明　細　書

発明の名称 ：

翻訳促進剤、鋳型核酸、翻訳鋳型の生産方法、および、タンパク質の生産方法

技術分野

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

背景技術

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

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

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

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

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

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

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開２００９－７２２０７号公報

特許文献2：特開２０１３－１５８３４２号公報

特許文献3：特開２００７－９７４３８号公報

特許文献4：特開２００８－３５７０１号公報

特許文献5：特開２００５－２４７８５７号公報

特許文献6：国際公開第２０１６／１４３７９９号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｂｉｏｔｅｃｈｏｎｏｌｏｇｙ Ｊｏｕｒｎａｌ，２０１４，９，６４１－６５１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 無細胞タンパク質合成では、鋳型ＤＮＡから翻訳鋳型であるｍＲＮＡを合成する必要がある。そのため、ｍＲＮＡの合成効率の観点からは、目的タンパク質の合成とは関係の無い３’ＵＴＲは短い方が好ましい。しかしながら、目的タンパク質の合成効率は高い方が好ましい。

[0010] 本出願における開示は、上記従来の問題点を解決するためになされたものであり、鋭意研究を行ったところ、（１）目的タンパク質のアミノ酸配列を

コードするコード領域の３’末端に隣接して連結される３’非翻訳領域の核酸として、（２）前記コード領域の３’末端に隣接する、１０～４０個の核酸配列からなる第１領域と、前記第１領域に連結する２～４０個のＡが連続するポリＡ配列からなる第２領域と、を含み、（３）前記第１領域が、ヘアピン構造を有することで、（４）比較的短い３’非翻訳領域にもかかわらず、目的タンパク質の合成効率が向上すること、を新たに見出した。

[0011] すなわち、本出願の開示の目的は、比較的短い３’非翻訳領域にもかかわらず、目的タンパク質の合成効率が向上する翻訳促進剤、鋳型核酸、翻訳鋳型の生産方法、および、タンパク質の生産方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本出願の開示は、以下に示す、翻訳促進剤、鋳型核酸、翻訳鋳型の生産方法、および、タンパク質の生産方法に関する。

[0013] （１）無細胞タンパク質合成系における翻訳促進剤であって、

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

前記３’非翻訳領域が、

前記コード領域の３’末端に隣接する、１０～４０個の核酸配列からなる第１領域と、

前記第１領域に連結する２～４０個のＡが連続するポリＡ配列からなる第２領域と、

から構成され、

前記第１領域が、ヘアピン構造を有する、

翻訳促進剤。

（２）無細胞タンパク質合成系に用いる鋳型核酸であって、

プロモーター領域と、

前記プロモーター領域によって作動可能に連結される目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と、

上記（１）に記載の翻訳促進剤からなる、前記コード領域の３’非翻訳領

域と、

を含む、鋳型核酸。

（３）前記コード領域は、前記目的タンパク質として、任意のタンパク質のＣ末端にプロテインタグを含む融合タンパク質をコードする領域である、上記（２）に記載の鋳型核酸。

（４）前記コード領域は、前記目的タンパク質として、任意のタンパク質のＮ末端にプロテインタグを含む融合タンパク質をコードする領域である、上記（２）または（３）に記載の鋳型核酸。

（５）前記鋳型核酸は、転写鋳型ＤＮＡである、上記（２）～（４）のいずれか一つに記載の鋳型核酸。

（６）前記鋳型核酸は、翻訳鋳型ｍＲＮＡである、上記（２）～（４）のいずれか一つに記載の鋳型核酸。

（７）無細胞タンパク質合成系のための翻訳鋳型の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で上記（２）～（５）のいずれか一つに記載の鋳型核酸を用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、

を備える、方法。

（８）タンパク質の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡをタンパク質に翻訳するための要素の存在下で上記（６）に記載の鋳型核酸を用いてタンパク質を合成する工程、

を備える、生産方法。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図１は、翻訳促進剤および鋳型核酸の概略を説明する概略図である。

[図2]図２は、実施例および比較例で用いた転写用鋳型ＤＮＡの概略について説明する概略図である。

[図3]図３は、ＰＣＲにより転写鋳型ＤＮＡの作製手順について説明する概略図である。

[図4]図４は、実施例１～２および比較例１～３の3’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄを用いて解析した構造を示す図である。

[図5]図５は、実施例１～２および比較例１～３のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。

[図6]図４は、実施例３～５の3’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄを用いて解析した構造を示す図である。

[図7]図７は、実施例３～５および比較例４のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。

[図8]図８は、実施例６～９および比較例５の3’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄを用いて解析した構造を示す図である。

[図9]図９は、実施例６～８および比較例５のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。

[図10]図１０は、実施例９および比較例５のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下に、本出願で開示する、翻訳促進剤、鋳型核酸、翻訳鋳型の生産方法、および、タンパク質の生産方法について詳しく説明する。なお、以下の説明は、理解を容易にするためのものであり、本出願で開示する技術事項の範囲は、以下の説明に限定されない。以下の例示以外にも、本出願で開示する趣旨を損なわない範囲で適宜変更できることは言うまでもない。

[0016] （翻訳促進剤）

図１を参照して、翻訳促進剤の実施形態について説明する。図１は、翻訳促進剤の概略を説明する概略図である。翻訳促進剤１は、無細胞タンパク質合成系で使用する鋳型核酸において、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域２の3’末端に隣接して連結されている。そして、翻訳促進剤１は、自身はタンパク質として合成されない、3’非翻訳領域としての

核酸からなる。実施形態に係る翻訳促進剤１は、コード領域２の３’末端に隣接する第１領域１ａと、第１領域１ａに連結する第２領域１ｂと、から構成されている。

[0017] 第１領域１ａは、ヘアピン構造を有する。なお、本明細書において、「ヘアピン構造」とは、第１領域１ａを構成する核酸内において、他の核酸と対合して形成される安定的なループ構造を意味する。第１領域１ａは、ヘアピン構造を形成できる配列であれば、核酸配列に特に制限はない。また、第１領域１ａを構成する核酸の長さ（核酸の個数）は、核酸配列が短すぎるとヘアピン構造を形成し難くなるあるいはストップコドンがヘアピン構造に含まれるあるいは近接することから、例えば、１０以上、１３以上、１５以上、２０以上とすればよい。一方、上限に関しては、タンパク質合成ができる範囲内であれば、特に制限はない。しかしながら、一般的に、プロモーター３、コード領域２および３’非翻訳領域１を含む鋳型核酸ＤＮＡは、ＰＣＲなどの核酸増幅反応によって取得する。そのため、プライマー設計上の観点やコストの観点から、短い方が好ましい。したがって、効率化の観点から、第１領域１ａを構成する核酸の長さは、５０以下、４５以下、４０以下、３０以下、としてもよい。なお、第１領域１ａに形成される「ループ構造」の数は、一つであってもよいし、２つ以上であってもよい。

[0018] 第２領域１ｂは、Ａ（アデニン）が連続するポリＡ配列で構成されている。Ａの長さ（核酸の個数）は、少なすぎるとタンパク質の合成効率が向上しないことから、例えば、２以上、３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上、１０以上、１１以上、１２以上、１３以上、１４以上、１５以上とすればよい。一方、上限に関しては、第１領域１ａと同様、無細胞タンパク質合成ができる範囲内であれば特に制限はないが、プライマー設計上の観点やコストの観点から、第２領域１ｂを構成するＡ（アデニン）の長さ（個数）は、５０以下、４５以下、４０以下、３５以下、３０以下、とすればよい。

[0019] 実施形態に係る翻訳促進剤により、目的とするタンパク質の合成効率が向

上する機序は不明であるが、後述する実施例および比較例に示す通り、コード領域２の３’末端に、第１領域１ａと、第２領域１ｂとを順に配置することで、タンパク質の合成効率が向上する。

[0020] 翻訳促進剤は、転写鋳型ＤＮＡに適用される場合には、このＤＮＡの３’末端側においてＤＮＡ二本鎖として備えられる。また、翻訳促進剤が、翻訳鋳型ｍＲＮＡに適用される場合には、このｍＲＮＡの３’末端側において一本鎖ＲＮＡとして備えられる。

[0021]（鋳型核酸）

図１を参照して、鋳型核酸の実施形態について説明する。図１は、鋳型核酸の概略を説明する概略図である。鋳型核酸１０は、プロモーター領域３と、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域２と、翻訳促進剤１と、を含む。翻訳促進剤１は、既に説明済みであることから、プロモーター領域３とコード領域２について、以下に説明をする。

[0022] プロモーター領域３は、遺伝子の転写が行われるときの、転写開始部分として機能すれば、配列は特に制限はなく、当該技術分野で公知のプロモーター配列を採用することができる。プロモーター領域３を構成する配列としては、例示であって限定するものではないが、公知のＴ７プロモーター配列、ＳＰ６プロモーター配列、Ｔ３プロモーター配列などが挙げられる。

[0023] コード領域２は、目的タンパク質のアミノ酸をコードする核酸配列であり、且つ、プロモーター領域３によって作動可能となるように連結されていれば特に制限はない。

[0024] なお、図１に示す例では、プロモーター領域３の直後にコード領域２が連結しているが、コード領域２のプロモ―タ領域３側に、コード領域２により合成される目的タンパク質に付加するプロテインタグ（Ｃ末端プロテインタグ）をコードする配列を連結してもよい。プロテインタグ配列を含むことで、目的タンパク質をタグ付きの融合タンパク質として合成できる。同様に、コード領域２の翻訳促進剤１側に、コード領域２により合成される目的タンパク質に付加するプロテインタグ（Ｎ末端プロテインタグ）をコードする配

列を連結してもよい。Ｃ末端プロテインタグ配列およびＮ末端プロテインタグ配列は、いずれか一方のみ連結してもよいし、両方を連結してもよい。

[0025] Ｃ末端プロテインタグおよびＮ末端プロテインタグは、例えば、Ｈｉｓタグ、ＧＳＴタグ、ＭＢＰタグ、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、ＢＣＣＰタグが挙げられる。また、視覚的に検出可能なものとしては、例えば、ＧＦＰ（Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＢＦＰ（Ｂｌｕｅ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＣＦＰ（Ｃｙａｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＲＦＰ（Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＹＦＰ（Ｙｅｌｌｏｗ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＧＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｇｒｅｅｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＣＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｃｙａｎ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＲＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｒｅｄ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＥＹＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｙｅｌｌｏｗ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ）、ＴＭＲ（ＴｅｔｒａＭｅｔｈｙｌ－Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）、ルシフェラーゼ等が挙げられる。なお、上記Ｃ末端プロテインタグおよびＮ末端プロテインタグは、単なる例示で、その他のプロテインタグであってもよい。

[0026] なお、Ｃ末端プロテインタグ配列およびＮ末端プロテインタグ配列は、任意のタンパク質配列のＮ末端及び／又はＣ末端に対して直接連結されてもよいし、適当なリンカー配列を介して連結されてもよい。

[0027] 鋳型核酸は、後述する無細胞タンパク質合成系に用いる要素の一つである。鋳型核酸は、転写鋳型ＤＮＡであり、また、翻訳鋳型ｍＲＮＡでもありうる。また、転写鋳型ＤＮＡは、ＰＣＲ等で合成された直鎖状ほかプラスミドなどの環状体であってもよい。鋳型核酸が、無細胞タンパク質合成系において用いられ得るＤＮＡ二本鎖の形態の場合、センス鎖が翻訳促進剤としてポリＡ配列を有しているとき、アンチセンス鎖は対応してポリＴ配列を有していることになる。また、転写鋳型ＤＮＡや翻訳鋳型ｍＲＮＡが翻訳促進剤を備える場合は、その３’末端側に翻訳促進剤を備えていることになる。

[0028] 鋳型核酸は、公知の化学的又は遺伝子工学的方法により取得できるが、後述するように、ＰＣＲ等の核酸増幅反応を利用して遺伝子やｃＤＮＡを鋳型として取得することが好ましい。また、翻訳鋳型ｍＲＮＡは、ツーステップ法等に適用される公知の翻訳鋳型ｍＲＮＡの合成方法により取得することができる。

[0029] （転写鋳型ＤＮＡの生産方法）

無細胞タンパク質合成系のための転写鋳型ＤＮＡの生産方法は、目的タンパク質のコード領域を含むＤＮＡに対して核酸増幅反応を実施して、転写鋳型ＤＮＡを合成する工程、を備えることができる。転写鋳型ＤＮＡは、例えば、適宜設計したプライマーセットを用いて、目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域を含むＤＮＡに対して、ＰＣＲの核酸増幅反応により得ることができる。

[0030] また、転写鋳型ＤＮＡは、ベクターを用いて取得することもできる。タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域を少なくとも含むＤＮＡをベクターに挿入することによって鋳型核酸を取得できる。こうして作製したベクターは、それ自体を転写鋳型ＤＮＡとして用いることができるし、ベクターから転写鋳型ＤＮＡに相当するＤＮＡ断片を切り出して用いることもできる。

[0031] 転写鋳型ＤＮＡは、例えば、ＰＣＲ反応液（すなわち、転写鋳型ＤＮＡを精製することなく）として、無細胞タンパク質合成系に適用してもよいし、適宜精製等して無細胞タンパク質合成系に適用してもよい。

[0032] （翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法）

細胞タンパク質合成系のための翻訳鋳型の生産方法は、細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で転写鋳型ＤＮＡを用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、を備えることができる。より具体的には、転写鋳型ＤＮＡを含むＰＣＲ反応液又はベクターに由来する転写鋳型ＤＮＡに対して、転写鋳型ＤＮＡが備えるプロモーター領域に適合するＲＮＡポリメラーゼ及びＲＮＡ合成用の基質（４種類のリボヌク

レオシド３リン酸）等を転写反応に必要な成分を含む組成の下で、例えば、約２０℃～６０℃、好ましくは、約３０℃～４２℃で適当な時間インキュベートすることにより翻訳鋳型ｍＲＮＡを得ることができる。なお、上記の例は、転写鋳型ＤＮＡから翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する手順を示している。代替的に、ｍＲＮＡの長さにもよるが、核酸合成により直接ｍＲＮＡを合成してもよい。

[0033] 翻訳鋳型ｍＲＮＡの生産方法は、無細胞タンパク質合成系としての転写／翻訳系の一部として実施することができるし、翻訳鋳型ｍＲＮＡの翻訳系への適用に先立つ工程として実施することもできる。こうして得られた翻訳鋳型ｍＲＮＡは、その反応液を、翻訳系に適用することができる。

[0034]（タンパク質の生産方法）

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

[0035] 以下に実施例を掲げ、本出願で開示する実施形態を具体的に説明するが、この実施例は単に実施形態の説明のためのものである。本出願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

実施例

[0036]［無細胞タンパク質合成の手順］

実施例における無細胞タンパク質合成手順について説明する。

（１）転写用鋳型ＤＮＡの構造

図２を参照して、実施例および比較例で用いた転写用鋳型ＤＮＡの概略について説明する。転写鋳型ＤＮＡは、図２に示すように、

・５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）：Ｔ７プロモーター３、エンハンサー

・コード領域２：ＣＳＦ３（Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｃｏｌｏｎｙ－ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ ｐｒｏｔｅｉｎ）、Ｌｉｎｋｅｒ＿Ｃ、ＦＬＡＧ ｔａｇ、

・３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、

から構成されている。後述する実施例および比較例では、３’ＵＴＲ部分のみを、様々な配列に代えて実験を行った。３’ＵＴＲ部分を除く配列は、以下のとおり。

[0037] [表1]

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
T7 promoter	CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATA	1
Enhancer	GGG CTCACCTATC TCTCTACACA AAACATTTCC CTACATACAA CTTTCAACTT CCTATT	2
CSF3	ATGGCTGGAC CTGCCACCCA GAGCCCCATG AAGCTGATGG CCCTGCAGCT GCTGCTGTGG CACAGTGCAC TCTGGACAGT GCAGCAAGCC ACCCCCCTGG GCCCTGCCAG CTCCCTGCCC CAGAGCTTCC TGCTCAAGTG CTTAGAGCAA GTGAGGAAGA TCCAGGGCGA TGGCGCAGCG CTCCAGGAGA AGCTGGTGAG TGAGTGTGCC ACCTACAAGC TGTGCCACCC CGAGGAGCTG GTGCTGCTCG GACACTCTCT GGGCATCCCC TGGGCTCCCC TGAGCAGCTG CCCCAGCCAG GCCCTGCAGC TGGCAGGCTG CTTGAGCCAA CTCCATAGCG GCCTTTTCCT CTACCAGGGG CTCCTGCAGG CCCTGGAAGG GATCTCCCCC GAGTTGGGTC CCACCTTCGA CACACTGCAG CTGGACGTCG CCGACTTTGC CACCACCATC TGGCAGCAGA TGGAAGAACT GGGAATGGCC CCTGCCCTGC AGCCCACCCA GGGTGCCATG CCGGCCTTCG CCTCTGCTTT CCAGCGCCGG GCAGGAGGGG TCCTGGTTGC CTCCCATCTG CAGAGCTTCC TGGAGGTGTC GTACCGCGTT CTACGCCACC TTGCCCaHHH C	3
Linker_C	GGA CTC CAG CAG GGA GGT ACT	4
FLAG tag	GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG	5

[0038] （２）ＰＣＲによる転写鋳型ＤＮＡの作製

図３を参照して、ＰＣＲにより転写鋳型ＤＮＡの作製手順について説明する。転写鋳型ＤＮＡは、図３に示すようにＰｒｉｍｅｒを設計し、転写鋳型ＤＮＡを２段階ＰＣＲにより作製した。ＰＣＲの反応溶液組成とプログラムを以下に示す。なお、表５に示すプログラムは、ＳＥＱ．ＩＤ．３０、３１に示すプライマーを用いた際の専用プログラムである。

[0039]

[表2]

1st PCR 反応液

Reagents	Volume
10x PCR buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
10 μM 1st_CSF3_F	1 μL
10 μM 1st_CSF3_R	1 μL
Plasmid DNA	1 μL
PCR DNA Polymerase	1 μL
Ultra pure water	33 μL
Total	50 μL

[0040] [表3]

2nd PCR 反応液

Reagents	Volume
10x PCR buffer	5 μL
2 mM dNTPs	5 μL
25 mM $MgSO_4$	3 μL
10 μM 2nd_CF1	1 μL
100 nM 2nd_CR1	1 μL
10 μM 2nd_CR2	1 μL
1st PCR product	1 μL
PCR DNA Polymerase	1 μL
Ultra pure water	32 μL
Total	50 μL

[0041] [表4]

1st/2nd PCR Program

Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	94°C	2 min	1
2-1 2-2	98°C 68°C	10 sec 1 min	30
3	20°C	-	-

[0042]

[表5]

2nd PCR 2-1, 2-2 専用プログラム

Seg.	Temp.	Time	Cycle
1	94℃	2 min	1
2-1 2-2 2-3	98℃ 60℃ 68℃	10 sec 1 min 1 min	5
3-1 3-2	98℃ 68℃	10 sec 1 min	30
4	72℃	2 min	1
5	20℃	-	-

[0043] なお、使用した試薬および機械は以下のとおり。

・ＰＣＲ酵素：東洋紡株式会社　ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｎｅｏ

・Ｐｒｉｍｅｒ，人工遺伝子：ユーロフィンジェノミクス株式会社　受託合成サービス

・Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ：ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ社製　Ｍａｓｔｅｃｙｃｌｅｒ　Ｘ５０ｓ

[0044] （３）転写反応

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

[0045] [表6]

Reagents	Volume
10x Transcription buffer	2.5 µl
25 mM NTP Mix	2.5 µl
T7 RNA Polymerase	1 µl
100 mM DTT	1.25 µl
2nd PCR Product	2.5 µl
RNAase free water	15.25 ul
Total	25 µl

[0046] 転写反応液２５μｌに対して１０μｌの４Ｍ 酢酸アンモニウムを加えてよく混合し、さらに、１００μｌの１００％エタノールを加え転倒混和し、卓上遠心機で数秒間遠心分離した後、－２０℃で１０分静置した。その後、遠心分離（１２，０００ｒｐｍ、１５分、４°Ｃ）した。上清を除去後、卓上遠心機を用い数秒間遠心した。再度上清を除去し、沈殿が乾燥するまで静置した。その後、転写反応液２５μｌに対して４０μｌのＲＮａｓｅ ｆｒｅｅ水（ＤＥＰＣ水）を加え、チップで沈殿をよく懸濁した。ＰＳＳ４０５０プロトコルに従い、１１０μｌ翻訳溶液中のｍＲＮＡ量を３５μｇとなるように核酸濃度測定を行い、８０μｌにフィルアップし、これを翻訳鋳型ｍＲＮＡ溶液とした。

[0047] （４）翻訳反応

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

[0048] [表7]

Reagents	Volume
Wheat germ extract	10 μl
Amino acid mix	20 μl
mRNA溶液	80 μl
Total	110 μl

[0049] 反応後、反応液をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離（１５，０００ｒｐｍ、１５分、４℃）を行い、上清を翻訳完了後のタンパク質溶液とした。得られたタンパク質の発現量の解析手順を以下に示す。

[0050] ＜使用試薬類＞

・ゲル：４－１５％　Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ　ｇｅｌ（バイオラッドラボラトリーズ社製）

・メンブレン：０．２μｍ　ＰＶＤＦメンブレン（バイオラッドラボラトリーズ社製）

・一次抗体：ＦＬＡＧ抗体（ｍｏｕｓｅ；和光純薬工業株式会社製）

・二次抗体：ｇｏａｔ　ａｎｔｉ　ｍｏｕｓｅ　ＨＲＰ　抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社製）

・ウェスタンブロット発光試薬：ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｗｅｓｔ　Ｐｉｃｏ（Ｔｈｅｒｍｏ社製）

[0051] ＜解析手順＞

（１）翻訳完了後のタンパク質溶液上清を１μＬ、４ｘ　ｓａｍｐｌｅ　ｂｕｆｆｅｒ　２．５μＬ、２Ｍ　ＤＴＴ　１μＬ、超純水５．５μＬを混合して１０μＬに調整した。

（２）ブロックヒーターで、７０℃、１０分加熱した。

（３）加熱したサンプルの、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。

（４）ＳＤＳ－ＰＡＧＥ完了後のゲルとメンブレンを、Ｔｏｕｂｉｎ　ｂｕｆｆｅｒで１５分平衡化した。

（５）セミドライ転写装置で、ゲルのタンパク質をメンブレンへ電気転写した。

（６）メンブレンを、超純水で２分洗浄した。

（７）ＰＢＳ＋２％スキムミルク＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で３０分、メンブレンのブロッキングを行った。

（８）適量の（７）のスキムミルク溶液に、１次抗体（１：２０００）、２次抗体（１：１０００）となるように抗体を加えた。

（９）この抗体溶液とメンブレンをパックして室温で１時間反応させた。

（１０）反応終了後、パックからメンブレンを取り出し、（７）のバッファーで５分×３回の洗浄を行った。

（１１）メンブレンを超純水で２分洗浄した。

（１２）メンブレンに発光試薬をまんべんなく塗布し、３分放置した。

（１３）ケミルミイメージングシステム　Ｆｕｓｉｏｎ　Ｓｏｌｏ　７Ｓ．（ＶＩＬＢＥＲ社製）を用い、露光時間１秒で、メンブレンの発光量を３Ｄイメージ画像とした。

[0052] ［実施例１～２、比較例１～３］

（ヘアピン構造＋ポリＡ配列の評価）

（１）転写用鋳型ＤＮＡの構造

実施例１～２および比較例１～３の３’ＵＴＲとして、以下の配列を有する転写用鋳型ＤＮＡを用いた。具体的な配列は、表８に示す。

・ＮＡＭＥ１－１（比較例１）：ポリＡ配列（長さ１０）＋核酸配列（長さ４７、ヘアピン構造有り）

・ＮＡＭＥ１－２（比較例２）：第１領域（長さ２０、ヘアピン構造無し）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ１－３（比較例３）：第１領域（長さ２０、ヘアピン構造無し）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ１－４（実施例１）：第１領域（長さ２０、ヘアピン構造有り）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ１－５（実施例２）：第１領域（長さ２０、ヘアピン構造有り）＋ポリＡ配列（長さ１０）

[0053] [表8]

NAME	SEQUENCE of 3' UTR （5' to 3' stop + UTR 20_fold + poly A 10）	SEQ.ID.
1-1（比較例1）	TAA AAAAAAAAAA GACCTCTTGG ATCCGGCCAT AAGGGCCTGA TCCTTCGAGG GGGGGCC	6
1-2（比較例2）	TAG AATAA GGCCATTTTTACCGG AAAAAAAAAA	7
1-3（比較例3）	TAG AATAA GGCCCTTTTTCCCGG AAAAAAAAAA	8
1-4（実施例1）	TAG AATAA GTGCTCGGGCtGGCC AAAAAAAAAA	9
1-5（実施例2）	TAG AATAA GTGCTCGGGCtGGtC AAAAAAAAAA	10

[0054] また、図４は、実施例１～２および比較例１～３の３’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄ（ｈｔｔｐ：／／ｒｔｏｏｌｓ．ｃｂｒｃ．ｊｐ／ｃｅｎｔｒｏｉｄｆｏｌｄ／）を用いて解析した構造を示す。

[0055] （２）タンパク質合成量の比較

上記［無細胞タンパク質合成の手順］にしたがって、実施例１～２および比較例１～３の転写用鋳型ＤＮＡを用いてタンパク質を合成した。使用したプライマーを以下に示す。なお、“２ｎｄ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　ｐｒｉｍｅｒ　ＣＲ２”は、実施例１～２および比較例１～３に応じて異なるプライマーを使用したが、その他のプライマーは同じものを使用した。

[0056] [表9]

1st gene specific PCR primer 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CSF3_CF	CACAAAACAT TTCCCTACAT ACAACTTTCA ACTTCCTATT ATGGCTGGAC CTGCCAGC	11
CSF3_CR	AGTACCTCCC TGCTGGAGAC CGGGCTGGGC AAGGTGGCG	12

2nd Reverse primer CR1 100 nM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CR1_1-1	CCCTCGAAGG ATCAGGCCCT TATGGCGGGA TGCAAGAGCT CTTTTTTTTT TTTACTTGTC ATCGTCATCC TTGTAGTCAG TACCTCCCTG CTGG	13
CR1_U30 (1-2～1-5)	GGCCCTCCCG AGCACTTATT CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTCAGT ACCTCCCTGC TGG	14

2nd Reverse primer CR2 10 pM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CR2　1-1	GGCCCCCCCT CGAAGG	15
CR2　1-2	TTTTTTTTTT CCGGTAAAAATGGCC TTATT CTACTTGTCA TCG	16
CR2　1-3	TTTTTTTTT CCGGGAAAAAGGGCC TTATT CTACTTGTCA TCG	17
CR2　1-4	TTTTTTTTT GGCCAGCCCG AGCACTTATT CTACTTGTCA TCG	18
CR2　1-5	TTTTTTTTT GACCAGCCCG AGCACTTATT CTACTTGTCA TCG	19

2nd Forward primer CF1 10 pM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CF1	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTATCTCTCTACACAAAACATTTCC	20

[0057] 図５は、実施例１～２および比較例１～３のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。図５から明らかなように、３’ＵＴＲの第１領域がヘアピン構造を有しない比較例２および３の場合、タンパク質の発現量は、比較例１とほぼ同じであった。一方、３’ＵＴＲの第１領域がヘアピン構造を有し、且つ、第１領域の後にポリＡ配列を設けた場合は、タンパク質発現量に顕著な向上が見られた。

[0058] また、比較例１は特許文献６の実施例７（図１８）で最もタンパク質の発現量が向上した“Ａ１０＋４７ｂｐ”に相当し、且つ、図４に示すようにヘアピン構造を有している。しかしながら、本出願で開示する翻訳促進剤の第

１領域と第２領域の順番が逆となっており、その結果、タンパク質の発現量は低くなっている。以上の結果より、第１領域がヘアピン構造を有すること、且つ、ヘアピン構造を有する第１領域の３’末端側にポリＡ配列からなる第２領域を形成することで、タンパク質の合成量が著しく向上するという効果を奏することを確認した。

[0059] ［実施例３～５、比較例４］

（第１領域の長さの検討）

次に、第１領域の長さとタンパク質発現量の関係を調べた。

（１）転写用鋳型ＤＮＡの構造

実施例３～５および比較例４の３’ＵＴＲとして、以下の配列を有する転写用鋳型ＤＮＡを用いた。具体的な配列は、表１０に示す。

・ＮＡＭＥ２－１（比較例４）：第１領域（長さ０）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ２－２（実施例３）：第１領域（長さ１０）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ２－３（実施例４）：第１領域（長さ３０）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ２－４（実施例５）：第１領域（長さ４０）＋ポリＡ配列（長さ１０）

[0060] [表10]

NAME	SEQUENCE of 3' UTR (5' to 3' stop + 1st region 0~40 + poly A 10)	SEQ.ID.
2-1(比較例4)	TAG AAAAAAAAAA	21
2-2(実施例3)	TAG AATAA GTGCT AAAAAAAAAA	22
2-3(実施例4)	TAG AATAA AGTAA ATATA GTGCTCGGGCGGGCC AAAAAAAAAA	23
2-4(実施例5)	TAG AATAA AGTAA ATATA CACGAGCCCG GTGCTCGGGCGGGCC AAAAAAAAAA	24

[0061] また、図６は、実施例３～５の３’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄ（ｈｔｔｐ：／／ｒｔｏｏｌｓ．ｃｂｒｃ．ｊｐ／ｃｅｎｔｒｏｉｄｆｏｌｄ／）を用いて解析した構造を示す。図６に示すとおり、実施例３～５は、第１領域の長さは異なるものの、何れ

もヘアピン構造を有する。

[0062]（２）タンパク質合成量の比較

上記［無細胞タンパク質合成の手順］にしたがって、実施例３～５および比較例４の転写用鋳型ＤＮＡを用いてタンパク質を合成した。使用したプライマーを以下に示す。なお、ＳＥＱ．ＩＤ．が同じ番号のものは、同じ配列を意味する。

[0063][表11]

1st gene specific PCR primer 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CSF3_CF	CACAAAACAT TTCGCTACAT ACAACTTTCA ACTTCCTATT AIGGCTGGAC CTGCCACC	11
CSF3_CR	AGTACCTCCC TGCTGGAGAC CAGGCTGGGC AAGGTGCCC	12
CSF3_CR_U30/40	TCATCCTTGT AGTCAGTACC TCCCTGCTGG AGACCGGGC1 GGGCAAGGTG GCG	25

2nd Reverse primer CR1 100 nM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CR1_U0 (2-1)	CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTCAGT ACCTCCCTGC TGG	26
CR1_U10 (2-2)	AGCACTTATT CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTCAGT ACCTCCCTGC TGG	27
CR1_U30 (2-3)	GGCCCTCCCG AGCACTATAT TTACTTTATT CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTC	28
CR1_U40 (2-4)	GGCCCTCCCG AGCACCGGGC TCGTGTATAT TTACTTTATT CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTC	29

2nd Reverse primer CR2 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID
CR2_U0(2-1)	TTTTTTTTTT CTACTTGTCA TCGTC	30
CR2_U10(2-2)	TTTTTTTTTT AGCACTTATT CTA	31
CR2_U30(2-3)	TTTTTTTTTT GGCCCGCCCG AGCAC	32
CR2_U30(2-4)	TTTTTTTTTT GGCCCGCCCG AGCAC	32

2nd Forward primer CF1 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CF1	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTAATCTCTCTACACAAAACATTTCC	20

[0064] 図７は、実施例３～５および比較例４のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。図７から明らかなように、３’ＵＴＲの第１領域の長さが０（ヘアピン構造を有しない）の比較例４（２－１）と比較して、第１領域の核酸の長さが１０（２－２、実施例３）、３０（２－３、実施例４）、４０（２－５、実施例５）の何れの場合でも、タンパク質の発現量が向上した。以上の結果より、第１領域の長さは、ヘアピン構造を形成できる範囲で適宜調整すればよいことが明らかとなった。

[0065]［実施例６～９、比較例５］

（ポリＡ配列の長さの検討）

次に、ポリＡ配列の長さとタンパク質発現量の関係を調べた。

（１）転写用鋳型ＤＮＡの構造

実施例６～９および比較例５の３’ＵＴＲとして、以下の配列を有する転写用鋳型ＤＮＡを用いた。具体的な配列は、表１２に示す。

・ＮＡＭＥ３－１（比較例５）：第１領域（長さ２０）＋ポリＡ配列（長さ０）

・ＮＡＭＥ３－２（実施例６）：第１領域（長さ２０）＋ポリＡ配列（長さ１０）

・ＮＡＭＥ３－３（実施例７）：第１領域（長さ２０）＋ポリＡ配列（長さ２０）

・ＮＡＭＥ３－４（実施例８）：第１領域（長さ２０）＋ポリＡ配列（長さ４０）

・ＮＡＭＥ３－５（実施例９）：第１領域（長さ２０）＋ポリＡ配列（長さ２）

[0066] [表12]

NAME	SEQUENCE of 3' UTR （5' to 3' stop + 1st region 20_fold + poly A 0~40）	SEQ ID.
3-1(比較例5)	TAG AATAA GTGCTCGGGCGGGCC	33
3-2(実施例6)	TAG AATAA GTGCTCGGGCGGGCC AAAAAAAAAA	34
3-3(実施例7)	TAG AATAA GTGCTCGGGCGGGCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	35
3-4(実施例8)	TAG AATAA GTGCTCGGGCGGGCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	36
3-5(実施例9)	TAG AATAA GTGCTCGGGCGGGCC AA	37

[0067] また、図８は、実施例６～９および比較例５の３’ＵＴＲ配列を、ｍＲＮＡの２次構造予測ソフト　ＣｅｎｔｒｏｉｄＦｏｌｄ（ｈｔｔｐ：／／ｒｔｏｏｌｓ．ｃｂｒｃ．ｊｐ／ｃｅｎｔｒｏｉｄｆｏｌｄ／）を用いて解析した構造を示す。図８に示すとおり、実施例６～９および比較例５で用いた第１領域は、ヘアピン構造を有する。

[0068] （２）タンパク質合成量の比較

上記［無細胞タンパク質合成の手順］にしたがって、実施例６～９および比較例５の転写用鋳型ＤＮＡを用いてタンパク質を合成した。使用したプラ

イマーを以下に示す。なお、ＳＥＱ．ＩＤ．が同じ番号のものは、同じ配列を意味する。

[0069] [表13]

1st gene specific PCR primer 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CSF3_CF	CACAAAACAT TTCCCTACAT ACAACTTTCA ACTTCCTATT ATGGCTGGAC CTGCCACC	11
CSF3_CR	AGTACCTCCC TGCTGGAGAC CGGGCTGGGC AAGGTGGCG	12

2nd Reverse primer CR1 100 nM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CR1_U20	GGCCCTCCCG AGCACTTATT CTACTTGTCA TCGTCATCCT TGTAGTCAGT ACCTCCCTGC TCG	14

2nd Reverse primer CR2 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CR2_A0(3-1)	GGCCGGCCCG AGCAC	38
CR2_A10(3-2)	TTTTTTTTTT GGCCCGCCCG AGCAC	39
CR2_A20(3-3)	TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GGCCCGCCCG AGCAC	40
CR2_A40(3-4)	TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT GGCCCGCCCG AGCAC	41
CR2_A2(3-5)	TT GGCCGGCCCG AGCAC	42

2nd Forward primer CF1 10 μM

NAME	SEQUENCE	SEQ.ID.
CF1	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTATCTCTCTACACAAAACATTTCC	20

[0070] 図９は、実施例６～８および比較例５のタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。図９から明らかなように、第１領域に連結するポリＡ配列について、ポリＡの長さが１０（３－２、実施例６）の場合にタンパク質の発現量が多くなり、ポリＡを長くするほど、タンパク質の発現量は緩やかに減少したが、ポリＡの長さが１０～４０の間では、比較例５（３－１、ポリＡの長さ０）よりタンパク質の発現量は多かった。

[0071] 次に、図１０は、実施例９（３－５、ポリＡ２個）と比較例５におけるタンパク質の発現量を示す３Ｄイメージ画像である。図１０から明らかなように、第１領域の後ろにＡを２個連結した場合でも、ポリＡが０個の比較例５よりタンパク質の発現量が増加することを確認した。したがって、ポリＡの長さは、２以上で適宜調整すればよい。

[0072] 以上の結果より、ヘアピン構造を有する第１領域とポリＡ配列とを組み合わせて翻訳促進剤を作製する場合、ポリＡは２個以上あればよく、ポリＡ配列の上限は、鋳型核酸の設計効率等を考慮し、適宜選択すればよいことが明

らかとなった。

産業上の利用可能性

[0073] 本出願で開示する翻訳促進剤により、無細胞タンパク質合成系を用いて合成するタンパク質の合成量を高くできる。したがって、製薬業界、研究機関等、無細胞タンパク質合成が必要な産業に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 無細胞タンパク質合成系における翻訳促進剤であって、

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

前記３’非翻訳領域が、

前記コード領域の３’末端に隣接する、１０～４０個の核酸配列からなる第１領域と、

前記第１領域に連結する２～４０個のＡが連続するポリＡ配列からなる第２領域と、

から構成され、

前記第１領域が、ヘアピン構造を有する、

翻訳促進剤。

[請求項2] 無細胞タンパク質合成系に用いる鋳型核酸であって、

プロモーター領域と、

前記プロモーター領域によって作動可能に連結される目的タンパク質のアミノ酸配列をコードするコード領域と、

請求項１に記載の翻訳促進剤からなる、前記コード領域の３’非翻訳領域と、

を含む、鋳型核酸。

[請求項3] 前記コード領域は、前記目的タンパク質として、任意のタンパク質のＣ末端にプロテインタグを含む融合タンパク質をコードする領域である、請求項２に記載の鋳型核酸。

[請求項4] 前記コード領域は、前記目的タンパク質として、任意のタンパク質のＮ末端にプロテインタグを含む融合タンパク質をコードする領域である、請求項２に記載の鋳型核酸。

[請求項5] 前記コード領域は、前記目的タンパク質として、任意のタンパク質のＮ末端にプロテインタグを含む融合タンパク質をコードする領域である、請求項３に記載の鋳型核酸。

[請求項6] 前記鋳型核酸は、転写鋳型ＤＮＡである、請求項２～５のいずれか一項に記載の鋳型核酸。

[請求項7] 前記鋳型核酸は、翻訳鋳型ｍＲＮＡである、請求項２～５のいずれか一項に記載の鋳型核酸。

[請求項8] 無細胞タンパク質合成系のための翻訳鋳型の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ転写鋳型ＤＮＡをｍＲＮＡに転写するための要素の存在下で請求項２～６のいずれか一項に記載の鋳型核酸を用いて翻訳鋳型ｍＲＮＡを合成する工程、

を備える、方法。

[請求項9] タンパク質の生産方法であって、

細胞の不存在下であってかつ翻訳鋳型ｍＲＮＡをタンパク質に翻訳するための要素の存在下で請求項７に記載の鋳型核酸を用いてタンパク質を合成する工程、

を備える、生産方法。