

明 細 書

発明の名称： 改変された遺伝暗号表を有する翻訳系

技術分野

[0001] 本開示は、改変された遺伝暗号表を有する翻訳系、ならびにその使用方法に関する。

背景技術

[0002] ディスプレイライブラリーは、標的タンパク質に結合する分子を進化工学的に効率よく取得できる、大変有用な技術である。ディスプレイライブラリーを用いて、任意の標的分子に対し高結合能を示す分子を取得したり、あるいは複数のエピトープに対してそれぞれ結合する分子を多種類取得したりするためには、高い多様性をもつライブラリーからのパニングが必要である。多様性の高いライブラリーを構築するためには、その構成単位 (building block) の数を増やす、あるいは種類を増やすことが考えられるが、膜透過性の観点から分子量に制限がある場合、building blockの数にも制限がかかる。よって、ライブラリーの多様性を高めるためにbuilding blockの種類を増やすという手段は重要な意味を持つ。

[0003] PURESYSYSTEM (非特許文献1) のような再構成された無細胞翻訳系は、アミノ酸、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase; ARS) 等の構成成分の濃度調整が可能であるため、天然のコドン-アミノ酸の対応付けを変更できる。このような翻訳系を用いることにより、任意のbuilding blockを20種類以上導入したディスプレイライブラリーを構築することも可能となっているが、3塩基コドンを用いた大腸菌の翻訳系においては、ウォブル (wobble) 則の存在により、原理上は32種類が導入できるbuilding blockの上限であると考えられる。より具体的に説明すると、コドンの3文字目とアンチコドンの1文字目の対合には、“遊び” が存在し、ワトソン-クリック (Watson-Crick) 塩基対以外にも、wobble塩基対と呼ばれるG・U間の対合が可能となっている。そのため、アンチコドンGNNはNNUおよびNNCのコドンを、ア

ンチコドンUNNはNNAおよびNNGのコドンを解読 (decode) してしまうため、これらのコドンを読み分けることができず、1つのコドンボックスに導入できるアミノ酸の種類は最大2アミノ酸に制限されてしまう (非特許文献2)。

[0004] これまで、特定のコドンボックスにおいて、NNAとNNGのコドンに異なるアミノ酸を割り当てた報告 (非特許文献3、非特許文献4、特許文献1) はあるが、さらに同じコドンボックスにおいて、もう1つ別のアミノ酸を割り当て、計3アミノ酸を同時にかつ正確に読み分け、building blockの数の拡張に成功している報告は存在しない。さらに、すでに報告された方法では、選択できるアミノ酸の汎用性は低いと考えられる。また、系外で調製したアミノアシル tRNA を翻訳に使用する場合、系内でARSにより調製されるアミノアシル化 tRNA の濃度よりも高濃度のアミノアシル tRNA が必要となり、その場合NNAとNNGコドンの読み分けが難しくなることも数学的に示されている (非特許文献5)。

[0005] 本技術分野においては、様々なアミノ酸をコドンテーブルに当てはめると、各コドンを正確に読み分けて翻訳を行うことがディスプレイライブラリーの質を決定づける。各コドンに割り当てたアミノ酸が、それぞれのコドンから特異的に翻訳されることが非常に重要である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1: W02016/154675

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Shimizu et al., Nat Biotechnol. 2001; 19(8): 751-755.

非特許文献2: Iwane et al., Nat Chem. 2016; 8(4): 317-325.

非特許文献3: Mukai et al., Nucleic Acids Res. 2015; 43(16): 8111-8122

.

非特許文献4: Cui et al., J Am Chem Soc. 2015; 137(13): 4404-4413.

非特許文献5: Frenkel-Morgenstern et al., Mol Syst Biol. 2012; 8: 572.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] これまでにもコドン拡張を目的とした種々の試みがなされてきているが、NNAとNNGのコドンに異なるアミノ酸を割り当てて、それらが正確に読み分けられていることを明確に示した報告は存在しない。また、同じコドンボックス内に3つのアミノ酸を割り当てて、それらが正確に読み分けられていることを明確に示した報告も存在しない。本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、コドンの読み分けを可能にする新たな手段を提供することを目的の一つとするものである。

課題を解決するための手段

[0009] 今回本発明者らは、特定のコドンボックスにおいて、wobble塩基対の存在により困難であったNNAとNNGコドンの読み分けに成功した。さらに、同じコドンボックスのNNUもしくはNNCコドンに別のアミノ酸を割り当てることを行った。これら3つのコドンを含む配列を実際に翻訳して読み分け能を評価したところ、目的のコドンからそれに対応するアミノ酸のみが特異的に翻訳され、正確な読み分けに成功していることが数値的にも確認された。

[0010] 本開示はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下〔1〕～〔32〕に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

〔1〕

M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAおよび M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを含む翻訳系であって、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオチドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され、

前記2種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、翻訳系。

〔2〕

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、〔1〕に記載の翻訳系。

〔3〕

(i) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、または、

(ii) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを含む翻訳系であって、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオチドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)のいずれかから選択され、

前記(i)および(ii)における3種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、翻訳系。

〔4〕

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔5〕

M_1 および M_2 が以下の(i)から(x)のいずれかである、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の翻訳系：

- (i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (v) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がウリジン(U)である、

(vii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がシチジン(C)である、

(viii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、

(ix) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または

(x) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[6]

M_1 および M_2 が以下の (i) から(vii)のいずれかである、[5] に記載の翻訳系:

(i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、

(ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、

(iii) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、

(iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、

(v) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、

(vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または

(vii) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[7]

前記翻訳系に含まれる前記tRNAの一コドンあたりの濃度が、(i) 0.8~1000 μ M、(ii) 1.6~500 μ M、(iii) 3.2~250 μ M、(iv) 6.4~150 μ M、または(v) 10~100 μ Mのいずれかである、[1] から[6] のいずれかに記載の翻訳系。

[8]

前記アミノ酸が、天然アミノ酸または非天然アミノ酸である、[1] から[7] のいずれかに記載の翻訳系。

[9]

前記tRNAが開始tRNAまたは伸長tRNAである、[1] から[8] のいずれかに記載の翻訳系。

[10]

前記tRNAが原核生物由来または真核生物由来のtRNAである、[1] から[9] のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 1 〕

前記アンチコドンが、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、またはウリジン(U)のいずれか1種または複数種のヌクレオシドを含む、〔 1 〕 から〔 1 0 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 2 〕

一つの遺伝暗号表から、20種類より多くのアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳可能である、〔 1 〕 から〔 1 1 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 3 〕

無細胞翻訳系である、〔 1 〕 から〔 1 2 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 4 〕

再構成型の無細胞翻訳系である、〔 1 3 〕 に記載の翻訳系。

〔 1 5 〕

大腸菌由来のリボソームを含む、〔 1 3 〕 または〔 1 4 〕 に記載の翻訳系。

〔 1 6 〕

前記tRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔 1 〕 から〔 1 5 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 7 〕

前記tRNAのうち、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔 1 〕 から〔 1 6 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 8 〕

前記tRNAが、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法によって得られるものである、〔 1 〕 から〔 1 7 〕 のいずれかに記載の翻訳系。

〔 1 9 〕

〔 1 〕 から〔 1 8 〕 のいずれかに記載の翻訳系の製造方法であって、前記

アミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳系外でtRNAに結合させることを含む、方法。

〔20〕

前記翻訳系外でのアミノ酸またはアミノ酸類縁体のtRNAへの結合が、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法による、〔19〕に記載の方法。

〔21〕

〔1〕から〔18〕のいずれかに記載の翻訳系または〔19〕もしくは〔20〕に記載の方法によって得られる翻訳系を用いて核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法。

〔22〕

ペプチドが環状部を有するペプチドである、〔21〕に記載の方法。

〔23〕

〔21〕または〔22〕に記載の方法により製造されたペプチド。

〔24〕

〔1〕から〔18〕のいずれかに記載の翻訳系または〔19〕もしくは〔20〕に記載の方法によって得られる翻訳系を用いて核酸ライブラリーを翻訳することを含む、ペプチドライブラリーの製造方法。

〔25〕

〔24〕に記載の方法により製造されたペプチドライブラリー。

〔26〕

〔25〕に記載のペプチドライブラリーに標的分子を接触させることを含む、当該標的分子に対して結合活性を有するペプチドの同定方法。

〔27〕

前記アンチコドンがライシジンを含まない、〔1〕から〔18〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔28〕

前記アンチコドンがライシジン誘導体を含まない、〔1〕から〔18〕お

よび〔27〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔29〕

前記アンチコドンがアグマチジンを含まない、〔1〕から〔18〕、〔27〕および〔28〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔30〕

前記アンチコドンがアグマチジン誘導体を含まない、〔1〕から〔18〕および〔27〕から〔29〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔31〕

M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを含む核酸をさらに含む、〔1〕から〔18〕および〔27〕から〔30〕のいずれかに記載の翻訳系。

〔32〕

前記核酸が、(i) M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドン、または、(ii) M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンを含む、〔31〕に記載の翻訳系。

[0011] また本開示は、以下〔101〕～〔120〕に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

〔101〕

翻訳系を用いて核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法であって

、

前記翻訳系が、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA A、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを含み

、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され、

前記2種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体

が結合している、前記製造方法。

[102]

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、[101]に記載の方法。

[103]

翻訳系を用いて核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法であって、
前記翻訳系が、

(i) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、または、

(ii) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを含み、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)のいずれかから選択され、

前記(i)および(ii)における3種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、前記製造方法。

[104]

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、[101]から[103]のいずれかに記載の方法。

[105]

M_1 および M_2 が以下の(i)から(x)のいずれかである、[101]から[104]のいずれかに記載の方法：

(i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、

- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (v) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (vii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がシチジン(C)である、
- (viii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (ix) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または
- (x) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[106]

M_1 および M_2 が以下の(i)から(vii)のいずれかである、[105]に記載の方法:

- (i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iii) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (v) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または
- (vii) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[107]

前記翻訳系に含まれる前記tRNAの一コドンあたりの濃度が、(i) 0.8~100 μM 、(ii) 1.6~500 μM 、(iii) 3.2~250 μM 、(iv) 6.4~150 μM 、または(v) 10~100 μM のいずれかである、[101]から[106]のいずれかに記載の方法。

[108]

前記アミノ酸が、天然アミノ酸または非天然アミノ酸である、[101]から[107]のいずれかに記載の方法。

[109]

前記tRNAが開始tRNAまたは伸長tRNAである、〔101〕から〔108〕のいずれかに記載の方法。

〔110〕

前記tRNAが原核生物由来または真核生物由来のtRNAである、〔101〕から〔109〕のいずれかに記載の方法。

〔111〕

前記アンチコドンが、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、またはウリジン(U)のいずれか1種または複数種のヌクレオシドを含む、〔101〕から〔110〕のいずれかに記載の方法。

〔112〕

一つの遺伝暗号表から、20種類より多くのアミノ酸を翻訳可能である、〔101〕から〔111〕のいずれかに記載の方法。

〔113〕

翻訳系が無細胞翻訳系である、〔101〕から〔112〕のいずれかに記載の方法。

〔114〕

翻訳系が再構成型の無細胞翻訳系である、〔113〕に記載の方法。

〔115〕

翻訳系が大腸菌由来のリボソームを含む、〔113〕または〔114〕に記載の方法。

〔116〕

前記tRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔101〕から〔115〕のいずれかに記載の方法。

〔117〕

前記tRNAのうち、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔101〕から〔116〕のいずれかに記載の方法。

[1 1 8]

前記tRNAが、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法によって得られるものである、[1 0 1] から [1 1 7] のいずれかに記載の方法。

[1 1 9]

前記核酸が、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを含む、[1 0 1] から [1 1 8] のいずれかに記載の方法。

[1 2 0]

前記核酸が、(i) M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドン、または、(i i) M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンを含む、[1 0 3] から [1 1 8] のいずれかに記載の方法。

[0012] また本開示は、以下 [2 0 1] ~ [2 1 8] に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

[2 0 1]

ペプチドを製造するためのキットまたは組成物であって、

M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNAを含み、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され、

前記2種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、前記キットまたは組成物。

[2 0 2]

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、[2 0 1] に記載の方法。

[2 0 3]

ペプチドを製造するためのキットまたは組成物であって、

(i) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、または、

(ii) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを含み、

M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれアデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)のいずれかから独立に選択され、

前記(i)および(ii)における3種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、前記キットまたは組成物。

[204]

M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、[201]から[203]のいずれかに記載のキットまたは組成物。

[205]

M_1 および M_2 が以下の(i)から(x)のいずれかである、[201]から[204]のいずれかに記載のキットまたは組成物：

- (i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (v) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (vii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がシチジン(C)である、
- (viii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (ix) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または

(x) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[206]

M_1 および M_2 が以下の(i)から(vii)のいずれかである、[205]に記載のキットまたは組成物:

(i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、

(ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、

(iii) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、

(iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、

(v) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、

(vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または

(vii) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[207]

前記tRNAの一コドンあたりの濃度が、(i) 0.8~1000 μ M、(ii) 1.6~500 μ M、(iii) 3.2~250 μ M、(iv) 6.4~150 μ M、または(v) 10~100 μ Mのいずれかである、[201]から[206]のいずれかに記載のキットまたは組成物。

[208]

前記アミノ酸が、天然アミノ酸または非天然アミノ酸である、[201]から[207]のいずれかに記載のキットまたは組成物。

[209]

前記tRNAが開始tRNAまたは伸長tRNAである、[201]から[208]のいずれかに記載のキットまたは組成物。

[210]

前記tRNAが原核生物由来または真核生物由来のtRNAである、[201]から[209]のいずれかに記載のキットまたは組成物。

[211]

前記アンチコドンが、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、またはウリジン(U)のいずれか1種または複数種のヌクレオシドを含む、[201]

〕から〔210〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

〔212〕

一つの遺伝暗号表から、20種類より多くのアミノ酸を翻訳可能である、〔201〕から〔211〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

〔213〕

翻訳系が無細胞翻訳系である、〔201〕から〔212〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

〔214〕

翻訳系が再構成型の無細胞翻訳系である、〔213〕に記載のキットまたは組成物。

〔215〕

翻訳系が大腸菌由来のリボソームを含む、〔213〕または〔214〕に記載のキットまたは組成物。

〔216〕

前記tRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔201〕から〔215〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

〔217〕

前記tRNAのうち、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、〔201〕から〔216〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

〔218〕

前記tRNAが、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法によって得られるものである、〔201〕から〔217〕のいずれかに記載のキットまたは組成物。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCUU、CUA、CUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表6を参照）。

tRNA：化合物AA t R－1（アンチコドン：aag、アミノ酸：nBuG）

化合物AA t R－2（アンチコドン：uag、アミノ酸：Pic2）

化合物AA t R－3（アンチコドン：cag、アミノ酸：dA）

mRNA：m R－1（CUUのコドンを含む）

m R－2（CUAのコドンを含む）

m R－3（CUGのコドンを含む）

[図2]図2は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはGUU、GUA、GUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表7を参照）。

tRNA：化合物AA t R－4（アンチコドン：aac、アミノ酸：nBuG）

化合物AA t R－5（アンチコドン：uac、アミノ酸：Pic2）

化合物AA t R－6（アンチコドン：cac、アミノ酸：dA）

mRNA：m R－4（GUUのコドンを含む）

m R－5（GUAのコドンを含む）

m R－6（GUGのコドンを含む）

[図3]図3は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAU、CAA、CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表8を参照）。

tRNA：化合物AA t R－7（アンチコドン：aug、アミノ酸：nBuG）

化合物 A A t R - 8 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 9 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 7 (CAUのコドンを含む)

m R - 8 (CAAのコドンを含む)

m R - 9 (CAGのコドンを含む)

[図4]図4は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはA A U, A A A, A A Gである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表9を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 1 0 (アンチコドン : auu、アミノ酸 : nBuG)

化合物 A A t R - 1 1 (アンチコドン : uuu、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 1 2 (アンチコドン : cuu、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 1 0 (AAUのコドンを含む)

m R - 1 1 (AAAのコドンを含む)

m R - 1 2 (AAGのコドンを含む)

[図5]図5は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはG A U, G A A, G A Gである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表10を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 1 3 (アンチコドン : auc、アミノ酸 : nBuG)

化合物 A A t R - 1 4 (アンチコドン : uuc、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 1 5 (アンチコドン : cuc、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 1 3 (GAUのコドンを含む)

m R - 1 4 (GAAのコドンを含む)

m R - 1 5 (GAGのコドンを含む)

[図6]図6は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにお

ける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはUUU, UUA, UUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表11を参照）。

tRNA：化合物AA t R-16（アンチコドン：aaa、アミノ酸：nBuG）

化合物AA t R-17（アンチコドン：uaa、アミノ酸：Pic2）

化合物AA t R-18（アンチコドン：caa、アミノ酸：dA）

mRNA：m R-16（UUUのコドンを含む）

m R-17（UUAのコドンを含む）

m R-18（UUGのコドンを含む）

[図7]図7は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはAGU, AGA, AGGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表12を参照）。

tRNA：化合物AA t R-19（アンチコドン：acu、アミノ酸：nBuG）

化合物AA t R-20（アンチコドン：ucu、アミノ酸：Pic2）

化合物AA t R-21（アンチコドン：ccu、アミノ酸：dA）

mRNA：m R-19（AGUのコドンを含む）

m R-20（AGAのコドンを含む）

m R-21（AGGのコドンを含む）

[図8]図8は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはUGC, UGA, UGGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表13を参照）。

tRNA：化合物AA t R-22（アンチコドン：gca、アミノ酸：nBuG）

化合物AA t R-23（アンチコドン：uca、アミノ酸：Pic2）

化合物 A A t R - 2 4 (アンチコドン : cca、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 2 2 (UGCのコドンを含む)

m R - 2 3 (UGAのコドンを含む)

m R - 2 4 (UGGのコドンを含む)

[図9]図9は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAC, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表14を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 2 6 (アンチコドン : gug、アミノ酸 : nBuG)

化合物 A A t R - 8 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 9 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 2 5 (CACのコドンを含む)

m R - 8 (CAAのコドンを含む)

m R - 9 (CAGのコドンを含む)

[図10]図10は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはAAC, AAA, AAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表15を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 2 7 (アンチコドン : guu、アミノ酸 : nBuG)

化合物 A A t R - 1 1 (アンチコドン : uuu、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 1 2 (アンチコドン : cuu、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 2 6 (AACのコドンを含む)

m R - 1 1 (AAAのコドンを含む)

m R - 1 2 (AAGのコドンを含む)

[図11]図11は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価

したコドンはA G C, A G A, A G Gである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表16を参照）。

tRNA：化合物A A t R - 28（アンチコドン：gcu、アミノ酸：nBuG）

化合物A A t R - 20（アンチコドン：ucu、アミノ酸：Pic2）

化合物A A t R - 21（アンチコドン：ccu、アミノ酸：dA）

mRNA：m R - 29（AGCのコドンを含む）

m R - 20（AGAのコドンを含む）

m R - 21（AGGのコドンを含む）

[図12]図12は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはC A U, C A A, C A Gである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表17を参照）。

tRNA：化合物A A t R - 29（アンチコドン：aug、アミノ酸：MeA3Pyr）

化合物A A t R - 30（アンチコドン：uug、アミノ酸：StBuOH）

化合物A A t R - 31（アンチコドン：cug、アミノ酸：MeSnPr）

mRNA：m R - 7（CAUのコドンを含む）

m R - 8（CAAのコドンを含む）

m R - 9（CAGのコドンを含む）

[図13]図13は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはA A U, A A A, A A Gである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表18を参照）。

tRNA：化合物A A t R - 32（アンチコドン：auu、アミノ酸：MeA3Pyr）

化合物A A t R - 33（アンチコドン：uuu、アミノ酸：StBuOH）

化合物A A t R - 34（アンチコドン：cuu、アミノ酸：MeSnPr）

mRNA : m R - 1 0 (AAUのコドンを含む)

m R - 1 1 (AAAのコドンを含む)

m R - 1 2 (AAGのコドンを含む)

[図14]図14は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはGAU, GAA, GAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表19を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 3 5 (アンチコドン : auc、アミノ酸 : MeA3Pyr)

化合物AA t R - 3 6 (アンチコドン : uuc、アミノ酸 : StBuOH)

化合物AA t R - 3 7 (アンチコドン : cuc、アミノ酸 : MeSnPr)

mRNA : m R - 1 3 (GAUのコドンを含む)

m R - 1 4 (GAAのコドンを含む)

m R - 1 5 (GAGのコドンを含む)

[図15]図15は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはUUU, UUA, UUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表20を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 3 8 (アンチコドン : aaa、アミノ酸 : MeA3Pyr)

化合物AA t R - 3 9 (アンチコドン : uaa、アミノ酸 : StBuOH)

化合物AA t R - 4 0 (アンチコドン : caa、アミノ酸 : MeSnPr)

mRNA : m R - 1 6 (UUUのコドンを含む)

m R - 1 7 (UUAのコドンを含む)

m R - 1 8 (UUGのコドンを含む)

[図16]図16は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはAGU, AGA, AGGである。以下に記載のtRNAおよびmRNA

のそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 1 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 4 1 （アンチコドン : acu、アミノ酸 : MeA3Pyr）

化合物 A A t R - 4 2 （アンチコドン : ucu、アミノ酸 : StBuOH）

化合物 A A t R - 4 3 （アンチコドン : ccu、アミノ酸 : MeSnPr）

mRNA : m R - 1 9 （AGUのコドンを含む）

m R - 2 0 （AGAのコドンを含む）

m R - 2 1 （AGGのコドンを含む）

[図17]図 1 7 は、実施例 6 ～ 7 に記載されるように、1 つのコドンボックスにおける 3 種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンは U G C, U G A, U G G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 2 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 4 4 （アンチコドン : gca、アミノ酸 : MeA3Pyr）

化合物 A A t R - 4 5 （アンチコドン : uca、アミノ酸 : StBuOH）

化合物 A A t R - 4 6 （アンチコドン : cca、アミノ酸 : MeSnPr）

mRNA : m R - 2 2 （UGCのコドンを含む）

m R - 2 3 （UGAのコドンを含む）

m R - 2 4 （UGGのコドンを含む）

[図18]図 1 8 は、実施例 6 ～ 7 に記載されるように、1 つのコドンボックスにおける 3 種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンは C A C, C A A, C A G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 3 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 4 7 （アンチコドン : gug、アミノ酸 : MeA3Pyr）

化合物 A A t R - 3 0 （アンチコドン : uug、アミノ酸 : StBuOH）

化合物 A A t R - 3 1 （アンチコドン : cug、アミノ酸 : MeSnPr）

mRNA : m R - 2 5 （CACのコドンを含む）

m R - 8 (CAAのコドンを含む)

m R - 9 (CAGのコドンを含む)

[図19]図19は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはAAC, AAA, AAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表24を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 48 (アンチコドン : guu、アミノ酸 : MeA3Pyr)

化合物AA t R - 33 (アンチコドン : uuu、アミノ酸 : StBuOH)

化合物AA t R - 34 (アンチコドン : cuu、アミノ酸 : MeSnPr)

mRNA : m R - 26 (AACのコドンを含む)

m R - 11 (AAAのコドンを含む)

m R - 12 (AAGのコドンを含む)

[図20]図20は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはGAC, GAA, GAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表25を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 49 (アンチコドン : guc、アミノ酸 : MeA3Pyr)

化合物AA t R - 36 (アンチコドン : uuc、アミノ酸 : StBuOH)

化合物AA t R - 37 (アンチコドン : cuc、アミノ酸 : MeSnPr)

mRNA : m R - 27 (GACのコドンを含む)

m R - 14 (GAAのコドンを含む)

m R - 15 (GAGのコドンを含む)

[図21]図21は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはUUC, UUA, UUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラ

フの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 6 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 0 （アンチコドン : gaa、アミノ酸 : MeA3Pyr）

化合物 A A t R - 3 9 （アンチコドン : uaa、アミノ酸 : StBuOH）

化合物 A A t R - 4 0 （アンチコドン : caa、アミノ酸 : MeSnPr）

mRNA : m R - 2 8 （UUC のコドンを含む）

m R - 1 7 （UUA のコドンを含む）

m R - 1 8 （UUG のコドンを含む）

[図22]図 2 2 は、実施例 6 ～ 7 に記載されるように、1 つのコドンボックスにおける 3 種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンは A G C, A G A, A G G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 7 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 1 （アンチコドン : gcu、アミノ酸 : MeA3Pyr）

化合物 A A t R - 4 2 （アンチコドン : ucu、アミノ酸 : StBuOH）

化合物 A A t R - 4 3 （アンチコドン : ccu、アミノ酸 : MeSnPr）

mRNA : m R - 2 9 （AGC のコドンを含む）

m R - 2 0 （AGA のコドンを含む）

m R - 2 1 （AGG のコドンを含む）

[図23-1]図 2 3 - 1 は、実施例 6 ～ 7 に記載されるように、1 つのコドンボックスにおける 3 種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンは C G C, C G A, C G G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 2 8 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 7 （アンチコドン : gcg、アミノ酸 : nBuG）

化合物 A A t R - 5 8 （アンチコドン : ucg、アミノ酸 : SPh2Cl）

化合物 A A t R - 5 9 （アンチコドン : ccg、アミノ酸 : dA）

mRNA : m R - 4 2 （CGU のコドンを含む）

m R - 4 3 （CGA のコドンを含む）

m R - 4 4 (CGGのコードを含む)

[図23-2]図23-2は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAU, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表28-2を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 6 0 (アンチコドン : aug、アミノ酸 : nBuGly)

化合物AA t R - 6 1 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物AA t R - 6 2 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 7 (CAUのコードを含む)

m R - 8 (CAAのコードを含む)

m R - 9 (CAGのコードを含む)

[図23-3]図23-3は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAU, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表28-3を参照)。

tRNA : 化合物AA t R - 6 3 (アンチコドン : aug、アミノ酸 : nBuGly)

化合物AA t R - 6 4 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物AA t R - 6 5 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 7 (CAUのコードを含む)

m R - 8 (CAAのコードを含む)

m R - 9 (CAGのコードを含む)

[図23-4]図23-4は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAC, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表28-4を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 6 6 (アンチコドン : gug、アミノ酸 : nBuGly)

化合物 A A t R - 6 7 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 6 8 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 2 5 (CACのコドンを含む)

m R - 8 (CAAのコドンを含む)

m R - 9 (CAGのコドンを含む)

[図23-5]図23-5は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAC, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表28-5を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 6 9 (アンチコドン : gug、アミノ酸 : nBuGly)

化合物 A A t R - 7 0 (アンチコドン : uug、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 7 1 (アンチコドン : cug、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 2 5 (CACのコドンを含む)

m R - 8 (CAAのコドンを含む)

m R - 9 (CAGのコドンを含む)

[図23-6]図23-6は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはGAU, GAA, GAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表28-6を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 7 2 (アンチコドン : auc、アミノ酸 : nBuGly)

化合物 A A t R - 7 3 (アンチコドン : uuc、アミノ酸 : Pic2)

化合物 A A t R - 7 4 (アンチコドン : cuc、アミノ酸 : dA)

mRNA : m R - 1 3 (GAUのコドンを含む)

m R - 1 4 (GAAのコドンを含む)

m R - 1 5 (GAGのコドンを含む)

[図23-7]図23-7は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAU, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表28-7を参照）。

tRNA：化合物AA t R-75（アンチコドン：aug、アミノ酸：MeA3Pr）

化合物AA t R-76（アンチコドン：uug、アミノ酸：StBuOH）

化合物AA t R-77（アンチコドン：cug、アミノ酸：MeSnPr）

mRNA：m R-7（CAUのコドンを含む）

m R-8（CAAのコドンを含む）

m R-9（CAGのコドンを含む）

[図23-8]図23-8は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはCAC, CAA, CAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表28-8を参照）。

tRNA：化合物AA t R-78（アンチコドン：gug、アミノ酸：MeA3Pr）

化合物AA t R-79（アンチコドン：uug、アミノ酸：StBuOH）

化合物AA t R-80（アンチコドン：cug、アミノ酸：MeSnPr）

mRNA：m R-25（CACのコドンを含む）

m R-8（CAAのコドンを含む）

m R-9（CAGのコドンを含む）

[図23-9]図23-9は、実施例6～7に記載されるように、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸読み分けの翻訳評価の結果を示す図である。評価したコドンはGAU, GAA, GAGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行った場合に得られるペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表28-9を参照）。

tRNA：化合物AA t R-81（アンチコドン：auc、アミノ酸：MeA3Pr）

化合物 A A t R - 8 2 (アンチコドン : uuc、アミノ酸 : StBuOH)

化合物 A A t R - 8 3 (アンチコドン : cuc、アミノ酸 : MeSnPr)

mRNA : m R - 1 3 (GAUのコドンを含む)

m R - 1 4 (GAAのコドンを含む)

m R - 1 5 (GAGのコドンを含む)

[図24-1]図24-1は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンはUCU, UCC, UCA, UCGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた各ペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表29-1を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 2 (アンチコドン : uga、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 0 (UCUのコドンを含む)

m R - 3 1 (UCCのコドンを含む)

m R - 3 2 (UCAのコドンを含む)

m R - 3 3 (UCGのコドンを含む)

[図24-2]図24-2は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンはUCU, UCC, UCA, UCGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた[各ペプチドの翻訳量]に対する[目的のペプチドの翻訳量]の比をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表29-2を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 2 (アンチコドン : uga、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 0 (UCUのコドンを含む)

m R - 3 1 (UCCのコドンを含む)

m R - 3 2 (UCAのコドンを含む)

m R - 3 3 (UCGのコドンを含む)

[図25-1]図25-1は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンは A C U, A C C, A C A, A C G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた各ペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す (具体的な測定値は表30-1を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 3 (アンチコドン : ugu、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 4 (ACUのコドンを含む)

m R - 3 5 (ACCのコドンを含む)

m R - 3 6 (ACAのコドンを含む)

m R - 3 7 (ACGのコドンを含む)

[図25-2]図25-2は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリード

の翻訳量のそれぞれの变化を評価した結果を示す図である。評価したコドン
は A C U, A C C, A C A, A C G である。以下に記載の tRNA および mRNA の
それぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた [各ペプチドの翻訳量]
に対する [目的のペプチドの翻訳量] の比をグラフの縦軸に示す (具体的な
測定値は表 3 0 - 2 を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 3 (アンチコドン : ugu、アミノ酸 : MeHph)

tRNA 濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 4 (ACU のコドンを含む)

m R - 3 5 (ACC のコドンを含む)

m R - 3 6 (ACA のコドンを含む)

m R - 3 7 (ACG のコドンを含む)

[図26-1] 図 2 6 - 1 は、実施例 6 ~ 7 に記載されるように、アミノアシル化
t R N A の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリード
の翻訳量のそれぞれの变化を評価した結果を示す図である。評価したコドン
は A U U, A U C, A U A, A U G である。以下に記載の tRNA および mRNA の
それぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた各ペプチドの翻訳量をグ
ラフの縦軸に示す (具体的な測定値は表 3 1 - 1 を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 4 (アンチコドン : uau、アミノ酸 : MeHph)

tRNA 濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 (AUU のコドンを含む)

m R - 3 9 (AUCのコドンを含む)

m R - 4 0 (AUAのコドンを含む)

m R - 4 1 (AUGのコドンを含む)

[図26-2]図26-2は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンは A U U, A U C, A U A, A U G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた [各ペプチドの翻訳量] に対する [目的のペプチドの翻訳量] の比をグラフの縦軸に示す (具体的な測定値は表31-2を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 4 (アンチコドン : uau、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 (AUUのコドンを含む)

m R - 3 9 (AUCのコドンを含む)

m R - 4 0 (AUAのコドンを含む)

m R - 4 1 (AUGのコドンを含む)

[図27-1]図27-1は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンは A U U, A U C, A U A, A U G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた各ペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す (具体的な測定値は表32-1を参照)。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 5 (アンチコドン : uau、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M3.2 μ M1.6 μ M0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 (AUUのコドンを含む)

m R - 3 9 (AUCのコドンを含む)

m R - 4 0 (AUAのコドンを含む)

m R - 4 1 (AUGのコドンを含む)

[図27-2]図27-2は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンはAUU, AUC, AUA, AUGである。以下に記載のtRNAおよびmRNAのそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた[各ペプチドの翻訳量]に対する[目的のペプチドの翻訳量]の比をグラフの縦軸に示す(具体的な測定値は表32-2を参照)。

tRNA : 化合物A A t R - 5 5 (アンチコドン : uau、アミノ酸 : MeHph)

tRNA濃度 : 12.8 μ M6.4 μ M3.2 μ M1.6 μ M0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 (AUUのコドンを含む)

m R - 3 9 (AUCのコドンを含む)

m R - 4 0 (AUAのコドンを含む)

m R - 4 1 (AUGのコドンを含む)

[図28-1]図28-1は、実施例6～7に記載されるように、アミノアシル化 tRNA の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドン

は A U U, A U C, A U A, A U G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた各ペプチドの翻訳量をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 3 3 - 1 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 6 （アンチコドン : uau、アミノ酸 : Ile）

tRNA 濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 （AUU のコドンを含む）

m R - 3 9 （AUC のコドンを含む）

m R - 4 0 （AUA のコドンを含む）

m R - 4 1 （AUG のコドンを含む）

[図28-2] 図 2 8 - 2 は、実施例 6 ~ 7 に記載されるように、アミノアシル化 t R N A の濃度が異なる条件下における目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量のそれぞれの変化を評価した結果を示す図である。評価したコドンは A U U, A U C, A U A, A U G である。以下に記載の tRNA および mRNA のそれぞれの組合せで翻訳を行い、その結果得られた [各ペプチドの翻訳量] に対する [目的のペプチドの翻訳量] の比をグラフの縦軸に示す（具体的な測定値は表 3 3 - 2 を参照）。

tRNA : 化合物 A A t R - 5 6 （アンチコドン : uau、アミノ酸 : Ile）

tRNA 濃度 : 12.8 μ M

6.4 μ M

3.2 μ M

1.6 μ M

0.8 μ M

mRNA : m R - 3 8 （AUU のコドンを含む）

m R - 3 9 （AUC のコドンを含む）

m R - 4 0 (AUAのコドンを含む)

m R - 4 1 (AUGのコドンを含む)

発明を実施するための形態

[0014] 1. 定義

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、該当する場合はいつでも、単数形で使用された用語は複数形をも含み、その逆もまた同様である。本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明することのみを目的としており、限定を意図したものではないことが、理解されるべきである。下記の定義のいずれかが、参照により本明細書に組み入れられた任意の文書と矛盾する場合には、下記の定義が優先するものとする。

[0015] 「コドン」とは、生体内の遺伝情報がタンパク質に翻訳される際の、各アミノ酸に対応する3つのヌクレオシドの組合せ（トリプレット）のことである。DNAの場合は、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびチミン（T）の4種類の塩基が用いられ、mRNAの場合は、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびウラシル（U）の4種類の塩基が用いられる。各コドンとアミノ酸の対応関係を示した表は遺伝暗号表あるいはコドン表と呼ばれ、終止コドンを除く61種類のコドンに、20種類のアミノ酸が割り当てられている（表1）。表1に記載の遺伝暗号表は、真核生物および原核生物（真正細菌および古細菌）におけるほとんどすべての生物で共通して使用されていることから、標準遺伝暗号表あるいは普遍遺伝暗号表とも呼ばれる。本開示においては、天然に存在する生物で使用されている遺伝暗号表を天然の遺伝暗号表と称し、人工的にリプログラミングされた（コドンとアミノ酸の対応関係が改変された）遺伝暗号表とは区別する。遺伝暗号表においては、通常、1文字目と2文字目が共通で3文字目のみが異なる4つのコドンが一つのボックスにまとめられており、これらをコドンボックスと呼ぶ。

[0016]

[表1]

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Stop	UGA	Stop	A
	UUG		UCG		UAG		UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	Arg	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

- [0017] 本開示において、mRNAにおけるコドンは「 $M_1M_2M_3$ 」で表されることがある。
ここで、 M_1 、 M_2 、および M_3 はそれぞれコドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドを表す。
- [0018] 「アンチコドン」とは、mRNA上のコドンに対応する、tRNA上の3つの連続したヌクレオシドのことである。mRNAと同様に、アンチコドンには、アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、およびウラシル (U) の4種類の塩基が用いられる。さらに、それらを修飾して得られる修飾塩基が用いられることもある。コドンがアンチコドンによって特異的に認識されることによって、mRNA上の遺伝情報が読み取られ、タンパク質に翻訳される。mRNA上の5'から3'方向のコドン配列とtRNA上の5'から3'方向のアンチコドン配列は相補的に結合するため、コドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドと、アンチコドンの3文字目、2文字目、および1文字目のヌクレオシドとの間でそれぞれ相補的な塩基対が形成される。
- [0019] 本開示において、tRNAにおけるアンチコドンは「 $N_1N_2N_3$ 」で表されることが

ある。ここで、 N_1 、 N_2 、および N_3 はそれぞれアンチコドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドを表す。後述のtRNAナンバリング則に従うと、 N_1 、 N_2 、および N_3 はそれぞれtRNAの34位、35位、および36位に番号付けされる。

[0020] 本開示においては、熱力学的に安定な塩基対を形成し得るような核酸の組合せを互いに「相補的」とであるという。アデノシンとウリジン (A-U)、グアノシンとシチジン (G-C) といったワトソン・クリック型塩基対に加えて、グアノシンとウリジン (G-U)、イノシンとウリジン (I-U)、イノシンとアデノシン (I-A)、イノシンとシチジン (I-C) などの非ワトソン・クリック型塩基対を形成する核酸の組合せも、本開示における「相補的」な核酸の組合せに含まれる。特に、コドンの1文字目とアンチコドンの3文字目、コドンの2文字目とアンチコドンの2文字目の間にはワトソン・クリック型塩基対の形成のみが許容されるのに対し、コドンの3文字目とアンチコドンの1文字目の間には空間的なゆらぎ (wobble) が存在するため、上記のような非ワトソン・クリック型塩基対の形成も許容されると考えられている (ゆらぎ仮説)。

[0021] 「伝令RNA (messenger RNA; mRNA)」とは、タンパク質に翻訳され得る遺伝情報を持ったRNAのことである。遺伝情報はコドンとしてmRNA上にコードされており、それらが全20種類のアミノ酸にそれぞれ対応している。タンパク質の翻訳は開始コドンから始まり、終止コドンで終了する。真核生物における開始コドンは原則としてAUGであるが、原核生物 (真正細菌および古細菌) ではAUGの他にGUGやUUGなども開始コドンとして使用されることがある。AUGはメチオニン (Met) をコードするコドンであり、真核生物および古細菌ではそのままメチオニンから翻訳が開始される。一方、真正細菌では、開始コドンのAUGのみN-ホルミルメチオニン (fMet) に対応しているため、ホルミルメチオニンから翻訳が開始される。終止コドンには、UAA (オーカー) ・ UAG (アンバー) ・ UGA (オパール) の3種がある。終止コドンが翻訳終結因子 (release factor; RF) と呼ばれるタンパク質によって認識されると、それまでに合成されたペプチド鎖がtRNAから解離し、翻訳工程は終了する。

[0022] 「転移RNA (transfer RNA; tRNA)」とは、mRNA を鋳型にしたペプチド合成を仲介する 100塩基以下の短い RNA のことである。二次構造上は、3つのステムループ (D アーム、アンチコドンアーム、T アーム) と1つのステム (アクセプターステム) からなる、クローバー葉状の構造を有している。tRNAによっては、さらに1つの可変ループが含まれることがある。アンチコドンアームには、アンチコドンと呼ばれる3つの連続したヌクレオシドからなる領域が存在し、アンチコドンがmRNA上のコドンと塩基対を形成することによってコドンが認識される。一方、tRNAの3' 末端には、シチジーン-シチジーン-アデノシンからなる核酸配列 (CCA配列) が存在し、その末端のアデノシン残基にアミノ酸が付加される (具体的には、アデノシン残基のリボースの2位または3位のヒドロキシル基と、アミノ酸のカルボキシル基がエステル結合する)。アミノ酸が付加したtRNAはアミノアシルtRNAと呼ばれる。本開示においては、アミノアシルtRNAもtRNAの定義に含まれる。また、後述のように、tRNAのCCA配列から末端の2残基 (CおよびA) を除去し、それをアミノアシルtRNAの合成に用いる方法が知られている。そのような3' 末端のCA配列が除去されたtRNAも、本開示におけるtRNAの定義に含まれる。生体内において、tRNAへのアミノ酸の付加は、アミノアシルtRNA合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase; aaRSまたはARS) という酵素によって行われる。通常、アミノ酸ごとに1種類のアミノアシルtRNA合成酵素が存在していて、なおかつそれぞれのアミノアシルtRNA合成酵素が複数のtRNAの中から特定のtRNAのみを基質として特異的に認識することから、tRNAとアミノ酸との対応関係は厳密に制御されている。

[0023] tRNAにおける各ヌクレオシドは、tRNAナンバリング則に従って番号付けがなされている (Sprinzl et al., *Nucleic Acids Res* (1998) 26: 148-153)。例えば、アンチコドンは34位~36位に、CCA配列は74~76位にそれぞれ番号付けされている。

[0024] 「開始tRNA (initiator tRNA)」とは、mRNAの翻訳の開始時に使用される特定のtRNAのことである。開始アミノ酸を結合した開始tRNAが、翻訳開始因

子 (initiation factor; IF) に触媒されてリボソームに導入され、mRNA上の開始コドンに結合することで、翻訳が始まる。開始コドンとして、一般的にはメチオニンのコドンであるAUGが用いられるため、開始tRNAはAUGに対応するアンチコドンを含んでおり、また、開始アミノ酸としてメチオニン（原核生物ではホルミルメチオニン）を結合している。

[0025] 「伸長tRNA (elongator tRNA)」とは、翻訳工程におけるペプチド鎖の伸長反応において使用されるtRNAのことである。ペプチド合成においては、アミノ酸を結合した伸長tRNAが、GTP化された翻訳伸長因子 (elongation factor; EF) EF-Tu/eEF-1によりリボソームに順次運ばれることによって、ペプチド鎖の伸長反応が進行する。

[0026] 本開示における「tRNAボディ (tRNA body)」とは、アンチコドン (34～36位) を除くtRNAの本体部分 (核酸で構成された主要な構造部分) を指す。いくつかの態様において、本開示のtRNAボディは、tRNAの1～33位及び37～76位を指す。別の態様において、本開示のtRNAボディは、tRNAの1～33位及び37～74位を指す。

[0027] 「ライシジン (lysidine)」は修飾ヌクレオシドの一種で、2-リジルシチジン (2-lysylcytidine; k2CあるいはL) とも表記される。ライシジンは、真正細菌におけるイソロイシンに対応したtRNA (tRNA Ile2) において、アンチコドンの1文字目のヌクレオシドとして用いられている。tRNA Ile2は、CAUのアンチコドンをもった前駆体の状態で合成された後、tRNA Ile-ライシジン合成酵素 (tRNA Ile-lysidine synthetase; Tils) と呼ばれる酵素の作用により、アンチコドンの1文字目のシチジン (C) がライシジン (k2C) に改変 (変換) される。その結果、k2CAUのアンチコドンをもったtRNA Ile2が完成する (Muramatsu et al., J Biol Chem (1988) 263: 9261-9267, Suzuki et al., FEBS Lett (2010) 584: 272-277)。k2CAUのアンチコドンは、イソロイシンのコドンAUAのみを特異的に認識することが知られている。また、アンチコドンがk2CAUに改変されることによって初めて、イソロイシルtRNA合成酵素によりtRNA Ile2が基質として認識され、tRNA Ile2のアミノアシル化 (イソ

ロイシンの付加) が起きると考えられている。

[0028] 「アグマチジン (agmatidine)」は修飾ヌクレオシドの一種で、2-アグマチニルシチジン (2-agmatinylcytidine; agm2CあるいはAgm) とも表記される。アグマチジンは、古細菌におけるイソロイシンに対応したtRNA (tRNA Ile2) において、アンチコドンの1文字目のヌクレオシドとして用いられている。tRNA Ile2は、CAUのアンチコドンをもった前駆体の状態で合成された後、tRNA Ile-アグマチジン合成酵素 (tRNA Ile-agmatidine synthetase; TiaS) と呼ばれる酵素の作用により、アンチコドンの1文字目のシチジン (C) がアグマチジン (agm2C) に改変 (変換) される。その結果、agm2CAUのアンチコドンをもったtRNA Ile2が完成する (Ikeuchi et al., Nat Chem Biol (2010) 6(4): 277-282)。agm2CAUのアンチコドンは、イソロイシンのコドンAUAのみを特異的に認識することが知られている。また、アンチコドンがagm2CAUに改変されることによって初めて、イソロイシルtRNA合成酵素によりtRNA Ile2が基質として認識され、tRNA Ile2のアミノアシル化 (イソロイシンの付加) が起きると考えられている。

[0029] 本開示において「クロスリード」とは、あるアミノアシルtRNAが、本来認識すべきコドン以外のコドンも認識することによって、目的以外のアミノ酸が余分に翻訳される現象を意味する。目的以外のアミノ酸が翻訳される程度は特に限定されないが、通常は、翻訳の直交性が十分に達成されていないと判断されるレベルのものを指す。

[0030] 本開示において「アルキル」とは、脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される1価の基であり、骨格中にヘテロ原子または不飽和の炭素-炭素結合を含有せず、水素および炭素原子を含有するヒドロカルビルまたは炭化水素基構造の部分集合を有する。炭素鎖の長さnは1~20個の範囲であり、アルキルとしては、例えばC₁-C₁₀アルキル、C₁-C₆アルキル、C₁-C₃アルキルなどが挙げられ、具体的には、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソプロピル、t-ブチル、sec-ブチル、1-メチルプロピル、1, 1-ジメチルプロピル、2, 2-ジメチル

ルプロピル、1, 2-ジメチルプロピル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、1, 1, 2, 2-テトラメチルプロピル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、イソペンチル、ネオペンチルなどが挙げられる。

[0031] 本開示において「シクロアルキル」とは、飽和または部分的に飽和した環状の1価の脂肪族炭化水素基を意味し、単環、ビスシクロ環、スピロ環を含む。シクロアルキルとしては、例えば C_3-C_{10} シクロアルキルが挙げられ、具体的には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビスシクロ[2, 2, 1]ヘプチルなどが挙げられる。

[0032] 本開示において「アルケニル」とは、少なくとも1個の二重結合（2個の隣接SP²炭素原子）を有する1価の基である。二重結合および置換分（存在する場合）の配置によって、二重結合の幾何学的形態は、エンタゲゲン（E）またはツザンメン（Z）、シスまたはトランス配置をとることができる。直鎖状または分枝鎖状のアルケニルが挙げられ、内部オレフィンを含む直鎖などを含む。アルケニルとしては、例えば C_2-C_{10} アルケニル、 C_2-C_6 アルケニルなどが挙げられ、具体的には、ビニル、アリル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル（シス、トランスを含む）、3-ブテニル、ペンテニル、ヘキセニルなどが挙げられる。

[0033] 本開示において「アルキニル」とは、少なくとも1個の三重結合（2個の隣接SP炭素原子）を有する、1価の基である。直鎖状または分枝鎖状のアルキニルが挙げられ、内部アルキレンを含む。アルキニルとしては、例えば C_2-C_{10} アルキニル、 C_2-C_6 アルキニルなどが挙げられ、具体的には、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル、3-ブチニル、ペンチニル、ヘキシニル、3-フェニル-2-プロピニル、3-(2'-フルオロフェニル)-

2-プロピニル、2-ヒドロキシ-2-プロピニル、3-(3-フルオロフェニル)-2-プロピニル、3-メチル-(5-フェニル)-4-ペンチニルなどが挙げられる。

[0034] 本開示において「アリール」とは、1価の芳香族炭化水素環を意味する。アリールとしては、例えば C_6-C_{10} アリールが挙げられ、具体的には、フェニル、ナフチル（例えば、1-ナフチル、2-ナフチル）などが挙げられる。

[0035] 本開示において「ヘテロアリール」とは、環を構成する原子中にヘテロ原子を含有する芳香族性の環の1価の基を意味し、部分的に飽和されていてもよい。環は単環、または2個の縮合環（例えば、ベンゼンまたは単環ヘテロアリールと縮合した2環式ヘテロアリール）であってもよい。環を構成する原子の数は例えば5-10個である（5員-10員ヘテロアリール）。環を構成する原子中に含まれるヘテロ原子の数は例えば1-5個である。ヘテロアリールとしては、具体的には、フリル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピリダジニル、ピラジニル、トリアジニル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、ベンゾイミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、シンノリニル、キナゾリニル、キノキサリニル、ベンゾジオキサソリル、インドリジニル、イミダゾピリジルなどが挙げられる。

[0036] 本開示において「アリールアルキル（アラルキル）」とは、アリールとアルキルを共に含む基であり、例えば、前記アルキルの少なくとも一つの水素原子がアリールで置換された基を意味する。アラルキルとしては、例えば C_5-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキルが挙げられ、具体的には、ベンジルなどが挙げられる。

[0037] 本開示において「アルキレン」とは、前記「アルキル」からさらに任意の

水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味し、直鎖状のものでも分枝鎖状のものでもよい。直鎖アルキレンとしては、 C_2-C_6 直鎖アルキレン、 C_4-C_5 直鎖アルキレンなどが挙げられ、具体的には、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 、 $-(CH_2)_6-$ などが挙げられる。分岐アルキレンとしては、 C_2-C_6 分岐アルキレン、 C_4-C_5 分岐アルキレンなどが挙げられ、具体的には、 $-CH(CH_3)CH_2-$ 、 $-C(CH_3)_2-$ 、 $-CH(CH_3)CH_2CH_2-$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 、 $-CH_2C(CH_3)_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ などが挙げられる。

[0038] 本開示において「アルケニレン」は、前記「アルケニル」からさらに任意の水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味し、直鎖状のものでも分枝鎖状のものでもよい。二重結合および置換基（存在する場合）の配置によって、エントゲーゲン（E）またはツザンメン（Z）、シスまたはトランス配置をとることができる。直鎖アルケニレンとしては、 C_2-C_6 直鎖アルケニレン、 C_4-C_5 直鎖アルケニレンなどが挙げられ、具体的には、 $-CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH=CHCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH=CH-$ などが挙げられる。

[0039] 本開示において「アリーレン」とは、前記アリールからさらに任意の水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味する。環は単環でも縮合環でもよい。環を構成する原子の数は特に限定されないが、例えば6-10個である（ C_6-C_{10} アリーレン）。アリーレンとしては、具体的には、フェニレン、ナフチレンなどが挙げられる。

[0040] 本開示において「ヘテロアリーレン」とは、前記ヘテロアリールからさらに任意の水素原子を1個除いて誘導される二価の基を意味する。環は単環でも縮合環でもよい。環を構成する原子の数は特に限定されないが、例えば5-10個である（5員～10員ヘテロアリーレン）。ヘテロアリーレンとし

ては、具体的には、ピロールジイル、イミダゾールジイル、ピラゾールジイル、ピリジンジイル、ピリダジンジイル、ピリミジンジイル、ピラジンジイル、トリアゾールジイル、トリアジンジイル、イソオキサゾールジイル、オキサゾールジイル、オキサジアゾールジイル、イソチアゾールジイル、チアゾールジイル、チアジアゾールジイル、フランジイル、チオフェンジイルなどが挙げられる。

[0041] 本開示における「翻訳系」とは、ペプチドを翻訳するための方法およびペプチドを翻訳するための組成物およびキットの両方を含む概念として定義される。翻訳系には、通常、リボソーム、翻訳因子、tRNA、アミノ酸、アミノアシルtRNA合成酵素 (aaRS)、及びATPやGTPなどのペプチドの翻訳反応に必要な因子が構成成分として含まれる。翻訳系の主な種類としては、生細胞を利用した翻訳系や、細胞抽出液を利用した翻訳系（無細胞翻訳系）がある。生細胞を利用した翻訳系としては、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞や哺乳動物細胞などの生細胞に、所望のアミノアシルtRNAおよびmRNAをマイクロインジェクション法やリポフェクション法により導入してペプチド翻訳を行う系が知られている (Nowak et al., Science (1995) 268: 439-442)。無細胞翻訳系の例としては、大腸菌 (Chen et al., Methods Enzymol (1983) 101: 674-690)、酵母 (Gasior et al., J Biol Chem (1979) 254: 3965-3969)、小麦胚芽 (Erickson et al., Methods Enzymol (1983) 96: 38-50)、ウサギ網状赤血球 (Jackson et al., Methods Enzymol (1983) 96: 50-74)、HeLa細胞 (Barton et al., Methods Enzymol (1996) 275: 35-57)、あるいは昆虫細胞 (Swerdel et al., Comp Biochem Physiol B (1989) 93: 803-806) などからの抽出液を利用した翻訳系が知られている。このような翻訳系は、当業者に公知の方法またはそれに準ずる方法によって適宜調製することができる。無細胞翻訳系には、ペプチド翻訳に必要な因子をそれぞれ単離・精製して、それらを再構成して構築された翻訳系（再構成型の無細胞翻訳系）も含まれる (Shimizu et al., Nat Biotech (2001) 19: 751-755)。再構成型の無細胞翻訳系には、通常、リボソーム、アミノ酸、tRNA、アミノアシルtRN

A合成酵素 (aaRS)、翻訳開始因子 (例えば、IF1、IF2、IF3)、翻訳伸長因子 (例えばEF-Tu、EF-Ts、EF-G)、翻訳終結因子 (例えばRF1、RF2、RF3)、リボソーム再生因子 (ribosome recycling factor; RRF)、エネルギー源としてのNTP類、エネルギー再生系、および翻訳に必要なその他の因子などが含まれ得る。DNAからの転写反応を併せて行う場合は、さらにRNAポリメラーゼなどが含まれ得る。無細胞翻訳系に含まれる種々の因子は、当業者に周知の方法によって単離・精製することが可能であり、それらを用いて再構成型の無細胞翻訳系を適宜構築することができる。あるいは、ジーンフロンティア社のPUREfrex (登録商標) や、New England BioLabs社のPURExpress (登録商標) などの市販されている再構成型の無細胞翻訳系を利用することもできる。再構成型の無細胞翻訳系の場合、翻訳系の構成成分のうち必要な成分だけを再構成して、所望の翻訳系を構築することができる。

[0042] アミノ酸・tRNA・アミノアシルtRNA合成酵素の特異的な組合せにより、アミノアシルtRNAが合成され、それがペプチドの翻訳に用いられる。上記の組合せの代わりに、アミノアシルtRNAをそのまま翻訳系の構成成分として用いることもできる。特に、非天然アミノ酸など、アミノアシルtRNA合成酵素でアミノアシル化することが困難なアミノ酸が翻訳に用いられる場合は、あらかじめ非天然アミノ酸でアミノアシル化されたtRNAを構成成分として用いることが望ましい。

[0043] 翻訳系にmRNAを加えることによって、その翻訳が開始される。mRNAには、通常、目的のペプチドをコードする配列が含まれており、さらに、翻訳反応の効率を上昇させるための配列 (例えば、原核生物におけるシャイン・ダルガーノ (Shine-Dalgarno; SD) 配列、真核生物におけるコザック (Kozac) 配列など) が含まれていてもよい。あらかじめ転写されたmRNAを系に直接加えてもよいし、mRNAの代わりに、プロモーターを含む鋳型DNAとそれに適したRNAポリメラーゼ (例えばT7プロモーターとT7 RNAポリメラーゼなど) を系に加えることによって、mRNAが鋳型DNAから転写されるようにしてもよい。

[0044] 本明細書において、数値範囲を示す「～」とはその両端の値を含み、例え

ば、「A～B」は、A以上であり、かつB以下である数値範囲を意味する。

[0045] 本明細書において、「および/または」との用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば、「A、B、および/またはC」には、以下の7通りのバリエーションが含まれる；

(i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) AおよびB、(v) AおよびC、(vi) BおよびC、(vii) A、B、およびC。

[0046] 1.1. 翻訳系および翻訳系の製造方法

一局面において、本開示は、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを含む翻訳系を提供する。一局面において、本開示においては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。本開示における翻訳系に含まれる2種類のtRNAのそれぞれは、互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合されたアミノアシルtRNAであることができる。本開示におけるtRNAは、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。したがって本開示のtRNAを含む翻訳系を使用することにより、一つのコドンボックス（当該コドンボックスは、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンよりなる）から、少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。

本開示における M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンには、 M_1 をアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択し、 M_2 をアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択することによって特定することが可能な全ての組み合わせが含まれる。

なお開示において「コドンを選択的に翻訳する」の表現は「コドンを読み

分ける」、「クロスリードを低減する」と言い換えることもでき、これらは同一の意味に解釈され得る。

[0047] 一局面において、本開示は、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを含む翻訳系を提供する。また一局面において、本開示は、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを含む翻訳系を提供する。一局面において、本開示においては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。本開示における翻訳系に含まれる3種類のtRNAのそれぞれは、互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合されたアミノアシルtRNAであることができる。一局面において本開示におけるtRNAは、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。また一局面において本開示におけるtRNAは、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。したがって本開示のtRNAを含む翻訳系を使用することにより、一つのコドンボックス（当該コドンボックスは、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンよりなる）から、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。

本開示における M_1M_2U で表されるコドンおよび M_1M_2C で表されるコドンには、 M_1 をアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択し、 M_2 をアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択することによって特定することが可能な全ての組み合わせが含まれる。

[0048] 本開示における翻訳系には複数の異なる種類のtRNAが含まれ、それらのtRNA

Aから複数の異なる種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。一局面において、本開示は、ペプチド翻訳に適した複数の異なる種類のtRNAを含む、コドンを選択的に翻訳するための組成物およびキットを提供する。別の局面において、本開示は、ペプチド翻訳に適した複数の異なる種類のtRNAを含む翻訳系において核酸を翻訳する工程を含む、コドンを選択的に翻訳するための方法を提供する。特定の局面において、前記の複数の異なる種類のtRNAの中に、本開示のtRNAが含まれる。

[0049] 本開示において選択的に翻訳することが可能なコドンの組み合わせとして、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンの組み合わせ、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンの組み合わせ、ならびに M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンの組み合わせが例示される。

[0050] 本開示における翻訳系には、一態様において、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含む核酸が含まれていてもよい。また本開示における翻訳系には、一態様において、(i) M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含む核酸、または、(ii) M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含む核酸が含まれていてもよい。また一態様において、本開示における翻訳系には、 M_1M_2A で表されるコドン、 M_1M_2G で表されるコドン、 M_1M_2U で表されるコドン、および M_1M_2C で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含む核酸が含まれていてもよい。一態様において、本開示における翻訳系は、このような核酸を1種または複数種含むことができる。

[0051] 一局面において、本開示は、翻訳系の製造方法に関する。本開示における翻訳系の製造方法は、アミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳系外でおよび／または人工的にtRNAに結合させる工程を含む。一局面において、本開示における翻訳系の製造方法は、アミノ酸またはアミノ酸類縁体を結合されたtRNAと本開示における翻訳系とを混合する工程をさらに含む。

翻訳系には、通常、リボソーム、翻訳因子、tRNA、アミノ酸、アミノアシルtRNA合成酵素（aaRS）、及びATPやGTPなどのペプチドの翻訳反応に必要な因子が構成成分として含まれる。特に、再構成型の無細胞翻訳系の場合、翻訳系の構成成分のうち必要な成分だけを再構成して、所望の翻訳系を構築することができる。翻訳系中におけるアミノアシルtRNA（アミノ酸またはアミノ酸類縁体が付加したtRNA）の合成は、翻訳系内で行われてもよいし、翻訳系外で行われてもよい。また、翻訳系内での合成と翻訳系外での合成が併用されてもよい。

いくつかの態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、翻訳系外でアミノ酸またはアミノ酸類縁体に結合される。いくつかの態様において、本開示における M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、翻訳系外でアミノ酸またはアミノ酸類縁体に結合される。いくつかの態様において、本開示における M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、翻訳系外でアミノ酸またはアミノ酸類縁体に結合される。さらなる態様において、翻訳系中に含まれる上記以外のtRNAは、翻訳系内でアミノ酸またはアミノ酸類縁体に結合されてもよいし、翻訳系外でアミノ酸またはアミノ酸類縁体に結合されてもよい。

[0052] 本開示において、tRNAはアミノ酸またはアミノ酸類縁体が人工的に連結されたものであることが好ましい。tRNAは、任意の生物（例えば大腸菌など）に由来する天然tRNAであってもよいし、または天然tRNAとは異なる配列を有する、人工的に合成した非天然tRNAであってもよい。あるいは、天然tRNAと同じ配列を有する、人工的に合成したtRNAであってもよい。また本開示におけるtRNAは、「in vitroで転写合成されたtRNA」であってもよい。

[0053] いくつかの態様において、本開示におけるtRNAが天然tRNAとは異なる配列を有する改変されたtRNAである場合、当該改変されたtRNAはtRNAを構成する1つ以上のヌクレオシドに対して、以下の群から選択される少なくとも1種類以上の改変を含むことができる：(i) 付加（既存のtRNAに任意の新たなヌクレオシドを付け足すこと）、(ii) 欠失（既存のtRNAから任意のヌクレオシドを削除すること）、(iii) 置換（既存のtRNAにおける任意のヌクレオシドを別の任意のヌクレオシドに置き換えること）、(iv) 挿入（既存のtRNAにおける任意の2つのヌクレオシドの間に新たな任意のヌクレオシドを追加すること）、(v) 修飾（既存のtRNAにおける任意のヌクレオシドの構造の一部（例えば塩基部分や糖部分）を別の構造に変化させること）。改変はtRNAのどの構造（例えばDアーム、アンチコドンアーム、Tアーム、アクセプターステム、可変ループなど）に対して行われてもよい。いくつかの態様において、本開示におけるtRNAの改変は、アンチコドンアームに含まれるアンチコドンに対して行われる。さらなる態様において、本開示におけるtRNAの改変は、アンチコドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドのうちの少なくとも1つに対して行われる。tRNAにおけるヌクレオシドのナンバリング則に従うと、アンチコドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドは、それぞれtRNAの34位、35位、および36位に該当する。本明細書においては、アンチコドンの1文字目、2文字目、および3文字目のヌクレオシドをそれぞれ N_1 、 N_2 、および N_3 と表現することがある。本開示のtRNAにおいて改変されるヌクレオシドの数は1以上の任意の数であることができる。いくつかの態様において、本開示のtRNAにおいて改変されるヌクレオシドの数は、20以下、15以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下、あるいは1である。別の態様において、改変後のtRNAの核酸配列は、改変前の核酸配列と比べて、80%以上、85%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、あるいは99%以上同一である。本開示において、ある塩基配列に対する「パーセント（%）配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を得るように

配列を整列させてかつ必要ならギャップを導入した後の、かつ、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとしたときの、参照塩基配列中の塩基と同一である候補配列中の塩基の、百分率比として定義される。塩基配列のパーセント配列同一性を決める目的のアラインメントは、当該技術分野における技術の範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) ソフトウェア、またはGENETYX (登録商標) (株式会社ゼネティックス) などの、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントをとるための適切なパラメーターを決定することができる。

[0054] いくつかの態様において、本開示におけるtRNAの改変とは、tRNAを構成する1つ以上のヌクレオシドを置換することを意味する。ヌクレオシドの種類に関して、置換された後のヌクレオシドは、天然tRNA中に存在するいずれかのヌクレオシドであってもよいし、天然tRNA中には存在しない任意のヌクレオシド (人工的に合成されたヌクレオシド) であってもよい。天然tRNA中には、4つの典型的なヌクレオシドであるアデノシン、グアノシン、シチジンおよびウリジンの他に、それらを修飾して得られる改変体 (修飾ヌクレオシド) も含まれている。いくつかの態様において、天然tRNA中に存在するヌクレオシドは、以下のヌクレオシドの中から選択され得る: アデノシン (adenosine; A)、シチジン (cytidine; C)、グアノシン (guanosine; G)、ウリジン (uridine; U)、1-メチルアデノシン (1-methyladenosine; m1A)、2-メチルアデノシン (2-methyladenosine; m2A)、N6-イソペンテニルアデノシン (N6-isopentenyladenosine; i6A)、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン (2-methylthio-N6-isopentenyladenosine; ms2i6A)、N6-メチルアデノシン (N6-methyladenosine; m6A)、N6-トレオニルカルバモイルアデノシン (N6-threonylcarbamoyladenine; t6A)、N6-メチル-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン (N6-methyl-N6-threonylcarbamoyladenine; m6t6A)

、2-メチルチオ-N6-トレオニルカルバモイルアデノシン (2-methylthio-N6-threonylcarbamoyladenosine; ms2t6A)、2'-0-メチルアデノシン (2'-0-methyladenosine; Am)、イノシン (inosine; I)、1-メチルイノシン (1-methylinosine; m1I)、2'-0-リボシルアデノシン(リン酸塩) (2'-0-ribosyladenosine (phosphate); Ar(p))、N6-(cis-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン (N6-(cis-hydroxyisopentenyl)adenosine; io6A)、2-チオシチジン (2-thiocytidine; s2C)、2'-0-メチルシチジン (2'-0-methylcytidine; Cm)、N4-アセチルシチジン (N4-acetylcytidine; ac4C)、5-メチルシチジン (5-methylcytidine; m5C)、3-メチルシチジン (3-methylcytidine; m3C)、ライシジン (lysidine; k2C)、5-ホルミルシチジン (5-formylcytidine; f5C)、2'-0-メチル-5-ホルミルシチジン (2'-0-methyl-5-formylcytidine; f5Cm)、アグマチジン (agmatidine; agm2C)、2'-0-リボシルグアノシン(リン酸塩) (2'-0-ribosylguanosine (phosphate); Gr(p))、1-メチルグアノシン (1-methylguanosine; m1G)、N2-メチルグアノシン (N2-methylguanosine; m2G)、2'-0-メチルグアノシン (2'-0-methylguanosine; Gm)、N2, N2-ジメチルグアノシン (N2, N2-dimethylguanosine; m22G)、N2, N2, 2'-0-トリメチルグアノシン (N2, N2, 2'-0-trimethylguanosine; m22Gm)、7-メチルグアノシン (7-methylguanosine; m7G)、アーキオシン (archaeosine; G*)、キューオシン (queuosine; Q)、マンノシルキューオシン (mannosylqueuosine; manQ)、ガラクトシルキューオシン (galactosylqueuosine; galQ)、ワイブトシン (wybutosine; yW)、ペルオキシワイブトシン (peroxywybutosine; o2yW)、5-メチルアミノメチルウリジン (5-methylaminomethyluridine; mnm5U)、2-チオウリジン (2-thiouridine; s2U)、2'-0-メチルウリジン (2'-0-methyluridine; Um)、4-チオウリジン (4-thiouridine; s4U)、5-カルバモイルメチルウリジン (5-carbamoylmethyluridine; ncm5U)、5-メトキシカルボニルメチルウリジン (5-methoxycarbonylmethyluridine; mcm5U)、5-メチルアミノメチル-2-チオウリジン (5-methylaminomethyl-2-thiouridine; mnm5s2U)、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン (5-

methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine; mcm5s2U)、ウリジン5-オキシ酢酸 (uridine 5-oxyacetic acid; cmo5U)、5-メトキシウリジン (5-methoxyuridine; mo5U)、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン (5-carboxymethylaminomethyluridine; cmnm5U)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン (5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine; cmnm5s2U)、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン (3-(3-amino-3-carboxypropyl)uridine; acp3U)、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジンメチルエステル (5-(carboxyhydroxymethyl)uridinemethyl ester; mchm5U)、5-カルボキシメチルアミノメチル-2'-0-メチルウリジン (5-carboxymethylaminomethyl-2'-0-methyluridine; cmnm5Um)、5-カルバモイルメチル-2'-0-メチルウリジン (5-carbamoylmethyl-2'-0-methyluridine; ncm5Um)、ジヒドロウリジン (dihydrouridine; D)、シュードウリジン (pseudouridine; Ψ)、1-メチルシュードウリジン (1-methylpseudouridine; m1 Ψ)、2'-0-メチルシュードウリジン (2'-0-methylpseudouridine; Ψ m)、5-メチルウリジン (5-methyluridine; m5U)、5-メチル-2-チオウリジン (5-methyl-2-thiouridine; m5s2U)、5, 2'-0-ジメチルウリジン (5, 2'-0-dimethyluridine; m5Um)。

[0055] 本開示において改変されるtRNAは、任意の核酸配列を有するtRNAの中から適宜選択することができる。いくつかの態様において、tRNAはtRNA Ala、tRNA Arg、tRNA Asn、tRNA Asp、tRNA Cys、tRNA Gln、tRNA Glu、tRNA Gly、tRNA His、tRNA Ile、tRNA Leu、tRNA Lys、tRNA Met、tRNA Phe、tRNA Pro、tRNA Ser、tRNA Thr、tRNA Trp、tRNA Tyr、tRNA Valのいずれかである。上記の20種類のtRNA以外にも、tRNA fMetやtRNA Sec (セレノシステイン)、tRNA Pyl (ピロリシン)、tRNA AsnE2なども用い得る。特定の態様において、tRNAはtRNA Glu、tRNA Asp、tRNA AsnE2、tRNA(fMet)、tRNA(Ile)のいずれかである。tRNAの本体部分(核酸で構成された主要な構造部分)を指してtRNA bodyとの用語が用いられることもある。

[0056] なお、本開示において、tRNAは以下のように表記されることがある。

・「tRNA Xxx」あるいは「tRNA(Xxx)」・・・アミノ酸Xxxに対応したtRNA (

全長)を示す(例えばtRNA GluやtRNA(Glu)など)。

・「tRNA(Xxx)nnn」・・・アミノ酸Xxxに対応したtRNAであって、アンチコドン配列がnnnであるtRNA(全長)を示す(例えばtRNA(Glu)ugaやtRNA(Glu)Lgaなど)。

・「tRNA(Xxx)nnn-CA」・・・アミノ酸Xxxに対応したtRNAであって、アンチコドン配列がnnnであるtRNA(3'末端のCA配列が除去されたもの)を示す(例えばtRNA(Glu)uga-CAやtRNA(Glu)Lga-CAなど)。

[0057] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、開始tRNAまたは伸長tRNAである。開始tRNAまたは伸長tRNAを改変することによってtRNAを作製してもよいし、改変により作製されたtRNAが開始tRNAまたは伸長tRNAとしての機能を有していてもよい。あるtRNAが開始tRNAとしての機能を有しているか否かは、当該tRNAを翻訳系で用いた場合に、(i) IF2を介してリボソームに導入され、なおかつ(ii) 当該tRNAに結合しているアミノ酸を開始アミノ酸として用いて、ペプチド翻訳を開始させることができるか否かによって判断することができる。また、あるtRNAが伸長tRNAとしての機能を有しているか否かは、当該tRNAを翻訳系で用いた場合に、(i) EF-Tuを介してリボソームに導入され、なおかつ(ii) 当該tRNAに結合しているアミノ酸をペプチド鎖に取り込ませて、ペプチド鎖を伸長させることができるか否かによって判断することができる。

[0058] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、原核生物由来のtRNAまたは真核生物由来のtRNAである。原核生物由来のtRNAまたは真核生物由来のtRNAを改変することによって変異tRNAを作製してもよいし、改変により作製されたtRNAが、原核生物由来のtRNAまたは真核生物由来のtRNAと最も高い核酸配列同一性を有していてもよい。真核生物はさらに動物、植物、菌類および原生動物に分類される。本開示のtRNAは、例えばヒト由来のtRNAであってもよい。原核生物は、さらに真正細菌と古細菌に分類される。真正細菌としては、例えば大腸菌、枯草菌、乳酸菌、または*Desulfitobacterium hafniense*などを挙げるができる。古細菌としては、例えば高度好塩菌、好熱菌、または

メタン菌（例えば*Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanocaldococcus jannaschii*）などを挙げることができる。本開示のtRNAは、例えば大腸菌や*Desulfitobacterium hafniense*, *Methanosarcina mazei*由来のtRNAであってもよい。

[0059] いくつかの態様において、本開示におけるtRNAは、アンチコドン、例えばその1文字目(N_1)にライシジン(k2C)、ライシジン誘導体、アグマチジン(agg2C)、またはアグマチジン誘導体のいずれかを有さないものであってもよい。特定の態様において、本開示におけるtRNAは、アンチコドン、例えば、その1文字目(N_1)にライシジン(k2C)、ライシジン誘導体、アグマチジン(agg2C)、またはアグマチジン誘導体のいずれをも有さないものであってもよい。

[0060] tRNAは、例えば、所望のtRNA遺伝子をコードするDNAを用意し、その上流にT7、T3、あるいはSP6などの適切なプロモーターを配置して、当該DNAを鋳型に各プロモーターに適応したRNAポリメラーゼを用いて転写反応を行うことによって合成することができる。また、tRNAは生物学的材料からの精製によっても調製することができる。例えば、細胞などのtRNAを含む材料から抽出液を調製して、そこにtRNAの核酸配列に相補的な配列を含むプローブを添加することによってtRNAを回収することができる。この際、所望のtRNAを発現可能な発現ベクターを用意して、当該発現ベクターで形質転換した細胞を材料に調製を行うこともできる。in vitroの転写によって合成されたtRNAには、通常、4つの典型的なヌクレオシドであるアデノシン、グアノシン、シチジン、およびウリジンのみが含まれている。一方、細胞内で合成されたtRNAには、それらを修飾して得られた修飾ヌクレオシドなども含まれていることがある。あるいは、転写によって合成された断片もしくは、後述の実施例に記載のように、化学合成された断片等を酵素反応によって連結する手法によってもtRNAを調製することができる。

[0061] アミノアシルtRNAも化学的および／または生物学的な合成法によって調製することができる。例えば、アミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いて、tRNAにアミノ酸を結合させることによってアミノアシルtRNAを合成することが

できる。アミノ酸はARSの基質となり得るものであれば、天然アミノ酸であっても、非天然アミノ酸であってもよい。あるいは、天然アミノ酸をtRNAに結合させた後に、アミノ酸に化学的な修飾を加えてもよい。また、ARSにアミノ酸変異を導入することによって、非天然アミノ酸に対する作用が高められた例も多数報告されており（例えばW02006/135096、W02007/061136、W02007/103307、W02008/001947、W02010/141851、W02015/120287などを参照）、そのような変異ARSを用いて、tRNAにアミノ酸を結合させてもよい。ARSを用いる方法以外にも、例えば、tRNAの3'末端からCA配列を除去し、そこにアミノアシル化されたpdCpA（デオキシシチジンおよびアデノシンから構成されるジヌクレオチド）をRNAリガーゼを用いて結合させることによってアミノアシルtRNAを合成することができる（pdCpA法；Hecht et al., J Biol Chem (1978) 253: 4517-4520）。pdCpAの代わりにpCpA（シチジンおよびアデノシンから構成されるジヌクレオチド）を用いる方法も知られている（pCpA法；Wang et al., ACS Chem Biol (2015) 10: 2187-2192）。すなわち、pCpA-アミノ酸と3'末端のCA欠損tRNAをRNAリガーゼで結合させてアミノアシル化tRNAを調製できる。また、あらかじめエステル化により活性化した非天然型アミノ酸を人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いてtRNAに結合させることによってアミノアシルtRNAを合成することができる（W02007/066627、W02012/026566、H. Murakami et al., Chemistry & Biology, Vol. 10, 2003, 655-662；H. Murakami et al., Chemistry & Biology, Vol. 10, 2003, 1077-1084；H. Murakami et al., Nature Methods 3, 2006, 357-359；N. Niwa et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19, 2009, 3892-3894）。フレキシザイムは、tRNAにアミノ酸またはヒドロキシ酸を連結することのできる人工RNA触媒である。本開示におけるフレキシザイムには、原型のフレキシザイム（Fx）、及び、これから改変されたジニトロベンジルフレキシザイム（dFx）、エンハンスドフレキシザイム（eFx）、アミノフレキシザイム（aFx）等も含まれる。

[0062] いくつかの態様において、本開示のtRNAにはアミノ酸またはアミノ酸類縁

体が結合している。アミノ酸またはアミノ酸類縁体は、通常、tRNAの3' 末端に、より具体的には、3' 末端のCCA配列のアデノシン残基に結合している。tRNAに結合しているアミノ酸またはアミノ酸類縁体の具体的な種類は、以下に記載のアミノ酸またはアミノ酸類縁体の中からそれぞれ適宜選択することができる。

[0063] 本開示におけるアミノ酸には、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸などが含まれる。立体構造としては、L型アミノ酸、D型アミノ酸のいずれも含まれる。また、本開示におけるアミノ酸は、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含む。特定の態様において、天然アミノ酸は、以下の20種類の α -アミノ酸：グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp)、ヒスチジン (His)、グルタミン酸 (Glu)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン (Gln)、アスパラギン (Asn)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)、およびプロリン (Pro) からなる。あるいは、上述の20種類のアミノ酸から、任意の1種類以上のアミノ酸を除いたものを、本開示における天然アミノ酸としてもよい。一態様において、天然アミノ酸は、イソロイシンを除く19種類のアミノ酸からなる。一態様において、天然アミノ酸は、メチオニンを除く19種類のアミノ酸からなる。さらなる態様において、天然アミノ酸は、イソロイシンおよびメチオニンを除く18種類のアミノ酸からなる。天然アミノ酸は通常、L型アミノ酸である。

[0064] 本開示において、非天然アミノ酸とは、上記の20種類の α -アミノ酸からなる天然アミノ酸を除く全てのアミノ酸を表す。非天然アミノ酸の例として、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、D型アミノ酸、天然アミノ酸とは側鎖が異なる α -アミノ酸、 α , α -二置換アミノ酸、主鎖のアミノ基が置換基を有するアミノ酸 (N置換アミノ酸) などを挙げることができる。非天然アミノ酸の側鎖は、特に限定されないが、水素原子の他に、例えばアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラールキル、シクロアル

キルなどを有していてもよい。また、 α , α -二置換アミノ酸の場合、2つの側鎖が環を形成していてもよい。さらに、これらの側鎖は、1つ以上の置換基を有していてもよい。特定の態様において、置換基は、ハロゲン原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、またはP原子を含む任意の官能基の中から選択することができる。例えば、本開示において「ハロゲンを置換基に有する C_1-C_6 アルキル」とは、アルキルにおける少なくとも一つの水素原子がハロゲン原子で置換された「 C_1-C_6 アルキル」を意味し、具体的には、例えば、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、フルオロメチル、ペンタフルオロエチル、テトラフルオロエチル、トリフルオロエチル、ジフルオロエチル、フルオロエチル、トリクロロメチル、ジクロロメチル、クロロメチル、ペンタクロロエチル、テトラクロロエチル、トリクロロエチル、ジクロロエチル、クロロエチルなどを含む。また、例えば「置換基を有する C_5-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル」とは、アリールおよび／またはアルキルにおける少なくとも一つの水素原子が置換基により置換された「 C_5-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル」を意味する。さらに、「置換基を2つ以上有している」とは、ある官能基（例えばS原子を含む官能基）を置換基として有し、さらにその官能基が別の置換基（例えばアミノやハロゲンなどの置換基）を有していることも含む。非天然アミノ酸の具体的な例としては、W02013/100132やW02018/143145なども参照することができる。

[0065] 非天然アミノ酸の主鎖のアミノ基は、非置換のアミノ基（ NH_2 基）でもよく、置換されたアミノ基（ NHR 基）であってもよい。ここで、Rは、置換基を有していてもよいアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、アラルキル、シクロアルキルを示す。また、プロリンのように主鎖のアミノ基のN原子に結合した炭素鎖と α 位の炭素原子とが環を形成していてもよい。置換基は、ハロゲン原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、またはP原子を含む任意の官能基の中から選択することができる。アミノ基のアルキル置換の例としては、N-メチル化、N-エチル化、N-プロピル化、N-ブチル化などが、アラルキル置換の例としては、N-

ベンジル化などが挙げられる。N-メチルアミノ酸の具体的な例としては、N-メチルアラニン、N-メチルグリシン、N-メチルフェニルアラニン、N-メチルチロシン、N-メチル-3-クロロフェニルアラニン、N-メチル-4-クロロフェニルアラニン、N-メチル-4-メトキシフェニルアラニン、N-メチル-4-チアゾールアラニン、N-メチルヒスチジン、N-メチルセリン、N-メチルアスパラギン酸などを挙げることができる。

[0066] ハロゲン原子を含む置換基の例としては、フルオロ(-F)、クロロ(-Cl)、ブロモ(-Br)、ヨード(-I)などが挙げられる。

[0067] O原子を含む置換基の例としては、ヒドロキシル(-OH)、オキシ(-OR)、カルボニル(-C=O-R)、カルボキシル(-CO₂H)、オキシカルボニル(-C=O-OR)、カルボニルオキシ(-O-C=O-R)、チオカルボニル(-C=O-SR)、カルボニルチオ(-S-C=O-R)、アミノカルボニル(-C=O-NHR)、カルボニルアミノ(-NH-C=O-R)、オキシカルボニルアミノ(-NH-C=O-OR)、スルホニルアミノ(-NH-SO₂-R)、アミノスルホニル(-SO₂-NHR)、スルファモイルアミノ(-NH-SO₂-NHR)、チオカルボキシル(-C(=O)-SH)、カルボキシルカルボニル(-C(=O)-CO₂H)などが挙げられる。

[0068] オキシ(-OR)の例としては、アルコキシ、シクロアルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールオキシ、ヘテロアリールオキシ、アラルキルオキシなどが挙げられる。

[0069] カルボニル(-C=O-R)の例としては、ホルミル(-C=O-H)、アルキルカルボニル、シクロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アラルキルカルボニルなどが挙げられる。

[0070] オキシカルボニル(-C=O-OR)の例としては、アルキルオキシカルボニル、シクロアルキルオキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ヘテロアリール

オキシカルボニル、アラルキルオキシカルボニルなどが挙げられる。

[0071] カルボニルオキシ ($-\text{O}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$) の例としては、アルキルカルボニルオキシ、シクロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アリールカルボニルオキシ、ヘテロアリールカルボニルオキシ、アラルキルカルボニルオキシなどが挙げられる。

[0072] チオカルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{S R}$) の例としては、アルキルチオカルボニル、シクロアルキルチオカルボニル、アルケニルチオカルボニル、アルキニルチオカルボニル、アリールチオカルボニル、ヘテロアリールチオカルボニル、アラルキルチオカルボニルなどが挙げられる。

[0073] カルボニルチオ ($-\text{S}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$) の例としては、アルキルカルボニルチオ、シクロアルキルカルボニルチオ、アルケニルカルボニルチオ、アルキニルカルボニルチオ、アリールカルボニルチオ、ヘテロアリールカルボニルチオ、アラルキルカルボニルチオなどが挙げられる。

[0074] アミノカルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{N H R}$) の例としては、アルキルアミノカルボニル、シクロアルキルアミノカルボニル、アルケニルアミノカルボニル、アルキニルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、ヘテロアリールアミノカルボニル、アラルキルアミノカルボニルなどが挙げられる。さらに、 $-\text{C}=\text{O}-\text{N H R}$ 中の N 原子と結合した H 原子は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。

[0075] カルボニルアミノ ($-\text{N H}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$) の例としては、アルキルカルボニルアミノ、シクロアルキルカルボニルアミノ、アルケニルカルボニルアミノ、アルキニルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、ヘテロアリールカルボニルアミノ、アラルキルカルボニルアミノなどが挙げられる。さらに、 $-\text{N H}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$ 中の N 原子と結合した H 原子は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。

[0076] オキシカルボニルアミノ ($-\text{N H}-\text{C}=\text{O}-\text{O R}$) の例としては、アルコ

キシカルボニルアミノ、シクロアルコキシカルボニルアミノ、アルケニルオキシカルボニルアミノ、アルキニルオキシカルボニルアミノ、アリールオキシカルボニルアミノ、ヘテロアリールオキシカルボニルアミノ、アラルキルオキシカルボニルアミノなどが挙げられる。さらに、 $-NH-C(=O)-OR$ 中のN原子と結合したH原子は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。

[0077] スルホニルアミノ ($-NH-SO_2-R$) の例としては、アルキルスルホニルアミノ、シクロアルキルスルホニルアミノ、アルケニルスルホニルアミノ、アルキニルスルホニルアミノ、アリールスルホニルアミノ、ヘテロアリールスルホニルアミノ、アラルキルスルホニルアミノなどが挙げられる。さらに、 $-NH-SO_2-R$ 中のN原子と結合したH原子は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。

[0078] アミノスルホニル ($-SO_2-NHR$) の例としては、アルキルアミノスルホニル、シクロアルキルアミノスルホニル、アルケニルアミノスルホニル、アルキニルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、ヘテロアリールアミノスルホニル、アラルキルアミノスルホニルなどが挙げられる。さらに、 $-SO_2-NHR$ 中のN原子と結合したH原子は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。

[0079] スルファモイルアミノ ($-NH-SO_2-NHR$) の例としては、アルキルスルファモイルアミノ、シクロアルキルスルファモイルアミノ、アルケニルスルファモイルアミノ、アルキニルスルファモイルアミノ、アリールスルファモイルアミノ、ヘテロアリールスルファモイルアミノ、アラルキルスルファモイルアミノなどが挙げられる。さらに、 $-NH-SO_2-NHR$ 中のN原子と結合した2つのH原子のうちの少なくとも1つは、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、およびアラ

ルキルからなる群より選択される置換基で置換されていてもよい。2つのH原子がともに置換されている場合は、それぞれ独立して置換基を選択してもよく、また、これらの2つの置換基は環を形成していてもよい。

[0080] S原子を含む置換基の例としては、チオール ($-SH$)、チオ ($-S-R$)、スルフィニル ($-S=O-R$)、スルホニル ($-S(O)_2-R$)、スルホ ($-SO_3H$) などが挙げられる。

[0081] チオ ($-S-R$) の例としては、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、アルケニルチオ、アルキニルチオ、アリールチオ、ヘテロアリールチオ、アラルキルチオなどが挙げられる。

[0082] スルフィニル ($-S=O-R$) の例としては、アルキルスルフィニル、シクロアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アリールスルフィニル、ヘテロアリールスルフィニル、アラルキルスルフィニルなどが挙げられる。

[0083] スルホニル ($-S(O)_2-R$) の例としては、アルキルスルホニル、シクロアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アリールスルホニル、ヘテロアリールスルホニル、アラルキルスルホニルなどが挙げられる。

[0084] N原子を含む置換基の例としては、アジド ($-N_3$)、シアノ ($-CN$)、1級アミノ ($-NH_2$)、2級アミノ ($-NH-R$)、3級アミノ ($-NR(R')$)、アミジノ ($-C(=NH)-NH_2$)、置換アミジノ ($-C(=NR)-NR'R''$)、グアニジノ ($-NH-C(=NH)-NH_2$)、置換グアニジノ ($-NR-C(=NR''')-NR'R''$)、アミノカルボニルアミノ ($-NR-CO-NR'R''$) などが挙げられる。

[0085] 2級アミノ ($-NH-R$) の例としては、アルキルアミノ、シクロアルキルアミノ、アルケニルアミノ、アルキニルアミノ、アリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、アラルキルアミノなどが挙げられる。

[0086] 3級アミノ ($-NR(R')$) におけるN原子上の2つの置換基RおよびR'は、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテ

ロアリアル、およびアラルキルからなる群よりそれぞれ独立に選択することができる。3級アミノの例としては、例えばアルキル（アラルキル）アミノなどが挙げられる。これらの2つの置換基は環を形成していてもよい。

[0087] 置換アミジノ（ $-\text{C}(=\text{NR})-\text{NR}'\text{R}''$ ）におけるN原子上の3つの置換基R、R'、およびR''は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、およびアラルキルからなる群よりそれぞれ独立に選択することができる。置換アミジノの例としては、例えばアルキル（アラルキル）（アリアル）アミジノなどが挙げられる。これらの置換基は互いに環を形成していてもよい。

[0088] 置換グアニジノ（ $-\text{NR}-\text{C}(=\text{NR}''')-\text{NR}'\text{R}''$ ）におけるN原子上の4つの置換基R、R'、R''、およびR'''は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、およびアラルキルからなる群よりそれぞれ独立に選択することができる。これらの置換基は互いに環を形成していてもよい。

[0089] アミノカルボニルアミノ（ $-\text{NR}-\text{CO}-\text{NR}'\text{R}''$ ）におけるN原子上の3つの置換基R、R'、およびR''は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、およびアラルキルからなる群よりそれぞれ独立に選択することができる。これらの置換基は互いに環を形成していてもよい。

[0090] B原子を含む置換基の例としては、ボリル（ $-\text{BR}(\text{R}')$ ）やジオキシボリル（ $-\text{B}(\text{OR})(\text{OR}')$ ）などが挙げられる。B原子上の2つの置換基RおよびR'は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アリアル、ヘテロアリアル、およびアラルキルからなる群よりそれぞれ独立に選択することができる。これらの置換基は互いに環を形成していてもよい。

[0091] いくつかの態様において、本開示におけるアミノ酸として、nBuG (2-(butylamino)acetic acid)、Pic2 ((2S)-piperidine-2-carboxylic acid)、dA ((2R)-2-aminopropanoic acid)、MeA3Pyr ((2S)-2-(methylamino)-3-(3-pyri

dyI)propanoic acid)、StBuOH ((2S)-3-(2-hydroxy-2-methyl-propoxy)-2-(methylamino)propanoic acid)、MeSnPr ((2S)-2-(methylamino)-3-propoxypropanoic acid)、SPh2Cl ((2S)-2-amino-3-(2-chlorophenoxy)propanoic acid)、MeHph ((2S)-2-(methylamino)-4-phenyl-butanoic acid)、およびIleなどを例示することができる。

[0092] 本開示におけるアミノ酸類縁体の例として、例えばヒドロキシカルボン酸（ヒドロキシ酸）を挙げることができる。ヒドロキシカルボン酸には、 α -ヒドロキシカルボン酸、 β -ヒドロキシカルボン酸、 γ -ヒドロキシカルボン酸などが含まれる。ヒドロキシカルボン酸における α 位の炭素には、アミノ酸と同様に、水素原子以外の側鎖が結合していてもよい。立体構造としては、L型およびD型のいずれも含まれ得る。側鎖の構造は、上述の天然アミノ酸または非天然アミノ酸の側鎖と同様に定義することができる。ヒドロキシカルボン酸の例として、ヒドロキシ酢酸、乳酸、フェニル乳酸などを挙げることができる。

[0093] 本開示におけるアミノ酸は、翻訳可能なアミノ酸であってもよく、アミノ酸類縁体は、翻訳可能なアミノ酸類縁体であってもよい。本明細書において「翻訳可能な」アミノ酸またはアミノ酸類縁体（まとめてアミノ酸等と呼ぶことがある）とは、翻訳合成により（例えば、本開示に記載の翻訳系を用いて）ペプチドに組み込むことが可能なアミノ酸等を意味する。あるアミノ酸等が翻訳可能か否かは、当該アミノ酸等を結合させたtRNAを用いた翻訳合成実験により確認することができる。翻訳合成実験には再構成の無細胞翻訳系を用いてもよい（例えば、W02013100132を参照のこと）。

[0094] 本開示における非天然アミノ酸やアミノ酸類縁体は、従来公知の化学的な合成法や、後述の実施例に記載の合成法、それらに準ずる合成法によって調製することができる。

[0095] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを読み分けて、これらのコドンのそれぞれについて異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。いくつかの態様

において、本開示のtRNAは、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを読み分けて、これらのコドンのそれぞれについて異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを読み分けて、これらのコドンのそれぞれについて異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。ここで、コドンの1文字目のヌクレオシド (M_1) および2文字目のヌクレオシド (M_2) は、それぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。別の態様において、本開示のtRNAは、 M_1M_2A で表される特定のコドン、 M_1M_2G で表される特定のコドンに相補的なアンチコドン有する。また別の態様において、本開示のtRNAは、 M_1M_2U で表される特定のコドン、 M_1M_2A で表される特定のコドン、 M_1M_2G で表される特定のコドンに相補的なアンチコドン有する。また別の態様において、本開示のtRNAは、 M_1M_2C で表される特定のコドン、 M_1M_2A で表される特定のコドン、 M_1M_2G で表される特定のコドンに相補的なアンチコドン有する。さらなる態様において、tRNAにおけるアンチコドンの3文字目のヌクレオシド (N_3) および2文字目のヌクレオシド (N_2) は、 M_1 および M_2 とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択することができ、 N_2 および N_3 は、それぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され得る。具体的には、 M_2 (または M_1) がアデノシンのとき、 N_2 (または N_3) はウリジンである。 M_2 (または M_1) がグアノシンのとき、 N_2 (または N_3) はシチジンである。 M_2 (または M_1) がシチジンのとき、 N_2 (または N_3) はグアノシンである。 M_2 (または M_1) がウリジンのとき、 N_2 (または N_3) はアデノシンである。

[0096] 本開示の文脈において、「あるtRNAが特定のコドンを翻訳可能である」との態様は、「あるtRNAが特定のコドンに相補的なアンチコドン有している」との態様を本質的に内包するものであり、当該tRNA上のアンチコドンの配列について言及する限りにおいて、これらの表現は置き換えが可能である。

[0097] 本開示における翻訳系を構成するtRNAが翻訳可能なコドンの1文字目のヌクレオシド (M_1) および2文字目のヌクレオシド (M_2) は、遺伝暗号表における特定のコドンボックスを構成するコドンの1文字目のヌクレオシド (M_1) および2文字目のヌクレオシド (M_2) からそれぞれ選択することができる。特定の態様において、遺伝暗号表は標準遺伝暗号表である。別の態様において、遺伝暗号表は天然の遺伝暗号表である。

[0098] 別の態様において、本開示における M_1 および M_2 は、天然の遺伝暗号表において M_1M_2A で表されるコドンに終止コドンが割り当てられていて、かつ M_1M_2G で表されるコドンにアミノ酸が割り当てられているコドンボックスから選択することができる。別の態様において、本開示における M_1 および M_2 は、天然の遺伝暗号表において M_1M_2A で表されるコドンと M_1M_2G で表されるコドンとともに終止コドンが割り当てられているコドンボックスから選択することができる。

いくつかの態様において、遺伝暗号表が天然の遺伝暗号表と同一である翻訳系は、本開示における翻訳系から除かれる。いくつかの態様において、遺伝暗号表が表1に記載された遺伝暗号表と同一である翻訳系は、本開示における翻訳系から除かれる。

[0099] 一態様において、 M_1 および M_2 は、3文字目がAであるコドンとGであるコドンがともに同じアミノ酸をコードしているコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。一例として、コドンが UUM_3 で表されるコドンボックスにおいては、3文字目がAであるコドン (UUA) とGであるコドン (UUG) がともに同じアミノ酸 (Leu) をコードしているので、同コドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (U) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0100] 一態様において、 M_1 および M_2 は、3文字目がUであるコドンとAであるコドンがともに同じアミノ酸をコードしているコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。一例として、コドンが AUM_3 で表されるコドンボックスにおいては、3文字目がUであるコドン (AUU) とAであるコドン (AUA) がともに同じアミノ酸 (Ile) をコードしているので、同コドンボッ

クスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (U) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

- [0101] 一態様において、 M_1 および M_2 は、3文字目がAであるコドンとGであるコドンが互いに異なるアミノ酸をコードしているコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。一例として、コドンがAUM₃で表されるコドンボックスにおいては、3文字目がAであるコドン (AUA) とGであるコドン (AUG) が互いに異なるアミノ酸 (IleとMet) をコードしているので、同コドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (U) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。
- [0102] 一態様において、 M_1 および M_2 は、3文字目がAであるコドンおよび／またはGであるコドンが終止コドンであるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。一例として、コドンがUGM₃で表されるコドンボックスにおいては、3文字目がAであるコドン (UGA) が終止コドン (オパール) であるので、同コドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (G) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。
- [0103] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンがUUM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (U) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。
- [0104] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンがUAM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (A) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。
- [0105] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンがUGM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシ

ド (G) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0106] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが CAM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (C) および2文字目のヌクレオシド (A) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0107] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが CGM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (C) および2文字目のヌクレオシド (G) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0108] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが AUM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (U) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0109] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが ACM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (C) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0110] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが AAM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (A) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0111] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが AGM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (G) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

[0112] さらに態様において、 M_1 および M_2 は、コドンが GAM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンの M_1 および M_2 からそれぞれ選択され得る。具体的には、当該コドンにおける1文字目のヌクレオシド (G) および2文字目のヌクレオシド

ド (A) をそれぞれ M_1 および M_2 として選択することができる。

- [0113] 本開示のtRNAにおけるアンチコドンの3文字目のヌクレオシド (N_3) および2文字目のヌクレオシド (N_2) は、 M_1 および M_2 とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択することができる。
- [0114] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがUUM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (U) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてAを、 N_2 としてAをそれぞれ選択することができる。
- [0115] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがUAM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (A) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてAを、 N_2 としてUをそれぞれ選択することができる。
- [0116] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがUGM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (U) および2文字目のヌクレオシド (G) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてAを、 N_2 としてCをそれぞれ選択することができる。
- [0117] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがCAM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (C) および2文字目のヌクレオシド (A) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてGを、 N_2 としてUをそれぞれ選択することができる。
- [0118] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがCGM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (C) および2文字目のヌクレオシド (G) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてGを、 N_2 としてCをそれぞれ選択することができる。
- [0119] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンがAUM₃で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (U) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてUを、 N_2 としてAをそれぞれ選択することができる。

- [0120] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンが ACM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (C) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてUを、 N_2 としてGをそれぞれ選択することができる。
- [0121] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンが AAM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (A) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてUを、 N_2 としてUをそれぞれ選択することができる。
- [0122] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンが AGM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (A) および2文字目のヌクレオシド (G) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてUを、 N_2 としてCをそれぞれ選択することができる。
- [0123] 一態様において、 N_3 および N_2 は、コドンが GAM_3 で表されるコドンボックスを構成するコドンにおける1文字目のヌクレオシド (G) および2文字目のヌクレオシド (A) とそれぞれ相補的なヌクレオシドとして選択され得る。具体的には、 N_3 としてCを、 N_2 としてUをそれぞれ選択することができる。
- [0124] いくつかの態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNAは、他のコドンに比べて、 M_1M_2A で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。他のコドンとは、 M_1M_2A で表されるコドンとは異なるコドン、例えば M_1M_2U 、 M_1M_2C 、または M_1M_2G で表されるコドンのいずれかであることができる。特定の態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNAは、 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、および M_1M_2G で表されるいずれのコドンと比べても、 M_1M_2A で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。
- [0125] 本開示の一態様において、あるtRNAが、 M_1M_2A のコドンを選択的に翻訳することができるとは、〔当該tRNAによる M_1M_2A のコドンの翻訳量〕が、〔当該tRNAによる他のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍

以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、あるtRNAがCUAで表されるコドンを選択的に翻訳することができるか否かは、〔当該tRNAによるCUAのコドンの翻訳量〕が〔当該tRNAによるCUGのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0126] ある特定のコドン（例えば M_1M_2A ）が翻訳される量と、それ以外のコドン（例えば M_1M_2G ）が翻訳される量とを比較する際には、例えば、あるペプチドをコードするmRNAであって、 M_1M_2A のコドンが含まれているmRNAと、 M_1M_2A のコドンが M_1M_2G のコドンに置き換えられている以外は全て前記mRNAと同じ核酸配列を有する別のmRNAを用意して、同じ条件下でそれらの2つのmRNAを翻訳し、その結果得られた2つのペプチドの合成量を比較することによって行うことができる。

[0127] 別の態様において、 M_1M_2A で表されるコドンは、他のtRNAよりも、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAによって選択的に翻訳され得る。他のtRNAとは、 M_1M_2A で表されるコドンとは異なるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、例えば M_1M_2U 、 M_1M_2C 、または M_1M_2G のいずれかのコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAであることができる。特定の態様において、 M_1M_2A で表されるコドンは、 M_1M_2U のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2C のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2G のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAのいずれのtRNAよりも、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAによって選択的に翻訳され得る。

[0128] 本開示の一態様において、 M_1M_2A で表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るとは、〔当該tRNAによる M_1M_2A のコドンの翻訳量〕が、〔他のtRNAによる M_1M_2A のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4

倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、CUAで表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るか否かは、〔当該tRNAによるCUAのコードンの翻訳量〕が〔CUGのコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNA（例えばCAGのアンチコードンを有するtRNA）によるCUAのコードンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0129] 本開示の翻訳系は、前記の2つの特徴を併せ持っていてもよい。すなわち、特定の態様において、本開示の翻訳系においては、(i) M_1M_2A で表されるコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNAが、他のコードんに比べて、 M_1M_2A で表されるコードンを選択的に翻訳することができ、なおかつ、(ii) M_1M_2A で表されるコードンが、他のtRNAよりも、 M_1M_2A で表されるコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNAによって選択的に翻訳され得る。このような関係が成立している場合、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2A で表されるコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNAを用いたペプチド翻訳と、それ以外のtRNAを用いたペプチド翻訳とが、互いに相互作用を起こさない独立した関係、すなわち直交性を有する（オルソゴナルな）関係にあるということができる。天然に存在する生物の翻訳系においては、本来、コードンとアミノ酸との間に厳密な対応関係が確立されているため、直交性のないtRNAがそこに加わることによって、その対応関係が崩れ、翻訳系の機能に致命的な影響が出るおそれがある。よって、本開示の翻訳系において、 M_1M_2A で表されるコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNAとそれ以外のtRNAとの間に直交性が確立されていることは、重要な特徴の一つになり得る。

[0130] 一態様において、本開示における翻訳系は、(a) M_1M_2A で表されるコードんに相補的なアンチコードンを有するtRNA、および(b) M_1M_2G で表されるコードんに相

補的なアンチコドン有するtRNAの少なくとも2つのtRNAを含む。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAおよび M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAは、アンチコドン以外の核酸配列がともに同一であってもよいし、互いに異なってもよい。アンチコドン以外の核酸配列が同一である場合、これら2つのtRNAの物理化学的性質が互いに類似したものになり得るため、反応性がより均質で安定した翻訳系を構築できる可能性がある。

[0131] いくつかの態様において、本開示における M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAは、他のコドンに比べて、 M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。他のコドンとは、 M_1M_2G で表されるコドンとは異なるコドン、例えば M_1M_2U 、 M_1M_2C 、または M_1M_2A で表されるコドンのいずれかであることができる。特定の態様において、本開示における M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAは、 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、および M_1M_2A で表されるいずれのコドンと比べても、 M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。

[0132] 本開示の一態様において、あるtRNAが、 M_1M_2G のコドンを選択的に翻訳することができるとは、〔当該tRNAによる M_1M_2G のコドンの翻訳量〕が、〔当該tRNAによる他のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、あるtRNAがCUGで表されるコドンを選択的に翻訳することができるか否かは、〔当該tRNAによるCUGのコドンの翻訳量〕が〔当該tRNAによるCUAのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0133] 別の態様において、 M_1M_2G で表されるコドンは、他のtRNAよりも、本開示に

における M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAによって選択的に翻訳され得る。他のtRNAとは、 M_1M_2G で表されるコドンとは異なるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、例えば M_1M_2U 、 M_1M_2C 、または M_1M_2A のいずれかのコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAであることができる。特定の態様において、 M_1M_2G で表されるコドンは、 M_1M_2U のコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2C のコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2A のコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAのいずれのtRNAよりも、本開示における M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAによって選択的に翻訳され得る。

[0134] 本開示の一態様において、 M_1M_2G で表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るとは、〔当該tRNAによる M_1M_2G のコドンの翻訳量〕が、〔他のtRNAによる M_1M_2G のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、CUGで表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るか否かは、〔当該tRNAによるCUGのコドンの翻訳量〕が〔CUAのコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA（例えばUAGのアンチコドンをもつtRNA）によるCUGのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0135] 本開示の翻訳系は、前記の2つの特徴を併せ持ってもよい。すなわち、特定の態様において、本開示の翻訳系においては、(i) M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAが、他のコドンに比べて、 M_1M_2G で表されるコドンを選択的に翻訳することができ、なおかつ、(ii) M_1M_2G で表されるコドンが、他のtRNAよりも、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAによって選択的に翻訳され得る。このような関係が成立して

いる場合、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを用いたペプチド翻訳と、それ以外のtRNAを用いたペプチド翻訳とが、互いに相互作用を起こさない独立した関係、すなわち直交性を有する（オルソゴナルな）関係にあるということが出来る。本開示の翻訳系において、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAとそれ以外のtRNAとの間に直交性が確立されていることは、重要な特徴の一つになり得る。

[0136] さらに態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに結合しているアミノ酸（以後、本アミノ酸を“アミノ酸-A”とも表記する）と、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに結合しているアミノ酸（以後、本アミノ酸を“アミノ酸-G”とも表記する）とは、アミノ酸の種類が互いに異なる。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAと M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに関して、上述のようなオルソゴナルな関係が成立している場合、本翻訳系においては、 M_1M_2A のコドンとアミノ酸-A、および M_1M_2G のコドンとアミノ酸-Gはいずれも一対一の対応関係にある。すなわち、本開示の翻訳系においては、同じコドンボックス内に存在する(i) M_1M_2A および(ii) M_1M_2G の2つのコドンから、2種類の異なるアミノ酸を翻訳することが可能である。

[0137] 一態様において、本開示における翻訳系は、(a) M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、(b) M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および(c) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAの少なくとも3つのtRNAを含む。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、アンチコドン以外の核酸配列が全て同一であってもよいし、互いに異なってもよい。アンチコドン以外の核酸配列が同一である場合、これら3つのtRNAの物理化学的性質が互いに類似し

たものになり得るため、反応性がより均質で安定した翻訳系を構築できる可能性がある。

[0138] いくつかの態様において、本開示における M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、他のコドンに比べて、 M_1M_2U で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。他のコドンとは、 M_1M_2U で表されるコドンとは異なるコドン、例えば M_1M_2A または M_1M_2G で表されるコドンのいずれかであることができる。特定の態様において、本開示における M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、 M_1M_2A および M_1M_2G で表されるいずれのコドンと比べても、 M_1M_2U で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。

[0139] 本開示の一態様において、あるtRNAが、 M_1M_2U のコドンを選択的に翻訳することができることは、〔当該tRNAによる M_1M_2U のコドンの翻訳量〕が、〔当該tRNAによる他のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、あるtRNAがCUUで表されるコドンを選択的に翻訳することができるか否かは、〔当該tRNAによるCUUのコドンの翻訳量〕が〔当該tRNAによるCUAのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0140] 別の態様において、 M_1M_2U で表されるコドンは、他のtRNAよりも、本開示における M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAによって選択的に翻訳され得る。他のtRNAとは、 M_1M_2U で表されるコドンとは異なるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、例えば M_1M_2A または M_1M_2G のいずれかのコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAであることができる。特定の態様において、 M_1M_2U で表されるコドンは、 M_1M_2A のコドンに相補的なアンチ

コドン有するtRNAおよびM₁M₂Gのコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAのいずれのtRNAよりも、本開示におけるM₁M₂Uで表されるコドンに相補的なアンチコドン有するtRNAによって選択的に翻訳され得る。

[0141] 本開示の一態様において、 M_1M_2U で表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るとは、〔当該tRNAによる M_1M_2U のコドンの翻訳量〕が、〔他のtRNAによる M_1M_2U のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、CUUで表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るか否かは、〔当該tRNAによるCUUのコドンの翻訳量〕が〔CUAのコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNA（例えばUAGのアンチコドンを有するtRNA）によるCUUのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0142] 本開示の翻訳系は、前記の2つの特徴を併せ持ってもよい。すなわち、特定の態様において、本開示の翻訳系においては、(i) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAが、他のコドンに比べて、 M_1M_2U で表されるコドンを選択的に翻訳することができ、なおかつ、(ii) M_1M_2U で表されるコドンが、他のtRNAよりも、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAによって選択的に翻訳され得る。このような関係が成立している場合、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAを用いたペプチド翻訳と、それ以外のtRNAを用いたペプチド翻訳とが、互いに相互作用を起こさない独立した関係、すなわち直交性を有する（オルソゴナルな）関係にあるということが出来る。本開示の翻訳系において、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAとそれ以外のtRNAとの間に直交性が確立されていることは、重要な特徴の一

つになり得る。

[0143] さらに態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ に結合しているアミノ酸（“アミノ酸-A”）、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ に結合しているアミノ酸（“アミノ酸-G”）、および M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ に結合しているアミノ酸（以後、本アミノ酸を“アミノ酸-U”とも表記する）は、アミノ酸の種類がいずれも互いに異なる。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、および M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ に関して、上述のようなオルソゴナルな関係が成立している場合、本翻訳系においては、 M_1M_2A のコドンとアミノ酸-A、 M_1M_2G のコドンとアミノ酸-G、および M_1M_2U のコドンとアミノ酸-Uは、いずれも一対一の対応関係にある。すなわち、本開示の翻訳系においては、同じコドンボックス内に存在する(i) M_1M_2A 、(ii) M_1M_2G 、および(iii) M_1M_2U の3つのコドンから、3種類の異なるアミノ酸を翻訳することが可能である。あるいは、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、3種類の異なるアミノ酸を翻訳することが可能である。

[0144] 一態様において、本開示における翻訳系は、(a) M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、(b) M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、および(c) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ の少なくとも3つの $tRNA$ を含む。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ 、および M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつ $tRNA$ は、アンチコドン以外の核酸配列が全て同一であってもよいし、互いに異なってもよい。アンチコドン以外の核酸配列が同一である場合、これら3つの $tRNA$ の物理化学的性質が互いに類似したものになり得るため、反応性がより均質で安定した翻訳系を構築できる可

能性がある。

- [0145] いくつかの態様において、本開示における M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、他のコドンに比べて、 M_1M_2C で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。他のコドンとは、 M_1M_2C で表されるコドンとは異なるコドン、例えば M_1M_2A または M_1M_2G で表されるコドンのいずれかであることができる。特定の態様において、本開示における M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAは、 M_1M_2A および M_1M_2G で表されるいずれのコドンと比べても、 M_1M_2C で表されるコドンを選択的に翻訳することができる。
- [0146] 本開示の一態様において、あるtRNAが、 M_1M_2C のコドンを選択的に翻訳することができることは、〔当該tRNAによる M_1M_2C のコドンの翻訳量〕が、〔当該tRNAによる他のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、あるtRNAがCUCで表されるコドンを選択的に翻訳することができるか否かは、〔当該tRNAによるCUCのコドンの翻訳量〕が〔当該tRNAによるCUAのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。
- [0147] 別の態様において、 M_1M_2C で表されるコドンは、他のtRNAよりも、本開示における M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAによって選択的に翻訳され得る。他のtRNAとは、 M_1M_2C で表されるコドンとは異なるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、例えば M_1M_2A または M_1M_2G のいずれかのコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAであることができる。特定の態様において、 M_1M_2C で表されるコドンは、 M_1M_2A のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAおよび M_1M_2G のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA

AのいずれのtRNAよりも、本開示における M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAによって選択的に翻訳され得る。

[0148] 本開示の一態様において、 M_1M_2C で表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るとは、〔当該tRNAによる M_1M_2C のコドンの翻訳量〕が、〔他のtRNAによる M_1M_2C のコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いことを意味する。一例として、CUCで表されるコドンが、あるtRNAによって選択的に翻訳され得るか否かは、〔当該tRNAによるCUCのコドンの翻訳量〕が〔CUAのコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA（例えばUAGのアンチコドンをもつtRNA）によるCUCのコドンの翻訳量〕よりも、例えば2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、あるいは100倍以上多いか否かによって判断することができる。

[0149] 本開示の翻訳系は、前記の2つの特徴を併せ持ってもよい。すなわち、特定の態様において、本開示の翻訳系においては、(i) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAが、他のコドンに比べて、 M_1M_2C で表されるコドンを選択的に翻訳することができ、なおかつ、(ii) M_1M_2C で表されるコドンが、他のtRNAよりも、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAによって選択的に翻訳され得る。このような関係が成立している場合、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを用いたペプチド翻訳と、それ以外のtRNAを用いたペプチド翻訳とが、互いに相互作用を起こさない独立した関係、すなわち直交性を有する（オルソゴナルな）関係にあるということが出来る。本開示の翻訳系において、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA Aとそれ以外のtRNAとの間に直交性が確立されていることは、重要な特徴の一つになり得る。

- [0150] さらに態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに結合しているアミノ酸（“アミノ酸-A”）、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに結合しているアミノ酸（“アミノ酸-G”）、および M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに結合しているアミノ酸（以後、本アミノ酸を“アミノ酸-C”とも表記する）は、アミノ酸の種類がいずれも互いに異なる。本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAに関して、上述のようなオルソゴナルな関係が成立している場合、本翻訳系においては、 M_1M_2A のコドンとアミノ酸-A、 M_1M_2G のコドンとアミノ酸-G、および M_1M_2C のコドンとアミノ酸-Cはいずれも一対一の対応関係にある。すなわち、本開示の翻訳系においては、同じコドンボックス内に存在する(i) M_1M_2A 、(ii) M_1M_2G 、および(iii) M_1M_2C の3つのコドンから、3種類の異なるアミノ酸を翻訳することが可能である。あるいは、本開示の翻訳系においては、 M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、3種類の異なるアミノ酸を翻訳することが可能である。
- [0151] いくつかの態様において、本開示における M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、および M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNAのうち、少なくとも一つに非天然アミノ酸が結合していてもよい。
- [0152] いくつかの態様において、遺伝暗号表における少なくとも1つのコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。さらに態様において、遺伝暗号表における複数のコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。複数のコドンボックスとしては、例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、または16個のコドンボックスであることができ

る。それぞれのtRNAがどのコドンボックスを構成するコドンに割り当てられるかは、当該tRNAが有するアンチコドンの2文字目のヌクレオシド (N_2) および3文字目のヌクレオシド (N_3) によって決定される。異なるコドンボックスを構成するコドンに割り当てられるtRNAどうしであれば、互いに異なる N_2 および N_3 を有している。また、異なるコドンボックスを構成するコドンに割り当てられるtRNAどうしは、アンチコドン以外の核酸配列が同一であってもよいし、互いに異なってもよい。アンチコドン以外の核酸配列が同一である場合、これらのtRNAの物理化学的性質が互いに類似したものになり得るため、反応性がより均質で安定した翻訳系を構築できる可能性がある。

[0153] 特定の態様において、遺伝暗号表における以下の(i)~(x)から選択される少なくとも1つのコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。さらなる態様において、遺伝暗号表における以下の(i)~(x)から選択される少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。

- (i) コドンがUUM₃で表されるコドンボックス、
- (ii) コドンがUAM₃で表されるコドンボックス、
- (iii) コドンがUGM₃で表されるコドンボックス、
- (iv) コドンがCAM₃で表されるコドンボックス、
- (v) コドンがCGM₃で表されるコドンボックス、
- (vi) コドンがAUM₃で表されるコドンボックス、
- (vii) コドンがACM₃で表されるコドンボックス、
- (viii) コドンがAAM₃で表されるコドンボックス、
- (ix) コドンがAGM₃で表されるコドンボックス、
- (x) コドンがGAM₃で表されるコドンボックス。

[0154] 特定の態様において、遺伝暗号表における以下の(i)~(vii)から選択される少なくとも1つのコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。さらなる態様において、遺伝暗号表における以下

の(i)～(vii)から選択される少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、または7個のコドンボックスを構成するコドンに、本開示のtRNAが割り当てられていてもよい。

- (i) コドンがUUM₃で表されるコドンボックス、
- (ii) コドンがUGM₃で表されるコドンボックス、
- (iii) コドンがCAM₃で表されるコドンボックス、
- (iv) コドンがCGM₃で表されるコドンボックス、
- (v) コドンがAAM₃で表されるコドンボックス、
- (vi) コドンがAGM₃で表されるコドンボックス、
- (vii) コドンがGAM₃で表されるコドンボックス。

[0155] いくつかの態様において、本開示のtRNAが割り当てられなかった残りのコドンボックスを構成するコドンに対しては、任意のtRNAを割り当てることができる。望ましくは、残りのコドンボックスを構成するコドンに対して、各コドンを何らかのアミノ酸に翻訳可能な任意のtRNAのセットが割り当てられる。そのようなtRNAのセットは、天然tRNAに由来するものであってもよいし、人工的に合成されたtRNAであってもよい。

[0156] いくつかの態様において、本開示の翻訳系から、1種類、2種類、3種類、4種類、5種類、6種類、7種類、8種類、9種類、10種類、11種類、12種類、13種類、14種類、15種類、16種類、17種類、18種類、19種類、または20種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することができる。あるいは、本開示のtRNAを用いて、1つのコドンボックスにおけるM₁M₂AとM₁M₂Gのコドン、M₁M₂U、M₁M₂AおよびM₁M₂Gのコドン、またはM₁M₂C、M₁M₂AおよびM₁M₂Gのコドンの読み分けを行えば、20種類より多くのアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することも可能である。さらなる態様において、本開示の翻訳系から、例えば21種類、22種類、23種類、24種類、25種類、26種類、27種類、28種類、29種類、30種類、31種類、32種類、33種類、34種類、35種類、36種類、37種類、38種類、39種類、40種類、41種類、42種類、43種類、44種類、45種類、46種類、47種類、または48種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳することが可能であ

る。

- [0157] いくつかの態様において、本開示の翻訳系は、無細胞翻訳系である。さらなる態様において、本開示の翻訳系は、再構成型の無細胞翻訳系である。無細胞翻訳系における細胞抽出液やペプチド翻訳に必要な因子（例えばリボソームなど）は、種々の生物材料に由来するものを利用することができる。そのような生物材料として、例えば、大腸菌、酵母、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、HeLa細胞、あるいは昆虫細胞などを挙げることができる。いくつかの態様において、本開示の無細胞翻訳系は、大腸菌由来のリボソームを含む。
- [0158] いくつかの態様において本開示の翻訳系は、一コドンあたりのtRNA（各コドンに対応するtRNA）を、 $0.8\mu\text{M}$ 、 $1.6\mu\text{M}$ 、 $2.4\mu\text{M}$ 、 $3.2\mu\text{M}$ 、 $4.0\mu\text{M}$ 、 $4.8\mu\text{M}$ 、 $5.6\mu\text{M}$ 、 $6.4\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ からなる群より選択される下限、および、 $100\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ 、 $350\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $450\mu\text{M}$ 、 $500\mu\text{M}$ 、 $550\mu\text{M}$ 、 $600\mu\text{M}$ 、 $650\mu\text{M}$ 、 $700\mu\text{M}$ 、 $750\mu\text{M}$ 、 $800\mu\text{M}$ 、 $850\mu\text{M}$ 、 $900\mu\text{M}$ 、 $950\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ からなる群より選択される上限によって特定可能な範囲の濃度で含むことができる。具体的には、例えば、 $0.8\sim 1000\mu\text{M}$ 、好ましくは $1.6\sim 500\mu\text{M}$ 、より好ましくは $3.2\sim 250\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $6.4\sim 150\mu\text{M}$ 、特に好ましくは $10\sim 100\mu\text{M}$ の濃度で含むことができる。
- [0159] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)であるコドンである。すなわち、コドンが UUM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、UUAおよびUUGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、UUU、UUA、UUGのコドンの組合せ、またはUUC、UUA、UUGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。これらのコドンを選択的に翻訳するためには、本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコド

ンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8～1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0160] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がアデノシン(A)であるコドンである。すなわち、コドンが UAM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、UAAおよびUAGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、UAU、UAA、UAGのコドンの組合せ、または UAC、UAA、UAGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞

翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化するには、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0161] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)であるコドンである。すなわち、コドンがUG M_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、UGAおよびUGGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、UGU、UGA、UGGのコドンの組合せ、またはUGC、UGA、UGGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化するには、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、

天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0162] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)であるコドンである。すなわち、コドンが CAM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、CAAおよびCAGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、CAU、CAA、CAGのコドンの組合せ、またはCAC、CAA、CAGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0163] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)であるコドンである。すなわち、コドンが CGM_3 で

表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、CGAおよびCGGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、CGU、CGA、CGGのコドンの組合せ、またはCGC、CGA、CGGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μ Mの範囲内であることが好ましい。

[0164] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がウリジン(U)であるコドンである。すなわち、コドンが AUM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、AUAおよびAUGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、AUU、AUA、AUGのコドンの組合せ、またはAUC、AUA、AUGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的

に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0165] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がシチジン(C)であるコドンである。すなわち、コドンが ACM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、ACAおよびACGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、ACU、ACA、ACGのコドンの組合せ、またはACC、ACA、ACGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、

シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μ Mの範囲内であることが好ましい。

[0166] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)であるコドンである。すなわち、コドンが AAM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、AAAおよびAAGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、AAU、AAA、AAGのコドンの組合せ、またはAAC、AAA、AAGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されていることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdC

pA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μ Mの範囲内であることが好ましい。

[0167] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)であるコドンである。すなわち、コドンが AGM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、AGAおよびAGGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、AGU、AGA、AGGのコドンの組合せ、またはAGC、AGA、AGGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドン

あたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0168] 特定の態様において、本開示の翻訳系におけるコドンは、 M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)であるコドンである。すなわち、コドンが GAM_3 で表されるコドンボックスに本開示のtRNAを割り当てることができる。本開示におけるtRNAを含む翻訳系を用いることにより、GAAおよびGAGのコドンの組合せから2種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。あるいは、GAU、GAA、GAGのコドンの組合せ、またはGAC、GAA、GAGのコドンの組合せから3種類のアミノ酸を選択的に翻訳することができる。本開示のtRNAとして、人工的に合成したtRNA（例えば転写合成したtRNA）を用いることが好ましい。その場合、天然のtRNAの配列を用いる他、アンチコドン以外の部分に任意のtRNA（例えばtRNA(Glu)、tRNA(AsnE2)、tRNA(Asp)など）に由来する配列を用いて、そこに所望のアンチコドンの配列を連結して用いることもできる。本開示のtRNAは、アンチコドンの部分も含めて、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、ウリジン(U)の4種類のヌクレオシドのみから構成されることが好ましく、それら以外の修飾ヌクレオシドは含まれていないことが望ましい。本開示の翻訳系としては、無細胞翻訳系、特に再構成型の無細胞翻訳系が好ましい。各tRNAをアミノアシル化する際には、翻訳系外でアミノ酸を結合させることが好ましく、そのための方法として、例えばpCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法が好ましい。各tRNAに結合させるアミノ酸としては、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のどちらも用いることができるが、天然の遺伝暗号表には含まれていない非天然アミノ酸を用いることが本開示の目的の観点からも望ましい。翻訳系中に含まれる本開示のtRNAの一コドンあたりの濃度は、例えば0.8~1000 μM の範囲内であることが好ましい。

[0169] 1.1.1. ペプチドの製造方法、組成物およびキット

一局面において、本開示は、ペプチドの製造方法であって、本開示における翻訳系を用いて核酸を翻訳することを含む方法を提供する。具体的には、本開示は、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、お

よび、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを含む翻訳系において核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法に関する。一局面において、本開示においては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。一局面において、前記2種類のtRNAのそれぞれには互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合されている。また一局面において、本開示における製造方法においては、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンから少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳され得る。

[0170] 一局面において、本開示は、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを含む翻訳系において核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法に関する。また一局面において、本開示は、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを含む翻訳系において核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法に関する。一局面において、本開示においては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。一局面において、前記3種類のtRNAのそれぞれには互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合されている。また一局面において、本開示における製造方法においては、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳され得る。

[0171] 本開示における核酸には、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンがそれぞれ一個または複数個含まれ得る。本開示におけるペプチドの製

造方法は、本開示におけるtRNAが、当該核酸に含まれ得る M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一回または複数回、選択的に翻訳するプロセス（あるいは読み分けるプロセス）を含み得る。一態様において、本開示におけるペプチドの製造方法においては、これらのコドンを含む1種または複数種の核酸が翻訳され得る。

[0172] 本開示における核酸には、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンがそれぞれ一個または複数個含まれ得る。本開示におけるペプチドの製造方法は、本開示におけるtRNAが、当該核酸に含まれ得る M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一回または複数回、選択的に翻訳するプロセス（あるいは読み分けるプロセス）を含み得る。一態様において、本開示におけるペプチドの製造方法においては、これらのコドンを含む1種または複数種の核酸が翻訳され得る。

[0173] 本開示における核酸には、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンがそれぞれ一個または複数個含まれ得る。本開示におけるペプチドの製造方法は、本開示におけるtRNAが、当該核酸に含まれ得る M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一回または複数回、選択的に翻訳するプロセス（あるいは読み分けるプロセス）を含み得る。一態様において、本開示におけるペプチドの製造方法においては、これらのコドンを含む1種または複数種の核酸が翻訳され得る。

[0174] 本開示における核酸には、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンがそれぞれ一個または複数個含まれ得る。本開示におけるペプチドの製造方法は、本開示におけるtRNAが、当該核酸に含まれ得る M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一回または複数回、選択的に翻訳するプロセス（あるいは読み分けるプロセス）を含み得る。一態様において、本開示におけるペプチドの製造方法においては

、これらのコドンを含む1種または複数種の核酸が翻訳され得る。

[0175] 一局面において、本開示は、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドン
を有するtRNA、および、 M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドン
を有するtRNAを含む、ペプチドを製造するための組成物およびキットに関する
。一局面において、本開示においては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字
目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノ
シン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかか
ら選択される。一局面において、前記2種類のtRNAのそれぞれには互いに異なる
アミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合されている。また一局面において、
本開示における組成物およびキットを使用することにより、 M_1M_2U で表される
コドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表さ
れるコドンから少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳され
得る。

[0176] 一局面において、本開示は、 M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコ
ドンに有するtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンに有するtRN
A、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンに有するtRNAを含む
、ペプチドを製造するための組成物およびキットに関する。また一局面にお
いて、本開示は、 M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンに有するtRN
A、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンに有するtRNA、および M_1M_2G
で表されるコドンに相補的なアンチコドンに有するtRNAを含む、ペプチドを
製造するための組成物およびキットに関する。一局面において、本開示にお
いては、 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシド
を表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シ
チジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択される。一局面において、
前記3種類のtRNAのそれぞれには互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体
が結合されている。また一局面において、本開示における製造方法において
は、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン
、および M_1M_2G で表されるコドンから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミ

ノ酸類縁体が翻訳され得る。

[0177] 本開示における翻訳系を構成するtRNAは、核酸の翻訳に通常用いられるバッファーや物質などを含む組成物を構成することができる。また本開示における翻訳系を構成するtRNAは、ペプチドの翻訳に通常用いられる各種の物質などとともにあらかじめパッケージングしてキットとして供給することができる。またキットに含まれる各種の物質は、その使用態様に応じて粉末状あるいは液状とすることができる。またこれらを適当な容器に収納し、適時に使用することができる。

[0178] 本開示においては、2つ以上のアミノ酸がアミド結合によって結合した化合物が、本開示のペプチドに含まれ得る。また、アミノ酸の代わりにヒドロキシカルボン酸などのアミノ酸類縁体がエステル結合によって結合した化合物も、本開示のペプチドに含まれ得る。ペプチドに含まれるアミノ酸またはアミノ酸類縁体の数は2個以上であれば特に限定されないが、例えば2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上などが挙げられ、また、100個以下、80個以下、50個以下、30個以下、25個以下、20個以下、19個以下、18個以下、17個以下、16個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下などが挙げられる。あるいは、9個、10個、11個、12個の中から選択することもできる。

[0179] 一局面において、本開示における組成物およびキットには核酸が含まれていてもよい。一態様において、本開示における組成物およびキットを構成する核酸は、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含むことができる。また一局面において、本開示における組成物およびキットを構成する核酸は、(i) M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドン、または、(ii) M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドン、および M_1M_2G で表されるコドンをそれぞれ一個または複数個含むことができる。また一局面において、本開示における組成物およびキットを構成する核酸は、 M_1M_2A で表されるコドン、 M_1M_2G で表されるコドン、 M_1M_2U で表されるコドン、および M_1M_2C で表されるコドンをそ

れぞれ一個または複数個含むことができる。一態様において、本開示における組成物およびキットは、このような核酸を1種または複数種含むことができる。

- [0180] 一態様において、本開示のペプチドは、N置換アミノ酸を含んでいてもよく、ペプチドに含まれるN置換アミノ酸の数は、例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個などであることができる。また、別の態様において、本開示のペプチドは、N置換されていないアミノ酸を含んでいてもよく、N置換されていないアミノ酸の数は、例えば1個、2個、3個、4個などであることができる。さらなる態様において、本開示のペプチドは、N置換アミノ酸とN置換されていないアミノ酸の両方を含んでいてもよい。
- [0181] いくつかの態様において、本開示のペプチドは、直鎖状のペプチドであってもよいし、環状部を有するペプチドであってもよい。環状部を有するペプチドとは、ペプチド鎖上に存在するあるアミノ酸またはアミノ酸類縁体の主鎖あるいは側鎖が、同じペプチド鎖上に存在する別のアミノ酸またはアミノ酸類縁体の主鎖あるいは側鎖と結合することによって、分子内に環状構造が形成されたペプチドを意味する。環状部を有するペプチドは、環状部のみから構成されていてもよいし、環状部と直鎖部をともに含んでいてもよい。環状部に含まれるアミノ酸またはアミノ酸類縁体の数は、例えば4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上などであり、また、14個以下、13個以下、12個以下、11個以下などであることができる。あるいは、9個、10個、11個の中から選択することもできる。また、直鎖部に含まれるアミノ酸またはアミノ酸類縁体の数は、例えば0個以上であり、また、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下などであることができる。あるいは、0個、1個、2個、3個の中から選択することもできる。
- [0182] 環状部を形成するための結合としては、例えば、アミノ基とカルボキシル基から形成されるペプチド結合を利用することができる。それ以外にも、適切な官能基の組合せから形成されるアミド結合、ジスルフィド結合、エーテル結合、チオエーテル結合、エステル結合、チオエステル結合、炭素-炭素

結合、アルキル結合、アルケニル結合、ホスホネートエーテル結合、アゾ結合、アミン結合、 $C=N-C$ 結合、ラクタム架橋、カルバモイル結合、尿素結合、チオ尿素結合、チオアミド結合、スルフィニル結合、スルホニル結合、トリアゾール結合、ベンゾオキサゾール結合などを利用することができる。炭素-炭素結合は、鈴木（Suzuki）反応、ヘック（Heck）反応、菌頭（Sonogashira）反応などの遷移金属を触媒とした反応によって形成することができる。一態様において、本開示のペプチドは、分子内において上記の結合を形成することが可能な少なくとも1組の官能基を含んでいる。環状部の形成は、本開示の翻訳系を用いて直鎖状のペプチドが製造された後に、上記の官能基どうしを結合させるための反応を別途行うことによってなされてもよい。環状部を有するペプチドの合成については、W02013/100132、W02012/026566、W02012/033154、W02012/074130、W02015/030014、W02018/052002、Comb Chem High Throughput Screen (2010)13: 75-87、Nat Chem Biol (2009) 5: 502-507、Nat Chem Biol (2009) 5: 888-90、Bioconjug Chem (2007) 18: 469-476、ChemBioChem (2009) 10: 787-798、Chem Commun (Camb) (2011) 47: 9946-9958なども参照することができる。

[0183] いくつかの態様において、本開示の翻訳系において翻訳される核酸はmRNAである。mRNAには、所望のアミノ酸配列を有するペプチドがコードされていてもよい。mRNAを本開示の翻訳系に添加することによって、当該mRNAのペプチドへの翻訳を行うことができる。一方、DNAをmRNAに転写するためのRNAポリメラーゼが翻訳系に含まれている場合、DNAを本開示の翻訳系に添加することによって、当該DNAのmRNAへの転写、および当該mRNAのペプチドへの翻訳を併せて行うことができる。mRNAは少なくとも、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドン、 M_1M_2U で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドン、または、 M_1M_2C で表されるコドン、 M_1M_2A で表されるコドンおよび M_1M_2G で表されるコドンを含むものであってよい。

[0184] 翻訳されるペプチドのN末端には通常、開始アミノ酸としてメチオニンが存在しているが、メチオニン以外のアミノ酸をN末端に導入するための方法

もいくつか報告されている。それらを本開示におけるペプチドの製造方法と組み合わせて用いてもよい。そのような方法として、例えば、メチオニン以外のアミノ酸でアミノアシル化された開始tRNAを用いて、所望のアミノ酸から開始される核酸を翻訳する方法が挙げられる (Initiation suppression)。特に、外来性のアミノ酸を許容し得る程度としては、ペプチド鎖の伸長時よりも翻訳開始時の方が高いことから、N末端では、天然アミノ酸と大きく構造の異なるアミノ酸であっても利用できる可能性がある (Goto & Suga, J Am Chem Soc (2009) 131(14): 5040-5041)。他の方法として、翻訳系から開始メチオニルtRNAを除去することにより、あるいは、開始アミノ酸をメチオニン以外の翻訳効率の低いアミノ酸に置き換えることにより、2番目以降のコドンから翻訳を開始する方法が挙げられる (Initiation read-through; 開始コドンの読み飛ばし)。さらに別法として、ペプチドデホルミラーゼ (peptide deformylase) およびメチオニンアミノペプチダーゼ (Methionine aminopeptidase) などの酵素を作用させることによって、ペプチドのN末端のメチオニンを削除する方法を挙げることにもできる (Meinzel et al., Biochimie (1993) 75: 1061-1075)。メチオニンから開始されるペプチドライブラリーを用意し、これに上記の酵素を作用させることによって、N末端がランダムなアミノ酸から開始されるペプチドライブラリーを調製することができる。

[0185] 別の局面において、本開示は、本開示におけるペプチドの製造方法によって製造されたペプチドを提供する。本開示における方法により製造されたペプチドに対して、さらに化学修飾を行うなどして得られたペプチドもまた、本開示が提供するペプチドに含まれる。

[0186] 一局面において、本開示は、ペプチドライブラリーの製造方法であって、本開示における翻訳系を用いて核酸ライブラリーを翻訳することを含む方法を提供する。ペプチドをそれぞれコードする核酸分子であって、核酸配列の多様性に富んだ複数の核酸分子を用意し、それらをそれぞれペプチドに翻訳することによって、アミノ酸配列の多様性に富んだ複数のペプチド分子を製造することができる。ライブラリーのサイズは特に限定されないが、例えば

、 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、 10^{10} 以上、 10^{11} 以上、 10^{12} 以上、 10^{13} 以上、 10^{14} 以上などであることができる。核酸はDNAであってもよいし、RNAであってもよい。RNAは通常mRNAである。DNAはmRNAへの転写を介してペプチドへの翻訳が行われる。そのような核酸ライブラリーは、当業者に公知の方法またはそれに準ずる方法によって調製することができる。核酸ライブラリーを合成する際、所望の位置に混合塩基を用いることによって、核酸配列の多様性に富んだ複数の核酸分子を容易に調製することができる。混合塩基を用いたコドンの例として、例えばNNN（ここで、NはA、T、G、Cの4塩基の混合を表す）やNNW（ここで、WはA、Tの2塩基の混合を表す）、NNM（ここで、WはA、Cの2塩基の混合を表す）、NNK（ここで、KはG、Tの2塩基の混合を表す）、NNS（ここで、SはC、Gの2塩基の混合を表す）などを挙げることができる。あるいは、コドンの3文字目で用いられる塩基を、A、T、G、Cのうちのいずれか1種類に限定することで、一部の特定のアミノ酸のみがコードされた核酸ライブラリーを合成することも可能である。さらに、混合塩基を含むコドンを作成する際、複数の塩基を等比ではなく異なる比率で混合することによって、そのコドンから得られるアミノ酸の出現頻度を任意に調節することも可能である。上記のようなコドンを1単位（ユニット）として、種類の異なるコドンユニットを複数用意し、それらを所望の順序で連結すれば、含まれるアミノ酸の出現位置や出現頻度が制御されたライブラリーをデザインすることも可能となる。

[0187] いくつかの態様において、本開示におけるペプチドライブラリーは、ペプチドが核酸上に提示されたライブラリー（核酸ディスプレイライブラリー、あるいは単にディスプレイライブラリー）である。ディスプレイライブラリーは、ペプチドとそれをコードする核酸が結合して1つの複合体を形成することによって、表現型と遺伝子型が対応付けられていることを特徴とするライブラリーである。主なディスプレイライブラリーの例として、mRNAディスプレイ法 (Roberts and Szostak, Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94: 12297-12302)、in vitroウィルス法 (Nemoto et al., FEBS Lett (1997) 414: 405

-408)、cDNAディスプレイ法 (Yamaguchi et al., Nucleic Acids Res (2009) 37: e108)、リボソームディスプレイ法 (Mattheakis et al, Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91: 9022-9026)、covalentディスプレイ法 (Reiersen et al., Nucleic Acids Res (2005) 33: e10)、CISディスプレイ法 (Odegrip et al., Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101: 2806-2810) などで作製されたライブラリーを挙げることができる。あるいは、in vitro compartmentalization法 (Tawfik and Griffiths, Nat Biotechnol (1998) 16: 652-656) を用いて作製されたライブラリーも、ディスプレイライブラリーの一態様として挙げるができる。

[0188] 別の局面において、本開示は、本開示におけるペプチドライブラリーの製造方法によって製造されたペプチドライブラリーを提供する。

[0189] 一局面において、本開示は、標的分子に対して結合活性を有するペプチドの同定方法であって、本開示におけるペプチドライブラリーに標的分子を接触させることを含む方法を提供する。標的分子は特に限定されず、例えば低分子化合物、高分子化合物、核酸、ペプチド、タンパク質、糖、脂質などの中から適宜選択することができる。標的分子は細胞外に存在する分子であってもよく、細胞内に存在する分子であってもよい。あるいは細胞膜に存在する分子であってもよく、その場合、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインのいずれが標的となってもよい。ペプチドライブラリーと標的分子を接触させる工程において、通常、標的分子は何らかの固相担体（例えばマイクロタイタープレートやマイクロビーズなど）に固定される。その後、標的分子に結合していないペプチドを除去して、標的分子に結合しているペプチドのみを回収することによって、標的分子に対して結合活性を有するペプチドを選択的に濃縮することができる（パニング法）。用いたペプチドライブラリーが核酸ディスプレイライブラリーの場合、回収されたペプチドにその遺伝情報がコードされた核酸が結合しているので、それらを単離し解析することによって、回収されたペプチドをコードする核酸配列およびアミノ酸配列を容易に同定することができる。さらに、得られた核酸配列あるいは

アミノ酸配列をもとに、化学合成あるいは遺伝子組み換え手法などにより、同定されたペプチドを個別に製造することもできる。

[0190] 一局面において、本開示は、ペプチドおよび該ペプチドをコードする核酸を含む核酸－ペプチド複合体であって、以下の特徴を有する複合体を提供する：

(i) ペプチドをコードする核酸配列の中に、 M_1M_2A および M_1M_2G の2つのコドンが含まれていて、かつ、

(ii) ペプチドのアミノ酸配列において、 M_1M_2A のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体および M_1M_2G のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の種類が互いに異なる。

ここで、 M_1 および M_2 は、ある特定のコードンの1文字目および2文字目をそれぞれ表す（ただし、 M_1 がAであり、かつ M_2 がUであるコドンは除く）。

[0191] さらに局面において、本開示は、ペプチドおよび該ペプチドをコードする核酸を含む核酸－ペプチド複合体であって、以下の特徴を有する複合体を提供する：

(i) ペプチドをコードする核酸配列の中に、 M_1M_2U 、 M_1M_2A および M_1M_2G の3つのコドンが含まれていて、かつ、

(ii) ペプチドのアミノ酸配列において、 M_1M_2U のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体、 M_1M_2A のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体、および M_1M_2G のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の種類がいずれも互いに異なる。

ここで、 M_1 および M_2 は、ある特定のコードンの1文字目および2文字目をそれぞれ表す。

[0192] 別の局面において、本開示は、ペプチドおよび該ペプチドをコードする核酸を含む核酸－ペプチド複合体であって、以下の特徴を有する複合体を提供する：

(i) ペプチドをコードする核酸配列の中に、 M_1M_2C 、 M_1M_2A および M_1M_2G の3つのコドンが含まれていて、かつ、

(ii) ペプチドのアミノ酸配列において、 M_1M_2G のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体、 M_1M_2A のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体、および M_1M_2G のコドンに対応するアミノ酸またはアミノ酸類縁体の種類がいずれも互いに異なる。

ここで、 M_1 および M_2 は、ある特定のコードンの1文字目および2文字目をそれぞれ表す。

[0193] いくつかの態様において、上述の核酸-ペプチド複合体は、ペプチドライブラリー（特に核酸ディスプレイライブラリー）を構成する要素の1つとしてそこに含まれ得る。一態様において、本開示は、本開示における核酸-ペプチド複合体を含むライブラリー（ペプチドライブラリーあるいは核酸ディスプレイライブラリー）を提供する。特定の態様において、上述の核酸-ペプチド複合体およびライブラリーは、本開示におけるtRNA、あるいは本開示における翻訳系を用いて作製され得る。

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

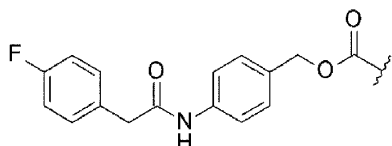
[0194] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

なお、実施例中では以下の略号を使用した。

AA	酢酸アンモニウム
CH_2CN	シアノメチル基
DBU	1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]-7-ウンデセン
DCM	ジクロロメタン
DIC	N, N-ジイソプロピルカルボジイミド
DIEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
FA	ギ酸

Fmoc 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基

F-PnAz 4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジ
ルオキシカルボニル基:



HFIP 1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール

MeCN アセトニトリル

NMP N-メチル-2-ピロリドン

TEA トリエチルアミン

TFA トリフルオロ酢酸

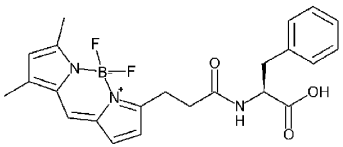
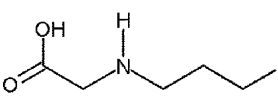
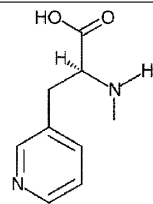
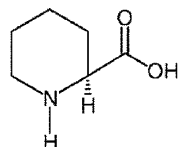
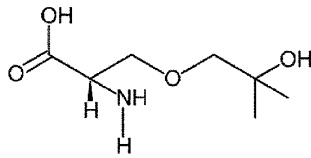
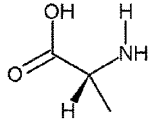
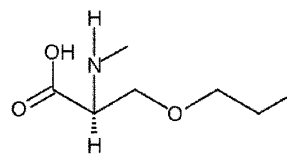
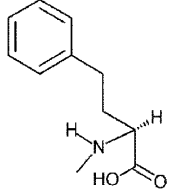
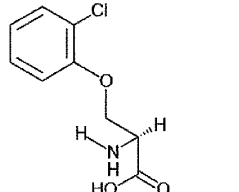
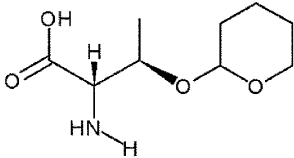
TFE 2, 2, 2-トリフルオロエタノール

THF テトラヒドロフラン

[0195] また、本実施例では、以下の略号を用いた。GlyまたはG（グリシン）、IleまたはI（イソロイシン）、LeuまたはL（ロイシン）、PheまたはF（フェニルアラニン）、ProまたはP（プロリン）、ThrまたはT（トレオニン）。これらに加えて、表2に記載の略号を用いた。

[0196]

[表2]

Biocode	Structure	Biocode	Structure
BdpFL -Phe		nBuG	
MeA3Pyr		Pic2	
StBuOH		dA	
MeSnPr		MeHph	
SPh2Cl		Thr (THP)	

[0197] また、LCMSの分析条件を、下記の表3に示す。

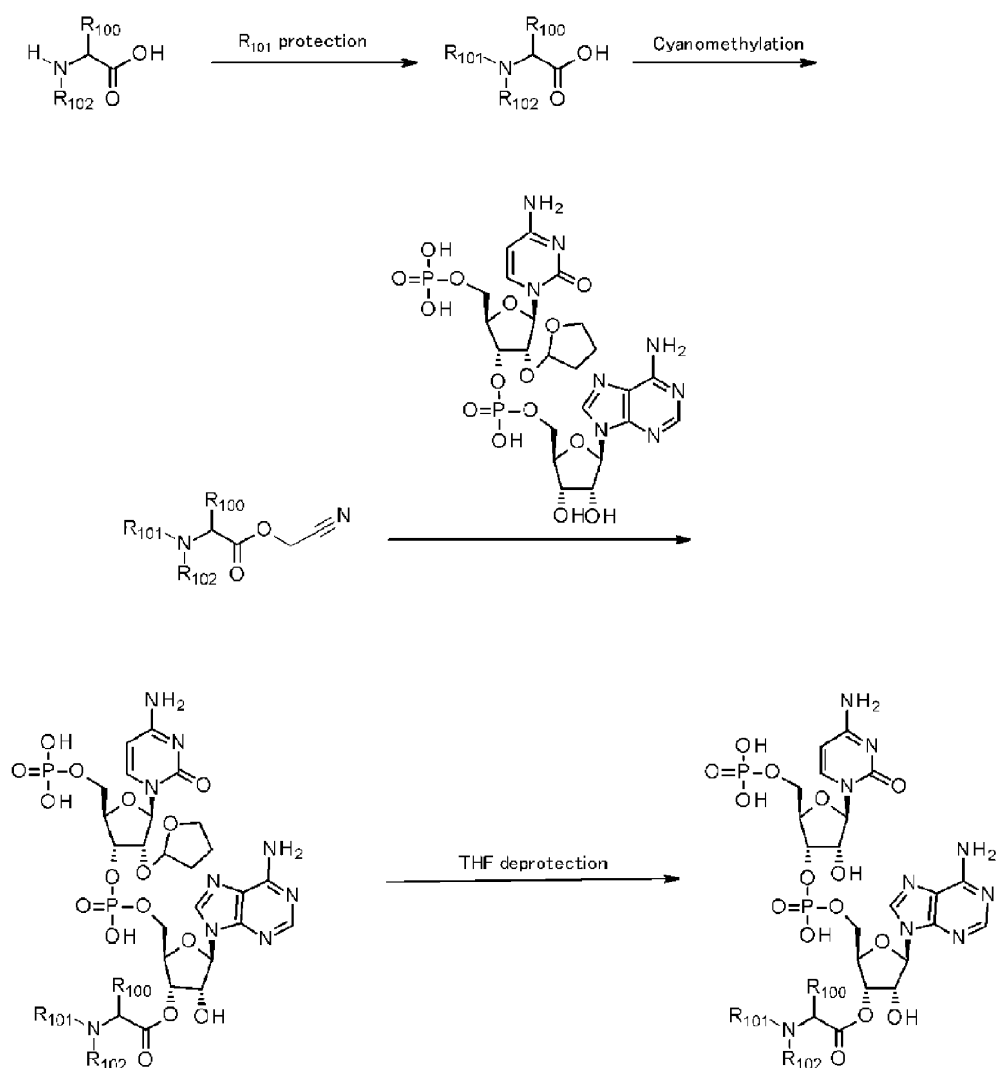
[0198]

[表3]

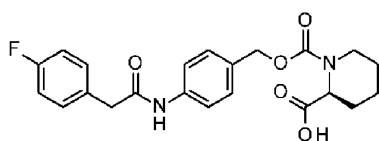
分取条件	装置	カラム (I.D. x 長さ (mm))	移動相	勾配 (A/B)	流速 (ml/分)	カラム温度 (°C)	波長
SOD FA05_01	Acquity UPLC/SOD	Aldrich Ascentis Express C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.0分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.4分 間)	1	35	210-400nm PDA total
SOD FA05_02	Acquity UPLC/S002	Aldrich Ascentis Express C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.0分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.4分 間)	0.9	35	210-400nm PDA total
SMD method 1	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6 μ m (3.0 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA, CH3CN	90/10 $\Rightarrow$ 0/100 (1.2 分間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 間)	1.5	40	190-400nm PDA total
SMD method 2	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	kinetex 2.6u XB-C18 100A 2.6 μ m (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 間)	1.0	40	190-400nm PDA total
SMD method 3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20AD	Shim-pack XR-0DS 2.2 μ m (3.0 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.6分 間)	1.2	40	190-400nm PDA total
SMD method 4	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTEOS C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA, CH3CN	90/10 $\Rightarrow$ 0/100 (1.2 分間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 間)	1.0	40	190-400nm PDA total
SMD method 5	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	Ascentis Express C18 2.7 μ m (2.1 x 50)	A) 0.05% TFA, H2O B) 0.05% TFA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 間)	1.0	40	190-400nm PDA total

[0199] 実施例 1. 無細胞翻訳系に用いるpCpA-アミノ酸の合成

以下のスキームに従い、アミノアシル化pCpA(SS14、SS15、SS16、SS48、SS49、SS50、SS51)を合成した。



[0200] (S)-1-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)ピペリジン-2-カルボン酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-0H)の合成



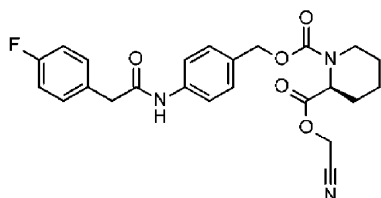
[0201] 窒素雰囲気下、(S)-ピペリジン-2-カルボン酸(42.6 mg、0.33 mmol)、特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(140 mg、0.44 mmol)の混合物に室温にてDMF(330 μ L)を添加した。室温で5分攪拌した後、トリ

エチルアミン(105.6 μ L、2.25 mmol)を0℃にて添加した。反応混合物を室温において30分間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-1-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)ピペリジン-2-カルボン酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-OH)(92 mg、67%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 413 (M-H)-

保持時間：0.70分(分析条件SQDFA05_01)

[0202] (S)-ピペリジン-1,2-ジカルボン酸 1-(4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル) 2-(シアノメチル)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-OCH₂CN)の合成



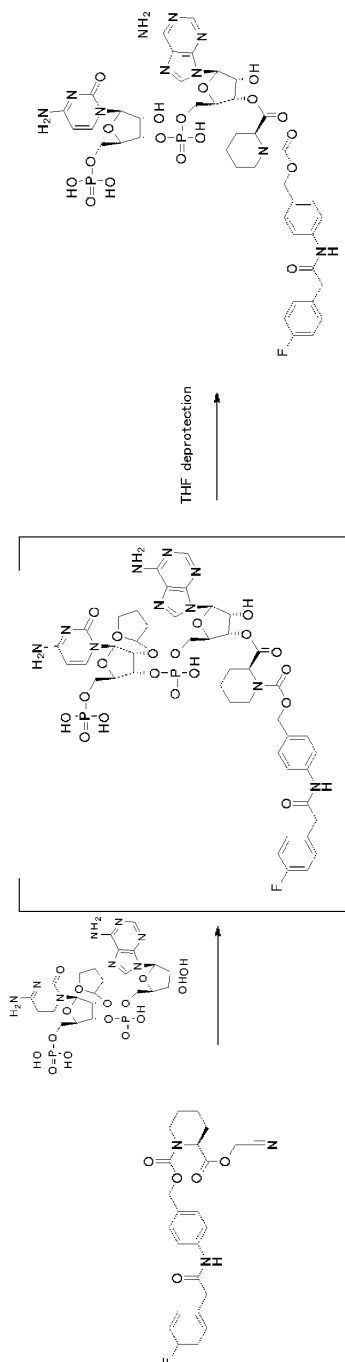
[0203] 窒素雰囲気下、((S)-1-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)ピペリジン-2-カルボン酸(化合物SS17、F-Pnaz-Pic2-OH)(30 mg、0.072 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(20.23 μ L、0.116 mmol)をアセトニトリル(90 μ L)に溶解し、2-ブロモアセトニトリル(5.34 μ L、0.080 mmol)を0℃において加え、室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮し、粗生成物(S)-ピペリジン-1,2-ジカルボン酸 1-(4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル) 2-(シアノメチル)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-OCH₂CN)を得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(2.00 mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI) m/z = 452 (M-H)-

保持時間：0.79分(分析条件SQDFA05_01)

[0204] (2S)-ピペリジン-1,2-ジカルボン酸 1-(4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル) 2-((2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-

5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル)(
化合物SS14、F-Pnaz-Pic2-pCpA)の合成



[0205] 緩衝液A(40 mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記載の方法で合成したリン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)

-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(113 mg、0.156 mmol)を溶解させ、(S)-ピペリジン-1,2-ジカルボン酸 1-(4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル) 2-(シアノメチル)(化合物SS18、F-Pnaz-Pic2-0CH₂CN)(35.4 mg、0.078 mmol)のアセトニトリル溶液(2.00 mL)を投与し、室温で150分攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸(2.00 mL)を加えた。反応液を0℃で45分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS14、F-Pnaz-Pic2-pCpA)(6.0 mg、7.3%)を得た。

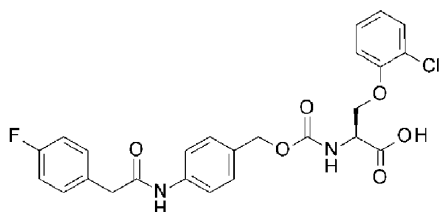
LCMS(ESI) m/z = 1047.5 (M-H)-

保持時間：0.50分(分析条件SQDFA05_01)

[0206] なお、緩衝液Aは以下のように調製した。

N,N,N-トリメチルヘキサデカン-1-アミニウム 塩化物(6.40g、20 mmol)とイミダゾール(6.81g、100 mmol)の水溶液に酢酸を添加し、pH8、20 mM N,N,N-トリメチルヘキサデカン-1-アミニウム、100 mMイミダゾールの緩衝液A(1L)を得た。

[0207] 0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリン(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2Cl-0H)の合成



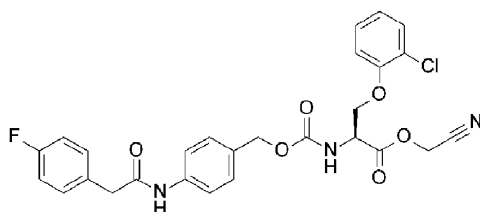
[0208] 窒素雰囲気下、特許文献(W02018225864)記載の方法で合成した0-(2-クロロフェニル)-L-セリン(化合物aa63)(1.25g、5.80 mmol)、特許文献(W020181431 45A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(2g、4.71 mmol)の混合物に室温に

てDMSO(15 mL)、トリエチルアミン(0.95 g、9.42 mmol)を添加した。反応混合物を室温において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリン(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2Cl-OH)(1.8g、73%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 523 (M+Na) +

保持時間：1.26分(分析条件SMD method6)

[0209] シアノメチル 0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリナート(化合物SS20、F-Pnaz-SPh2Cl-OCH₂CN)の合成



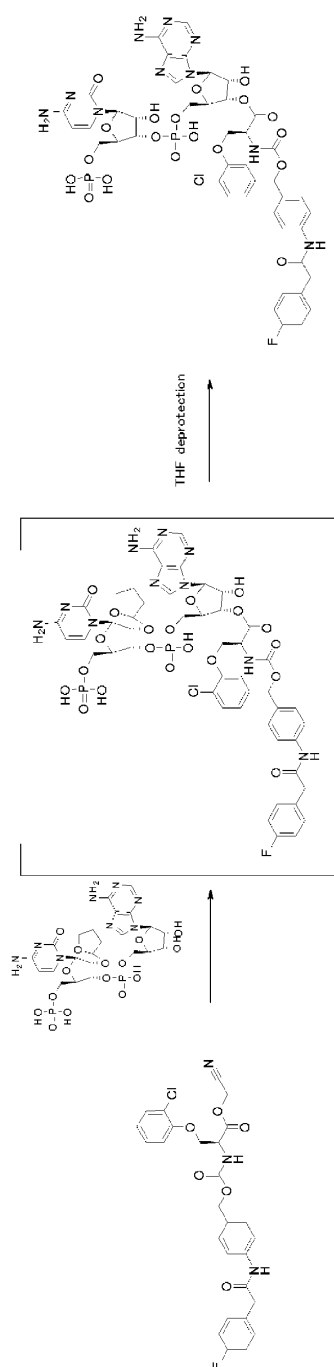
[0210] 窒素雰囲気下、0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリン(化合物SS19、F-Pnaz-SPh2Cl-OH)(800 mg、1.60 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(0.412g、3.19 mmol)をDCM(15 mL)に溶解し、2-ブロモアセトニトリル(760 mg、6.34 mmol)を室温において加え、室温で16時間攪拌した。反応液を濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、シアノメチル 0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリナート(化合物SS20、F-Pnaz-SPh2Cl-OCH₂CN)(220 mg、26%)を得た。得られた生成物をアセトニトリル(5 mL)に溶解し、次工程に用いた。

LCMS(ESI) m/z = 562 (M+Na) +

保持時間：1.15分(分析条件SMD method4)

[0211] (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2

H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-
イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プ
リ
ン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル 0-(2-クロロフェニル)
-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニ
ル)-L-セリナート(化合物SS15、F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA)の合成



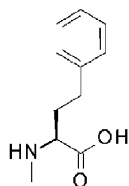
[0212] 緩衝液A(100 mL)に、リン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ
 ピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イ
 ル)-3,4-ジヒドロシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホ
 スホリル)オキシ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフ

ラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(400 mg、0.55 mmol)を溶解させ、シアノメチル 0-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリナート(化合物SS20、F-Pnaz-SPh2Cl-OC_H₂CN)(220 mg、0.41 mmol)のアセトニトリル溶液(5 mL)をシリンジポンプを使い15分以上かけて滴下し、室温で5分攪拌した。続いて、反応液にトリフルオロ酢酸(2.3 mL)を加えた。反応液を凍結乾燥した後に、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS15、F-Pnaz-SPh2Cl-pCpA)(20.7 mg、2%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1133.4 (M-H)-

保持時間：0.55分(分析条件SQDFA05_01)

[0213] ((S)-2-(メチルアミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS21、MeHph-OH)の合成

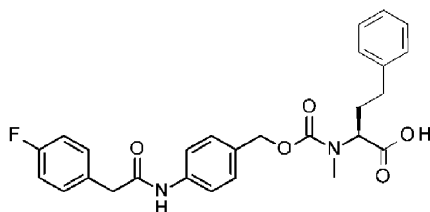


[0214] 特許文献(W02018225864)記載の方法で合成した(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物aa11)(150 mg、0.361 mmol)に室温にてDCM(903 μ L)、水(903 μ L)およびピペリジン(178 μ L、1.805 mmol)を室温にて添加した。反応混合物を室温において30分間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、((S)-2-(メチルアミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS21、MeHph-OH)(55 mg、79%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 192 (M-H)-

保持時間：0.15分(分析条件SQDFA05_02)

[0215] (S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH)の合成

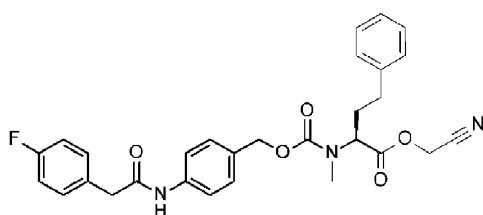


- [0216] 窒素雰囲気下、((S)-2-(メチルアミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS21、MeHph-OH)(35.1 mg、0.182 mmol)、特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(85 mg、0.20 mmol)の混合物に室温にてDMSO(727 μ L)を添加した。トリエチルアミン(76 μ L、0.545 mmol)を50℃にて添加した。反応混合物を40℃において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH)(80 mg、92%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 477 (M-H)-

保持時間：0.85分(分析条件SQDFA05_02)

- [0217] (S)-2-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸シアノメチル(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-OCH₂CN)の合成



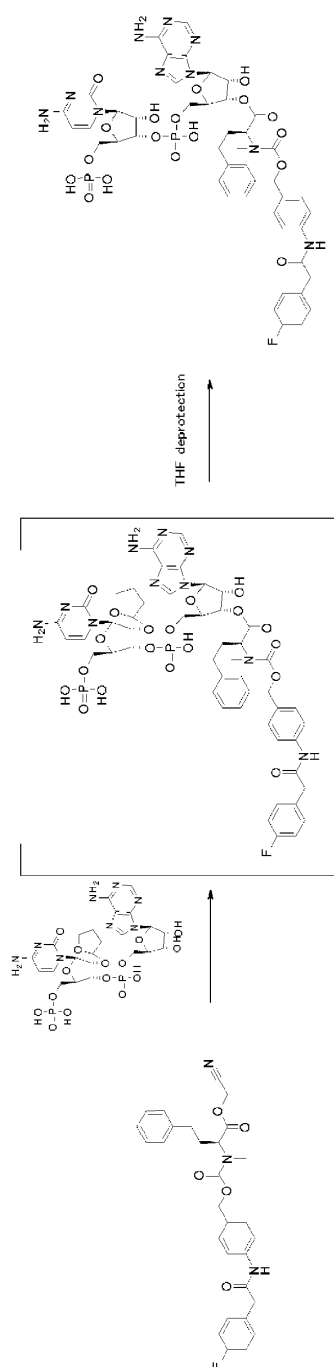
- [0218] 窒素雰囲気下、(S)-2-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH)(77 mg、0.16 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(31 μ L、0.176 mmol)の混合物にアセトニトリル(533 μ L)を室温にて加えた。その後、2-ブロモアセトニトリル(86 μ L、1.280 mmol)を

室温において加え、反応混合物を40℃において1時間撹拌した。反応液を濃縮し、粗生成物(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸シアノメチル(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-0CH₂CN)を得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(5.00 mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI) m/z = 516 (M-H)-

保持時間：0.92分(分析条件SQDFA05_02)

[0219] (2S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸 (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル(化合物SS16、F-Pnaz-MeHph-pCpA)の合成



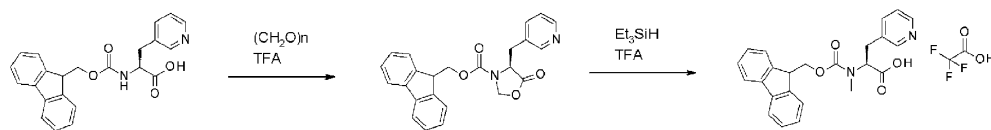
[0220] 緩衝液A(100 mL)に、リン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソ
 ピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イ
 ル)-3,4-ジヒドロシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホ
 スホリル)オキシ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフ

ラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(127 mg、0.176 mmol)を溶解させ、(S)-2-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸シアノメチル(化合物SS23、F-Pnaz-MeHph-h-OCH₂CN)(83 mg、0.16 mmol)のアセトニトリル溶液(5.00 mL)を投与し、室温で1時間攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸(5.00 mL)を加えた。反応液を0℃で1時間攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、その後さらに逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、表題化合物(化合物SS16、F-Pnaz-MeHph-pCpA)(26 mg、14.6%)を得た。

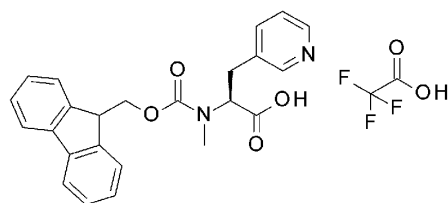
LCMS(ESI) m/z = 1111.5 (M-H)-

保持時間：0.64分(分析条件SQDFA05_02)

[0221] 化合物SS48の合成中間体は、以下のスキームに従って合成した。



[0222] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸化合物 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH · TFA)の合成



[0223] (S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(15g、38.62 mmol)、トリフルオロ酢酸(27 mL、348 mmol)およびパラホルムアルデヒド((CH₂O)_n)(3.48g、116 mmol)をトルエン(50 mL)に懸濁させ、窒素雰囲気下、40℃で16時間攪拌した。室温へと冷却後、反応液を減圧濃縮した。残渣をDCMに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液

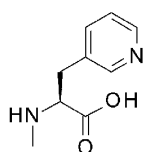
で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ過および減圧濃縮することで溶媒を除去し、(S)-5-オキソ-4-(ピリジン-3-イルメチル)オキサゾリジン-3-カルボン酸 (9H-フルオレン-9-イル)メチルを粗生成物として得た。

得られた粗生成物である(S)-5-オキソ-4-(ピリジン-3-イルメチル)オキサゾリジン-3-カルボン酸 (9H-フルオレン-9-イル)(18g、44.95 mmol)をジクロロエタン(100 mL)に溶解し、トリエチルシラン(Et_3SiH)(47g、404.20 mmol)およびトリフルオロ酢酸(100 mL)を室温に加えた。反応液を窒素雰囲気下、70℃で16時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸イソプロピルに溶解し、t-ブチルメチルエーテルとヘキサンの混合溶液(9:1)を加えた。その溶液を室温で20分間攪拌した後、4℃にて1時間静置した。生じた沈殿物をろ過にて回収し、冷却したt-ブチルメチルエーテルとヘキサンの混合溶液(9:1)で洗浄し、(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸化合物 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH · TFA)(19 g、95%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 403$ (M+H)⁺

保持時間：0.77分(分析条件SMD method1)

[0224] (S)-2-(メチルアミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH)の合成



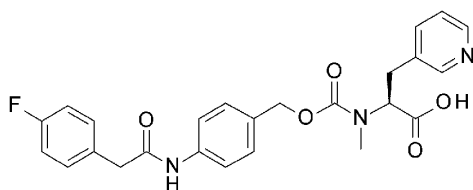
[0225] (S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸化合物 2,2,2-トリフルオロ酢酸塩(化合物SS52、Fmoc-MeA3Pyr-OH · TFA)(19 g、47.21 mmol)に室温にてDMF(72 mL)およびピペリジン(28.5 mL)を添加し、反応混合物を室温において3時間攪拌した。ジエチルエーテル(140 mL)およびヘキサン(280 mL)を加え、室温においてさらに3時間攪拌した。生じた沈殿物をろ過にて回収し、(S)-2-(メチルアミノ)

-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH) (7 g)を定量的に得た。

LCMS(ESI) $m/z = 181 (M+H)^+$

保持時間：0.15分(分析条件SMD method2)

- [0226] (S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)の合成

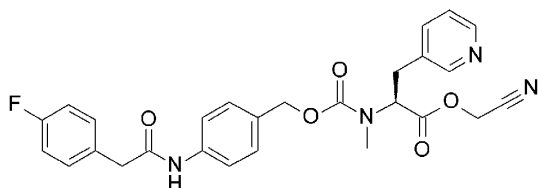


- [0227] 窒素雰囲気下、(S)-2-(メチルアミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS53、MeA3Pyr-OH) (970 mg、5.38 mmol)、特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11) (2 g、4.71 mmol)の混合物に室温にてDMSO (15 mL)、トリエチルアミン(950 mg、9.43 mmol)を添加した。反応混合物を40℃において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH) (1.0 g、46%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 466 (M+H)^+$

保持時間：0.98分(分析条件SMD method3)

- [0228] (S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸シアノメチル(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-0CH₂CN)の合成

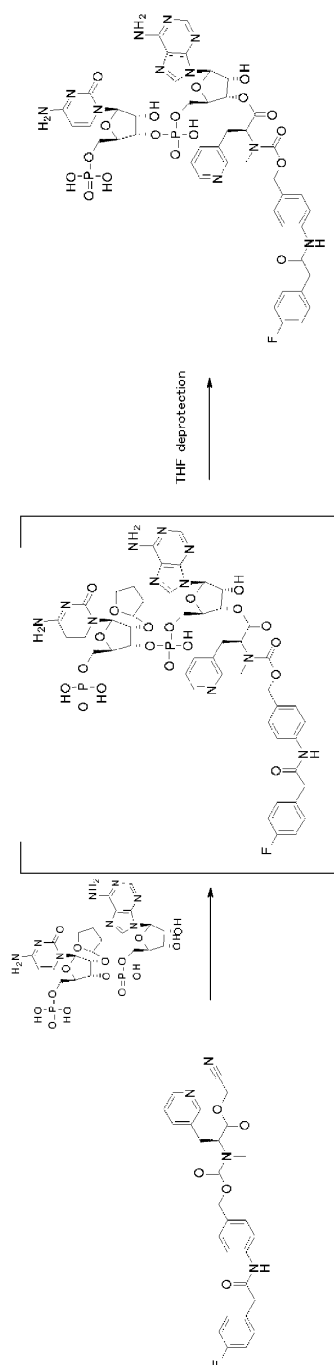


- [0229] 窒素雰囲気下、(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸(化合物SS54、F-Pnaz-MeA3Pyr-OH)(800 mg、1.72 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(444 mg、3.44 mmol)の混合物をDCM(20 mL)に溶解し、2-ブロモアセトニトリル(818 mg、6.82 mmol)を室温において加え、室温で6時間攪拌した。反応液を濃縮し、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル)にて精製し、(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸シアノメチル(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH₂CN)(221 mg、25%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 505 (M+H)⁺

保持時間：0.83分(分析条件SMD method4)

- [0230] (2S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸 (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル(化合物SS48、F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)の合成



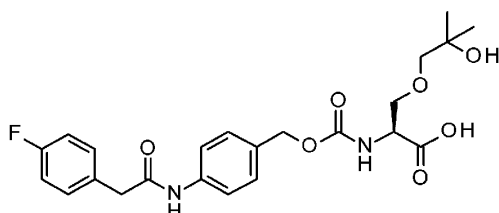
[0231] 緩衝液A(100 mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記載の方法で合成したリン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキ

シ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(400 mg、0.55 mmol)を溶解させ、(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-3-(ピリジン-3-イル)プロパン酸シアノメチル(化合物SS55、F-Pnaz-MeA3Pyr-OCH₂CN)(146 mg、0.29 mmol)のアセトニトリル溶液(5 mL)をシリンジポンプを用いて15分以上かけて滴下し、室温で1時間攪拌した。反応液にトリフルオロ酢酸(2.3 mL)を加え、反応液を凍結乾燥したのちに、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS48、F-Pnaz-MeA3Pyr-pCpA)(64.4 mg、5%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1098.5 (M-H)-

保持時間：0.39分(分析条件SQDFA05_01)

[0232] N-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリン(化合物SS56、F-Pnaz-StBuOH-OH)の合成



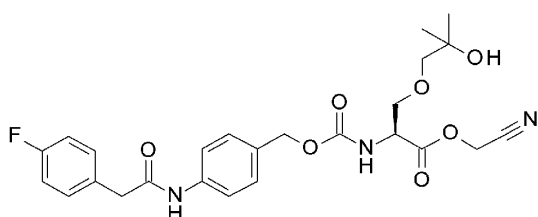
[0233] 窒素雰囲気下、特許文献(W02018225864)記載の方法で合成した0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリン(0.5 g、2.83 mmol)、特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(1g、2.36 mmol)の混合物に室温にてDMSO(7 mL)、トリエチルアミン(0.65 mL、4.72 mmol)を添加した。反応混合物を室温において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、N-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリン(化合物SS56、F-Pnaz-StBuOH-

OH)(1 g、92%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 485$ (M+Na) +

保持時間：0.80分(分析条件SMD method5)

- [0234] シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリナート(化合物S57、F-Pnaz-StBuOH- OCH_2CN)の合成

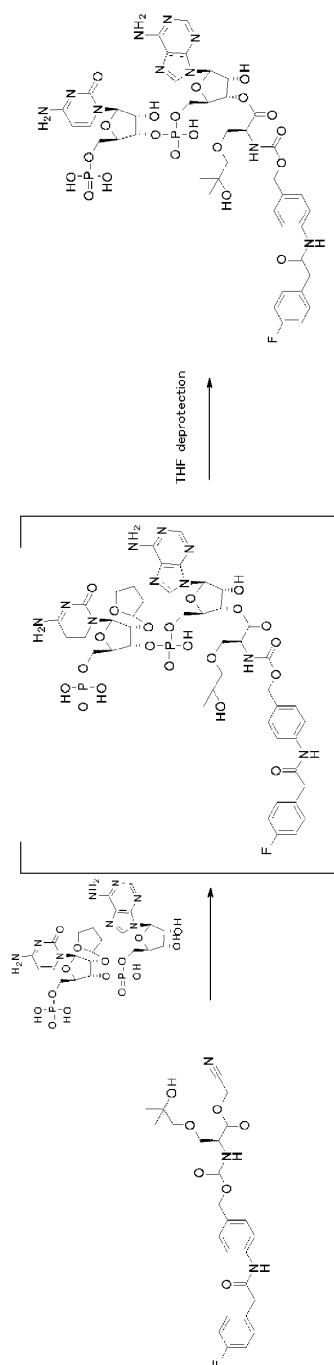


- [0235] 窒素雰囲気下、N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリン(化合物S56、F-Pnaz-StBuOH-OH)(1.2 g、2.59 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(670 mg、5.18 mmol)をDCM(36 mL)に溶解し、2-ブromoアセトニトリル(1.23 g、10.25 mmol)を室温において加え、室温で48時間撹拌した。反応液を濃縮し、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル/石油エーテル)にて精製し、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリナート(化合物SS57、F-Pnaz-StBuOH- OCH_2CN)(1 g、77%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 524$ (M+Na) +

保持時間：0.97分(分析条件SMD method4)

- [0236] (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリナート(化合物SS49、F-Pnaz-StBuOH-pCpA)の合成



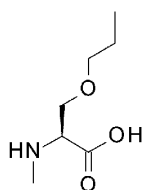
[0237] 緩衝液A(100 mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記載の方法で合成したリン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキ

シ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(400 mg、0.55 mmol)を溶解させ、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-0-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピル)-L-セリナート(化合物SS57、F-Pnaz-StBuOH-0CH₂CN)(139 mg、0.28 mmol)のアセトニトリル溶液(5 mL)をシリンジポンプを用いて15分以上かけて滴下し、室温で1時間攪拌した。反応液にトリフルオロ酢酸(2.3 mL)を加え、反応液を凍結乾燥したのちに、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS49、F-Pnaz-StBuOH-pCpA)(55.3 mg、5%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 1095.4$ (M-H)-

保持時間：0.46分(分析条件SQDFA05_01)

[0238] N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS58、MeSnPr-OH)の合成

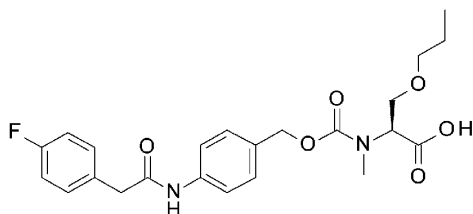


[0239] 特許文献(W02018225864)記載の方法で合成した(S)-2-((((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物aa52)(20 g、52.16 mmol)に室温にてDMF(80 mL)およびピペリジン(30 mL)を添加し、反応混合物を室温において3時間攪拌した。ジエチルエーテル(160 mL)およびヘキサン(500 mL)を加え、室温においてさらに3時間攪拌した。生じた沈殿物をろ過にて回収し、N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS58、MeSnPr-OH)(7 g、83%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 162$ (M+H)+

保持時間：0.34分(分析条件SMD method2)

[0240] N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH)の合成

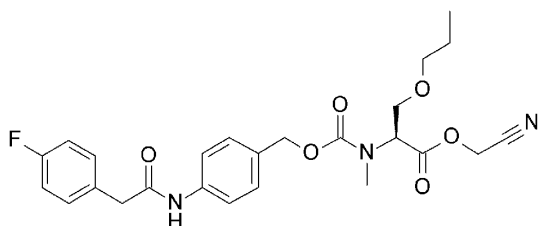


- [0241] 窒素雰囲気下、N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS58、MeSnPr-OH)(9.20 mg、5.71 mmol)、特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(2 g、4.71 mmol)の混合物に室温にてDMSO(15 mL)、トリエチルアミン(1.3 mL、9.43 mmol)を添加した。反応混合物を室温において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH)(2 g、95%)を得た。

LCMS(ESI) $m/z = 469$ (M+Na)⁺

保持時間：1.23分(分析条件SMD method3)

- [0242] シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリナート(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-OCH₂CN)の合成



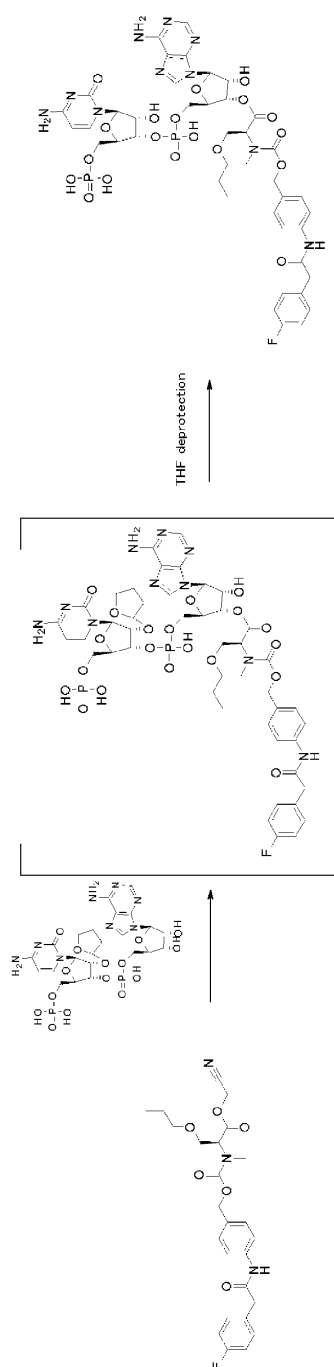
- [0243] 窒素雰囲気下、N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリン(化合物SS59、F-Pnaz-MeSnPr-OH)(2.2 g、4.93 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(1.28 g、9.90 mmol)の混合物をDCM(40 mL)に溶解し、2-ブロモアセトニトリル(2.35g、19.59 mmol)を室温において加え、室温で48時間攪拌した。反応液を濃縮し、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル

/石油エーテル)にて精製し、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリナート(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-0CH₂CN)(2 g、84%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 508 (M+Na) +

保持時間 : 1.32分(分析条件SMD method3)

[0244] (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリナート(化合物SS50、F-Pnaz-MeSnPr-pCpA)の合成



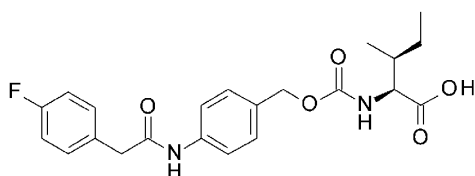
[0245] 緩衝液A(100 mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記載の方法で合成したリン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキ

シ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(400 mg、0.55 mmol)を溶解させ、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチル-0-プロピル-L-セリナート(化合物SS60、F-Pnaz-MeSnPr-OCH₂CN)(135 mg、0.28 mmol)のアセトニトリル溶液(5 mL)をシリンジポンプを用いて15分以上かけて滴下し、室温で4時間攪拌した。反応液にトリフルオロ酢酸(2.3 mL)を加え、反応液を凍結乾燥したのちに、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS50、F-Pnaz-MeSnPr-pCpA)(70.2 mg、6%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1079.5 (M-H)-

保持時間：0.52分(分析条件SQDFA05_01)

[0246] (((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシン(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)の合成



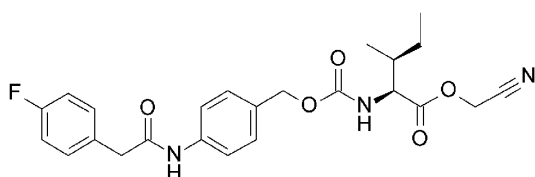
[0247] 窒素雰囲気下、L-イソロイシン(52.5 mg、0.40 mmol)、特許文献(W0201814 3145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(178 mg、0.42 mmol)の混合物に室温にてDMSO(2 mL)、トリエチルアミン(128 μ L、0.92 mmol)を添加した。反応混合物を室温にて2.5日間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシン(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)(125 mg、75%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 415.4 (M-H)-

保持時間：0.74分(分析条件SQDFA05_02)

[0248] シアノメチル (((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ

)カルボニル)-L-イソロイシナート(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN)の合成

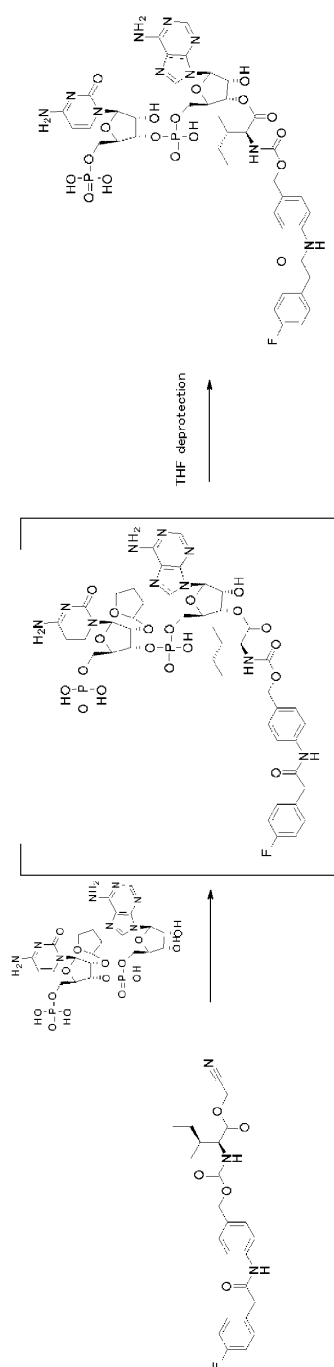


- [0249] 窒素雰囲気下、(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシン(化合物SS61、F-Pnaz-Ile-OH)(42 mg、0.1 mmol)および2-ブromoアセトニトリル(13 μ L、0.200 mmol)をアセトニトリル(500 μ L)に溶解し、N-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(35 μ L、0.200 mmol)を室温において加え、室温で16時間攪拌した。反応液を濃縮し、粗生成物シアノメチル(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシナート(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN)を得た。得られた粗生成物をアセトニトリル(3.00 mL)に溶解し、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI) m/z = 454 (M-H)⁻

保持時間：0.83分(分析条件SQDFA05_02)

- [0250] (2R, 3S, 4R, 5R)-2-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((ホスホノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシナート(化合物SS51、F-Pnaz-Ile-pCpA)の合成



[0251] 緩衝液A(60 mL)に、文献(Helv. Chim. Acta, 90, 297-310)記載の方法で合成したリン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)

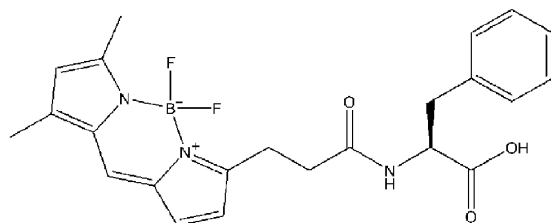
-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(72.2 mg、0.100 mmol)を溶解させ、シアノメチル(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-イソロイシナート(化合物SS62、F-Pnaz-Ile-OCH₂CN)(45.5 mg、0.100 mmol)のアセトニトリル溶液(3.00 mL)を投与し、室温で20時間攪拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸(3.00 mL)を加えた。反応液を室温で30分攪拌したのちに、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05%トリフルオロ酢酸水溶液/0.05%トリフルオロ酢酸アセトニトリル)にて精製し、表題化合物(化合物SS51、F-Pnaz-Ile-pCpA)(12 mg、11.4%)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1049.4 (M-H)-

保持時間：0.54分(分析条件SQDFA05_02)

[0252] 実施例 2. BdpFL-Phe-pCpA(MT01)の合成

(3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン(化合物MT02、BdpFL-Phe-0H)の合成



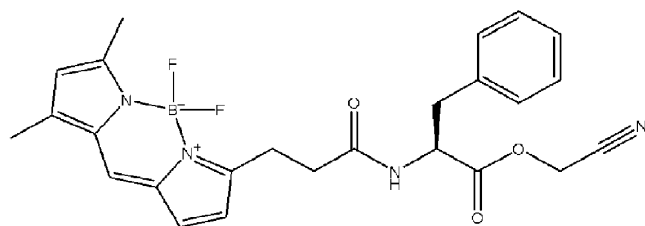
[0253] 窒素雰囲気下、3-(2-カルボキシエチル)-5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-4-イウム(200 mg, 0.685 mmol)と1-ヒドロキシピロリジン-2,5-ジオン(87 mg, 0.753 mmol)のNMP(4.5 mL)溶液にDIC(0.128 mL, 0.822 mmol)を室温に加えたのち、40℃で終夜攪拌した。室温に戻したのち、反応液にL-フェニルアラニン(113 mg, 0.685 mmol)とTEA(0.191 mL, 1.369 mmol)を加え、40℃で終夜攪拌した。反応液を逆相カラムクロマトグラフィー(0.1%FA MeCN/H₂O)にて精製し、(3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン(化合物MT02、BdpFL-

Phe-OH) (102 mg, 34%収率)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 438.3 (M-H)-

保持時間 : 0.78分(分析条件SQDFA05_02)

- [0254] (3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン シアノメチルエステル(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)の合成

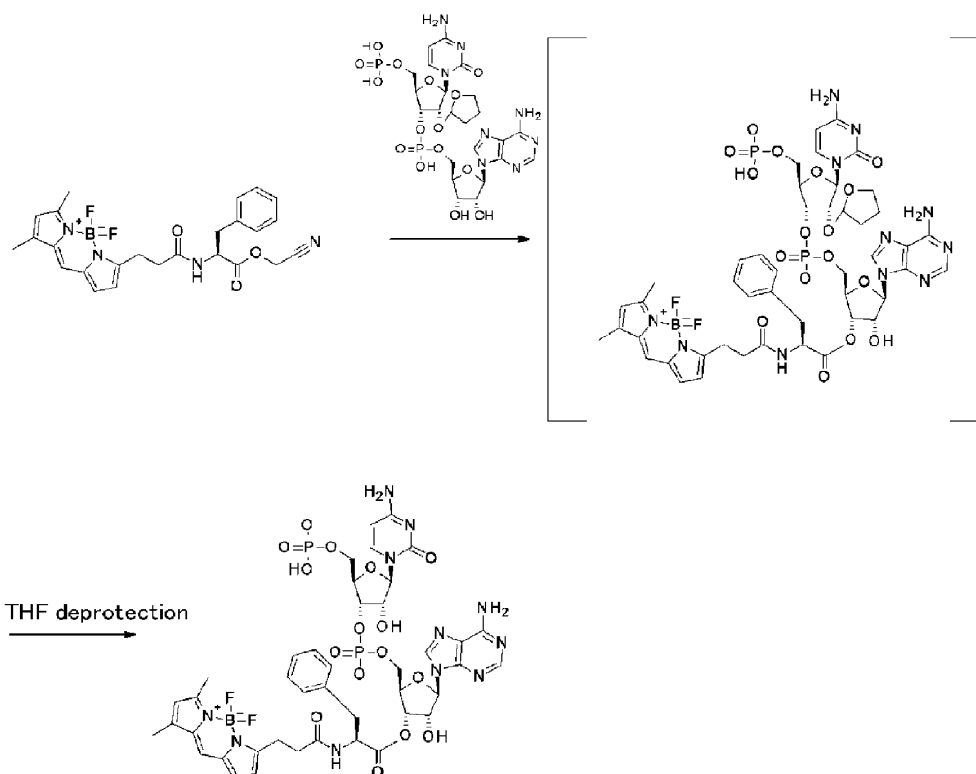


- [0255] 窒素雰囲気下、(3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン(50 mg, 0.114 mmol)およびN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン(DIPEA)(31.0 μL, 0.177 mmol)をアセトニトリル(500 μL)に溶解し、2-ブロモアセトニトリル(12 μL, 0.177 mmol)を0℃で加えたのち、40℃で3時間攪拌した。反応液を濃縮し、(3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン シアノメチルエステル(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)を粗生成物として得た。得られた粗生成物は、そのまま次工程に用いた。

LCMS(ESI) m/z = 477.3(M-H)-

保持時間 : 0.86分(分析条件SQDFA05_01)

- [0256] 3-(3-(((2S)-1-(((2R,3S,4R,5R)-2-((((2R,3S,4R,5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-4-ヒドロキシ-2-((フォスフォノオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)(ヒドロキシ)フォスホリル)オキシ)メチル)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル)オキシ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-3-オキソプロピル)-5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-4-イウム(化合物MT01、BdpFL-Phe-pCpA)の合成

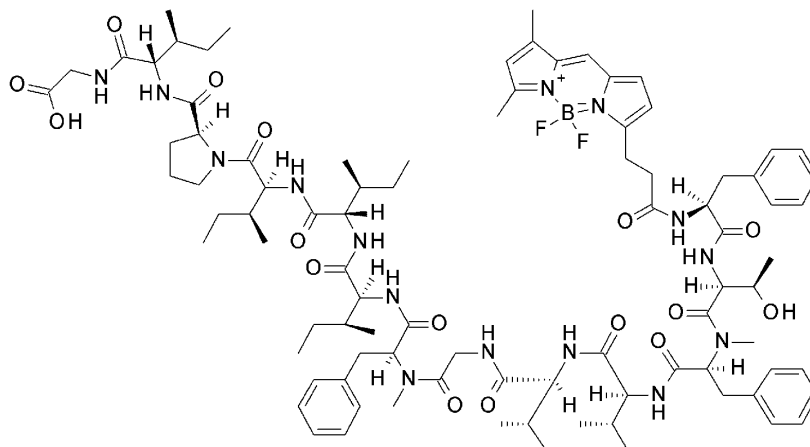


[0257] 緩衝液A(11.3 mL)に、リン酸二水素((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(4-アミノ-2-オキソピリミジン-1(2H)-イル)-3-((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-アミノ-9H-プリン-9-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メトキシ)(ヒドロキシ)ホスホリル)オキシ)-4-((テトラヒドロフラン-2-イル)オキシ)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル(化合物pc01)(33.2 mg、0.046 mmol)を溶解させ、(3-(5,5-ジフルオロ-7,9-ジメチル-5H-4λ4,5λ4-ジピロロ[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]ジアザボリニン-3-イル)プロパノイル)-L-フェニルアラニン シアノメチルエステル(化合物MT03、BdpFL-Phe-OCH₂CN)(11 mg、0.023 mmol)のアセトニトリル溶液(0.13 mL)を加えたのち、室温で45分攪拌した。反応液に0℃でTFA(0.56 mL)を加え、5分攪拌したのち、室温にて10分攪拌した。反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.05% TFA MeCN/H₂O)にて精製し、表題化合物(化合物MT01、BdpFL-Phe-pCpA)(2.1 mg、8.5%収率)を得た。

LCMS(ESI) m/z = 1072.5 (M-H)-

保持時間：0.56分(分析条件SQDFA05_02)

[0258] 実施例3. LC/MSの標品として用いるN末端にBdpFLを持つペプチド(LCT-67)の合成



[0259] Fmoc-Gly-OHを担持させた2-クロロトリチルレジン(100 mg)を用い、Fmocアミノ酸としてFmoc-Gly-OH、特許文献(W02018225864)記載の方法で合成したFmoc-Thr(THP)-OH(aa01)、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-Pro-OHを用いてペプチド合成機にてペプチドの伸長を行った(アミノ酸の略号については本明細書中に別途記載)。Fmoc法によるペプチド合成法に従い、ペプチドの伸長を行った(W02013100132B2)。ペプチドの伸長後、N末端のFmoc基の除去をペプチド合成機上にて行った後、レジンをDCMにて洗浄した。

レジンにTFE/DCM(1:1、v/v、2 mL)を加えて1時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをTFE/DCM(1:1、v/v、1 mL)にて2回洗浄した。全ての抽出液を混合し、DMF(2 mL)を加えた後、減圧下濃縮した。得られた残査をNMP(1 mL)に溶解し、4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸N-スクシンイミジルエステル(5 mg、0.013 mmol)を室温にて加え、19時間攪拌した後、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%FA MeCN/H₂O)に通し、中間体を含むフラクションを減圧下濃縮した。得られた残査を5%TFA in DCM(2 mL)に溶解し、室温で2時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮した後、得られた残渣を逆相

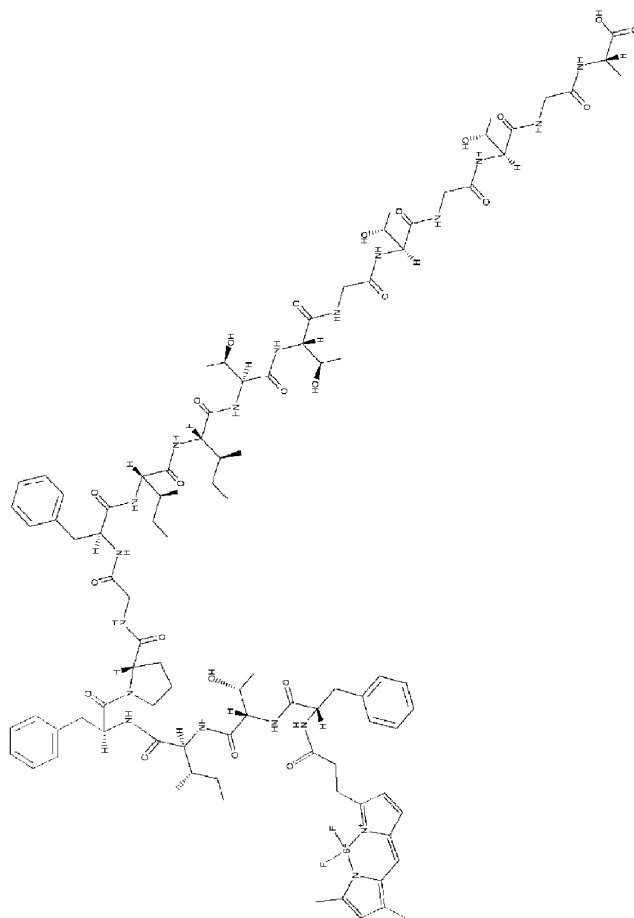
シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%FA MeCN/H₂O)にて精製し、表題化合物(LCT-67)(13 mg)を得た。LCT-67のアミノ酸配列を配列番号：223に示す

。

LCMS(ESI) m/z = 1751.2(M-H)⁻

保持時間：0.97分(分析条件SQDFA05_02)

[0260] 実施例4. LC/MSの標品として用いるN末端にBdpFLを持つペプチド(LCT-12)の合成



[0261] Fmoc-Ala-OHを担持させた2-クロロトリチルレジン(100 mg)を用い、Fmocアミノ酸としてFmoc-Gly-OH、Fmoc-Thr(THP)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Pro-OHを用いてペプチド合成機にてペプチドの伸長を行った(アミノ酸の略号については本明細書中に別途記載)。Fmoc法によるペプチド合成法に従

い、ペプチドの伸長を行った(W02013100132B2)。ペプチドの伸長後、N末端のFmoc基の除去をペプチド合成機上にて行った後、レジンをDCMにて洗浄した。

レジンにTFE/DCM(1:1、v/v、2 mL)を加えて1時間振とうし、ペプチドのレジンからの切り出しを行った。反応終了後、チューブ内の溶液を合成用カラムでろ過することによりレジンを除き、レジンをTFE/DCM(1:1、v/v、1 mL)にて2回洗浄した。全ての抽出液を混合し、DMF(2 mL)を加えた後、減圧下濃縮した。得られた残査をNMP(0.5 mL)に溶解し、そのうち1/4(125 μ L)を次の反応に使用した。ペプチドのNMP溶液に76.5 mMに調製したBdpFLスクシンイミドエステル(140 μ L)を室温にて加え、40°Cで終夜攪拌した後、減圧下濃縮した。得られた残査を0.05M テトラメチルアンモニウム硫酸水素塩 in HFIP(1.2 mL, 0.060 mmol)に溶解し、室温で2時間攪拌した。反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%FA MeCN/H₂O)にて精製し、表題化合物(LCT-12)(0.3 mg)を得た。LCT-12のアミノ酸配列を配列番号: 222に示す。

LCMS(ESI) m/z = 1972.9 (M-H)-

保持時間: 0.74分(分析条件SQDFA05_01)

[0262] 実施例 5. アミノアシル tRNA の合成

鋳型DNA (配列番号: 1 (D-1) ~ 配列番号: 34 (D-34)、配列番号: 35 (D-76) ~ 配列番号: 37 (D-78) 及び配列番号: 224 (D-82) ~ 配列番号: 241 (D-99)) から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro 転写反応によりtRNA (配列番号: 38 (TR-1) ~ 配列番号: 74 (TR-37) 及び配列番号: 242 (TR-38) ~ 配列番号: 259 (TR-55)) を合成し、RNeasy kit (Qiagen社) により精製した。

[0263] 鋳型DNA 配列番号: 1 (D-1)

DNA配列:

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAAGACGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型DNA 配列番号: 2 (D-2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTAGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 (D - 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCAGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 4 (D - 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAACACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 5 (D - 5)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTACACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 6 (D - 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTCACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 7 (D - 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 8 (D - 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 9 (D - 9)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 0 (D - 1 0)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 1 (D - 1 1)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 2 (D - 1 2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 3 (D - 1 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTATCACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 4 (D - 1 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTTTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 5 (D - 1 5)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCTCACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 6 (D - 1 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTAAAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 7 (D - 1 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTAAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 8 (D - 1 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCAAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 1 9 (D - 1 9)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTACTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 0 (D - 2 0)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 1 (D - 2 1)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCCTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 (D - 2 2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGCAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 (D - 2 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 4 (D - 2 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 5 (D - 2 5)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGCTCATAACCCGAAGAT

CGTCGGTTCAAATCCGGCCCCCGCAA

鋳型 D N A 配列番号 : 2 6 (D - 2 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 7 (D - 2 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 8 (D - 2 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGTCACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 9 (D - 2 9)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGAAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 0 (D - 3 0)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGCTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 1 (D - 3 1)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTGAACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 2 (D - 3 2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTGTACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 3 (D - 3 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTATACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 4 (D - 3 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCCCTTAGCTCAGTGGTTAGAGCAGGCGACTTATAATCGCTTGGTC

GCTGGTTCAAGTCCAGCAGGGGCCAC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 5 (D - 7 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTGCGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 6 (D - 7 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTTCGACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 3 7 (D - 7 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTCCGACGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 4 (D - 8 2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTAUGACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 5 (D - 8 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTAUGATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 6 (D - 8 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTGUGACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 7 (D - 8 5)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTGUGATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 8 (D - 8 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTUUGACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 2 9 (D - 8 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTUUGATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 0 (D - 8 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUGACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 1 (D - 8 9)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUGATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 2 (D - 9 0)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTAUCACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 3 (D - 9 1)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTUUCACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 4 (D - 9 2)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTCUCACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 5 (D - 9 3)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTATGATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 6 (D - 9 4)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTGTGATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 7 (D - 9 5)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTTTGATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 8 (D - 9 6)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTCTGATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 3 9 (D - 9 7)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTATCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 4 0 (D - 9 8)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTTTCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

鋳型 D N A 配列番号 : 2 4 1 (D - 9 9)

D N A 配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTCTCACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0264] t R N A 配列番号 : 3 8 (T R - 1)

tRNA(Glu)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

t R N A 配列番号 : 3 9 (T R - 2)

tRNA(Glu)uag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

t R N A 配列番号 : 4 0 (T R - 3)

tRNA(Glu)cag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCAGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：41 (TR-4)

tRNA(Glu)aac-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAACACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：42 (TR-5)

tRNA(Glu)uac-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUACACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：43 (TR-6)

tRNA(Glu)cac-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCACACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：44 (TR-7)

tRNA(Glu)aug-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUAUGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：45 (TR-8)

tRNA(Glu)uug-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUUGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：46 (TR-9)

tRNA(Glu)cug-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUCUGACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：47 (TR-10)

tRNA(Glu)auu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAUUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：48 (TR-11)

tRNA(Glu)uuu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：49 (TR-12)

tRNA(Glu)cuu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：50 (TR-13)

tRNA(Glu)auc-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAUCACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：51 (TR-14)

tRNA(Glu)uuc-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUUCACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：52 (TR-15)

tRNA(Glu)cuc-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：53 (TR-16)

tRNA(Glu)aaa-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAAACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：54 (TR-17)

tRNA(Glu)uaa-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：55 (TR-18)

tRNA(Glu)caa-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：56 (TR-19)

tRNA(Glu)acu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUACUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：57 (TR-20)

tRNA(Glu)ucu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：58 (TR-21)

tRNA(Glu)ccu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：59 (TR-22)

tRNA(Glu)gca-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUGCAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：60 (TR-23)

tRNA(Glu)uca-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：61 (TR-24)

tRNA(Glu)cca-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：62 (TR-25)

tRNA(fMet)cau-CA RNA配列：

GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUAUACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCGGCCCC
CGCAA

tRNA 配列番号：63 (TR-26)

tRNA(Glu)gug-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：64 (TR-27)

tRNA(Glu)guu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：65 (TR-28)

tRNA(Glu)guc-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGUCACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：66 (TR-29)

tRNA(Glu)gaa-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGAAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：67 (TR-30)

tRNA(Glu)gcu-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUGCUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号：68 (TR-31)

tRNA(Glu)uga-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGAACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 69 (TR-32)

tRNA(Glu)ugu-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 70 (TR-33)

tRNA(Glu)uau-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUAUACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 71 (TR-34)

tRNA(Ile)uau-CA RNA配列:

GGCCCCUAGCUCAGUGGUUAGAGCAGGCGACUUAUAAUCGCUUGGUCGUGGUUCAAGUCCAGCAGGG
GCCAC

tRNA 配列番号: 72 (TR-35)

tRNA(Glu)gcg-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUGCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 73 (TR-36)

tRNA(Glu)ucg-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUUCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 74 (TR-37)

tRNA(Glu)ccg-CA RNA配列:

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUCCGACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

tRNA 配列番号: 242 (TR-38)

tRNA(Asp)aug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUAUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：243 (TR-39)

tRNA(Asp)ccg-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUAUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：244 (TR-40)

tRNA(Asp)gug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUGUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：245 (TR-41)

tRNA(Asp)gug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUGUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：246 (TR-42)

tRNA(Asp)uug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUUUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：247 (TR-43)

tRNA(Asp)uug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUUUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：248 (TR-44)

tRNA(Asp)cug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUCUGACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：249 (TR-45)

tRNA(Asp)cug-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCUUCUGAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：250 (TR-46)

tRNA(Asp)auc-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUACACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：251 (TR-47)

tRNA(Asp)uuc-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUUACACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：252 (TR-48)

tRNA(Asp)cuc-CA RNA配列：

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUGCCUCUCACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

tRNA 配列番号：253 (TR-49)

tRNA(AsnE2)aug-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：254 (TR-50)

tRNA(AsnE2)gug-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：255 (TR-51)

tRNA(AsnE2)uug-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUUUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：256 (TR-52)

tRNA(AsnE2)cug-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCUGAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：257 (TR-53)

tRNA(AsnE2)auc-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUAUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：258 (TR-54)

tRNA(AsnE2)uuc-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUUUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

tRNA 配列番号：259 (TR-55)

tRNA(AsnE2)cuc-CA RNA配列：

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUCUCACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0265] アミノアシルpCpAを用いたアミノアシルtRNA混合液の調製

化合物AA tR-1を調製するために、25 μ M 転写tRNA(Glu)aag-CA (配列番号：38 (TR-1))、50 mM HEPES-KOH pH7.5、20 mM MgCl₂、1 mM ATP、0.6 unit/ μ l T4 RNAリガーゼ (New england bio lab.社)、0.25 mM アミノアシル化pCpA (特許記載 (W02018143145A1) の方法で合成したW02018143145A1に記載の化合物ts14のDMSO溶液) となるように、Nuclease free waterでメスアップした反応液を調製し、15°Cで45分間ライゲーション反応を行った。ただし、T4 RNAリガーゼおよびアミノアシル化pCpAを加える前の反応液は、95°Cで2分間加熱後、室温で5分間放置し、予めtRNAのリフォールディングを行った。なお、以降「ts」又は「TS」から始まるアミノアシル化pCpAは全てW02018143145A1に記載の方法で合成したW02018143145A1に記載の化合物である。

同様に、化合物AA tR-2を調製するために、転写tRNA(Glu)uag-CA (配

列番号：39（TR-2））に対して、アミノアシル化pCpA（SS14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-3を調製するために、転写tRNA(Glu)cag-CA（配列番号：40（TR-3））に対して、アミノアシル化pCpA（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-4を調製するために、転写tRNA(Glu)aac-CA（配列番号：41（TR-4））に対して、アミノアシル化pCpA（ts14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-5を調製するために、転写tRNA(Glu)uac-CA（配列番号：42（TR-5））に対して、アミノアシル化pCpA（SS14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-6を調製するために、転写tRNA(Glu)cac-CA（配列番号：43（TR-6））に対して、アミノアシル化pCpA（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-7を調製するために、転写tRNA(Glu)aug-CA（配列番号：44（TR-7））に対して、アミノアシル化pCpA（ts14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-8を調製するために、転写tRNA(Glu)uug-CA（配列番号：45（TR-8））に対して、アミノアシル化pCpA（SS14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-9を調製するために、転写tRNA(Glu)cug-CA（配列番号：46（TR-9））に対して、アミノアシル化pCpA（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-10を調製するために、転写tRNA(Glu)auu-CA（配列番号：47（TR-10））に対して、アミノアシル化pCpA（ts14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-11を調製するために、転写tRNA(Glu)uuu-CA（配列番号：48（TR-11））に対して、アミノアシル化pCpA（SS

14) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 2 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cuu-CA (配列番号 : 4 9 (T R - 1 2)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 3 を調製するために、転写 tRNA(Glu)auc-CA (配列番号 : 5 0 (T R - 1 3)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 4 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uuc-CA (配列番号 : 5 1 (T R - 1 4)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 5 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cuc-CA (配列番号 : 5 2 (T R - 1 5)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 6 を調製するために、転写 tRNA(Glu)aaa-CA (配列番号 : 5 3 (T R - 1 6)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 7 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uaa-CA (配列番号 : 5 4 (T R - 1 7)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 8 を調製するために、転写 tRNA(Glu)caa-CA (配列番号 : 5 5 (T R - 1 8)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 1 9 を調製するために、転写 tRNA(Glu)acu-CA (配列番号 : 5 6 (T R - 1 9)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 0 を調製するために、転写 tRNA(Glu)ucu-CA (配列番号 : 5 7 (T R - 2 0)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 1 を調製するために、転写 tRNA(Glu)ccu-CA (配列番号 : 5 8 (T R - 2 1)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 2 を調製するために、転写 tRNA(Glu)gca-CA (配列番号 : 5 9 (T R - 2 2)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 3 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uca-CA (配列番号 : 6 0 (T R - 2 3)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 4 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cca-CA (配列番号 : 6 1 (T R - 2 4)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 6 を調製するために、転写 tRNA(Glu)gug-CA (配列番号 : 6 3 (T R - 2 6)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 7 を調製するために、転写 tRNA(Glu)guu-CA (配列番号 : 6 4 (T R - 2 7)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 8 を調製するために、転写 tRNA(Glu)gcu-CA (配列番号 : 6 7 (T R - 3 0)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 2 9 を調製するために、転写 tRNA(Glu)aug-CA (配列番号 : 4 4 (T R - 7)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 8) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 0 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uug-CA (配列番号 : 4 5 (T R - 8)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 9) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 1 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cug-CA (配列番号 : 4 6 (T R - 9)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 5 0) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 2 を調製するために、転写 tRNA(Glu)auu-CA (配列番号 : 4 7 (T R - 1 0)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 8) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 3 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uuu-CA (配列番号 : 4 8 (T R - 1 1)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 9) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 4 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cuu-CA (配列番号 : 4 9 (T R - 1 2)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 5 0) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 5 を調製するために、転写 tRNA(Glu)auc-CA (配列番号 : 5 0 (T R - 1 3)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 8) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 6 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uuc-CA (配列番号 : 5 1 (T R - 1 4)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 9) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 7 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cuc-CA (配列番号 : 5 2 (T R - 1 5)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 5 0) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 8 を調製するために、転写 tRNA(Glu)aaa-CA (配列番号 : 5 3 (T R - 1 6)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 8) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 3 9 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uaa-CA (配列番号 : 5 4 (T R - 1 7)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 4 9) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 4 0 を調製するために、転写 tRNA(Glu)caa-CA (

配列番号：55 (TR-18)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 50) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-41 を調製するために、転写 tRNA(Glu)acu-CA (配列番号：56 (TR-19)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 48) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-42 を調製するために、転写 tRNA(Glu)ucu-CA (配列番号：57 (TR-20)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 49) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-43 を調製するために、転写 tRNA(Glu)ccu-CA (配列番号：58 (TR-21)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 50) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-44 を調製するために、転写 tRNA(Glu)gca-CA (配列番号：59 (TR-22)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 48) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-45 を調製するために、転写 tRNA(Glu)uca-CA (配列番号：60 (TR-23)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 49) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-46 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cca-CA (配列番号：61 (TR-24)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 50) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-47 を調製するために、転写 tRNA(Glu)gug-CA (配列番号：63 (TR-26)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 48) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-48 を調製するために、転写 tRNA(Glu)guu-CA (配列番号：64 (TR-27)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS 48) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 AAtR-49 を調製するために、転写 tRNA(Glu)guc-CA (配列番号：65 (TR-28)) に対して、アミノアシル化 pCpA (SS

48)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-50を調製するために、転写tRNA(Glu)gaa-CA (配列番号: 66 (TR-29)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 48)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-51を調製するために、転写tRNA(Glu)gcu-CA (配列番号: 67 (TR-30)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 48)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-52を調製するために、転写tRNA(Glu)uga-CA (配列番号: 68 (TR-31)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 16)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-53を調製するために、転写tRNA(Glu)ugu-CA (配列番号: 69 (TR-32)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 16)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-54を調製するために、転写tRNA(Glu)uau-CA (配列番号: 70 (TR-33)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 16)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-55を調製するために、転写tRNA(Ile)uau-CA (配列番号: 71 (TR-34)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 16)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-56を調製するために、転写tRNA(Ile)uau-CA (配列番号: 71 (TR-34)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 51)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-57を調製するために、転写tRNA(Glu)gcg-CA (配列番号: 72 (TR-35)) に対して、アミノアシル化pCpA (ts 14)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-58を調製するために、転写tRNA(Glu)ucg-CA (配列番号: 73 (TR-36)) に対して、アミノアシル化pCpA (SS 15)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 5 9 を調製するために、転写 tRNA(Glu)cag-CA (配列番号 : 7 4 (T R - 3 7)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 0 を調製するために、転写 tRNA(Asp)aug-CA (配列番号 : 2 4 2 (T R - 3 8)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 1 を調製するために、転写 tRNA(Asp)uug-CA (配列番号 : 2 4 6 (T R - 4 2)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 2 を調製するために、転写 tRNA(Asp)cug-CA (配列番号 : 2 4 8 (T R - 4 4)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 3 を調製するために、転写 tRNA(Asp)aug-CA (配列番号 : 2 4 3 (T R - 3 9)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 4 を調製するために、転写 tRNA(Asp)uug-CA (配列番号 : 2 4 7 (T R - 4 3)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 5 を調製するために、転写 tRNA(Asp)cug-CA (配列番号 : 2 4 9 (T R - 4 5)) に対して、アミノアシル化 p C p A (T S 2 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 6 を調製するために、転写 tRNA(Asp)gug-CA (配列番号 : 2 4 4 (T R - 4 0)) に対して、アミノアシル化 p C p A (t s 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 7 を調製するために、転写 tRNA(Asp)uug-CA (配列番号 : 2 4 6 (T R - 4 2)) に対して、アミノアシル化 p C p A (S S 1 4) を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R - 6 8 を調製するために、転写 tRNA(Asp)cug-CA (

配列番号：248（TR-44））に対して、アミノアシル化 p C p A（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-69 を調製するために、転写 tRNA(Asp)gug-CA（配列番号：245（TR-41））に対して、アミノアシル化 p C p A（ts14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-70 を調製するために、転写 tRNA(Asp)uug-CA（配列番号：247（TR-43））に対して、アミノアシル化 p C p A（SS14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-71 を調製するために、転写 tRNA(Asp)cug-CA（配列番号：249（TR-45））に対して、アミノアシル化 p C p A（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-72 を調製するために、転写 tRNA(Asp)auc-CA（配列番号：250（TR-46））に対して、アミノアシル化 p C p A（ts14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-73 を調製するために、転写 tRNA(Asp)uuc-CA（配列番号：251（TR-47））に対して、アミノアシル化 p C p A（SS14）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-74 を調製するために、転写 tRNA(Asp)cuc-CA（配列番号：252（TR-48））に対して、アミノアシル化 p C p A（TS24）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-75 を調製するために、転写 tRNA(AsnE2)aug-CA（配列番号：253（TR-49））に対して、アミノアシル化 p C p A（SS48）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-76 を調製するために、転写 tRNA(AsnE2)uug-CA（配列番号：255（TR-51））に対して、アミノアシル化 p C p A（SS49）を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物 A A t R-77 を調製するために、転写 tRNA(AsnE2)cug-CA（配列番号：256（TR-52））に対して、アミノアシル化 p C p A（

SS50)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-78を調製するために、転写tRNA(AsnE2)gug-CA(配列番号:254(TR-50))に対して、アミノアシル化pCpA(SS48)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-79を調製するために、転写tRNA(AsnE2)uug-CA(配列番号:255(TR-51))に対して、アミノアシル化pCpA(SS49)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-80を調製するために、転写tRNA(AsnE2)cug-CA(配列番号:256(TR-52))に対して、アミノアシル化pCpA(SS50)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-81を調製するために、転写tRNA(AsnE2)auc-CA(配列番号:257(TR-53))に対して、アミノアシル化pCpA(SS48)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-82を調製するために、転写tRNA(AsnE2)uuc-CA(配列番号:258(TR-54))に対して、アミノアシル化pCpA(SS49)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

同様に、化合物AA t R-83を調製するために、転写tRNA(AsnE2)cuc-CA(配列番号:259(TR-55))に対して、アミノアシル化pCpA(SS50)を前述の方法でライゲーション反応を行った。

[0266] それぞれのligation反応後の溶液に0.3M酢酸ナトリウムを加えたあと、フェノール・クロロホルム溶液を加えた段階で、各ligation産物を混合し、混合物の状態、もしくは単一の状態のまま、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、回収した。

具体的には、化合物AA t R-1、化合物AA t R-2、化合物AA t R-3の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化tRNA混合液(化合物AA t R-1、化合物AA t R-2、化合物AA t R-3の混合液)を調製した。

。

同様に、化合物 A A t R - 4、化合物 A A t R - 5、化合物 A A t R - 6 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 4、化合物 A A t R - 5、化合物 A A t R - 6 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 7、化合物 A A t R - 8、化合物 A A t R - 9 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 7、化合物 A A t R - 8、化合物 A A t R - 9 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 10、化合物 A A t R - 11、化合物 A A t R - 12 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 10、化合物 A A t R - 11、化合物 A A t R - 12 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 13、化合物 A A t R - 14、化合物 A A t R - 15 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 13、化合物 A A t R - 14、化合物 A A t R - 15 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 16、化合物 A A t R - 17、化合物 A A t R - 18 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 16、化合物 A A t R - 17、化合物 A A t R - 18 の混合液）を

調製した。

同様に、化合物 A A t R - 1 9、化合物 A A t R - 2 0、化合物 A A t R - 2 1 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 1 9、化合物 A A t R - 2 0、化合物 A A t R - 2 1 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 2 2、化合物 A A t R - 2 3、化合物 A A t R - 2 4 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 2 2、化合物 A A t R - 2 3、化合物 A A t R - 2 4 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 2 6、化合物 A A t R - 8、化合物 A A t R - 9 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 2 6、化合物 A A t R - 8、化合物 A A t R - 9 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 2 7、化合物 A A t R - 1 1、化合物 A A t R - 1 2 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 2 7、化合物 A A t R - 1 1、化合物 A A t R - 1 2 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 2 8、化合物 A A t R - 2 0、化合物 A A t R - 2 1 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出

出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 2 8、化合物 A A t R - 2 0、化合物 A A t R - 2 1 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 2 9、化合物 A A t R - 3 0、化合物 A A t R - 3 1 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 2 9、化合物 A A t R - 3 0、化合物 A A t R - 3 1 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 3 2、化合物 A A t R - 3 3、化合物 A A t R - 3 4 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 3 2、化合物 A A t R - 3 3、化合物 A A t R - 3 4 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 3 5、化合物 A A t R - 3 6、化合物 A A t R - 3 7 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 3 5、化合物 A A t R - 3 6、化合物 A A t R - 3 7 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 3 8、化合物 A A t R - 3 9、化合物 A A t R - 4 0 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 3 8、化合物 A A t R - 3 9、化合物 A A t R - 4 0 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 4 1、化合物 A A t R - 4 2、化合物 A A t R

ー 4 3 の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 4 1、化合物 A A t R - 4 2、化合物 A A t R - 4 3 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 4 4、化合物 A A t R - 4 5、化合物 A A t R - 4 6 の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 4 4、化合物 A A t R - 4 5、化合物 A A t R - 4 6 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 4 7、化合物 A A t R - 3 0、化合物 A A t R - 3 1 の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 4 7、化合物 A A t R - 3 0、化合物 A A t R - 3 1 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 4 8、化合物 A A t R - 3 3、化合物 A A t R - 3 4 の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 4 8、化合物 A A t R - 3 3、化合物 A A t R - 3 4 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 4 9、化合物 A A t R - 3 6、化合物 A A t R - 3 7 の3種類のligation産物に0.3M酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R - 4 9、化合物 A A t R - 3 6、化合物 A A t R - 3 7 の混合液）を

調製した。

同様に、化合物 A A t R - 5 0、化合物 A A t R - 3 9、化合物 A A t R - 4 0 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 5 0、化合物 A A t R - 3 9、化合物 A A t R - 4 0 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 5 1、化合物 A A t R - 4 2、化合物 A A t R - 4 3 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 5 1、化合物 A A t R - 4 2、化合物 A A t R - 4 3 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 5 7、化合物 A A t R - 5 9 の2種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 5 7、化合物 A A t R - 5 9 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 6 0、化合物 A A t R - 6 1、化合物 A A t R - 6 2 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A A t R - 6 0、化合物 A A t R - 6 1、化合物 A A t R - 6 2 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 6 3、化合物 A A t R - 6 4、化合物 A A t R - 6 5 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液（化合物 A

A t R - 6 3、化合物 A A t R - 6 4、化合物 A A t R - 6 5 の混合液) を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 6 6、化合物 A A t R - 6 7、化合物 A A t R - 6 8 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液 (化合物 A A t R - 6 6、化合物 A A t R - 6 7、化合物 A A t R - 6 8 の混合液) を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 6 9、化合物 A A t R - 7 0、化合物 A A t R - 7 1 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液 (化合物 A A t R - 6 9、化合物 A A t R - 7 0、化合物 A A t R - 7 1 の混合液) を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 7 2、化合物 A A t R - 7 3、化合物 A A t R - 7 4 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液 (化合物 A A t R - 7 2、化合物 A A t R - 7 3、化合物 A A t R - 7 4 の混合液) を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 7 5、化合物 A A t R - 7 6、化合物 A A t R - 7 7 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 t R N A 混合液 (化合物 A A t R - 7 5、化合物 A A t R - 7 6、化合物 A A t R - 7 7 の混合液) を調製した。

同様に、化合物 A A t R - 7 8、化合物 A A t R - 7 9、化合物 A A t R - 8 0 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・ク

クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R-78、化合物 A A t R-79、化合物 A A t R-80 の混合液）を調製した。

同様に、化合物 A A t R-81、化合物 A A t R-82、化合物 A A t R-83 の3種類の ligation 産物に 0.3M 酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、等量で混合し、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、アミノアシル化 tRNA 混合液（化合物 A A t R-81、化合物 A A t R-82、化合物 A A t R-83 の混合液）を調製した。

[0267] 以下の化合物は混合せずに精製し、調製した。

化合物 A A t R-52 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R-52 を調製した。

化合物 A A t R-53 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R-53 を調製した。

化合物 A A t R-54 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R-54 を調製した。

化合物 A A t R-55 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R-55 を調製した。

化合物 A A t R-56 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウム

を加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R - 5 6 を調製した。

。

化合物 A A t R - 5 8 の ligation 産物に 0.3M になるように酢酸ナトリウムを加え、フェノール・クロロホルム溶液を加えた液を、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、化合物 A A t R - 5 8 を調製した。

。

[0268] アミノアシル pCpA を用いた initiator アミノアシル tRNA の調製

25 μ M 転写 tRNA(fMet)cau-CA (配列番号: 62 (T R - 25)、50 mM HEPES-KOH pH7.5、20 mM MgCl₂、1 mM ATP、0.6 unit/ μ l T4 RNA リガーゼ (New England bio lab. 社)、0.25 mM アミノアシル化 pCpA (MT01 の DMSO 溶液) となるように、Nuclease free water でメスアップした反応液を調製し、15°C で 45 分間ライゲーション反応を行った。ただし、T4 RNA リガーゼおよびアミノアシル化 pCpA を加える前の反応液は、95°C で 2 分間加熱後、室温で 5 分間放置し、予め tRNA のリフォールディングを行った。

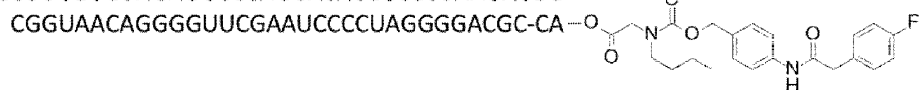
ライゲーション反応液に、酢酸ナトリウムを 0.3 M になるように加え、フェノール・クロロホルム抽出し、initiator アミノアシル tRNA (化合物 A A t R - 25) をエタノール沈殿により回収した。

initiator アミノアシル化 tRNA は、翻訳混合物に添加する直前に 1 mM 酢酸ナトリウムに溶解した。

[0269] 化合物 A A t R - 1 配列番号: 75

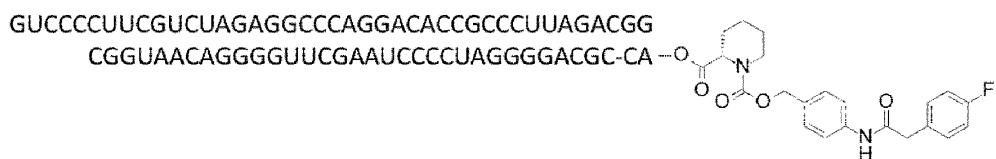
nBuG-tRNA(Glu)aag

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUAAGACGG



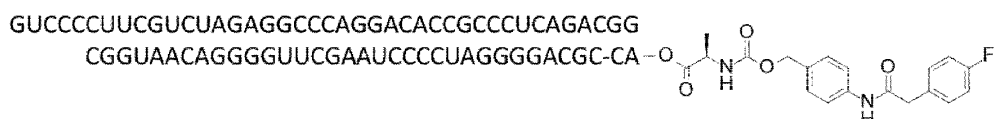
[0270] 化合物 A A t R - 2 配列番号: 76

Pic2-tRNA(Glu)uag



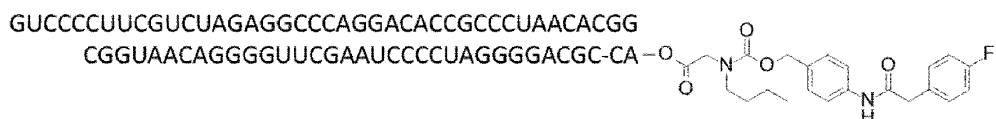
[0271] 化合物 A A t R - 3 配列番号 : 7 7

dA-tRNA(Glu)cag



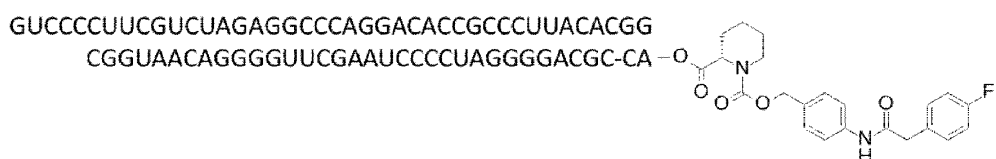
[0272] 化合物 A A t R - 4 配列番号 : 7 8

nBuG-tRNA(Glu)aac



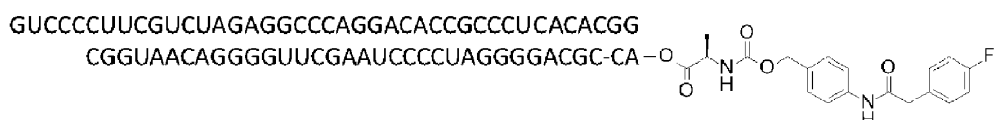
[0273] 化合物 A A t R - 5 配列番号 : 7 9

Pic2-tRNA(Glu)uac



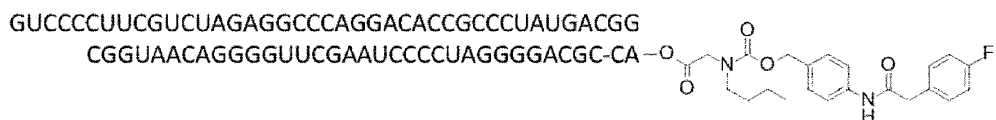
[0274] 化合物 A A t R - 6 配列番号 : 8 0

dA-tRNA(Glu)cac



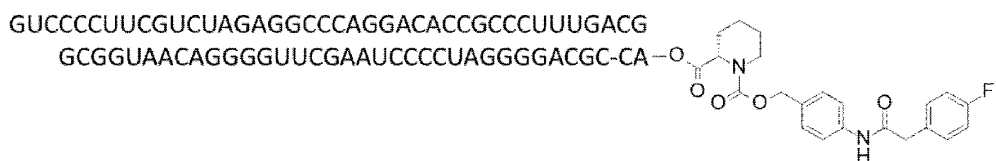
[0275] 化合物 A A t R - 7 配列番号 : 8 1

nBuG-tRNA(Glu)aug



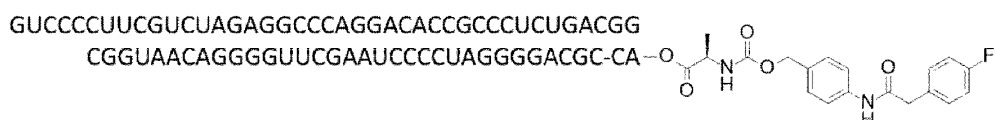
[0276] 化合物 A A t R - 8 配列番号 : 8 2

Pic2-tRNA(Glu)uug



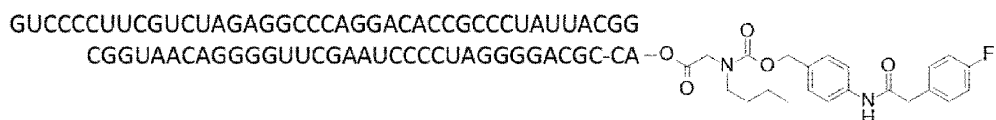
[0277] 化合物 A A t R - 9 配列番号 : 8 3

dA-tRNA(Glu)cug



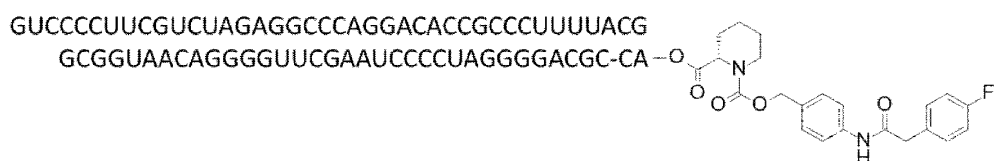
[0278] 化合物 A A t R - 1 0 配列番号 : 8 4

nBuG-tRNA(Glu)auu



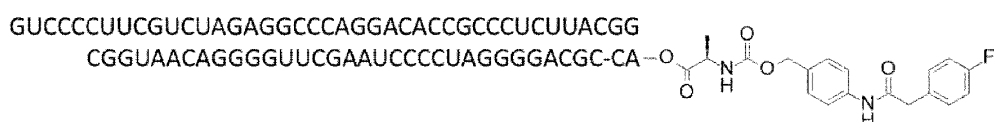
[0279] 化合物 A A t R - 1 1 配列番号 : 8 5

Pic2-tRNA(Glu)uuu



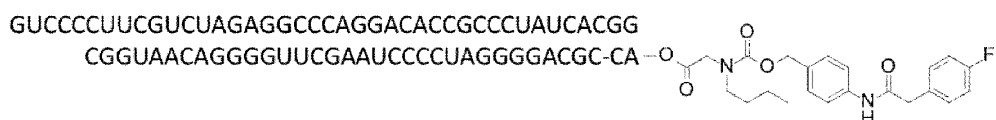
[0280] 化合物 A A t R - 1 2 配列番号 : 8 6

dA-tRNA(Glu)cuu



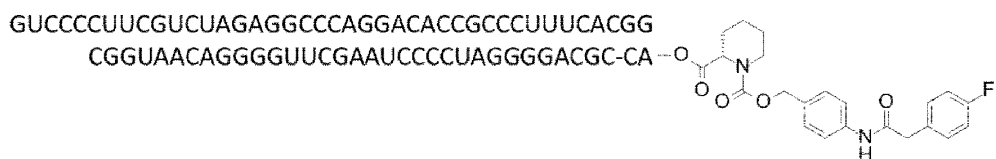
[0281] 化合物 A A t R - 1 3 配列番号 : 8 7

nBuG-tRNA(Glu)auc



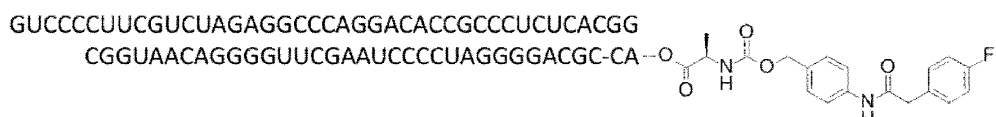
[0282] 化合物 A A t R - 1 4 配列番号 : 8 8

Pic2-tRNA(Glu)uuc



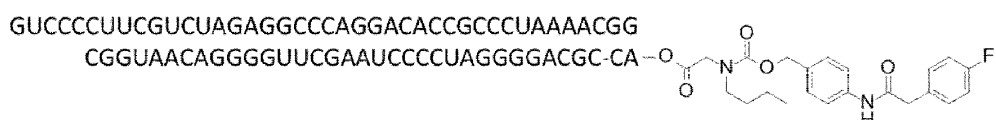
[0283] 化合物 A A t R - 1 5 配列番号 : 8 9

dA-tRNA(Glu)cuc



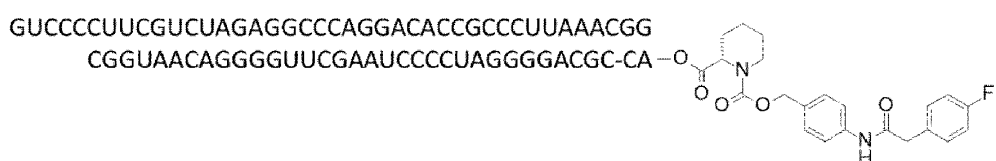
[0284] 化合物 A A t R - 1 6 配列番号 : 9 0

nBuG-tRNA(Glu)aaa



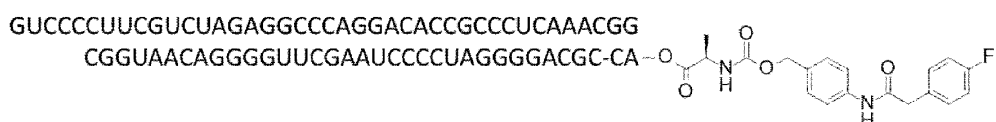
[0285] 化合物 A A t R - 1 7 配列番号 : 9 1

Pic2-tRNA(Glu)uua



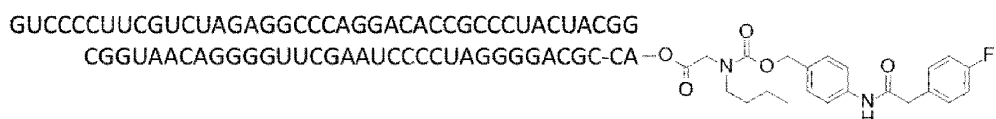
[0286] 化合物 A A t R - 1 8 配列番号 : 9 2

dA-tRNA(Glu)caa



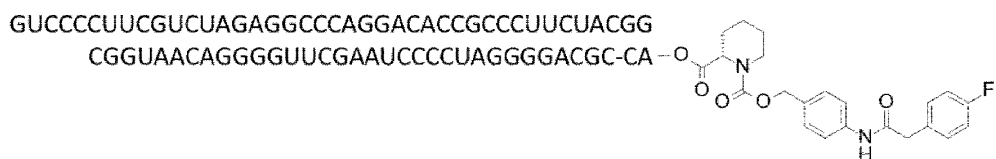
[0287] 化合物 A A t R - 1 9 配列番号 : 9 3

nBuG-tRNA(Glu)acu



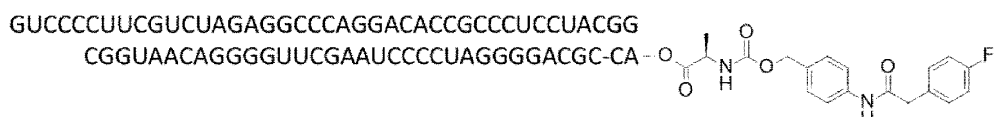
[0288] 化合物 A A t R - 2 0 配列番号 : 9 4

Pic2-tRNA(Glu)ucu



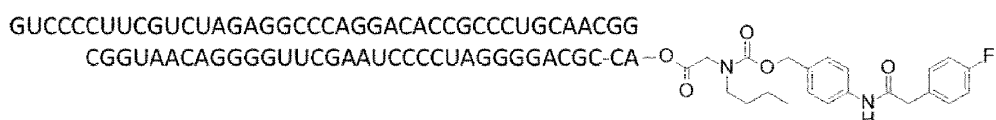
[0289] 化合物 A A t R - 2 1 配列番号 : 9 5

dA-tRNA(Glu)ccu



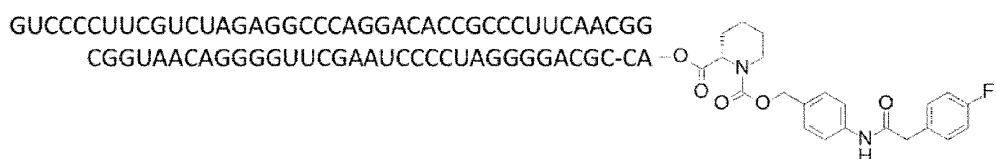
[0290] 化合物 A A t R - 2 2 配列番号 : 9 6

nBuG-tRNA(Glu)gca



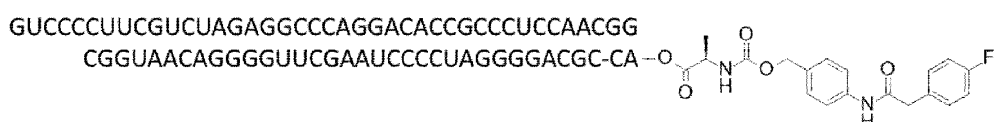
[0291] 化合物 A A t R - 2 3 配列番号 : 9 7

Pic2-tRNA(Glu)uca



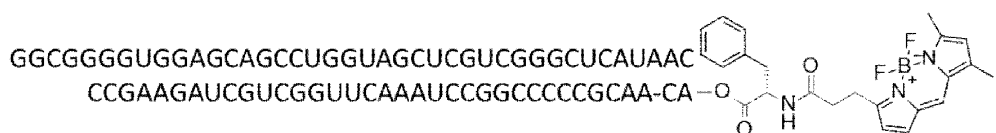
[0292] 化合物 A A t R - 2 4 配列番号 : 9 8

dA-tRNA(Glu)cca



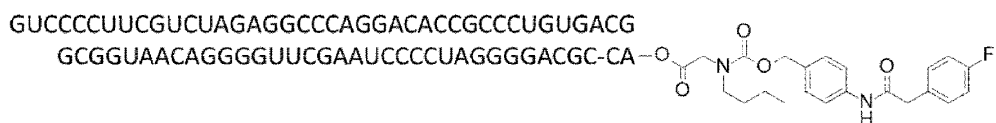
[0293] 化合物 A A t R - 2 5 配列番号 : 9 9

BdpFL-Phe-tRNA(fMet)cau



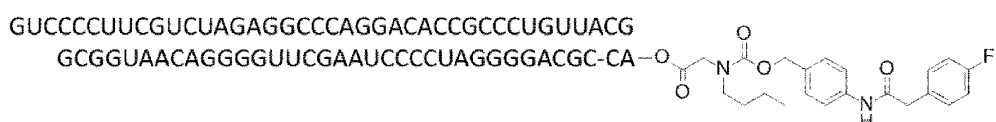
[0294] 化合物 A A t R - 2 6 配列番号 : 1 0 0

nBuG-tRNA(Glu)gug



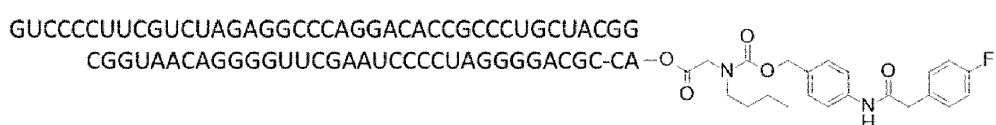
[0295] 化合物 A A t R - 2 7 配列番号 : 1 0 1

nBuG-tRNA(Glu)guu



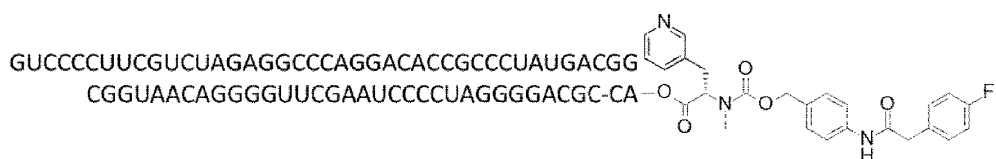
[0296] 化合物 A A t R - 2 8 配列番号 : 1 0 2

nBuG-tRNA(Glu)gcu



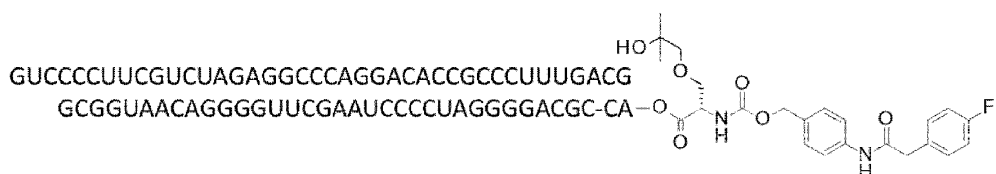
[0297] 化合物 A A t R - 2 9 配列番号 : 1 0 3

MeA3Pr-tRNA(Glu)aug



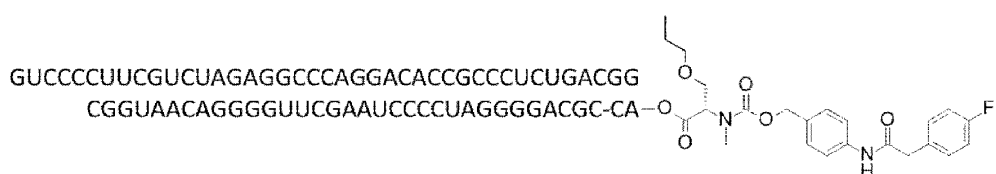
[0298] 化合物 A A t R - 3 0 配列番号 : 1 0 4

StBuOH-tRNA(Glu)uug



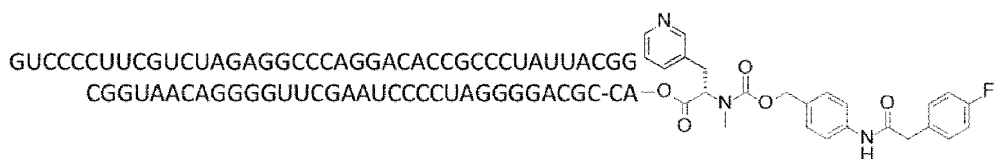
[0299] 化合物 A A t R - 3 1 配列番号 : 1 0 5

MeSnPr-tRNA(Glu)cug



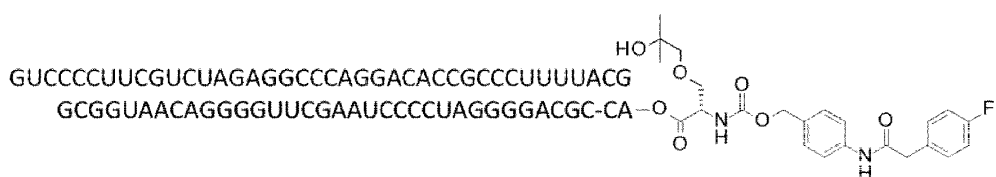
[0300] 化合物 A A t R - 3 2 配列番号 : 1 0 6

MeA3Pr-tRNA(Glu)auu



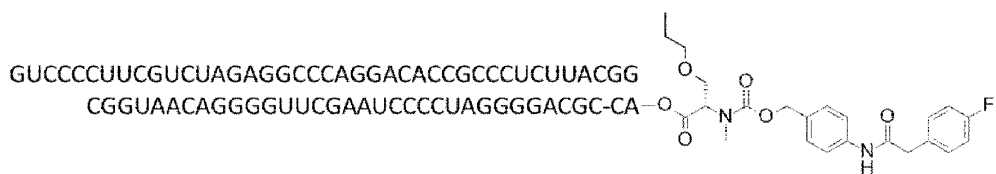
[0301] 化合物 A A t R - 3 3 配列番号 : 1 0 7

StBuOH-tRNA(Glu)uuu



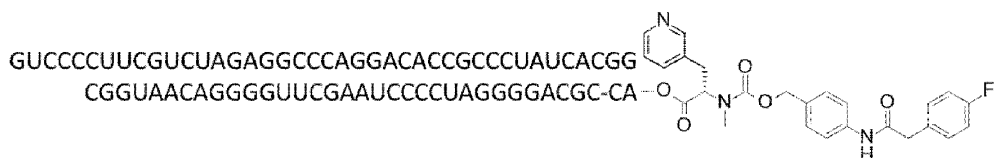
[0302] 化合物 A A t R - 3 4 配列番号 : 1 0 8

MeSnPr-tRNA(Glu)cuu



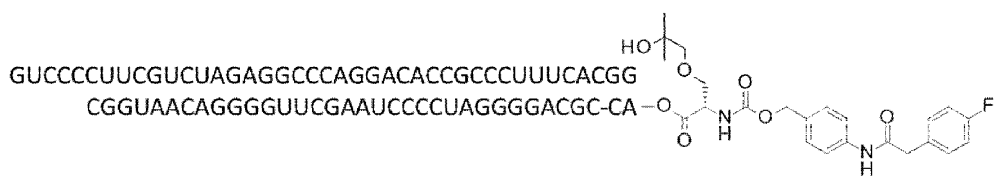
[0303] 化合物 A A t R - 3 5 配列番号 : 1 0 9

MeA3Pr-tRNA(Glu)auc



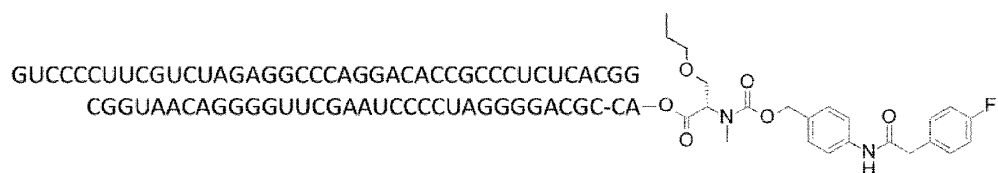
[0304] 化合物 A A t R - 3 6 配列番号 : 1 1 0

StBuOH-tRNA(Glu)uuc



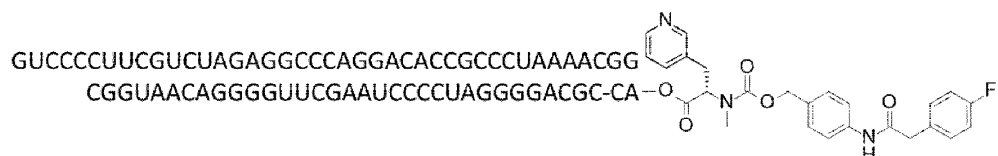
[0305] 化合物 A A t R - 3 7 配列番号 : 1 1 1

MeSnPr-tRNA(Glu)cuc



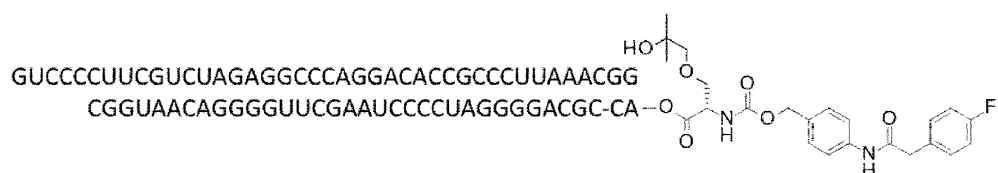
[0306] 化合物 A A t R - 3 8 配列番号 : 1 1 2

MeA3Pr-tRNA(Glu)aaa



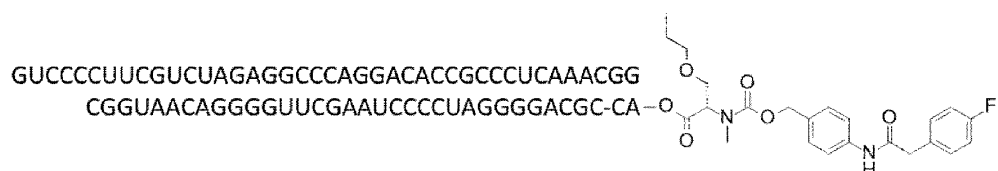
[0307] 化合物 A A t R - 3 9 配列番号 : 1 1 3

StBuOH-tRNA(Glu)uaa



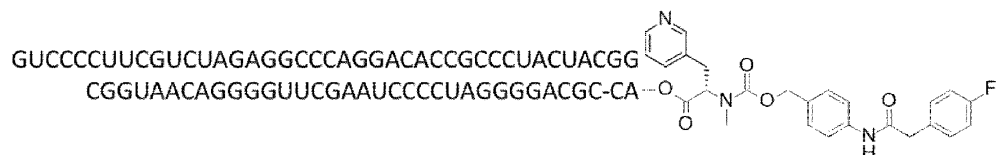
[0308] 化合物 A A t R - 4 0 配列番号 : 1 1 4

MeSnPr-tRNA(Glu)caa



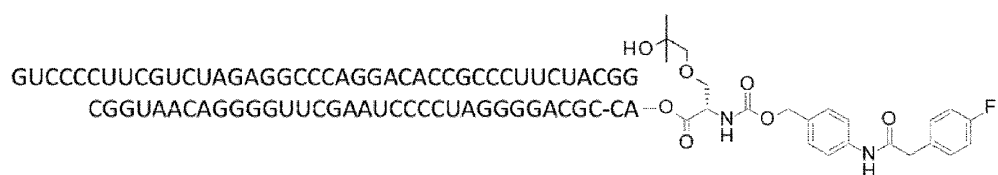
[0309] 化合物 A A t R - 4 1 配列番号 : 1 1 5

MeA3Pr-tRNA(Glu)acu



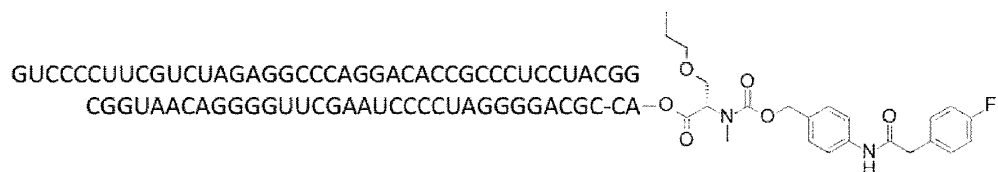
[0310] 化合物 A A t R - 4 2 配列番号 : 1 1 6

StBuOH-tRNA(Glu)ucu



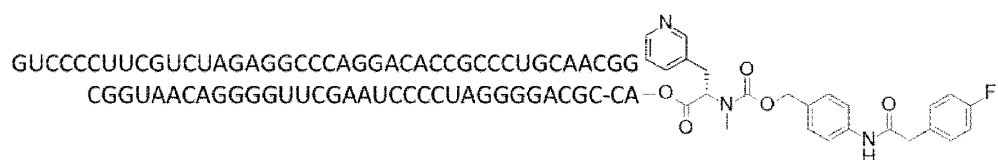
[0311] 化合物 A A t R - 4 3 配列番号 : 1 1 7

MeSnPr-tRNA(Glu)ccu



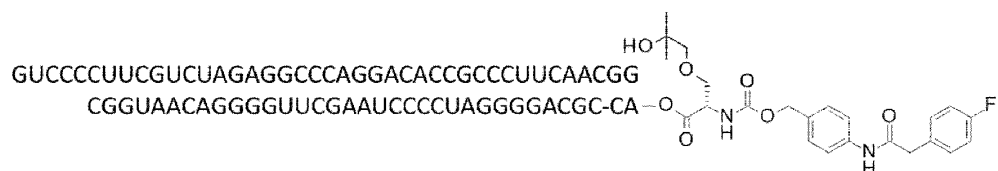
[0312] 化合物 A A t R - 4 4 配列番号 : 1 1 8

MeA3Pr-tRNA(Glu)gca



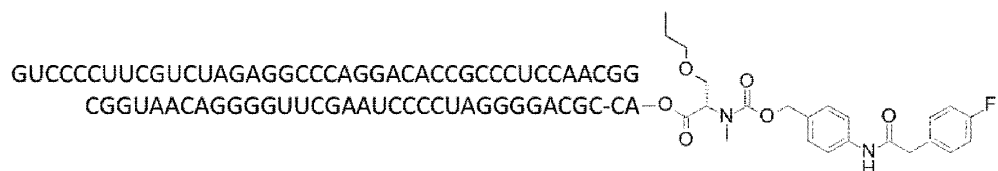
[0313] 化合物 A A t R - 4 5 配列番号 : 1 1 9

StBuOH-tRNA(Glu)uca



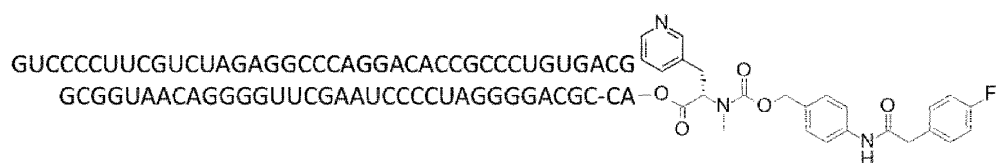
[0314] 化合物 A A t R - 4 6 配列番号 : 1 2 0

MeSnPr-tRNA(Glu)cca



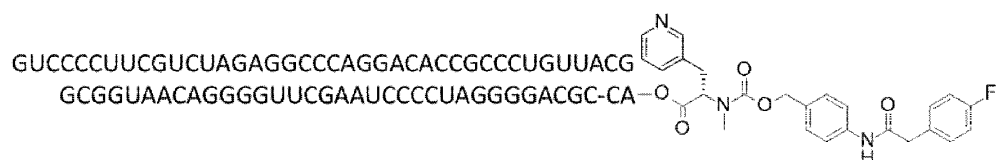
[0315] 化合物 A A t R - 4 7 配列番号 : 1 2 1

MeA3Pr-tRNA(Glu)gug



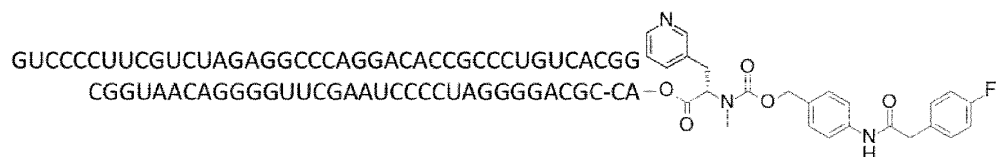
[0316] 化合物 A A t R - 4 8 配列番号 : 1 2 2

MeA3Pr-tRNA(Glu)guu



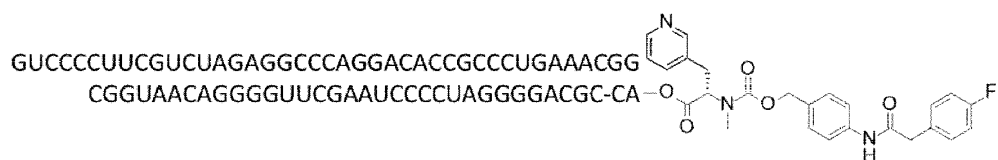
[0317] 化合物 A A t R - 4 9 配列番号 : 1 2 3

MeA3Pr-tRNA(Glu)guc



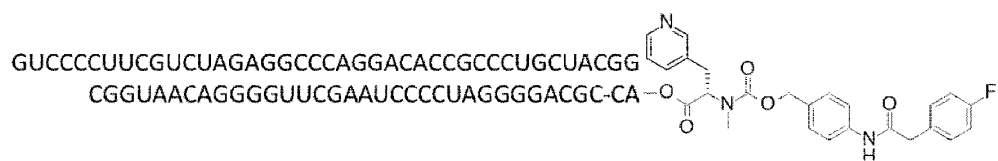
[0318] 化合物 A A t R - 5 0 配列番号 : 1 2 4

MeA3Pr-tRNA(Glu)gaa



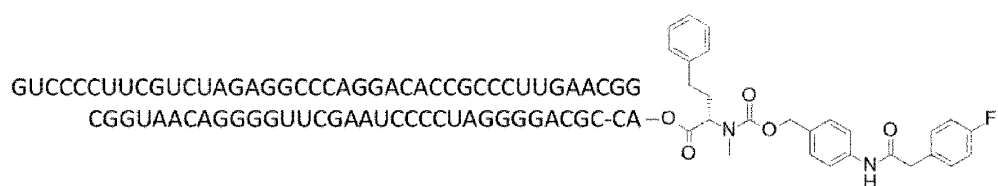
[0319] 化合物 A A t R - 5 1 配列番号 : 1 2 5

MeA3Pr-tRNA(Glu)gcu



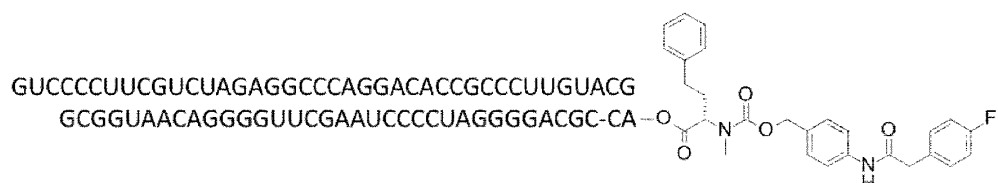
[0320] 化合物 A A t R - 5 2 配列番号 : 1 2 6

MeHph-tRNA(Glu)uga



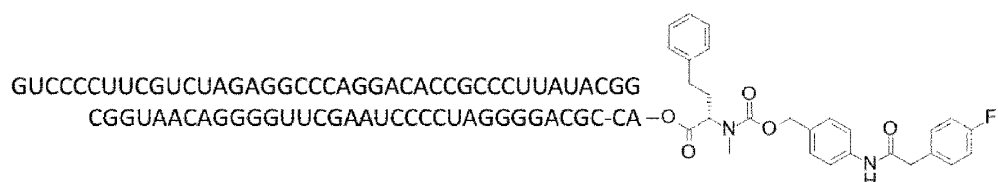
[0321] 化合物 A A t R - 5 3 配列番号 : 1 2 7

MeHph-tRNA(Glu)ugu



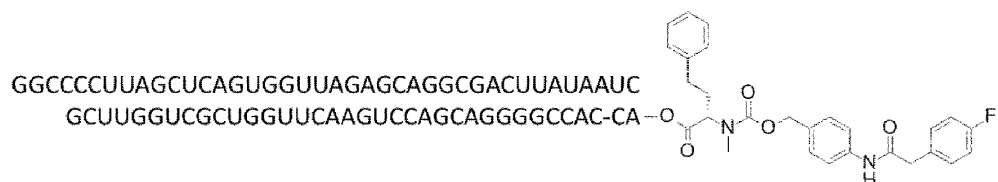
[0322] 化合物 A A t R - 5 4 配列番号 : 1 2 8

MeHph-tRNA(Glu)uau



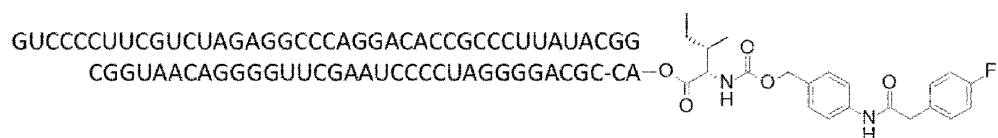
[0323] 化合物 A A t R - 5 5 配列番号 : 1 2 9

MeHph-tRNA(Ile2)uau



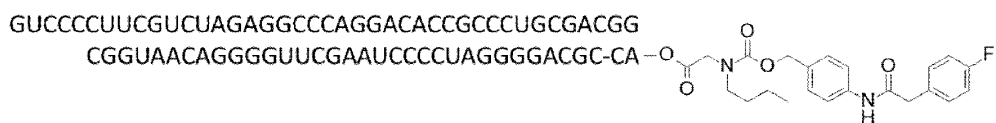
[0324] 化合物 A A t R - 5 6 配列番号 : 1 3 0

Ile-tRNA(Ile2)uau



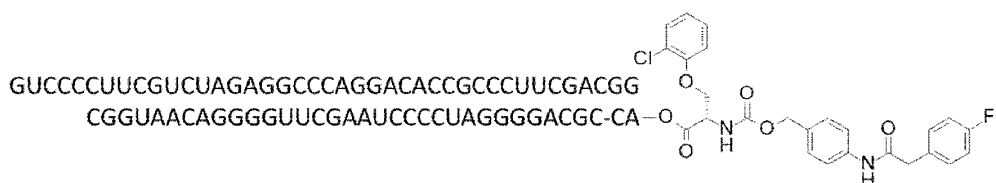
[0325] 化合物 A A t R - 5 7 配列番号 : 1 3 1

nBuG-tRNA(Glu)gcg



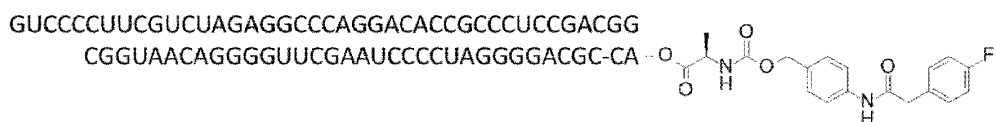
[0326] 化合物 A A t R - 5 8 配列番号 : 1 3 2

SPh2Cl-tRNA(Glu)ucg



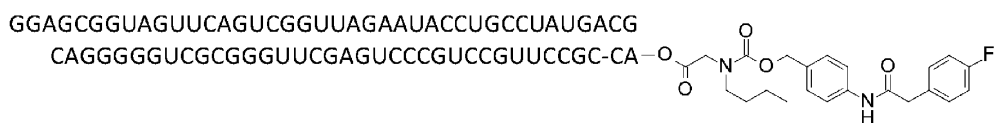
[0327] 化合物 A A t R - 5 9 配列番号 : 1 3 3

dA-tRNA(Glu)cgg



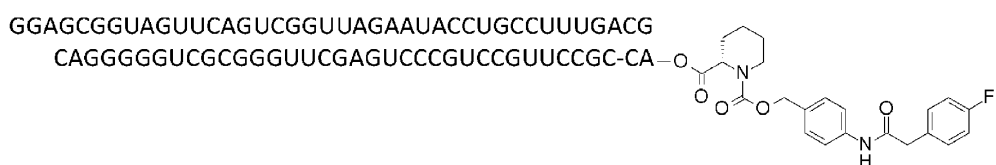
[0328] 化合物 A A t R - 6 0 配列番号 : 2 6 0

nBuGly-tRNA(Asp1)_aug



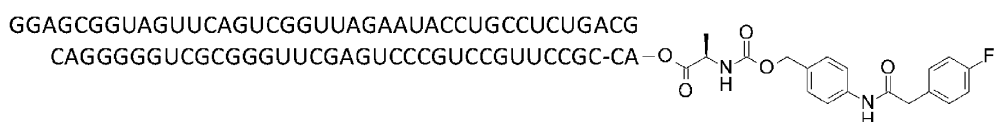
[0329] 化合物 A A t R - 6 1 配列番号 : 2 6 1

Pic2-tRNA(Asp1)_uug



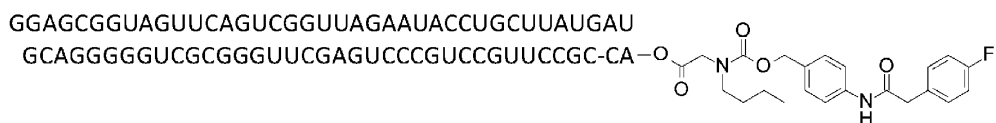
[0330] 化合物 A A t R - 6 2 配列番号 : 2 6 2

dA-tRNA(Asp1)_cug



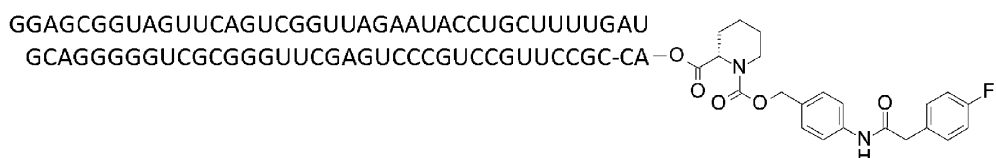
[0331] 化合物 A A t R - 6 3 配列番号 : 2 6 3

nBuGly-tRNA(Asp1-ACL7U)_aug



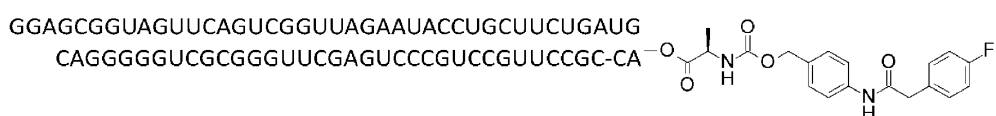
[0332] 化合物 A A t R - 6 4 配列番号 : 2 6 4

Pic2-tRNA(Asp1-ACL7A)_uug



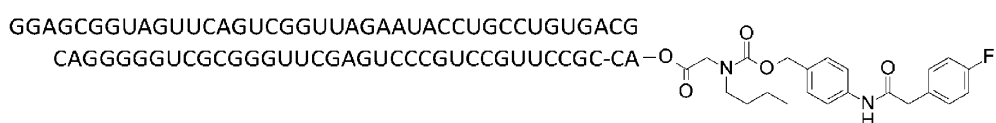
[0333] 化合物 A A t R - 6 5 配列番号 : 2 6 5

dA-tRNA(Asp1-ACL7G)_cug



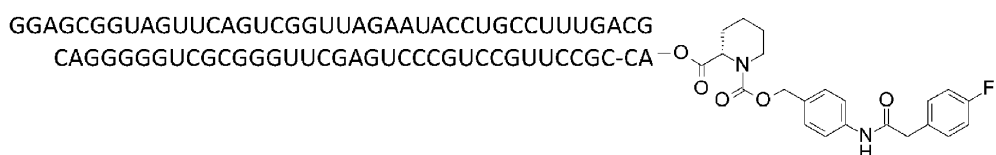
[0334] 化合物 A A t R - 6 6 配列番号 : 2 6 6

nBuGly-tRNA(Asp1)_gug



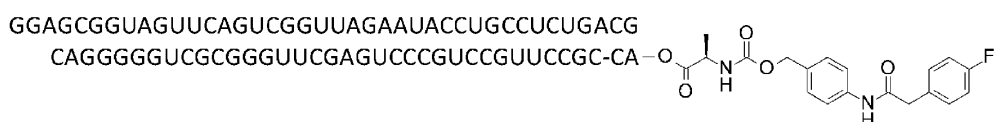
[0335] 化合物 A A t R - 6 7 配列番号 : 2 6 7

Pic2-tRNA(Asp1)_uug



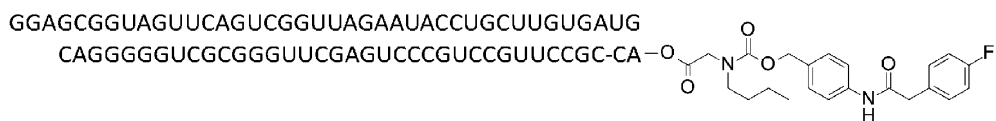
[0336] 化合物 A A t R - 6 8 配列番号 : 2 6 8

dA-tRNA(Asp1)_cug



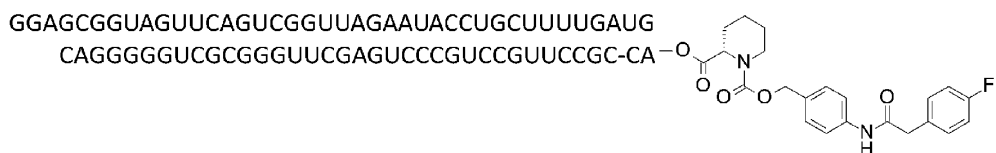
[0337] 化合物 A A t R - 6 9 配列番号 : 2 6 9

nBuGly-tRNA(Asp1-ACL7C)_gug



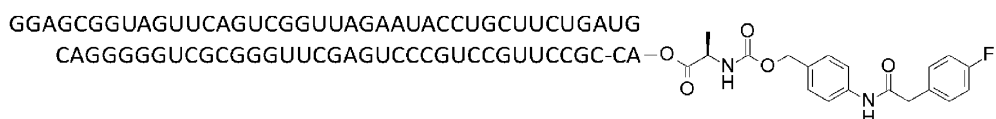
[0338] 化合物 A A t R - 7 0 配列番号 : 2 7 0

Pic2-tRNA(Asp1-ACL7A)_uug



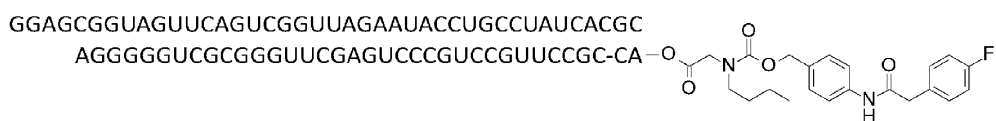
[0339] 化合物 A A t R - 7 1 配列番号 : 2 7 1

dA-tRNA(Asp1-ACL7G)_cug



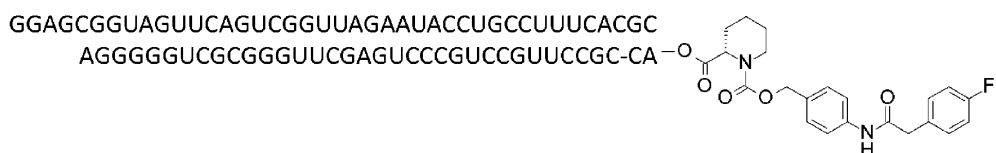
[0340] 化合物 A A t R - 7 2 配列番号 : 2 7 2

nBuGly-tRNA(Asp1)_auc



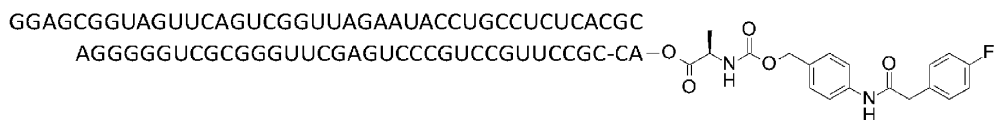
[0341] 化合物 A A t R - 7 3 配列番号 : 2 7 3

Pic2-tRNA(Asp1)_uuc



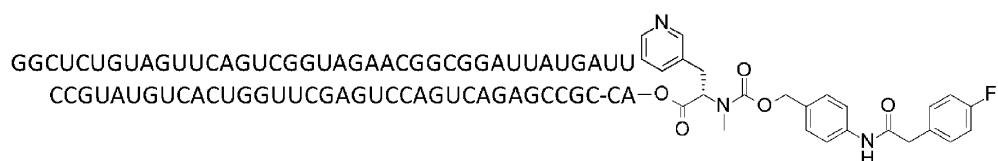
[0342] 化合物 A A t R - 7 4 配列番号 : 2 7 4

nBuGly-tRNA(Asp1)_cuc



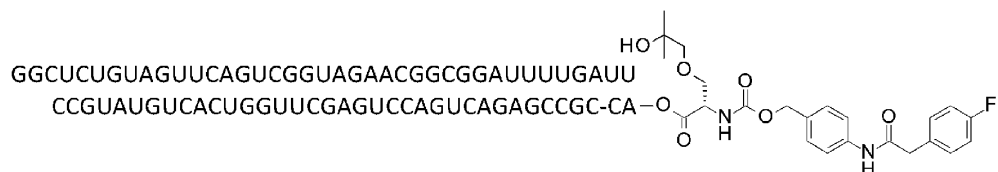
[0343] 化合物 A A t R - 7 5 配列番号 : 2 7 5

MeA3Pr-tRNA(AsnE2+ACL)_aug



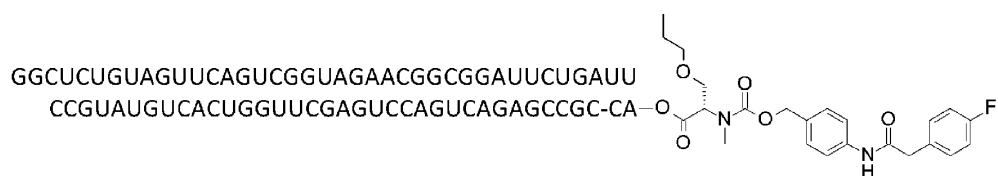
[0344] 化合物 A A t R - 7 6 配列番号 : 2 7 6

StBuOH-tRNA(AsnE2+ACL)_uug



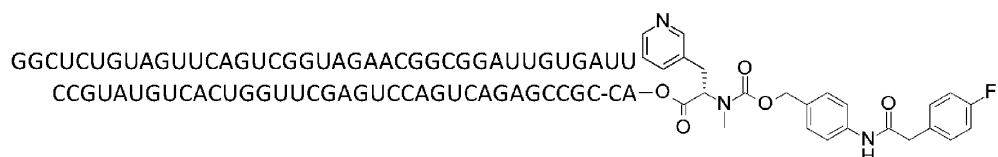
[0345] 化合物 A A t R - 7 7 配列番号 : 2 7 7

MeSnPr-tRNA(AsnE2+ACL)_cug



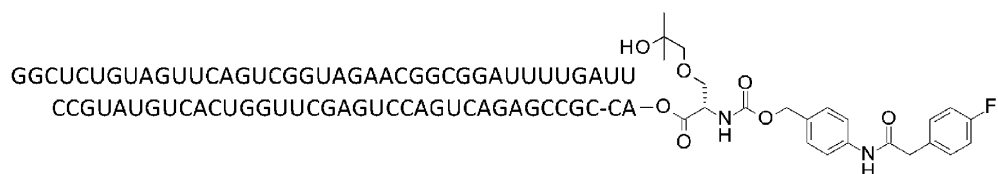
[0346] 化合物 A A t R - 7 8 配列番号 : 2 7 8

MeA3Pr-tRNA(AsnE2+ACL)_gug



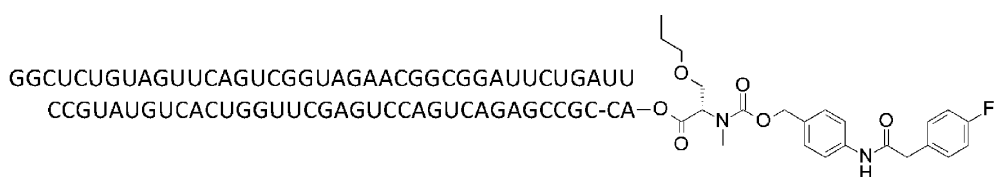
[0347] 化合物 A A t R - 7 9 配列番号 : 2 7 9

StBuOH-tRNA(AsnE2+ACL)_uug



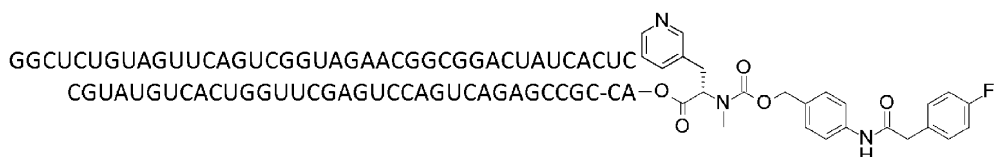
[0348] 化合物 A A t R - 8 0 配列番号 : 2 8 0

MeSnPr-tRNA(AsnE2+ACL)_cug



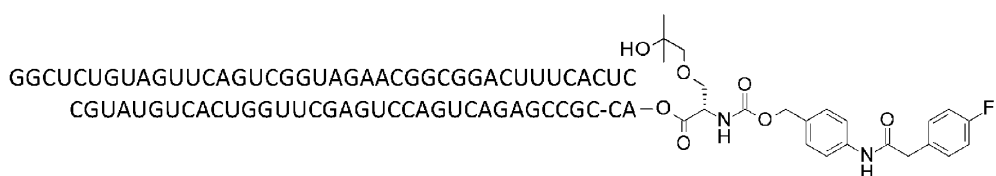
[0349] 化合物 A A t R - 8 1 配列番号 : 2 8 1

MeA3Pr-tRNA(AsnE2+ACL)_auc



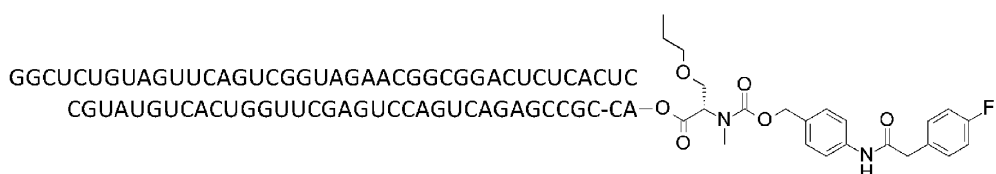
[0350] 化合物 A A t R - 8 2 配列番号 : 2 8 2

StBuOH-tRNA(AsnE2+ACL)_uuc



[0351] 化合物 A A t R - 8 3 配列番号 : 2 8 3

MeSnPr-tRNA(AsnE2+ACL)_cuc



[0352] 実施例 6. ペプチドの翻訳合成

次に、3種類のアミノアシル化 tRNA が存在する状況で、1つのコドンボックスにおける3種類のアミノ酸の読み分けを確認するための実験を実施した。具体的には、同一コドンボックス内の3種類のコドンのうちいずれか1つを含み、それ以外は同一配列の鋳型 mRNA（鋳型 mRNA 配列番号 : 134 (mR-1) ~ 配列番号 : 162 (mR-29)、配列番号 : 219 (mR-42) ~ 配列番号 : 221 (mR-44)）を、アミノアシル化 tRNA 混合液を用いて翻訳し、ペプチド化合物を翻訳合成した。特定のコドンボックスでは、wobbler コドン同士を読み分け、さらにもう一つ別の

コドンも同時に読み分けることができた。アミノ酸は2通りの組み合わせで検証し、いずれの条件でも、特定のコドンボックスにおいては、1コドンボックス内で3アミノ酸の読み分けが可能であることが示された。

[0353] 翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。

具体的には、翻訳液(1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNaseネガティブ)由来tRNA (Roche社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS)に、1 μ M 鋳型mRNA (配列番号: 134 (mR-1)、配列番号: 135 (mR-2)、もしくは配列番号: 136 (mR-3))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25 mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-25)を10 μ M、アミノアシル化tRNA混合液(化合物AA tR-1、化合物AA tR-2、化合物AA tR-3の混合液)を30 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0354] そのほかの配列(配列番号: 137 (mR-4)、配列番号: 138 (mR-5)、配列番号: 139 (mR-6))に関しても無細胞翻訳を行った

。

具体的には、翻訳液（1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来 tRNA (Roche社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 137 (mR-4)、配列番号: 138 (mR-5)、もしくは配列番号: 139 (mR-6))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-4、化合物 AAtR-5、化合物 AAtR-6 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

[0355] そのほかの配列 (配列番号: 140 (mR-7)、配列番号: 141 (mR-8)、配列番号: 142 (mR-9)) に関しても無細胞翻訳を行った。

。

具体的には、翻訳液（1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 m

M ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社), 0.26 μM EF-G, 0.24 μM RF2, 0.17 μM RF3, 0.5 μM RRF, 4 μg/ml クレアチンキナーゼ, 3 μg/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μg/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μM IF1, 0.4 μM IF2, 1.5 μM IF3, 40 μM EF-Tu, 54 μM EF-Ts, 1 μM EF-P-Lys, 0.4 unit/μl RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μM リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μM GlyRS, 0.4 μM IleRS, 0.68 μM PheRS, 0.16 μM ProRS, 0.09 μM ThrRS) に、1 μM 鋳型mRNA (配列番号: 140 (mR-7)、配列番号: 141 (mR-8)、もしくは配列番号: 142 (mR-9))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25 mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA t R-25) を10 μM、アミノアシル化tRNA混合液 (化合物AA t R-7、化合物AA t R-8、化合物AA t R-9の混合液、化合物AA t R-29、化合物AA t R-30、化合物AA t R-31の混合液、化合物AA t R-60、化合物AA t R-61、化合物AA t R-62の混合液、化合物AA t R-63、化合物AA t R-64、化合物AA t R-65の混合液もしくは化合物AA t R-75、化合物AA t R-76、化合物AA t R-77の混合液) を30 μMになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0356] そのほかの配列 (配列番号: 143 (mR-10)、配列番号: 144 (mR-11)、配列番号: 145 (mR-12)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM

酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml *E. coli* MRE600 (RNaseネガティブ) 由来 tRNA (Roche社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 54 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 143 (mR-10)、配列番号: 144 (mR-11)、もしくは配列番号: 145 (mR-12))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-10、化合物 AAtR-11、化合物 AAtR-12 の混合液、もしくは化合物 AAtR-32、化合物 AAtR-33、化合物 AAtR-34 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0357] そのほかの配列 (配列番号: 146 (mR-13)、配列番号: 147 (mR-14)、配列番号: 148 (mR-15)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml *E. coli* MRE600

(RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 49 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega 社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 146 (mR-13)、配列番号: 147 (mR-14)、もしくは配列番号: 148 (mR-15))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-13、化合物 AAtR-14、化合物 AAtR-15 の混合液、化合物 AAtR-72、化合物 AAtR-73、化合物 AAtR-74 の混合液もしくは化合物 AAtR-81、化合物 AAtR-82、化合物 AAtR-83 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

[0358] そのほかの配列 (配列番号: 149 (mR-16)、配列番号: 150 (mR-17)、配列番号: 151 (mR-18)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M

EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフوسفターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 54 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.02 μ M ValRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 149 (mR-16), 配列番号: 150 (mR-17), 配列番号: 151 (mR-18))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-16、化合物 AAtR-17、化合物 AAtR-18 の混合液、もしくは化合物 AAtR-38、化合物 AAtR-39、化合物 AAtR-40 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

[0359] そのほかの配列 (配列番号: 152 (mR-19), 配列番号: 153 (mR-20), 配列番号: 154 (mR-21)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフوسفターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレ

オシドニリン酸キナーゼ, $2.7 \mu\text{M}$ IF1, $0.4 \mu\text{M}$ IF2, $1.5 \mu\text{M}$ IF3, $40 \mu\text{M}$ EF-Tu, $35 \mu\text{M}$ EF-Ts, $1 \mu\text{M}$ EF-P-Lys, $0.4 \text{ unit}/\mu\text{l}$ RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), $1.2 \mu\text{M}$ リボソーム, 0.5 mM PGA, $0.09 \mu\text{M}$ GlyRS, $0.4 \mu\text{M}$ IleRS, $0.68 \mu\text{M}$ PheRS, $0.16 \mu\text{M}$ ProRS, $0.09 \mu\text{M}$ ThrRS) に、 $1 \mu\text{M}$ 鋳型 mRNA (配列番号: 152 (mR-19)、配列番号: 153 (mR-20)、もしくは配列番号: 154 (mR-21))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を $10 \mu\text{M}$ 、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-19、化合物 AAtR-20、化合物 AAtR-21 の混合液もしくは化合物 AAtR-41、化合物 AAtR-42、化合物 AAtR-43 の混合液) を $30 \mu\text{M}$ になるように翻訳反応混合物に添加し、 37°C で 1 時間静置することで行った。

[0360] そのほかの配列 (配列番号: 155 (mR-22)、配列番号: 156 (mR-23)、配列番号: 157 (mR-24)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, $1.5 \text{ mg}/\text{ml}$ E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), $0.26 \mu\text{M}$ EF-G, $0.25 \mu\text{M}$ RF1, $4 \text{ mg}/\text{ml}$ クレアチンキナーゼ, $3 \text{ mg}/\text{ml}$ ミオキナーゼ, $2 \text{ unit}/\text{ml}$ 無機ピロフォスファターゼ, $1.1 \text{ mg}/\text{ml}$ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, $2.7 \mu\text{M}$ IF1, $0.4 \mu\text{M}$ IF2, $1.5 \mu\text{M}$ IF3, $40 \mu\text{M}$ EF-Tu, $34.6 \mu\text{M}$ EF-Ts, $0.4 \text{ unit}/\mu\text{l}$ RNasein Ribonuclease inhi

bitor(Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 155 (mR-22)、配列番号: 156 (mR-23)、もしくは配列番号: 157 (mR-24))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-22、化合物 AAtR-23、化合物 AAtR-24 の混合液もしくは化合物 AAtR-44、化合物 AAtR-45、化合物 AAtR-46 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0361] そのほかの配列 (配列番号: 158 (mR-25)、配列番号: 141 (mR-8)、配列番号: 142 (mR-9)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 3 μ M Ala1BtRNA 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフオスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M I

I e R S, 0.68 μ M P h e R S, 0.16 μ M P r o R S, 0.09 μ M T h r R S) に、1 μ M 鋳型mRNA (配列番号: 158 (mR-25)、配列番号: 141 (mR-8)、もしくは配列番号: 142 (mR-9))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25 mMずつ、i n i t i a t o r アミノアシル化tRNA (化合物A A t R-25) を10 μ M、アミノアシル化tRNA混合液 (化合物A A t R-26、化合物A A t R-8、化合物A A t R-9の混合液、化合物A A t R-47、化合物A A t R-30、化合物A A t R-31の混合液、化合物A A t R-66、化合物A A t R-67、化合物A A t R-68の混合液、化合物A A t R-69、化合物A A t R-70、化合物A A t R-71の混合液もしくは化合物A A t R-78、化合物A A t R-79、化合物A A t R-80の混合液) を30 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37°Cで1時間静置することで行った。

[0362] そのほかの配列 (配列番号: 159 (mR-26)、配列番号: 144 (mR-11)、配列番号: 145 (mR-12)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM G T P, 1 mM A T P, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM H E P E S-K O H p H 7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 3 μ M A l a 1 B t R N A 1.5 mg/ml E. c o l i M R E 600 (R N a s e ネガティブ) 由来tRNA (R o c h e 社), 0.26 μ M E F-G, 0.24 μ M R F 2, 0.17 μ M R F 3, 0.5 μ M R R F, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 u n i t / m l 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M I F 1, 0.4 μ M I F 2, 1.5 μ M I F 3, 40 μ M E F-T u, 35 μ M E F-T s, 1 μ M E F-P-L y s, 0.4 u n i t / μ l R N a s e i n Ribonuclease inhibitor (Promega社, N 2 1 1 1), 1.2 μ M リボ

ソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 159 (mR-26)、配列番号: 144 (mR-11)、もしくは配列番号: 145 (mR-12))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-27、化合物 AAtR-11、化合物 AAtR-12 の混合液、もしくは化合物 AAtR-48、化合物 AAtR-33、化合物 AAtR-34 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

[0363] そのほかの配列 (配列番号: 162 (mR-29)、配列番号: 153 (mR-20)、配列番号: 154 (mR-21)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 3 μ M Ala1B tRNA 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega 社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.0

9 μM ThrRS) に、1 μM 鋳型 mRNA (配列番号: 162 (mR-29)、配列番号: 153 (mR-20)、もしくは配列番号: 154 (mR-21))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μM 、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-28、化合物 AAtR-20、化合物 AAtR-21 の混合液、もしくは化合物 AAtR-51、化合物 AAtR-42、化合物 AAtR-43 の混合液) を 30 μM になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

[0364] そのほかの配列 (配列番号: 146 (mR-13)、配列番号: 147 (mR-14)、配列番号: 148 (mR-15)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μM EF-G, 0.24 μM RF2, 0.17 μM RF3, 0.5 μM RRF, 4 $\mu\text{g/ml}$ クレアチンキナーゼ, 3 $\mu\text{g/ml}$ ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 $\mu\text{g/ml}$ ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μM IF1, 0.4 μM IF2, 1.5 μM IF3, 40 μM EF-Tu, 54 μM EF-Ts, 1 μM EF-P-Lys, 0.4 unit/ μl RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega 社, N2111), 1.2 μM リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μM GlyRS, 0.4 μM IleRS, 0.68 μM PheRS, 0.16 μM ProRS, 0.09 μM ThrRS) に、1 μM 鋳型 mRNA (配列番号: 146 (mR-13)、配列番号: 147 (mR-14)、もしくは配列番号: 148 (mR-15))、それぞれの

鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-35、化合物 AAtR-36、化合物 AAtR-37 の混合液) を 30 μ M になるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0365] そのほかの配列 (配列番号: 152 (mR-19), 配列番号: 153 (mR-20), 配列番号: 154 (mR-21)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNase ネガティブ) 由来 tRNA (Roche 社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 54 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega 社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型 mRNA (配列番号: 152 (mR-19)、配列番号: 153 (mR-20)、もしくは配列番号: 154 (mR-21))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μ M、アミノアシル化 tRNA 混合液 (化合物 AAtR-41、化合物 AAtR-42、化合物 AAtR-43 の混合液) を 30 μ M になるよう

に翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0366] そのほかの配列（配列番号：155（mR-22）、配列番号：156（mR-23）、配列番号：157（mR-24））に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液（1mM GTP, 1mM ATP, 20mM クレアチンリン酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 酢酸カリウム, 10mM 酢酸マグネシウム, 2mM スペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, 1.5mg/ml E. coli MRE600（RNaseネガティブ）由来tRNA（Roche社）, 0.26μM EF-G, 0.25μM RF1, 4μg/ml クレアチンキナーゼ, 3μg/ml ミオキナーゼ, 2unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1μg/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7μM IF1, 0.4μM IF2, 1.5μM IF3, 40μM EF-Tu, 34.6μM EF-Ts, 0.4unit/μl RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), 1.2μM リボソーム, 0.5mM PGA, 0.09μM GlyRS, 0.4μM IleRS, 0.68μM PheRS, 0.16μM ProRS, 0.09μM ThrRS)に、1μM 鋳型mRNA（配列番号：155（mR-22）、配列番号：156（mR-23）、もしくは配列番号：157（mR-24））、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA（化合物AA tR-25）を10μM、アミノアシル化tRNA混合液（化合物AA tR-44、化合物AA tR-45、化合物AA tR-46の混合液）を30μMになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0367] そのほかの配列（配列番号：160（mR-27）、配列番号：147（mR-14）、配列番号：148（mR-15））に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液（1mM GTP, 1mM ATP, 20mM クレ

アチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 3 μ M Ala1BtRNA1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型mRNA (配列番号: 160 (mR-27)、配列番号: 147 (mR-14)、もしくは配列番号: 148 (mR-15))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25 mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-25) を10 μ M、アミノアシル化tRNA混合液 (化合物AA tR-49、化合物AA tR-36、化合物AA tR-37の混合液) を30 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37°Cで1時間静置することで行った。

[0368] そのほかの配列 (配列番号: 161 (mR-28)、配列番号: 150 (mR-17)、配列番号: 151 (mR-18)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 1.5 mg/ml E. coli MRE600

(RNaseネガティブ)由来tRNA (Roche社), $0.26\mu\text{M}$ EF-G, $0.24\mu\text{M}$ RF2, $0.17\mu\text{M}$ RF3, $0.5\mu\text{M}$ RRF, $4\mu\text{g}/\text{ml}$ クレアチンキナーゼ, $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ミオキナーゼ, $2\text{unit}/\text{ml}$ 無機ピロフォスファターゼ, $1.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, $2.7\mu\text{M}$ IF1, $0.4\mu\text{M}$ IF2, $1.5\mu\text{M}$ IF3, $40\mu\text{M}$ EF-Tu, $35\mu\text{M}$ EF-Ts, $1\mu\text{M}$ EF-P-Lys, $0.4\text{unit}/\mu\text{l}$ RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), $1.2\mu\text{M}$ リボソーム, 0.5mM PGA, $0.09\mu\text{M}$ GlyRS, $0.4\mu\text{M}$ IleRS, $0.68\mu\text{M}$ PheRS, $0.16\mu\text{M}$ ProRS, $0.02\mu\text{M}$ ValRS) に、 $1\mu\text{M}$ 鋳型mRNA (配列番号: 161 (mR-28), 配列番号: 150 (mR-17), 配列番号: 151 (mR-18))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25mM ずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AAtR-25) を $10\mu\text{M}$ 、アミノアシル化tRNA混合液 (化合物AAtR-50、化合物AAtR-39、化合物AAtR-40の混合液) を $30\mu\text{M}$ になるように翻訳反応混合物に添加し、 37°C で1時間静置することで行った。

[0369] そのほかの配列 (配列番号: 219 (mR-42), 配列番号: 220 (mR-43), 配列番号: 221 (mR-44)) に関しても無細胞翻訳を行った。

具体的には、翻訳液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM クレアチンリン酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 酢酸カリウム, 10mM 酢酸マグネシウム, 2mM スペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, $3\mu\text{M}$ Ala1BtRNA $1.5\text{mg}/\text{ml}$ E. coli MRE600 (RNaseネガティブ)由来tRNA (Roche社), $0.26\mu\text{M}$ EF-G, $0.24\mu\text{M}$ RF2, $0.17\mu\text{M}$ RF3, $0.5\mu\text{M}$ RRF, $4\mu\text{g}/\text{ml}$ クレアチンキナーゼ, $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ミオキナーゼ, $2\text{unit}/\text{ml}$ 無機ピロフォスファターゼ

, 1. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2. 7 μM IF1, 0. 4 μM IF2, 1. 5 μM IF3, 40 μM EF-Tu, 49 μM EF-Ts, 1 μM EF-P-Lys, 0. 4 unit/ μl RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), 1. 2 μM リボソーム, 0. 5 mM PGA, 0. 09 μM GlyRS, 0. 4 μM IleRS, 0. 68 μM PheRS, 0. 16 μM ProRS, 0. 09 μM ThrRS) に、1 μM 鋳型mRNA (配列番号: 219 (mR-42)、配列番号: 220 (mR-43)、もしくは配列番号: 221 (mR-44))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0. 25 mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-25) を10 μM 、アミノアシル化tRNA混合液 (化合物AA tR-57、化合物AA tR-59の混合液) を20 μM 、アミノアシル化tRNA (化合物AA tR-58) を20 μM になるように翻訳反応混合物に添加し、37°Cで1時間静置することで行った。

[0370] 次に、アミノアシル化tRNAの濃度に依存してコドンボックス内の読み分け効率に差が生じるか検証するため、XXAのアンチコドンをもつアミノアシルtRNAのみが翻訳系中に存在する状況で、コドンボックス内のXXAコドン以外のコドンにおけるクロスリードの割合を翻訳量で確認した。具体的には、同一コドンボックス内の4種類のコドンのうちいずれか1つを含み、それ以外は同一配列の鋳型mRNA (鋳型mRNA 配列番号: 163 (mR-30) ~ 配列番号: 174 (mR-41)) を、XXAコドンのアンチコドンをもつアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-52、もしくは化合物AA tR-53、もしくは化合物AA tR-54、もしくは化合物AA tR-55、もしくは化合物AA tR-56) を、異なる濃度条件で加え、ペプチド化合物を翻訳合成した。

アミノアシルtRNAの濃度依存的にコドンボックス内の読み分け比率が変化することが示された。またこの現象は、tRNAのbody配列や、チャージするアミノ酸によらないことも示された。

[0371] 翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いた。具体的には、翻訳液（1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 mM ジチオスレイトール, 3 μ M Ala1BtRNA 1.5 mg/ml E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社), 0.26 μ M EF-G, 0.24 μ M RF2, 0.17 μ M RF3, 0.5 μ M RRF, 4 μ g/ml クレアチンキナーゼ, 3 μ g/ml ミオキナーゼ, 2 unit/ml 無機ピロフォスファターゼ, 1.1 μ g/ml ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2.7 μ M IF1, 0.4 μ M IF2, 1.5 μ M IF3, 40 μ M EF-Tu, 35 μ M EF-Ts, 1 μ M EF-P-Lys, 0.4 unit/ μ l RNasein Ribonuclease inhibitor (Promega社, N2111), 1.2 μ M リボソーム, 0.5 mM PGA, 0.09 μ M GlyRS, 0.4 μ M IleRS, 0.68 μ M PheRS, 0.16 μ M ProRS, 0.09 μ M ThrRS) に、1 μ M 鋳型mRNA (配列番号: 163 (mR-30)、配列番号: 164 (mR-31)、配列番号: 165 (mR-32)、配列番号: 166 (mR-33))、それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ0.25 mMずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-25) を10 μ M、アミノアシル化tRNA (化合物AA tR-52) を0.8 μ Mもしくは1.6 μ Mもしくは3.2 μ M、6.4 μ Mもしくは、12.8 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置することで行った。

[0372] その他のコドンボックスについても同様の検証を行った。

具体的には、翻訳液（1 mM GTP, 1 mM ATP, 20 mM クレアチンリン酸, 50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 2 mM スペルミジン, 1 m

M ジチオスレイトール, $3\mu\text{M}$ Ala1BtRNA $1.5\text{mg}/\text{ml}$ E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社), $0.26\mu\text{M}$ EF-G, $0.24\mu\text{M}$ RF2, $0.17\mu\text{M}$ RF3, $0.5\mu\text{M}$ RRF, $4\mu\text{g}/\text{ml}$ クレアチンキナーゼ, $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ミオキナーゼ, $2\text{unit}/\text{ml}$ 無機ピロフォスファターゼ, $1.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ヌクレオシド二リン酸キナーゼ, $2.7\mu\text{M}$ IF1, $0.4\mu\text{M}$ IF2, $1.5\mu\text{M}$ IF3, $40\mu\text{M}$ EF-Tu, $35\mu\text{M}$ EF-Ts, $1\mu\text{M}$ EF-P-Lys, $0.4\text{unit}/\mu\text{l}$ RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), $1.2\mu\text{M}$ リボソーム, 0.5mM PGA, $0.09\mu\text{M}$ GlyRS, $0.4\mu\text{M}$ IleRS, $0.68\mu\text{M}$ PheRS, $0.16\mu\text{M}$ ProRS) に、 $1\mu\text{M}$ 鋳型mRNA (配列番号: 167 (mR-34)、配列番号: 168 (mR-35)、配列番号: 169 (mR-36)、配列番号: 170 (mR-37)) それぞれの鋳型mRNAにコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0.25mM ずつ、initiatorアミノアシル化tRNA (化合物AA tR-25) を $10\mu\text{M}$ 、アミノアシル化tRNA (化合物AA tR-53) を $0.8\mu\text{M}$ もしくは $1.6\mu\text{M}$ もしくは $3.2\mu\text{M}$ 、 $6.4\mu\text{M}$ もしくは、 $12.8\mu\text{M}$ になるように翻訳反応混合物に添加し、 37°C で1時間静置することで行った。

[0373] その他のコドンボックスについても同様の検証を行った。

具体的には、翻訳液 (1mM GTP, 1mM ATP, 20mM クレアチンリン酸, 50mM HEPES-KOH pH7.6, 100mM 酢酸カリウム, 10mM 酢酸マグネシウム, 2mM スペルミジン, 1mM ジチオスレイトール, $3\mu\text{M}$ Ala1BtRNA $1.5\text{mg}/\text{ml}$ E. coli MRE600 (RNaseネガティブ) 由来tRNA (Roche社), $0.26\mu\text{M}$ EF-G, $0.24\mu\text{M}$ RF2, $0.17\mu\text{M}$ RF3, $0.5\mu\text{M}$ RRF, $4\mu\text{g}/\text{ml}$ クレアチンキナーゼ, $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ミオキナーゼ, $2\text{unit}/\text{ml}$ 無機ピロフォスファターゼ

, 1. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヌクレオシドニリン酸キナーゼ, 2. 7 μM IF1, 0. 4 μM IF2, 1. 5 μM IF3, 40 μM EF-Tu, 35 μM EF-Ts, 1 μM EF-P-Lys, 0. 4 unit/ μl RNasein Ribonuclease inhibitor(Promega社, N2111), 1. 2 μM リボソーム, 0. 5 mM PGA, 0. 09 μM GlyRS, 0. 68 μM LeuRS, 0. 68 μM PheRS, 0. 16 μM ProRS) に、1 μM 鋳型 mRNA (配列番号: 171 (mR-38)、配列番号: 172 (mR-39)、配列番号: 173 (mR-40)、配列番号: 174 (mR-41))、それぞれの鋳型 mRNA にコードされている天然アミノ酸群をそれぞれ 0. 25 mM ずつ、initiator アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-25) を 10 μM 、アミノアシル化 tRNA (化合物 AAtR-54、もしくは化合物 AAtR-55、もしくは化合物 AAtR-56) を 0. 8 μM もしくは 1. 6 μM もしくは 3. 2 μM 、6. 4 μM もしくは、12. 8 μM になるように翻訳反応混合物に添加し、37°C で 1 時間静置することで行った。

鋳型 mRNA と期待される翻訳ペプチド化合物、その分子量に関しては、以下の表 4 に記載した。

[0374]

[表4]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	期待される翻訳ペプチド化合物	m/z [M-H]	R.T. (method1)
化合物 A A t R-1	m R-1	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.8	3.0
化合物 A A t R-2	m R-2	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.8	3.0
化合物 A A t R-3	m R-3	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物 A A t R-4	m R-4	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.8	3.0
化合物 A A t R-5	m R-5	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.8	3.0
化合物 A A t R-6	m R-6	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物 A A t R-7	m R-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物 A A t R-8	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物 A A t R-9	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.7	2.8
化合物 A A t R-10	m R-10	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物 A A t R-11	m R-11	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物 A A t R-12	m R-12	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.8	2.8
化合物 A A t R-13	m R-13	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.0
化合物 A A t R-14	m R-14	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.0	3.0
化合物 A A t R-15	m R-15	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.8
化合物 A A t R-16	m R-16	BdpFL-Phe-TV11GV-nBuG-IIP1G	1626.8	2.8
化合物 A A t R-17	m R-17	BdpFL-Phe-TV11GV-Pic2-IIP1G	1624.7	2.7
化合物 A A t R-18	m R-18	BdpFL-Phe-TV11GV-dA-IIP1G	1584.7	2.6
化合物 A A t R-19	m R-19	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1722.8	3.0
化合物 A A t R-20	m R-20	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.8	3.0
化合物 A A t R-21	m R-21	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.8	2.9
化合物 A A t R-22	m R-22	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.7	3.0
化合物 A A t R-23	m R-23	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.7	3.0
化合物 A A t R-24	m R-24	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.7	2.8
化合物 A A t R-26	m R-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.0
化合物 A A t R-27	m R-26	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.0	3.0
化合物 A A t R-28	m R-29	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.0	3.0
化合物 A A t R-29	m R-7	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.7	2.6
化合物 A A t R-30	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1768.7	2.9
化合物 A A t R-31	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.7	3.1
化合物 A A t R-32	m R-10	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1771.7	2.6
化合物 A A t R-33	m R-11	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.7	2.9
化合物 A A t R-34	m R-12	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物 A A t R-35	m R-13	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.7	2.6
化合物 A A t R-36	m R-14	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.7	2.9
化合物 A A t R-37	m R-15	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物 A A t R-38	m R-16	BdpFL-Phe-TV11GV-MeA3Pr-IIP1G	1675.7	2.4
化合物 A A t R-39	m R-17	BdpFL-Phe-TV11GV-StBuOH-IIP1G	1673.8	2.7
化合物 A A t R-40	m R-18	BdpFL-Phe-TV11GV-MeSnPr-IIP1G	1656.8	2.9
化合物 A A t R-41	m R-19	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1771.7	2.6
化合物 A A t R-42	m R-20	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1768.7	2.9
化合物 A A t R-43	m R-21	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1752.7	3.1
化合物 A A t R-44	m R-22	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6

化合物 A A t R-45	m R-23	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1770.0	2.9
化合物 A A t R-46	m R-24	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1754.0	3.1
化合物 A A t R-47	m R-25	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.1	2.6
化合物 A A t R-48	m R-26	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-49	m R-27	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-50	m R-28	BdpFL-Phe-TV11GV-MeA3Pr-IIP1G	1676.0	2.4
化合物 A A t R-51	m R-29	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1773.0	2.6
化合物 A A t R-52	m R-32	BdpFL-Phe-TF11GF-MeHph-IIP1G	1786.0	3.1
化合物 A A t R-53	m R-36	BdpFL-Phe-PF11GF-MeHph-IIP1G	1782.0	3.2
化合物 A A t R-54	m R-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-MeHph-LLPLG	17860.0	3.3
化合物 A A t R-55	m R-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-MeHph-LLPLG	1786.0	3.3
化合物 A A t R-56	m R-40	BdpFL-Phe-TFLLGF-Ile-LLPLG	1724.0	3.4
化合物 A A t R-57	m R-42	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1724.0	3.1
化合物 A A t R-58	m R-43	BdpFL-Phe-TF11GF-SPh2Cl-IIP1G	1807.9	3.2
化合物 A A t R-59	m R-44	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.9
化合物 A A t R-60	m R-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.96	3.0
化合物 A A t R-61	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1720.95	3.0
化合物 A A t R-62	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.91	2.9
化合物 A A t R-63	m R-7	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-64	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-65	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.91	2.8
化合物 A A t R-66	m R-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-67	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-68	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.91	2.8
化合物 A A t R-69	m R-25	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-70	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1721.94	3.0
化合物 A A t R-71	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1681.91	2.8
化合物 A A t R-72	m R-13	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-73	m R-14	BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-IIP1G	1723.95	3.0
化合物 A A t R-74	m R-15	BdpFL-Phe-TF11GF-dA-IIP1G	1680.9	2.8
化合物 A A t R-75	m R-7	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.96	2.6
化合物 A A t R-76	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.97	2.9
化合物 A A t R-77	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.98	3.1
化合物 A A t R-78	m R-25	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.96	2.6
化合物 A A t R-79	m R-8	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.96	2.9
化合物 A A t R-80	m R-9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.97	3.1
化合物 A A t R-81	m R-13	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	1772.95	2.6
化合物 A A t R-82	m R-14	BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	1769.97	2.9
化合物 A A t R-83	m R-15	BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	1753.97	3.1

[0375] 鋳型DNA（配列番号：175（D-35）～配列番号：215（D-75）及び配列番号：216（D-79）～配列番号：218（D-81））から、RiboMAX Large Scale RNA production System T7（Promega社，P1300）を用いたin vitro 転写反応により鋳型mRNA（配列番号：134（mR-1）～配列番号：174（mR-41）、配列番号：219（mR-42）～配列番号：221（mR-44））を合成し、RNeasy Mini kit（Qi

agen社)により精製した。

[0376] 鋳型DNA 配列番号：175 (D-35)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：176 (D-36)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：177 (D-37)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：178 (D-38)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TGTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：179 (D-39)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TGTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：180 (D-40)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TGTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：181 (D-41)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCATATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：182 (D-42)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCAAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：183 (D-43)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCAGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：184 (D-44)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TAATATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：185 (D-45)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TAAAATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：186 (D-46)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TAAGATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：187 (D-47)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCATATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：188 (D-48)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCAAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：189 (D-49)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCAGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：190 (D-50)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT

TTTTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：191 (D-51)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT

TTTAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：192 (D-52)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT

TTTGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：193 (D-53)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TAGTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：194 (D-54)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TAGAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：195 (D-55)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TAGGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：196 (D-56)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TTGCATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：197 (D-57)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TTGAATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：198 (D-58)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TTGGATTATTCCGATTCTATAAGCTTC

鋳型DNA 配列番号：199 (D-59)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCACATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：200 (D-60)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TAACATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：201 (D-61)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TGACATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：202 (D-62)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTGTTATTATTGGTGT

TTTCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：203 (D-63)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TAGCATTATTCCGATTCTATAAGCTTC

鋳型DNA 配列番号：204 (D-64)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TTCTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：205 (D-65)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TTCCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：206 (D-66)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TTCAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：207 (D-67)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TTCCGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：208 (D-68)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT

TACTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：209 (D-69)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT

TACCATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：210 (D-70)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT

TACAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：211 (D-71)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAATAAGGAGATATAAATATGCCGTTTATTATTGGTTT

TACGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：212 (D-72)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT

TATTCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：213 (D-73)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT

TATCCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：214 (D-74)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT

TATACTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：215 (D-75)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTCTACTAGGTTT

TATGCTACTACCGCTAGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：216 (D-79)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCGTATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：217 (D-80)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCGAATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

鋳型DNA 配列番号：218 (D-81)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TCGGATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[0377] 鋳型mRNA 配列番号：134 (mR-1)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUUGGUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型mRNA 配列番号：135 (mR-2)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUUGGUUUUCUUAUUUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型mRNA 配列番号：136 (mR-3)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUUGGUUUUCUGAUUAUUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型mRNA 配列番号：137 (mR-4)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUUGGUUUUGUUAUUUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型mRNA 配列番号：138 (mR-5)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUUGGUUUUGUAAUUUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 3 9 (m R - 6)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUGGUUUUGUGAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 0 (m R - 7)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 1 (m R - 8)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 2 (m R - 9)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCAGAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 3 (m R - 1 0)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUCUAAUUUAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 4 (m R - 1 1)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUCUAAUUUAAAAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 4 5 (m R - 1 2)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUGACUUUUUUUAUUCUAAUUUAAGAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 3 (m R - 2 0)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUAGAAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 4 (m R - 2 1)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUAGGAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 5 (m R - 2 2)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUUAUUUUGCAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 6 (m R - 2 3)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUUAUUUUGAAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 7 (m R - 2 4)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUCUUAUUUUGGAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 8 (m R - 2 5)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUCACAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 5 9 (m R - 2 6)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUUUUAUUGGUUUUAACAUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 0 (m R - 2 7)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUGGUUUUGACAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 1 (m R - 2 8)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUGUUUAUUUUGGUGUUUUCAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 2 (m R - 2 9)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUCUUAUUUAGCAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 3 (m R - 3 0)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUGGUUUUUUCAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 4 (m R - 3 1)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCCAUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 5 (m R - 3 2)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUGGUUUUUCAUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 6 (m R - 3 3)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAU AUGACUUUUAUUUUGGUUUUUUCAUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 7 (m R - 3 4)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUUUAUUGGUUUUACUUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 8 (m R - 3 5)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUUUAUUGGUUUUACCAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 6 9 (m R - 3 6)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUUUAUUGGUUUUACAAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 7 0 (m R - 3 7)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAUAAGGAGAUUAAAUAUGCCGUUUUUAUUGGUUUUACGAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 7 1 (m R - 3 8)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUUCUACUACCGCUAGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 7 2 (m R - 3 9)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUCCUACUACCGCUAGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 7 3 (m R - 4 0)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUACUACUACCGCUAGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 1 7 4 (m R - 4 1)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUCUACUAGGUUUUAUGCUACUACCGCUAGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 2 1 9 (m R - 4 2)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUCGUAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 2 2 0 (m R - 4 3)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUCGAAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

鋳型 m R N A 配列番号 : 2 2 1 (m R - 4 4)

R N A 配列 :

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUAUGACUUUUAUUAUUGGUUUUCGGAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

[0378] 実施例 7. 翻訳ペプチドの分析

実施例 6 にて調製した非天然ペプチド翻訳溶液を10倍希釈し、LC-FLR-MSの装置を用いて分析した。分析データはMSデータより対象となる翻訳ペプチドの保持時間を同定し、該当保持時間の蛍光ピークを定量することで、ペプチド翻訳量を評価した。なお、定量評価は実施例 4 にて合成したLCT12、もしくは実施例 3 にて合成したLCT067を標品とし検量線を作成し、相対定量により含有量を算出した。LC-MSは下記の表 5 の条件に従い、対象となるサンプルに応じて最適な条件を選択して分析した。

[0379]

[表5]

分析条件	装置	カラム	移動相	グラジエント (%B)	流速 (mL/min)	カラム温度	蛍光測定波長 (Ex/Em)	MS mode
Method1	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof	waters BEH C18 (2.1 x 50mm, φ 1.7um)	A=0.1%FA with H2O B=0.1%FA with CH3CN	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0 min=10%	0.5	40	491 nm/ 515 nm	ESI-

[0380] 評価した結果を表6～表33、図1～図28に示す。試したコドンボックスのうち、CUXおよびGUXでは、クロスリードによって目的外のアミノ酸がやや多く翻訳され、十分な読み分け効果は観察されなかった（表6～表7、図1～図2）。一方、それら以外のコドンボックスではいずれも3種類のコドンに対応した特異的なアミノ酸の翻訳が観察され、十分な読み分け効果が確認された。なお、tRNAボディー（アンチコドン以外の配列部分）を変更しても、同様の効果が得られることが確認された。（表8～表28-9、図3～図23-9）。また、翻訳系中に添加するtRNAの濃度を増大させると、目的のペプチドおよびクロスリードの翻訳量がともに増加するが、その増加の割合は互いに異なる可能性が示唆された（表29～表33、図24～図28）。このことから、tRNA濃度の至適な条件（クロスリードに比べて目的のペプチドがより効率よく翻訳され得る条件）を設定することも可能と考えられた。

[0381] [表6]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-1 化合物AA t R-2 化合物AA t R-3	mR-1	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.22
		BdpFL-Phe-TF IG F-P i2-IP IG	0.41
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-2	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P i2-IP IG	1.44
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
	mR-3	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-P i2-IP IG	0.40
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.44

1 コドンボックスにおける3アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である（評価したコドン：CUU，CUA，CUG）。

[0382] [表7]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-4 化合物AA t R-5 化合物AA t R-6	mR-4	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.76
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.26
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-5	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.19
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-6	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.32
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.73

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: GUU, GUA, GUG)。

[0383] [表8]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-7 化合物AA t R-8 化合物AA t R-9	mR-7	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.11
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.03
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-8	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.45
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.03
	mR-9	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.13
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.28

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAU, CAA, CAG)。

[0384] [表9]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-10 化合物AA t R-11 化合物AA t R-12	mR-10	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.84
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.04
	mR-11	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.15
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
	mR-12	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.05
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.41

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AAU, AAA, AAG)。

[0385]

[表10]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-13 化合物AA t R-14 化合物AA t R-15	mR-13	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	1.19
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-14	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	2.38
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
	mR-15	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.12
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.36

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: GAU, GAA, GAG)。

[0386] [表11]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-16 化合物AA t R-17 化合物AA t R-18	mR-16	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.49
		BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	0.00
	mR-17	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	1.53
		BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	0.00
	mR-18	BdpFL-Phe-TV IG V-nBuG -IP IG	0.02
		BdpFL-Phe-TV IG V-P ic2-IP IG	0.11
		BdpFL-Phe-TV IG V-dA -IP IG	1.17

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: UUU, UUA, UUG)。

[0387] [表12]

アミノアシル化RNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-19 化合物AA t R-20 化合物AA t R-21	mR-19	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.85
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.01
	mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	1.62
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.02
	mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.02
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	1.35

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AGU, AGA, AGG)。

[0388]

[表13]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-22 化合物AA t R-23 化合物AA t R-24	mR-22	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	1.18
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.03
	mR-23	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.03
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	1.27
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.01
	mR-24	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.01
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.05
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	1.53

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: UGC, UGA, UGG)。

[0389] [表14]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-26 化合物AA t R-8 化合物AA t R-9	mR-25	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.19
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.39
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.03
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.27

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAC, CAA, CAG)。

[0390] [表15]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-27 化合物AA t R-11 化合物AA t R-12	mR-26	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.16
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.26
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.00
	mR-12	BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-nBuG-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-P ₁₅ 2-IP ₁₅	0.00
		BdpFL-Phe-TF ₁₅ F-dA-IP ₁₅	0.21

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AAC, AAA, AAG)。

[0391]

[表16]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-28 化合物AA t R-20 化合物AA t R-21	mR-29	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.20
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.36
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.00
	mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-nBuG -IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-P ic2-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-dA -IP IG	0.11

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AGC, AGA, AGG)。

[0392] [表17]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-29 化合物AA t R-30 化合物AA t R-31	mR-7	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	1.29
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	0.05
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-8	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	1.31
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.03
	mR-9	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	0.10
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.80

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAU, CAA, CAG)。

[0393] [表18]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-32 化合物AA t R-33 化合物AA t R-34	mR-10	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.74
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	0.04
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	0.77
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-12	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBuO H -IP IG	0.06
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.64

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AAU, AAA, AAG)。

[0394]

[表19]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-35 化合物AA t R-36 化合物AA t R-37	mR-13	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.91
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	0.03
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-14	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	1.50
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.07
	mR-15	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	0.13
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.87

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: GAU, GAA, GAG)。

[0395] [表20]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-38 化合物AA t R-39 化合物AA t R-40	mR-16	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP IG	0.50
		BdpFL-Phe-TV IG V-S tBu0 H-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-17	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP IG	0.02
		BdpFL-Phe-TV IG V-S tBu0 H-IP IG	0.96
		BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP IG	0.03
	mR-18	BdpFL-Phe-TV IG V-M eA3Pr-IP IG	0.02
		BdpFL-Phe-TV IG V-S tBu0 H-IP IG	0.14
		BdpFL-Phe-TV IG V-M eSnPr-IP IG	1.77

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: UUU, UUA, UUG)。

[0396] [表21]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-41 化合物AA t R-42 化合物AA t R-43	mR-19	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.95
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	0.02
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.01
	mR-20	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.00
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	1.16
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	0.02
	mR-21	BdpFL-Phe-TF IG F-M eA3Pr-IP IG	0.01
		BdpFL-Phe-TF IG F-S tBu0 H-IP IG	0.08
		BdpFL-Phe-TF IG F-M eSnPr-IP IG	1.50

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AGU, AGA, AGG)。

[0397]

[表22]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-44 化合物A A t R-45 化合物A A t R-46	mR-22	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	1.39
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-23	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.99
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR-24	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.07
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	1.82

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: UGC, UGA, UGG)。

[0398] [表23]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-47 化合物A A t R-30 化合物A A t R-31	mR-25	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.58
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.39
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.05
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.59

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAC, CAA, CAG)。

[0399] [表24]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-48 化合物A A t R-33 化合物A A t R-34	mR-26	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.55
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR-11	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.22
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR-12	BdpFL-Phe-TFIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-StBuOH-IPIG	0.04
		BdpFL-Phe-TFIIGF-MeSnPr-IPIG	0.50

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: AAC, AAA, AAG)。

[0400]

[表25]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物A A t R -49 化合物A A t R -36 化合物A A t R -37	mR - 2 7	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.47
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR - 1 4	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.40
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.01
	mR - 1 5	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.05
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.35

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン : G A C , G A A , G A G) 。

[0401] [表26]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物A A t R -50 化合物A A t R -39 化合物A A t R -40	mR - 2 8	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IPIG	0.65
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR - 1 7	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IPIG	0.03
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IPIG	0.33
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR - 1 8	BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeA3Pr-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-StBuOH-IPIG	0.04
		BdpFL-Phe-TVIIIGV-MeSnPr-IPIG	0.58

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン : U U C , U U A , U U G) 。

[0402] [表27]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物A A t R -51 化合物A A t R -42 化合物A A t R -43	mR - 2 9	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.55
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.00
	mR - 2 0	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.01
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.36
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.02
	mR - 2 1	BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeA3Pr-IPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-StBuOH-IPIG	0.05
		BdpFL-Phe-TFIIIGF-MeSnPr-IPIG	0.35

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン : A G C , A G A , A G G) 。

[0403]

[表28]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-57 化合物AA t R-58 化合物AA t R-59	mR-42	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.49
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.02
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.01
	mR-43	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.09
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	1.62
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.01
	mR-44	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.02
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.15
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	1.68

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CGU, CGA, CGG)。

[0404] [表28-2]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-60 化合物AA t R-61 化合物AA t R-62	mR-7	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.55
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.27
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.03
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.35

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAU, CAA, CAG)。

[0405] [表28-3]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-63 化合物AA t R-64 化合物AA t R-65	mR-7	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.58
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	mR-8	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.31
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.00
	mR-9	BdpFL-Phe-TFIIGF-nBuG-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-Pic2-IIPIG	0.00
		BdpFL-Phe-TFIIGF-dA-IIPIG	0.41

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAU, CAA, CAG)。

[0406]

[表28-4]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-66 化合物AA t R-67 化合物AA t R-68	m R - 2 5	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.60
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.29
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 9	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.36

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAC, CAA, CAG)。

[0407] [表28-5]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-69 化合物AA t R-70 化合物AA t R-71	m R - 2 5	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.62
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.30
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 9	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.42

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAC, CAA, CAG)。

[0408] [表28-6]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物AA t R-72 化合物AA t R-73 化合物AA t R-74	m R - 1 3	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.76
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 1 4	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.33
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.00
	m R - 1 5	BdpFL-Phe-TF11GF-nBuG-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-Pic2-11PIG	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-dA-11PIG	0.37

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: GAU, GAA, GAG)。

[0409]

[表28-7]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-75 化合物AA t R-76 化合物AA t R-77	m R - 7	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.31
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.86
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.02
	m R - 9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.55

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAU, CAA, CAG)。

[0410] [表28-8]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-78 化合物AA t R-79 化合物AA t R-80	m R - 2 5	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.31
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.00
	m R - 8	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.80
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.00
	m R - 9	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.02
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.46

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: CAC, CAA, CAG)。

[0411] [表28-9]

アミノアシル化tRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物AA t R-81 化合物AA t R-82 化合物AA t R-83	m R - 1 3	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.32
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.00
	m R - 1 4	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.05
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.75
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.02
	m R - 1 5	BdpFL-Phe-TF11GF-MeA3Pr-IIP1G	0.00
		BdpFL-Phe-TF11GF-StBuOH-IIP1G	0.01
		BdpFL-Phe-TF11GF-MeSnPr-IIP1G	0.52

1 コドンボックスにおける3 アミノ酸読み分けの翻訳評価結果の表である (評価したコドン: GAU, GAA, GAG)。

[0412]

[表29-1]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-52	12.8 μM	mR-30	BdpFL-Phe-TF DG F-M eH ph-IP DG	1.26
		mR-31		0.18
		mR-32		1.22
		mR-33		0.62
	6.4 μM	mR-30		0.82
		mR-31		0.09
		mR-32		1.24
		mR-33		0.36
	3.2 μM	mR-30		0.80
		mR-31		0.05
		mR-32		0.86
		mR-33		0.22
	1.6 μM	mR-30		0.50
		mR-31		0.03
		mR-32		0.45
		mR-33		0.11
	0.8 μM	mR-30		0.30
		mR-31		0.02
		mR-32		0.31
		mR-33		0.08

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証した結果の表である（評価したコドン：UCU，UCC，UCA，UCG）。

[0413] [表29-2]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	XXA翻訳量に対する比率 (%)
化合物A A t R-52	12.8 μM	mR-30	BdpFL-Phe-TF DG F-M eH ph-IP DG	103.71
		mR-31		15.04
		mR-32		100.00
		mR-33		51.25
	6.4 μM	mR-30		65.60
		mR-31		7.24
		mR-32		100.00
		mR-33		28.77
	3.2 μM	mR-30		93.81
		mR-31		5.72
		mR-32		100.00
		mR-33		26.15
	1.6 μM	mR-30		109.74
		mR-31		6.94
		mR-32		100.00
		mR-33		25.36
	0.8 μM	mR-30		95.28
		mR-31		5.34
		mR-32		100.00
		mR-33		24.15

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証し、目的産物量との比率算出した結果の表である（評価したコドン：UCU，UCC，UCA，UCG）。

[0414]

[表30-1]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-53	12.8 μM	mR-34	BdpFL-Phe-PF ₃ F-M eHph-IP ₃	0.79
		mR-35		0.50
		mR-36		0.98
		mR-37		0.61
	6.4 μM	mR-34		0.88
		mR-35		0.30
		mR-36		0.85
		mR-37		0.54
	3.2 μM	mR-34		0.64
		mR-35		0.25
		mR-36		1.09
		mR-37		0.44
	1.6 μM	mR-34		0.55
		mR-35		0.14
		mR-36		0.64
		mR-37		0.29
	0.8 μM	mR-34		0.26
		mR-35		0.07
		mR-36		0.32
		mR-37		0.15

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証した結果の表である（評価したコドン：ACU, ACC, ACA, ACG）。

[0415] [表30-2]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	XXA 翻訳量に対する比率 (%)
化合物A A t R-53	12.8 μM	mR-34	BdpFL-Phe-PF ₃ F-M eHph-IP ₃	81.10
		mR-35		50.86
		mR-36		100.00
		mR-37		62.59
	6.4 μM	mR-34		102.50
		mR-35		35.06
		mR-36		100.00
		mR-37		63.60
	3.2 μM	mR-34		58.61
		mR-35		23.37
		mR-36		100.00
		mR-37		40.64
	1.6 μM	mR-34		86.06
		mR-35		21.38
		mR-36		100.00
		mR-37		45.21
	0.8 μM	mR-34		80.76
		mR-35		20.68
		mR-36		100.00
		mR-37		46.62

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証し、目的産物量との比率算出した結果の表である（評価したコドン：ACU, ACC, ACA, ACG）。

[0416]

[表31-1]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物A A t R-54	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLG F-M eH oh-LLPLG	0.30
		mR-39		0.01
		mR-40		0.70
		mR-41		0.56
	6.4 μ M	mR-38		0.20
		mR-39		0.00
		mR-40		0.47
		mR-41		0.31
	3.2 μ M	mR-38		0.11
		mR-39		0.00
		mR-40		0.30
		mR-41		0.17
	1.6 μ M	mR-38		0.06
		mR-39		0.00
		mR-40		0.16
		mR-41		0.09
	0.8 μ M	mR-38		0.03
		mR-39		0.00
		mR-40		0.09
		mR-41		0.05

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証した結果の表である（評価したコドン：A U U，A U C，A U A，A U G）。

[0417] [表31-2]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	XXA 翻訳量に対する比率 (%)
化合物A A t R-54	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLG F-M eH oh-LLPLG	42.15
		mR-39		1.31
		mR-40		100.00
		mR-41		79.24
	6.4 μ M	mR-38		42.10
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		65.60
	3.2 μ M	mR-38		35.22
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		57.26
	1.6 μ M	mR-38		37.49
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		53.26
	0.8 μ M	mR-38		33.80
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		55.92

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証し、目的産物量との比率算出した結果の表である（評価したコドン：A U U，A U C，A U A，A U G）。

[0418]

[表32-1]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μM)
化合物A A t R-55	12.8 μM	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLG F-M eHph-LLPLG	0.21
		mR-39		0.00
		mR-40		0.77
		mR-41		0.43
	6.4 μM	mR-38		0.13
		mR-39		0.00
		mR-40		0.53
		mR-41		0.24
	3.2 μM	mR-38		0.08
		mR-39		0.00
		mR-40		0.36
		mR-41		0.12
	1.6 μM	mR-38		0.04
		mR-39		0.00
		mR-40		0.19
		mR-41		0.04
	0.8 μM	mR-38		0.02
		mR-39		0.00
		mR-40		0.11
		mR-41		0.03

単一コドンに対するアミノアシル化 t R N A 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証した結果の表である（評価したコドン：A U U，A U C，A U A，A U G）。

[0419] [表32-2]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	XXA翻訳量に対する比率 (%)
化合物A A t R-55	12.8 μM	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLG F-M eHph-LLPLG	27.95
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		56.55
	6.4 μM	mR-38		24.78
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		44.82
	3.2 μM	mR-38		22.45
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		34.96
	1.6 μM	mR-38		21.43
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		21.04
	0.8 μM	mR-38		16.07
		mR-39		0.00
		mR-40		100.00
		mR-41		25.31

単一コドンに対するアミノアシル化 t R N A 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証し、目的産物量との比率算出した結果の表である（評価したコドン：A U U，A U C，A U A，A U G）。

[0420]

[表33-1]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
化合物A A t R-56	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-Ile-LLPLG	0.91
		mR-39		0.55
		mR-40		1.11
		mR-41		1.25
	6.4 μ M	mR-38		0.82
		mR-39		0.47
		mR-40		0.95
		mR-41		1.09
	3.2 μ M	mR-38		0.69
		mR-39		0.34
		mR-40		0.76
		mR-41		0.62
	1.6 μ M	mR-38		0.39
		mR-39		0.25
		mR-40		0.53
		mR-41		0.31
	0.8 μ M	mR-38		0.23
		mR-39		0.13
		mR-40		0.25
		mR-41		0.14

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証した結果の表である（評価したコドン：AUU，AUC，AUA，AUG）。

[0421] [表33-2]

アミノアシル化tRNA	アミノアシル化tRNA濃度	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	XXA翻訳量に対する比率 (%)
化合物A A t R-56	12.8 μ M	mR-38	BdpFL-Phe-TFLLGF-Ile-LLPLG	82.07
		mR-39		49.45
		mR-40		100.00
		mR-41		112.80
	6.4 μ M	mR-38		86.46
		mR-39		49.15
		mR-40		100.00
		mR-41		115.09
	3.2 μ M	mR-38		90.81
		mR-39		44.24
		mR-40		100.00
		mR-41		82.09
	1.6 μ M	mR-38		73.46
		mR-39		47.96
		mR-40		100.00
		mR-41		58.19
	0.8 μ M	mR-38		89.86
		mR-39		50.80
		mR-40		100.00
		mR-41		54.77

単一コドンに対するアミノアシル化 tRNA 濃度依存的な、目的産物および同コドンボックス内のクロスリード翻訳物の翻訳量の変化を、翻訳実験で検証し、目的産物量との比率算出した結果の表である（評価したコドン：AUU，AUC，AUA，AUG）。

[0422] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて

詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

産業上の利用可能性

- [0423] 一態様において、本開示のtRNAは、天然の遺伝暗号表では読み分けられていないNNAのコドンとNNGのコドン、NNUのコドンとNNAのコドンとNNGのコドン、およびNNCのコドンとNNAのコドンとNNGのコドンの読み分けが可能である点で有用である。一態様において、本開示の翻訳系は、天然の遺伝暗号表を用いた翻訳系よりも多くの種類のアミノ酸を翻訳すること（コドン拡張）が可能である点で有用である。

請求の範囲

- [請求項1] M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAおよび M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNAを含む翻訳系であって、
 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され、
前記2種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、翻訳系。
- [請求項2] M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも2種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、請求項1に記載の翻訳系。
- [請求項3] (i) M_1M_2U で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、または、
(ii) M_1M_2C で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンをもつtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを含む翻訳系であって、
 M_1 および M_2 はそれぞれコドンの1文字目および2文字目のヌクレオシドを表し、 M_1 および M_2 はそれぞれ独立にアデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) のいずれかから選択され、
前記 (i) および (ii) における3種類のtRNAにはそれぞれ互いに異なるアミノ酸またはアミノ酸類縁体が結合している、翻訳系。
- [請求項4] M_1M_2U 、 M_1M_2C 、 M_1M_2A 、および M_1M_2G によって構成されるコドンボックスから、少なくとも3種類のアミノ酸またはアミノ酸類縁体が翻訳可能である、請求項1または3に記載の翻訳系。

[請求項5] M_1 および M_2 が以下の (i) から(x)のいずれかである、請求項1から4のいずれか一項に記載の翻訳系：

- (i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (v) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (vii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がシチジン(C)である、
- (viii) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (ix) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または
- (x) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[請求項6] M_1 および M_2 が以下の (i) から(vii)のいずれかである、請求項5に記載の翻訳系：

- (i) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がウリジン(U)である、
- (ii) M_1 がウリジン(U)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (iii) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (iv) M_1 がシチジン(C)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、
- (v) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がアデノシン(A)である、
- (vi) M_1 がアデノシン(A)であり、 M_2 がグアノシン(G)である、または
- (vii) M_1 がグアノシン(G)であり、 M_2 がアデノシン(A)である。

[請求項7] 前記翻訳系に含まれる前記tRNAの一コドンあたりの濃度が、(i) 0.8~1000 μM 、(ii) 1.6~500 μM 、(iii) 3.2~250 μM 、(iv) 6.4~150 μM 、または(v) 10~100 μM のいずれかである、請求項1から6のいずれか一項に記載の翻訳系。

[請求項8] 前記アミノ酸が、天然アミノ酸または非天然アミノ酸である、請求

項 1 から 7 のいずれか一項に記載の翻訳系。

- [請求項9] 前記tRNAが開始tRNAまたは伸長tRNAである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項10] 前記tRNAが原核生物由来または真核生物由来のtRNAである、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項11] 前記アンチコドンが、アデノシン(A)、グアノシン(G)、シチジン(C)、またはウリジン(U)のいずれか1種または複数種のヌクレオシドを含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項12] 一つの遺伝暗号表から、20種類より多くのアミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳可能である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項13] 無細胞翻訳系である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項14] 再構成型の無細胞翻訳系である、請求項 13 に記載の翻訳系。
- [請求項15] 大腸菌由来のリボソームを含む、請求項 13 または 14 に記載の翻訳系。
- [請求項16] 前記tRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項17] 前記tRNAのうち、 M_1M_2A で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNA、および M_1M_2G で表されるコドンに相補的なアンチコドンを有するtRNAが、翻訳系外で前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体と結合されたものである、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の翻訳系。
- [請求項18] 前記tRNAが、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法によって得られるものである、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の翻訳系。

- [請求項19] 請求項1から18のいずれか一項に記載の翻訳系の製造方法であって、前記アミノ酸またはアミノ酸類縁体を翻訳系外でtRNAに結合させることを含む、方法。
- [請求項20] 前記翻訳系外でのアミノ酸またはアミノ酸類縁体のtRNAへの結合が、pCpA法、pdCpA法、人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法、またはアミノアシルtRNA合成酵素（ARS）を用いた方法による、請求項19に記載の翻訳系の製造方法。
- [請求項21] 請求項1から18のいずれか一項に記載の翻訳系または請求項19もしくは20に記載の方法によって得られる翻訳系を用いて核酸を翻訳することを含む、ペプチドの製造方法。
- [請求項22] ペプチドが環状部を有するペプチドである、請求項21に記載の方法。
- [請求項23] 請求項21または22に記載の方法により製造されたペプチド。
- [請求項24] 請求項1から18のいずれか一項に記載の翻訳系または請求項19もしくは20に記載の方法によって得られる翻訳系を用いて核酸ライブラリーを翻訳することを含む、ペプチドライブラリーの製造方法。
- [請求項25] 請求項24に記載の方法により製造されたペプチドライブラリー。
- [請求項26] 請求項25に記載のペプチドライブラリーに標的分子を接触させることを含む、当該標的分子に対して結合活性を有するペプチドの同定方法。