいれて１０時間反応させた。なお、以下の組成のうち、翻訳鋳型ｍＲＮＡを除いた組成液を調製し、その後、この組成液を室温に戻した後に、翻訳鋳型ｍＲＮＡを添加して、泡を立てないようにポンピングして、反応させた。Ｗｈｅａｔ ｇｅｒｍ ｅｘｔｒａｃｔ、および、ａｍｉｎｏ ａｃｉｄ ｍｉｘは、ＮＵＰｒｏｔｅｉｎ社製ＰＳＳ４０５０用いた。

[0064]

[表7]

Reagents	Volume
Wheat germ extract	20 μL
Amino acid mix	40 μL
mRNA solution	160 μL

[0065] 反応後、反応液をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離（１５，０００ｒｐｍ、１５分、４℃）を行い、上清を翻訳完了後のＧＦＰ溶液とした。

[0066] ［合成されたＧＦＰの蛍光測定］

実施例１～１９および比較例１で合成されたＧＦＰの蛍光測定を行った。合成されたＧＦＰを含む溶液２２０μｌを試料とし、波長４７５ｎｍの励起光を照射して、ＧＦＰからの蛍光をプレートリーダで測定した（吸収フィルター５００－５５０ｎｍ）。プレートリーダには、ＧｌｏＭａｘ（登録商標）プレートリーダ（プロメガ社）を用いた。測定結果を図６に示す。図６は、比較例１のΩの測定値を１００とし、実施例１～１９の測定値を比較例１に対する相対値で表したグラフである。

[0067] また、実施例で作製した翻訳鋳型ｍＲＮＡの内、実施例１、３、１８および１９の翻訳鋳型ｍＲＮＡを２次構造予測ソフト　ＭＸｆｏｌｄ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｄｎａ．ｂｉｏ．ｋｅｉｏ．ａｃ．ｊｐ／ｍｘｆｏｌｄ／）を用いて解析し、ｆｏｒｎａ（ｈｔｔｐ：／／ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｆｏｒｎａ／）を用いて２次構造を可視化した。図７Ａおよび図７Ｂは、可視化した実施例１、３、１８および１９の２次構造の結合部Ｃ付近の拡大図である。

[0068] なお、図７Ａおよび図７Ｂ中の“ｓｔａｒｔ”の矢印は開始コドンである「ＡＵＧ」のＡを示している。Ｓｔａｒｔの矢印のＡより５’側が第１配列２に相当する。図中の“ｓｔｏｐ”は終止コドンである「ＵＡＧ」のＧを示している。Ｓｔｏｐの矢印のＧより３’側が第２配列３に相当する。

[0069] 図７Ａおよび図７Ｂから明らかなように、相補配列を含むように翻訳促進

剤の配列を設計することで第１配列２および第２配列３が接合部Ｃを形成できることを確認した。また、第１配列２および第２配列３の長さおよび配列を工夫することで、例えば、

（１）第１配列２単独で接合部Ｃより３’側（コード領域４側）にステムループＳＬを形成できること（実施例１８および１９）、

（２）接合部Ｃの中にループＬを形成できること（実施例１９）、

（３）第１配列２および／または第２配列３とコード領域４とが共同することで、ｍＲＮＡにループＬを形成できること（実施例１、３および１８）、

を確認した。なお、その他の実施例に関しては２次構造の図示を省略するが、表２に示すように、全ての実施例において第１配列２の５’末端側の５個の核酸配列は同じであり、第２配列３も全ての実施例で同じであることから、接合部Ｃを形成できることは明らかである。

[0070] 図６に示すように、第１配列２の核酸の長さが僅か５個（１－１－Ａ）でもｍＲＮＡからタンパク質を合成することができ、長さが９個（１－３－Ａ）の実施例３では５’ＵＴＲの翻訳促進剤として知られているΩの約２．５倍の翻訳促進効果を示した。以上の結果から、５’ＵＴＲと３’ＵＴＲで接合部Ｃを形成することで、５’ＵＴＲを短くできることを確認した。なお、５’ＵＴＲを短くできる機序は明らかではないが、図７Ａおよび図７Ｂの２次構造からみて、接合部Ｃを形成することでｓｔａｒｔコドンとｓｔｏｐコドンの位置が近くなり、翻訳終了後に速やかに次の翻訳が開始されるのではないかと推測される。

[0071] ＜実施例２０～２９＞

上記推測を確認するため、接合部Ｃからｓｔａｒｔコドン直前までの第１配列２およびｓｔｏｐコドン直後から接合部Ｃまでの第２配列３の核酸数の和を変える実験を行った。具体的には、実施例１～１９に記載の第１配列２を表８の１０個の核酸配列（ＳＥＱ．ＩＤ．２７）とした。そして、「ＧＧＧＣＣ」部分が接合部を形成し、「ＡＡＡＧＡ」部分は接合部Ｃを形成しないように第２配列３を設計した。つまり、第１配列２の接合部Ｃからｓｔａ

ｒｔコドン直前までの核酸（配列Ａ）は５個に固定した。

[0072] 第２配列３の接合部Ｃを形成する配列は、表８に示すように、実施例２０では「ＧＣＣＣ」とし、ｓｔｏｐコドンの最後のＧを含めて第１配列の「ＧＧＧＣＣ」と接合部Ｃを形成するように設計した。ｓｔｏｐコドンの最後のＧも接合部Ｃを形成していることから、実施例２０のｓｔｏｐコドン直後から接合部Ｃまでの核酸数（配列Ｂ）は０である。

[0073] 実施例２１では第２配列３の接合部Ｃを形成する配列を「ＧＧＣＣＣ」とし、第１配列２の「ＧＧＧＣＣ」と接合部Ｃを形成した上で、接合部Ｃからｓｔｏｐコドン直前までの核酸数（配列Ｂ）がアデニン（Ａ）の一つとなるように設計した（表８のＳＥＱ．ＩＤ．３０のアンダーラインが付された太文字Ａ）。実施例２２～２８は、実施例２１の配列Ｂにアデニン（Ａ）のみを追加することで長さを調節したことから、配列表の記載は省略する。プロモーターは実施例１～１９と同じ、コード領域４は表８に示すＧＦＰを用いた。

[0074] [表8]

NAME	SEQUENCE	SEQ ID.
first SEQ of TE	GGGCCAAAGA	27
GFP	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAA ATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAA AACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCAT ATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGA CGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTG ATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGCA GACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGA CCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTG CCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACAT GGCATGGATGAACTATACAAATAG	28
3'UTR (実施例２０)	GCCCAAAAAAAAAAAAAAA	29
3'UTR (実施例２１)	AGGCCCAAAAAAAAAAAAAAA	30

[0075] 実施例２０～２８の概略を以下に記載する。配列Ａの長さは全て５である。配列Ｂはアデニン（Ａ）の数である。

・実施例２０（１－４－Ａ／ＲＶ０）：配列Ｂ＝０、配列Ａ＋Ｂ＝５

・実施例２１（１－４－Ａ／ＲＶ１Ａ）：配列Ｂ＝１、配列Ａ＋Ｂ＝６

・実施例２２（１－４－Ａ／ＲＶ５Ａ）：配列Ｂ＝５、配列Ａ＋Ｂ＝１０

・実施例２３（１－４－Ａ／ＲＶ１０Ａ）：配列Ｂ＝１０、配列Ａ＋Ｂ＝１５

・実施例２４（１－４－Ａ／ＲＶ１５Ａ）：配列Ｂ＝１５、配列Ａ＋Ｂ＝２０

・実施例２５（１－４－Ａ／ＲＶ２０Ａ）：配列Ｂ＝２０、配列Ａ＋Ｂ＝２５

・実施例２６（１－４－Ａ／ＲＶ３０Ａ）：配列Ｂ＝３０、配列Ａ＋Ｂ＝３５

・実施例２７（１－４－Ａ／ＲＶ４０Ａ）：配列Ｂ＝４０、配列Ａ＋Ｂ＝４５

・実施例２８（１－４－Ａ／ＲＶ５０Ａ）：配列Ｂ＝５０、配列Ａ＋Ｂ＝５５

[0076] ・比較対象（実施例２９、ＧＦＰ－１＋ＰｌｙＡ）として、（１）第１配列２の核酸数は２３、第１配列２の接合部Ｃを形成する核酸数は４、配列Ａの核酸数は１９、（２）第２配列３の核酸数は４０（ポリＡ配列を含む）、第２配列３の接合部Ｃを形成する核酸数は４、配列Ｂの核酸数は２１、の翻訳鋳型ｍＲＮＡを作製した。

[0077] 図８は実施例２０、２１および２９で作製した翻訳鋳型ｍＲＮＡを２次構造予測ソフト ＭＸｆｏｌｄ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｄｎａ．ｂｉｏ．ｋｅｉｏ．ａｃ．ｊｐ／ｍｘｆｏｌｄ／）を用いて解析し、ｆｏｒｎａ（ｈｔｔｐ：／／ｒｎａ．ｔｂｉ．ｕｎｉｖｉｅ．ａｃ．ａｔ／ｆｏｒｎａ／）を用いて２次構造を可視化した図である。実施例２０，２１および２９において、配列Ａおよび配列Ｂの数が設計通りになっていることを確認した。図示は省略するが、実施例２２～２８で作製した翻訳鋳型ｍＲＮＡも設計通りであることを確認した。

[0078] 実施例２０～２８のフォーワードプライマー（ＦＷ－１－４－Ａ）は全ておなじものを使用した。実施例２０のリバースプライマー（ＲＶ－０）および実施例２１のリバースプライマー（ＲＶ－１）を表９に示す。なお、実施

例２２～２８のリバースプライマーは、ＲＶ－１の「ＧＧＧＣＣＴＣ」（表９のＳＥＱ．ＩＤ．３３のアンダーライン部分）の“Ｔ”の長さを変えればよい。したがって、実施例２２～２８のリバースプライマーの記載は省略する。実施例２９のフォワードプライマー（ＦＷ－ＧＦＰ－１＋ＰｌｙＡ）、リバースプライマー（ＲＶ－ＧＦＰ－１＋ＰｌｙＡ）は表９に示す。

[0079] [表9]

NAME	SEQUENCE	SEQ ID.
FW-1-4-A	CCCGGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGGAAAGAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGT	31
RV-0	TTTTTTTTTTTTTTTGGGCCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG	32
RV-1	TTTTTTTTTTTTTTTGGGCCTCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG	33
FW-GFP-1+PlyA	CCCGTTAATACGACTCACTATAGGGCACACACAAAGACAAACAAAAATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGT TGTCC	34
RV-GFP-1+PlyA	TTTTTTTTTTTTTTTCCCGTTTGTTTGTGTTTGTGTGTTTCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCA C	35

[0080] 図９に合成したＧＦＰの蛍光測定結果を示す。図９は、比較対象（実施例２９、ＧＦＰ－１＋ＰｌｙＡ）の測定値を１００とし、実施例２０～２８の測定値を実施例２９に対する相対値で表したグラフである。図９から明らかなように、配列Ａおよび配列Ｂの数が少ない、換言すると、ｓｔａｒｔコドンとｓｔｏｐコドンが近くに配置されると、翻訳効率が高くなることを確認した。

[0081] ＜実施例３０、比較例２＞

次に、実施例２９の第２配列３の３’末端側のポリＡ配列を除いた実験を行った。実施例３０は実施例２９のポリＡ配列を除いた以外は、実施例２９と同様である。比較例２は、５’ＵＴＲとして特開２００３－５５６６２６号公報に記載の翻訳促進剤、３’ＵＴＲとして国際公開第２０１６／１４３７９９号に記載のｐｏｌｙＡ配列を用いた。なお、比較例２の３’ＵＴＲはｓｔｏｐコドンの直後にポリＡ配列が連結しているため、接合部を形成しない。表１０にプライマーを示す。実施例３０のＦＷは実施例２９と同様である。プライマーが異なる以外は、上記実施例と同様の手順でＧＦＰの蛍光を測定した。

[0082]

[表10]

NAME	SEQUENCE	SEQ ID.
RV-GFP-1-PlyA	GGGCTATGTATGTGTATGTGTGTTTCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG	36
比較例２FW	CCCGTTAATACGACTCACTATAGGGCCCAACACCTAATAACATTCAATCACTCTTTCCACTAACCACCTATCTACAT CACCAATGAGTAAACGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCC	37
比較例２RV	TTTTTTTTTTTTTTTCTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAG	38

[0083] 図１０に合成したＧＦＰの蛍光測定結果を示す。なお、対比のため、実施例２９の測定結果も併せて示す。図１０は、比較例２の測定値を１００とし、比較例２に対する相対値で表したグラフである。図１０から明らかなように、５’ＵＴＲおよび３’ＵＴＲが接合部を形成することで、公知の５’翻訳促進剤および３’翻訳促進剤を組合わせた翻訳鋳型ｍＲＮＡより、より多くのタンパク質を合成できた。また、本出願で開示する翻訳促進剤は、第２配列３の３’側にポリＡ配列を付加すると、翻訳効率が更に向上することを確認した。

産業上の利用可能性

[0084] 本出願で開示する翻訳促進剤により、５’ＵＴＲを短くできる。したがって、製薬業界、研究機関等、無細胞タンパク質合成が必要な産業に有用である。

符号の説明

[0085] １…翻訳促進剤、２…第１配列、３…第２配列、３ａ…ポリＡ配列、４…コード領域、５…プロモーター領域、１０…翻訳鋳型ｍＲＮＡ、１００…転写鋳型ＤＮＡ

Ｃ…接合部、ＣＳ…相補配列、Ｌ…ループ、ＳＬ…ステムループ

請求の範囲

[請求項1] 翻訳促進剤と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と、

を含む翻訳鋳型ｍＲＮＡであって、

翻訳促進剤は、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の５’末端に隣接して連結される５’非翻訳領域としての核酸である第１配列と、

目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域の３’末端に隣接して連結される３’非翻訳領域としての核酸である第２配列と、

の組合せであり、

翻訳鋳型ｍＲＮＡをＭＸｆｏｌｄで解析した際に、第１配列および第２配列は、接合部を形成し、

第１配列の接合部より３’側の核酸の数および第２配列の接合部より５’側の核酸の数の和が２５以下である

翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項2] 第１配列の核酸の長さが３以上である

請求項１に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項3] 第２配列の核酸の長さが２０以上である

請求項１に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項4] 第２配列の核酸の長さが２０以上である

請求項２に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項5] 第２配列が接合部より３’側にＡ（アデニン）が連続するポリＡ配列を更に含む

請求項１～４の何れか一項に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項6] 第１配列および／または第２配列が、１個以上のステムまたはステムループを含む

請求項１～４の何れか一項に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項7] 第１配列および／または第２配列が、１個以上のステムまたはステムループを含む

請求項５に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡ。

[請求項8] 無細胞タンパク質合成系に用いる転写鋳型ＤＮＡであって、

該転写鋳型ＤＮＡは、

請求項１～７の何れか一項に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡをコードする領域と、

第１配列の５’末端に配置されるプロモーター領域と

を含む、転写鋳型ＤＮＡ。

[請求項9] 無細胞タンパク質合成系に用いる翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で請求項８に記載の転写鋳型ＤＮＡを用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、

を備える、翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法。

[請求項10] タンパク質の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡをタンパク質に翻訳するための要素の存在下で、請求項１～７の何れか一項に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡまたは請求項９に記載の翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法で生産した翻訳鋳型ｍＲＮＡを用いてタンパク質を合成する工程、

を備える、タンパク質の生産方法。