

明 細 書

発明の名称：

tRNA、アミノアシルtRNA、ポリペプチド合成用試薬、非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法、核酸ディスプレイライブラリの作製方法、核酸-ポリペプチド連結体及びスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本開示は、tRNA、アミノアシルtRNA、ポリペプチド合成用試薬、非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法、核酸ディスプレイライブラリの作製方法、核酸-ポリペプチド連結体及びスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 非天然アミノ酸（特殊アミノ酸とも呼ばれる。）が導入されたポリペプチドが医薬品の候補として注目されている。

特許文献1には、人工アミノアシル化触媒を用いてtRNAを特殊アミノ酸でアシル化し、特殊アミノ酸でアシル化されたtRNAを含む無細胞翻訳系によって特殊ポリペプチドのライブラリを作製し、標的タンパク質に結合する特殊ポリペプチドをスクリーニングする方法が開示されている。

特許文献2には、細胞膜透過性に優れた環状ペプチド化合物の製造方法及びスクリーニング方法が開示されている。

特許文献3には、マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合するtRNAと、このtRNAを用いて非天然アミノ酸をポリペプチドに導入する方法とが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2012-058092号公報

特許文献2：国際公開第2018/174078号

特許文献3：国際公開第2007/055429号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示は、UAAコドンを実アミノ酸に翻訳するtRNA及びアミノアシルtRNAと、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸を導入するポリペプチド合成用試薬、非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法及び核酸ディスプレイライブラリの作製方法と、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸が導入された核酸-ポリペプチド連結体と、少なくとも2種類の非天然アミノ酸が導入されたポリペプチドの中から目的の活性を有するポリペプチドを見出すスクリーニング方法と、を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 課題を解決するための具体的手段には、以下の態様が含まれる。

[0006] <1> マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合する、tRNA。

<2> CCA末端の5'側に隣接する塩基がA又はGである、<1>に記載のtRNA。

<3> 5'末端から3番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせがUA、GU又はUGである、<1>又は<2>に記載のtRNA。

<4> 5'末端から4番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせがGUである、<1>又は<2>に記載のtRNA。

<5> 配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号13、配列番号15及び配列番号17からなる群から選ばれる1種の塩基配列を有する、tRNA。

<6> <1>~<5>のいずれか1項に記載のtRNAにアミノ酸が結合した、アミノアシルtRNA。

<7> アミノ酸が非天然アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体か

らなる群から選ばれる 1 種である、＜6＞に記載のアミノアシル tRNA。

＜8＞ アミノ酸がクロロアセチル化リシン、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン及び蛍光標識アミノ酸からなる群から選ばれる 1 種である、＜6＞に記載のアミノアシル tRNA。

＜9＞ マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして CUA を有し UAG コドンに対合する tRNA と、

マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を有し UAA コドンに対合する tRNA と、を含む、ポリペプチド合成用試薬。

＜10＞ マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして CUA を有し UAG コドンに対合する tRNA に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を有し UAA コドンに対合する tRNA に、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、を含む、ポリペプチド合成用試薬。

＜11＞ 少なくとも 2 種類の非天然アミノ酸をポリペプチドに導入する方法であって、

UAG コドン及び UAA コドンを含む塩基配列を有する核酸と、

マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして CUA を有し UAG コドンに対合する tRNA に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を

有しUAAコドンに対合するtRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

を含有する無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させること、を含む、非天然アミノ酸の導入方法。

<12> 塩基配列が終止コドンであるUGAコドンをさらに含む、<11>に記載の非天然アミノ酸の導入方法。

<13> 少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドを作製する方法であって、

UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、

マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合するtRNAに、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合するtRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

を含有する無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させること、を含む、ポリペプチドの作製方法。

<14> 塩基配列が終止コドンであるUGAコドンをさらに含む、<13>に記載のポリペプチドの作製方法。

<15> UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、

マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合するtRNAに、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてUUAを

有しUAAコドンに対合するtRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

を含有する無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させ、核酸-ポリペプチド連結体を作製すること、を含む、核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<16> 核酸-ポリペプチド連結体を作製することが、mRNA-ポリペプチド連結体を作製すること、及び、mRNA-ポリペプチド連結体のmRNAを逆転写しcDNA-ポリペプチド連結体を作製することを含む、<15>に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<17> 核酸-ポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとがピュアロマイシンリンカーによって連結している、<15>又は<16>に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

<18> 少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドと、ポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸とが連結した核酸-ポリペプチド連結体であって、

塩基配列がUAGコドン及びUAAコドンを含み、

塩基配列においてUAGコドンがポリペプチド中の第一の非天然アミノ酸をコードし、

塩基配列においてUAAコドンがポリペプチド中の第二の非天然アミノ酸をコードする、核酸-ポリペプチド連結体。

<19> mRNA-ポリペプチド連結体又はcDNA-ポリペプチド連結体である、<18>に記載の核酸-ポリペプチド連結体。

<20> <15>~<17>のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、

核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸-ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む、スクリーニング方法。

発明の効果

[0007] 本開示によれば、UAAコドンを実アミノ酸に翻訳するtRNA及びアミノアシルtRNAと、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸を導入するポリペプチド合成用試薬、非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法及び核酸ディスプレイライブラリの作製方法と、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸が導入された核酸-ポリペプチド連結体と、少なくとも2種類の非天然アミノ酸が導入されたポリペプチドの中から目的の活性を有するポリペプチドを見出すスクリーニング方法と、が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本開示のtRNAの実施形態例を示す図であり、クローバーリーフ構造の概略図である。

[図2]ホルムアミドで固定したtRNAの電気泳動ゲルである。

[図3]蛍光標識アミノ酸とN-メチルフェニルアラニンとが多重導入されたポリペプチドの電気泳動ゲルである。

[図4]蛍光標識アミノ酸とN-メチルフェニルアラニンとが多重導入されたmRNAディスプレイの電気泳動ゲルである。

発明を実施するための形態

[0009] 以下に、本開示の実施形態を説明する。これらの説明及び実施例は実施形態を例示するものであり、実施形態の範囲を制限するものではない。本開示において述べる作用機序は推定を含んでおり、その正否は実施形態の範囲を制限するものではない。

[0010] 本開示において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本開示中に段階的に記載されている数値範囲において、一つの数値範囲で記載された上限値又は下限値は、他の段階的な記載の数値範囲の上限値又は下限値に置き換えてもよい。また、本開示中に記載されている数値範囲において、その数値範囲の上限値又は下限値は、実施例に示されている値に置き

換えてもよい。

[0011] 本開示において各成分は該当する物質を複数種含んでいてもよい。本開示において組成物中の各成分の量について言及する場合、組成物中に各成分に該当する物質が複数種存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する複数種の物質の合計量を意味する。

[0012] 本開示においてポリペプチドは、アミノ酸がペプチド結合により繋がった分子を指す。ポリペプチドのアミノ酸残基数に制限はなく、ポリペプチドはタンパク質を含む用語である。本開示におけるポリペプチドはアミノ酸残基数が6残基以上であることが望ましい。ポリペプチドには、アミノ酸が翻訳後修飾されたポリペプチドが含まれる。アミノ酸の翻訳後修飾としては、リン酸化、メチル化、アセチル化などが挙げられる。

[0013] 本開示において核酸は、ポリペプチドを合成する情報を担う分子を指す。核酸は、あらゆる核酸（例えば、DNA、RNA、これらの類似体、天然物、人工物）と、あらゆる核酸に低分子化合物、基、核酸以外の分子、構造物などが連結している核酸とを含む用語である。核酸は、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。

[0014] 本開示において配列番号で特定する tRNA の塩基配列は表 1 のとおりである。

配列番号 2 及び配列番号 5～17 は、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA の改変体である。

配列番号 18 は、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) の野生型トリプトファン用 tRNA である。

配列番号 1 及び配列番号 19 は、マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA の改変体である。

配列番号 3 は、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) のトリプトファン用 tRNA の改変体である。

配列番号 4 は、シュワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) のトリプトファン用 tRNA の改変体である。

表 1 において、アンチコドンに下線を付き、微生物ごとの野生型トリプトファン用 tRNA と相違する塩基をイタリック体で示す。

[0015]

[表1]

配列番号	塩基配列			備考
配列番号1	GGGAGAGUAG CUUUAAAACC CUUUCUCUCC	UUCAAUGGUA GAGCGUUGAG CAGCA	GAACGUCGGU GGUUCGAUUC	Mycoplasma capricolum G1 U33 U34 C72 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号2	GGGGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U33 U34 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号3	GGGGGCAUAG CUUUAAAACC UACUGCCCCC	UUCAACGGUA UUUGGUGUGG ACCA	GAUAGAGGU GUUCGAUUCC	Staphylococcus aureus G1 U33 U34 C72 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号4	GGGGGUGUAG GUCUUAAA UCCUGCCACC	UUCCAAUUGG CCGAUGGUUG CCACCA	UAGAACAGCG CGGGUUCGAG	Shewanella oneidensis G1 U33 U34 C72 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号5	GGCGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCGCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae C3 U33 U34 G70 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号6	GGAGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCUCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae A3 U33 U34 U70 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号7	GGUGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCAAC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U3 U33 U34 A70 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号8	GGGGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCUCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae G3 U33 U34 U70 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号9	GGUGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCGCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U3 U33 U34 G70 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号10	GGGCGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACGCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae C4 U33 U34 G69 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号11	GGGAGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACUCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae A4 U33 U34 U69 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号12	GGGUGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACACCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U4 U33 U34 A69 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号13	GGGGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACUCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae G4 U33 U34 U69 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号14	GGGUGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACGCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG ACCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U4 U33 U34 G69 A73 翻訳するコドンはUAA
配列番号15	GGGGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG GCCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U33 U34 G73 翻訳するコドンはUAA
配列番号16	GGUGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACCGCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG GCCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae U3 U33 U34 G70 G73 翻訳するコドンはUAA
配列番号17	GGGGGUGUAG CUUUAAAACU UUCCACUCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG GCCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae G4 U33 U34 U69 G73 翻訳するコドンはUAA
配列番号18	GGGGGUGUAG CUCCAAAACU UUCCACCCCC	UUUAGUGGCA GUCUGUGUGG GCCA	GAACAACAGU GUUCGAUUCC	Mycoplasma pneumoniae 野生型 翻訳するコドンはUGG
配列番号19	GGGAGAGUAG CUCUAAAACC CUUUCUCUCC	UUCAAUGGUA GAGCGUUGAG CAGCA	GAACGUCGGU GGUUCGAUUC	Mycoplasma capricolum G1 U34 C72 A73 翻訳するコドンはUAG

[0016] 自然界に見出される tRNA は、塩基数が 70 台から 90 台まで幅がある。典型的な tRNA は、塩基数が 76 である。表 1 の備考欄に記載した塩基位置は、塩基数 76 の典型的な tRNA との対比において特定した位置である。配列番号 2 を例にすると、塩基数 74 であるが、3' 末端の位置を塩基番号 76 と特定し、CCA 末端の 5' 側に隣接する位置を塩基番号 73 と特定する。

[0017] <tRNA>

本開示の tRNA は、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を有し UAA コドンに対合する。本開示の tRNA は、UAA コドンをアミノ酸に翻訳する。

[0018] マイコプラズマ・ニューモニエは野生型トリプトファン用 tRNA を 2 種類有する (Nucleic Acids Res. 1993 Oct 25; 21(21): 4967-4974)。本開示の tRNA は、2 種類の野生型トリプトファン用 tRNA のいずれの改変体も含む。本開示の tRNA は、配列番号 18 に示す野生型トリプトファン用 tRNA に改変を施した tRNA であることが好ましい。

[0019] 本開示の tRNA は、マイコプラズマ・ニューモニエの野生型トリプトファン用 tRNA のアンチコドンを CCA から UUA に改変した tRNA である。この改変によって、本開示の tRNA は、UAA コドンをアミノ酸に翻訳する機能を有する。

[0020] 本開示の発明者は、様々な微生物の野生型トリプトファン用 tRNA を改変して検討した結果、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA の改変体が UAA コドンを効率よくアミノ酸に翻訳することを見出した。

[0021] 本開示の tRNA は、マイコプラズマ・ニューモニエの野生型トリプトファン用 tRNA において、アンチコドンに加えてアクセプターステムにも改変を施した改変体であることが好ましい。アクセプターステムの改変が、tRNA の高次構造に影響し、リボソームにおけるペプチジル転移反応の効率

を上げるものと推測される。アクセプターステムの改変例として、CCA末端の5'側に隣接する塩基の改変；5'末端から3番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせの改変；5'末端から4番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせの改変；が挙げられる。

[0022] tRNAのCCA末端とは、tRNAの3'末端に普遍的に存在する3塩基である。

tRNA内部での対合とは、tRNAのクローバーリーフ構造において塩基対が向かい合うことをいう。

[0023] 図1は、本開示のtRNAの実施形態例を示す図であり、クローバーリーフ構造の概略図である。図1には、CCA末端の5'側に隣接する塩基（塩基番号73）の改変例、5'末端から3番目の塩基とこの塩基に對合する塩基（塩基番号70）との組み合わせの改変例、及び、5'末端から4番目の塩基とこの塩基に對合する塩基（塩基番号69）との組み合わせの改変例が例示されている。

[0024] 本開示のtRNAは、UAAコドン効率よくアミノ酸に翻訳する観点から、下記の形態（1）、形態（2）及び形態（3）からなる群から選ばれる少なくとも1形態を備えることが好ましい。

[0025] 形態（1）：CCA末端の5'側に隣接する塩基がA又はGである。

形態（2）：5'末端から3番目の塩基とこの塩基に對合する塩基との組み合わせがUA、GU又はUGである。ここで2塩基の記載は、5'末端から3番目の塩基を先に記載している。例えば「UA」は、5'末端から3番目の塩基がUであり、クローバーリーフ構造において3番目の塩基に對合する塩基がAである。

形態（3）：5'末端から4番目の塩基とこの塩基に對合する塩基との組み合わせがGUである。ここで2塩基の記載は、5'末端から4番目の塩基を先に記載している。5'末端から4番目の塩基がGであり、クローバーリーフ構造において4番目の塩基に對合する塩基がUである。

[0026] 本開示のtRNAの実施形態例として、形態（1）及び形態（2）を備え

る tRNA と形態 (1) 及び形態 (3) を備える tRNA とが挙げられる。

[0027] 本開示の tRNA の実施形態例として、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 又は配列番号 17 の塩基配列を有する tRNA が挙げられる。これらの中でも、UAA コドン を効率よくアミノ酸に翻訳する観点から、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 13、配列番号 15 又は配列番号 17 の塩基配列を有する tRNA が好ましい。

[0028] 本開示の tRNA は、マイコプラズマ・ニューモニエの野生型トリプトファン用 tRNA の塩基配列をもとにして、公知の遺伝子工学の技術を用いて作製することができる。例えば、tRNA 遺伝子を設計し、適切なプライマーを用いた PCR (Polymerase Chain Reaction) により tRNA 遺伝子を作製し、tRNA 遺伝子から tRNA を転写する。

[0029] <アミノアシル tRNA>

本開示のアミノアシル tRNA は、本開示の tRNA にアミノ酸が結合した tRNA である。アミノアシル tRNA においてアミノ酸は tRNA の 3' 末端に共有結合している。

[0030] 本開示の tRNA は、あらゆるアミノ酸でアシル化されうる。したがって、本開示のアミノアシル tRNA が有するアミノ酸の種類に制限はない。ここでアミノ酸は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体を含む。

[0031] 本開示において天然アミノ酸とは、一般的なタンパク質を構成するアミノ酸を指し、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンを指す。天然アミノ酸は、天然物でもよく人工物でもよい。

本開示において非天然アミノ酸とは、上記の 20 種類のアミノ酸以外のア

ミノ酸を指し、天然物も人工物も含む。

[0032] 非天然アミノ酸の一例として、クロロアセチル基を有するアミノ酸（例えば、クロロアセチル化リシン（chloroacetyl lysine）等のクロロアセチル化アミノ酸、クロロアセチルジアミノ酪酸）が挙げられる。

非天然アミノ酸の一例として、N-メチルアミノ酸（例えば、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン）が挙げられる。

[0033] 修飾化アミノ酸の一例として、標識化合物と結合したアミノ酸である標識化アミノ酸が挙げられる。標識化合物は、生化学的、化学的、免疫化学的又は電磁的な検出方法で検出可能な物質である。標識化合物としては、色素化合物、蛍光物質、化学発光物質、生物発光物質、酵素基質、補酵素、抗原性物質、特定のタンパク質に結合する物質、磁性物質などが挙げられる。標識化アミノ酸は、機能で分類すると例えば、蛍光標識アミノ酸、光応答性アミノ酸、光スイッチアミノ酸、蛍光プローブアミノ酸などである。

[0034] 標識化アミノ酸は、アミノ酸と標識化合物とが直接結合していてもよく、アミノ酸と標識化合物とがスペーサーを介して結合していてもよい。スペーサーとしては、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン；ポリオキシエチレン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール等のポリエーテル；ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリウレタン、ポリカーボネートなどが挙げられる。

[0035] 天然アミノ酸、非天然アミノ酸又は修飾化アミノ酸の誘導体としては、例えば、ヒドロキシ酸、メルカプト酸及びカルボン酸が挙げられる。

[0036] 本開示のアミノアシル tRNA の実施形態例として、tRNA に、クロロアセチル化リシン、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン及び蛍光標識アミノ酸からなる群から選ばれる 1 種が結合したアミノアシル tRNA が挙げられる。

[0037] 本開示の tRNA をアミノ酸でアシル化する方法として、下記の方法が挙げられる。

tRNA の 3' 末端の CA ジヌクレオチドを欠落させておく。一方、アミ

ノ酸のカルボキシ基にC A ジヌクレオチドを結合させておく。両者を、R N A リガーゼを用いて連結させる。本方法は公知であり、その詳細は例えば国際公開2004/009709号及び国際公開2007/055429号に開示されている。これら文献に開示された方法を、本開示のアミノアシル t R N A の作製に採用することができる。

[0038] <ポリペプチド合成用試薬>

本開示は、ポリペプチド合成用試薬として2形態（すなわち、第一のポリペプチド合成用試薬と第二のポリペプチド合成用試薬）を提供する。

[0039] 第一のポリペプチド合成用試薬は、

マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてC U A を有しU A G コドンに対合する t R N A と、

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてU U A を有しU A A コドンに対合する t R N A と、を含む。

[0040] 第一のポリペプチド合成用試薬において、上記2種類の t R N A は混合状態でもよく非混合状態でもよい。第一のポリペプチド合成用試薬は、上記2種類の t R N A 以外の t R N A をさらに含んでもよい。

[0041] 第二のポリペプチド合成用試薬は、

マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてC U A を有しU A G コドンに対合する t R N A に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル t R N A と、

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてU U A を有しU A A コドンに対合する t R N A に、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル t R N A と、を含む。

[0042] 第二のポリペプチド合成用試薬において、上記2種類のアミノアシル t R N A は混合状態でもよく非混合状態でもよい。第二のポリペプチド合成用試

薬は、上記2種類のアミノアシル tRNA 以外のアミノアシル tRNA をさらに含んでもよい。

[0043] 第二のポリペプチド合成用試薬において、第一の非天然アミノ酸と第二の非天然アミノ酸とは別種のアミノ酸である。第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸はそれぞれ、非天然アミノ酸；天然アミノ酸若しくは非天然アミノ酸の修飾化アミノ酸；又は天然アミノ酸、非天然アミノ酸若しくは修飾化アミノ酸の誘導体；を含む。これらアミノ酸の詳細は先述のとおりである。

[0044] 以下、マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして CUA を有し UAG コドンに対合する tRNA を、「UAG コドン翻訳 tRNA」という。

以下、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を有し UAA コドンに対合する tRNA を、「UAA コドン翻訳 tRNA」という。

[0045] 本開示のポリペプチド合成用試薬は、UAG コドン翻訳 tRNA と UAA コドン翻訳 tRNA とを併用する試薬である。両 tRNA を別々の非天然アミノ酸でアシル化し併用することによって、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸を導入することができる。

[0046] 第一のポリペプチド合成用試薬は、例えば、非天然アミノ酸でアシル化した後、無細胞ペプチド合成システムに添加して使用する。第二のポリペプチド合成用試薬は、例えば、無細胞ペプチド合成システムに添加して使用する。これらの使用形態によれば、無細胞ペプチド合成システムによって合成されるポリペプチドに非天然アミノ酸を少なくとも2種類導入することができる。無細胞ペプチド合成システムの詳細は後述するとおりである。

[0047] 第一のポリペプチド合成用試薬は、ポリペプチド合成に必要な要素のうち少なくとも UAG コドン翻訳 tRNA 及び UAA コドン翻訳 tRNA を含んでいけばよい。

第二のポリペプチド合成用試薬は、ポリペプチド合成に必要な要素のうち

少なくとも第一の非天然アミノ酸が結合したUAGコドン翻訳tRNA及び第二の非天然アミノ酸が結合したUAAコドン翻訳tRNAを含んでいればよい。

本開示のポリペプチド合成用試薬は、ポリペプチド合成に必要な要素全部を含んでもよい。本開示のポリペプチド合成用試薬は、ポリペプチド合成に用いられる器具を含んでもよい。

[0048] マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAGコドン翻訳tRNAは、国際公開2007/055429号に開示されている。国際公開2007/055429号に開示されたtRNA改変体を、本開示のポリペプチド合成用試薬並びに、後述する非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法及び核酸ディスプレイライブラリの作製方法に採用することができる。

[0049] マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAGコドン翻訳tRNAは、UAGコドンを効率よくアミノ酸に翻訳する観点から、下記の形態（A）、形態（B）及び形態（C）からなる群から選ばれる少なくとも1形態を備えることが好ましい。

[0050] 形態（A）：5'末端とこの塩基に対合する塩基との組み合わせがGCである。ここで2塩基の記載は、5'末端の塩基を先に記載している。5'末端の塩基がGであり、クローバーリーフ構造において5'末端の塩基に対合する塩基がCである。

形態（B）：3'末端から4番目の塩基がAである。

形態（C）：CCA末端の5'側に隣接する位置にA、C、G又はUが挿入されている。

[0051] マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体は、マイコプラズマ・カプリコラムの野生型トリプトファン用tRNAの塩基配列をもとにして、公知の遺伝子工学の技術を用いて作製することができる。例えば、tRNA遺伝子を設計し、適切なプライマーを用いたPCRによりtRNA遺伝子を作製し、tRNA遺伝子からtRNAを転写する。

[0052] <非天然アミノ酸の導入方法、ポリペプチドの作製方法>

本開示の非天然アミノ酸の導入方法は、少なくとも2種類の非天然アミノ酸をポリペプチドに導入する方法であり、無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させることを含む。

本開示のポリペプチドの作製方法は、少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドを作製する方法であり、無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させることを含む。

[0053] 本開示の非天然アミノ酸の導入方法及びポリペプチドの作製方法における無細胞ペプチド合成システムは、

UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、

マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAGコドン翻訳tRNAに、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAAコドン翻訳tRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、を含有する。

[0054] 第一の非天然アミノ酸と第二の非天然アミノ酸とは別種のアミノ酸である。第一の非天然アミノ酸及び第二の非天然アミノ酸はそれぞれ、非天然アミノ酸；天然アミノ酸若しくは非天然アミノ酸の修飾化アミノ酸；又は天然アミノ酸、非天然アミノ酸若しくは修飾化アミノ酸の誘導体；を含む。これらアミノ酸の詳細は先述のとおりである。

[0055] 無細胞ペプチド合成システムは、ポリペプチド合成のための反応システムであって、細胞そのものを使用することなく、(1)核酸の翻訳を行うシステム、又は、(2)核酸の転写及び翻訳を行うシステムである。無細胞ペプチド合成システムは、鋳型核酸、リボソーム、転写及び／又は翻訳のための因子及び酵素、これら以外にシステムの構成に必要な酵素類、各種の基質、エネルギー源、緩衝液及び塩類から構成される。転写及び／又は翻訳のための因子及び酵素としては、大腸菌等の原核細胞に由来する物質；コムギ胚芽

、動物細胞、昆虫細胞等の真核細胞に由来する物質；などが挙げられる。

[0056] 無細胞ペプチド合成システムにおいて鋳型核酸は、DNAでもよくRNAでもよい。DNAにおいて、UAGコドンはTAGに読み替え、UAAコドンはTAAに読み替える。

鋳型核酸は、一本鎖の核酸でもよく、二本鎖の核酸でもよい。鋳型核酸は、線状の核酸でもよく、環状の核酸でもよい。鋳型核酸は、ポリペプチド合成に必要な塩基配列がベクター（プラスミドベクター、コスミドベクター等）に組み込まれた核酸でもよい。

[0057] 鋳型核酸は、無細胞ペプチド合成システムによってポリペプチドを合成するに必要な塩基配列を有する。ポリペプチド合成に必要な塩基配列とは、ポリペプチドのアミノ酸配列に対応するコドンが並んだ塩基配列（すなわちコーディング領域）はもちろん、それ以外に例えば、プロモーター配列、リボソーム結合配列である。

[0058] 鋳型核酸の塩基配列は、終止コドンを含んでもよく終止コドンを含まなくてもよい。ここで終止コドンとは、対合するtRNAがないコドンを意味する。終止コドンの一例はUGAコドンである。鋳型核酸の塩基配列が終止コドンを含まない場合、mRNAーリボソームーポリペプチド連結体が形成されうる。

[0059] （１）核酸（例えばRNA）の翻訳を行う無細胞ペプチド合成システムは、リボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子、アミノアシルtRNA合成酵素、アミノアシルtRNA合成酵素によってアシル化されるtRNA、及びアミノ酸と結合した本開示のtRNAを含み、大腸菌由来のシステムである場合はさらにメチオニルtRNAトランスホルミラーゼを含む。

（２）核酸（例えばDNA）の転写及び翻訳を行う無細胞ペプチド合成システムは、（１）の構成物質に加えて、RNAポリメラーゼ（例えばT7 RNAポリメラーゼ）、及びRNAポリメラーゼの基質であるヌクレオシド三リン酸を含む。

(1) 及び (2) のいずれにおいても、構成物質から翻訳終結因子を除くことにより、mRNA-リボソーム-ポリペプチド連結体を形成することができる。

[0060] 転写及び／又は翻訳のための因子及び酵素以外の酵素類としては、例えば、クレアチンキナーゼ、ミオキナーゼ、ヌクレオシドニリン酸キナーゼ (nucleoside diphosphate kinase; NDPK) 等のエネルギーの再生のための酵素；無機ピロフォスファターゼ等の転写及び／又は翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素；などが挙げられる。

各種の基質としては、天然アミノ酸及び／又は非天然アミノ酸、エネルギー源としてのヌクレオチド三リン酸、クレアチンフォスフェート、ホルミル葉酸等が挙げられる。ヌクレオチド三リン酸としては、ATP、GTP、CTP、UTPが挙げられ、(1) においてはATP及びGTPが用いられ、(2) においてはATP、GTP、CTP及びUTPが用いられる。

緩衝液としては、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.3) が通常使用される。塩類としては、グルタミン酸カリウム、塩化アンモニウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、プトレシン (putrescine)、スペルミジン (spermidine)、ジチオトレイトール (dithiothreitol; DTT) 等が通常使用される。

[0061] 本開示の非天然アミノ酸の導入方法及びポリペプチドの作製方法には、公知のあらゆる無細胞ペプチド合成システムが採用できる。無細胞ペプチド合成システムの市販品の例として、PUREfrex (ジーンフロンティア、「PUREfrex」は登録商標)、Human Cell-Free Protein Expression System (タカラバイオ)、Rapid Translation System (ロシュ)、Expressway Cell-Free Expression System (インビトロジェン) 等が挙げられる。

[0062] 本開示の非天然アミノ酸の導入方法及びポリペプチドの作製方法においては、ポリペプチドをコードする塩基配列のUAGコドン及びUAAコドンが、第一の非天然アミノ酸が結合したUAGコドン翻訳tRNA及び第二の非天然アミノ酸が結合したUAAコドン翻訳tRNAによってそれぞれ翻訳さ

れ、少なくとも2種類の非天然アミノ酸がポリペプチドに導入される。

[0063] ポリペプチドの実施形態例として、N-メチルアミノ酸（例えばN-メチルアラニン又はN-メチルフェニルアラニン）と、クロロアセチル基を有するアミノ酸（例えばクロロアセチルジアミノ酪酸又はクロロアセチル化リシン）と、チオール基を有するアミノ酸（例えばシステイン）とを一分子に含むポリペプチドが挙げられる。このポリペプチドの合成には、N-メチルアミノ酸が結合したUAGコドン翻訳tRNA及びクロロアセチル基を有するアミノ酸が結合したUAAコドン翻訳tRNA（又は、クロロアセチル基を有するアミノ酸が結合したUAGコドン翻訳tRNA及びN-メチルアミノ酸が結合したUAAコドン翻訳tRNA）を用いればよい。このポリペプチドは、クロロアセチル基とチオール基とが反応して環化し、環状N-メチルポリペプチドとなる。環状N-メチルポリペプチドのアミノ酸残基数は、例えば3個〜20個である。

[0064] <核酸ディスプレイライブラリの作製方法、核酸-ポリペプチド連結体>

核酸ディスプレイライブラリは、核酸-ポリペプチド連結体を構成単位とし、複数個の核酸-ポリペプチド連結体のひとまとまりを指す。核酸ディスプレイライブラリを構成する核酸-ポリペプチド連結体のクローン数及びコピー数に制限はない。

[0065] 本開示の核酸-ポリペプチド連結体は、少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドと、このポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸とが連結した核酸-ポリペプチド連結体であって、

塩基配列がUAGコドン及びUAAコドンを含み、

塩基配列においてUAGコドンがポリペプチド中の第一の非天然アミノ酸をコードし、

塩基配列においてUAAコドンがポリペプチド中の第二の非天然アミノ酸をコードする。

[0066] 本開示の核酸-ポリペプチド連結体の実施形態例として、mRNA-ポリペプチド連結体又はcDNA-ポリペプチド連結体が挙げられる。cDNA

ーポリペプチド連結体は、mRNAーポリペプチド連結体の逆転写産物である。cDNAーポリペプチド連結体において、UAGコドンはTAGに読み替え、UAAコドンはTAAに読み替える。

[0067] 本開示の核酸ーポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとは、例えばピューロマイシンリンカー又はリボソームを介して連結している。

[0068] 本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法は、無細胞ペプチド合成システムによって核酸からポリペプチドを発現させ、核酸ーポリペプチド連結体を作製することを含む。

[0069] 本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法における無細胞ペプチド合成システムは、ポリペプチドに少なくとも2種類の非天然アミノ酸を導入することを目的に、

UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、

マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAGコドン翻訳tRNAに、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAAコドン翻訳tRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、を含有する。

[0070] 無細胞ペプチド合成システムは、(1)核酸の翻訳を行うシステム、又は、(2)核酸の転写及び翻訳を行うシステムのいずれでもよい。無細胞ペプチド合成システムの詳細は先述のとおりである。本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法には、公知のあらゆる無細胞ペプチド合成システムと、公知のあらゆる核酸ディスプレイライブラリの作製技術とが採用できる。

[0071] 無細胞ペプチド合成システムにおいて鋳型核酸は、DNAでもよくRNAでもよい。鋳型核酸は、例えば、ランダム配列を含むランダムプライマーセットを用いてオーバーラップエクステンションPCRを行うことで作製された、二本鎖DNA断片の集団である。ランダム配列は、例えば、トリプレットの繰り返し配列[NNK]_mである(ここで、mは正の整数、Nはそれぞ

れ独立にA、T、G又はC、Kはそれぞれ独立にT又はG)。トリプレット
[NNK]の繰り返し数を任意の数に設定して、任意の長さのペプチドを作
製することができる。ランダム配列は、終止コドンの出現抑制の観点からは
、1種類のアミノ酸に対して1種類のコドン割り当てたトリマーオリゴヌ
クレオチドであることが好ましい。

[0072] 鋳型核酸の3'末端側には、ポリペプチドの柔軟性を上げる観点から、ス
ペーサーをコードする塩基配列があることが好ましい。スペーサーは例えば
、グリシン及びセリンから選ばれる少なくとも1個のアミノ酸である。

[0073] 本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法の実施形態の一例は、m
RNA-ポリペプチド連結体を作製すること、及び、mRNA-ポリペプチ
ド連結体のmRNAを逆転写し、cDNA-ポリペプチド連結体を作製する
こと、を含む。本実施形態例によれば、核酸-ポリペプチド連結体の核酸が
DNAであるので、化学的により安定した核酸ディスプレイライブラリが得
られる。

[0074] 本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法において、翻訳される核
酸（通常はmRNA）と翻訳産物との連結は、ピューロマイシンリンカーを
介した連結、リボソームを介した連結などのいずれでもよい。翻訳産物が適
切な高次構造を形成しやすい観点及び翻訳産物の機能を評価しやすい観点か
ら、翻訳される核酸と翻訳産物との連結はピューロマイシンリンカーを介し
た連結であることが好ましい。

したがって、無細胞ペプチド合成システムにおいて翻訳される核酸は、3
'末端にピューロマイシンリンカーが付加された核酸であることが好ましい
。核酸にピューロマイシンを付加するためのリンカーとしては、核酸とピュ
ーロマイシンの解離を抑制する観点から、2'-O-メチル化した核酸リン
カー又は5'末端に紫外線架橋性化合物を有する核酸リンカーが好ましい。

[0075] 本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法は、20種類の天然アミ
ノ酸のコドンを保存したまま、さらにUAGコドン及びUAAコドンのアミ
ノ酸の翻訳に使用するので、核酸ディスプレイライブラリを構成するポリペ

プチドのアミノ酸配列を多様化することができる。

[0076] <スクリーニング方法>

本開示のスクリーニング方法は、本開示の核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸-ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む。

[0077] 「目的の活性」とは、例えば、標的物質への結合である。標的物質は、生理活性を示すあらゆる化学物質を含む用語であり、化合物、基、分子、タンパク質、核酸、脂質、糖質、これらの複合体などを含む用語である。標的物質は、例えば、受容体、転写因子、酵素、補酵素、調節因子、抗体、抗原、DNA、RNA、これらの断片、これらの複合体、これらの修飾基である。

[0078] 本開示のスクリーニング方法の実施形態の一例は、核酸ディスプレイライブラリと標的物質（例えば、標的タンパク質）とを接触させてインキュベートすることを含む。例えば、核酸ディスプレイライブラリと標的物質とを緩衝液中で接触させ、緩衝液のpH及び温度並びに接触時間を調節してインキュベートする。この際、標的物質を固相担体に固定しておき、固定された標的物質に核酸ディスプレイライブラリを接触させてもよい。固相担体は、標的物質を固定できる担体であれば制限はなく、マイクロタイタープレート、基板、ビーズ、磁性ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、PVDFメンブレン等が挙げられる。標的物質は、これらの固相担体に公知の技術によって固定される。

[0079] 上記の接触の後、標的物質（例えば、標的タンパク質）に結合している核酸-ポリペプチド連結体を抽出し、抽出した核酸-ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定する。塩基配列の同定は、核酸増幅システム及びシーケンサーを用いて実施可能である。

[0080] 核酸増幅システムは、核酸を鋳型にして核酸を増幅するシステムを指す。核酸増幅システムの核酸増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction)

ain reaction; PCR)、リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction; LCR)、TMA (transcription mediated amplification)、NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) 等のいずれでもよい。

[0081] 本開示において「シーケンサー」は、第一世代シーケンサー（キャピラリーシーケンサー）、第二世代シーケンサー（次世代シーケンサー）、第三世代シーケンサー、第四世代シーケンサー、及び今後開発されるシーケンサーを含む用語である。シーケンサーは、キャピラリーシーケンサーでもよく、次世代シーケンサーでもよく、その他のシーケンサーでもよい。シーケンサーとしては、解析の速さ、1度に処理可能な試料数の多さ等の観点から、次世代シーケンサーが好ましい。次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) とは、サンガー法を利用したキャピラリーシーケンサー（第一世代シーケンサーと呼ばれる。）に対比して分類されるシーケンサーを指す。現時点で最も普及している次世代シーケンサーは、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成又はDNAリガーゼによる相補鎖結合に連動した蛍光又は発光をとらえ塩基配列を決定する原理のシーケンサーである。具体的には、MiSeq (Illumina社、MiSeqは登録商標)、HiSeq2000 (Illumina社、HiSeqは登録商標)、Roche454 (Roche社) 等が挙げられる。

[0082] 本開示のスクリーニング方法によれば、少なくとも2種類の非天然アミノ酸が導入されたポリペプチドの中から目的の活性を有するポリペプチド、それをコードする塩基配列及びそのアミノ酸配列を見出すことができる。

実施例

[0083] 以下に具体例を挙げて、本開示のtRNA等をより具体的に説明する。以下の具体例に示す材料、処理手順等は、本開示の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。本開示のtRNA等の範囲は、以下に示す具体例によって限定的に解釈されるべきではない。

[0084] 以下の説明において、合成、処理、製造などは、特に断りのない限り、室温（25℃±3℃）で行った。物質濃度に係る百分率は質量基準である。物質濃度に係る「M」はモル濃度を表し、1M=1mol/Lである。

[0085] 以下の説明において、略号は下記の意味である。

A c O K : 酢酸カリウム

α -C H C A : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

B S A : bovine serum albumin

D M S O : dimethyl sulfoxide

d N T P : deoxynucleoside triphosphate

D - P B S : Dulbecco's phosphate buffered saline

D T T : dithiothreitol

G M P : guanosine monophosphate

N T P : nucleoside triphosphate

S D S - P A G E : sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

[0086] <実施例1>

マイコプラズマ・カプリコラム、マイコプラズマ・ニューモニエ、スタフィロコッカス・アウレウス及びシュワネラ・オネイデンシスそれぞれのトリプトファン用 tRNA をそれぞれ改変し、アンチコドンに UUA を有する tRNA として配列番号 1～4 の tRNA を設計した。

[0087] - tRNA 遺伝子の作製 -

配列番号 1～4 の塩基配列に基づき、プライマーとして 2 個のオリゴヌクレオチドを化学合成した。フォワードプライマーは、T7 プロモーターと tRNA の 1～51 番目の塩基配列を含む。リバープライマーは、tRNA の 36～74 番目（CCA 末端の最初の C まで）の塩基配列を含む。このプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物を精製して tRNA 遺伝子を得た。この遺伝子を tRNA-CA 遺伝子という。PCR 反応液は、KOD Dash Buffer, 0.2mM dNTP, 2.5 units KOD Dash を含み、100 μ L 中 0.2nmol の各プライマーを含む。PCR 産物の精製には、MinElute PCR Purification Kit (キアゲン社) を用いた。

[0088] - tRNAの作製 -

tRNA-CA遺伝子を転写し、転写産物を精製してtRNAを得た。このtRNAをtRNA-CAという。転写の反応液100 μ Lは、40mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM MgCl₂, 5mM DTT, 4mM NTP, 20mM GMP, 2mM Spermidine, 10 μ g/mL BSA, 40units Ribonuclease inhibitor, 0.5unit Inorganic Pyrophosphatase, 400units T7 RNA Polymerase, 6 μ g tRNA-CA遺伝子を含む。反応液を37℃で12時間反応させて、RNEasy Minelute Cleanup Kit (キアゲン社)によりtRNA-CAを精製した。

[0089] - tRNAのアミノアシル化 -

tRNAにBODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合させた。このtRNAを蛍光標識アミノ酸-tRNAという。5 $\times$ Ligation Buffer (275mM Hepes-Na (pH7.5), 75mM MgCl₂, 16.5mM DTT, 5mM ATP) 4 μ L, 200 μ M tRNA-CA 2.5 μ L, BODIPYFL-アミノフェニルアラニン-pdCpAのDMSO溶液2 μ L, 0.1%BSA 0.4 μ L, T4 RNA Ligase (40units/ μ L) 0.6 μ L, 水10.5 μ Lを混合し、4℃で2時間反応させた。0.3M AcOK (pH4.5) 20 μ L及びエタノール120 μ Lを加え、軽く混合し、-80℃で30分間置いた。4℃で15000rpm且つ30分間遠心した後、上清を除き、-30℃に保存してある70%エタノール200 μ Lを加え、4℃で15000rpm且つ1分間遠心した。上清を除き、減圧乾燥した。1mM AcOK (pH4.5) 3 μ Lに溶解させた。

[0090] - ポリペプチドへの蛍光標識アミノ酸の導入 -

アミノ酸20個からなるポリペプチド（配列番号20：MCKXKPRS KNMSDYKDDDDK。Xは非天然アミノ酸）をコードする塩基配列（

配列番号 21 : ATGTGCAAATAAAAACCGCGGAGCAAA
AACATGAGCGATTATAAAGATGATGATGATAAG)
を含むDNAを用意した。このポリペプチド及びDNAをポリペプチド(1)
及びDNA(1)という。ポリペプチド(1)は、FLAGタグを含み、
アミノ酸配列の13~20番目がFLAGタグである。DNA(1)は、P
URE f r e x 2. 0によるポリペプチド(1)の発現に必要な塩基配列を
すべて含む。

DNA(1)を転写し、転写産物を精製してmRNAを得た。DNA(1)
からの転写は、tRNA-C A遺伝子からの上記転写と同様にして、ただ
し反応液中に20mM GMPは添加しないで行った。

蛍光標識アミノ酸-tRNA及びPURE f r e x 2. 0(ジーンフロン
ティア社)を用いて、DNA(1)の転写産物且つ精製産物であるmRNA
からポリペプチド(1)を翻訳した。反応液10 μ Lは、PURE f r e x
2. 0のSolution I 5 μ L, Solution II 0. 5 μ L
, Solution III 1 μ L, 16 μ M mRNA 1 μ L, 蛍光標
識アミノ酸-tRNA溶液1 μ L, 水1. 5 μ Lを含む。翻訳反応は25℃
で1時間行なった。

[0091] ー蛍光標識アミノ酸の導入効率の評価ー

翻訳反応後の反応液1 μ Lに1 $\times$ サンプルバッファー9 μ Lを加えた。こ
のうちの5 μ Lを15%SDS-PAGE(0. 1%SDS)に供した。電
気泳動ゲルを蛍光スキャナー(日立ソフトウェアエンジニアリング社、FM
B I O - I I I)で観察した。488nm励起/520nm検出により、ポ
リペプチド(1)における蛍光標識アミノ酸の導入を確認し、その導入効率
を定量した。配列番号1を基準値1. 00にした相対値を表2に示す。

一方で、翻訳反応後の反応液9 μ Lに、D-PBS(-)(ナカライテク
ス社)81 μ L及び抗FLAG M2磁性ビーズ(Sigma-Aldrich
社)20 μ Lを加え、室温で30分間振とうした。磁性ビーズをD-PB
S(-)200 μ Lで5回洗浄した。磁性ビーズに2%蟻酸水溶液9 μ Lを

加え、室温で1時間振とうした。上清をポリペプチド(1)の精製物として回収した。精製溶液0.75 μ Lと飽和 α -CHCA溶液(50%アセトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)0.75 μ Lとを混合し、質量分析(ブルカー社ultraflex Xtreme、ポジティブモード測定)を行った。ポリペプチド(1)に蛍光標識アミノ酸が導入されていることを確認した。

[0092] [表2]

	配列番号1	配列番号2	配列番号3	配列番号4
	Mycoplasma capricolum の改変体	Mycoplasma pneumoniae の改変体	Staphylococcus aureus の改変体	Shewanella oneidensis の改変体
蛍光標識ポリペプチドの バンドの蛍光強度	1.00	1.11	1.00	0.70

[0093] マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAの改変体の優位性が示された。

[0094] <実施例2>

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAを改変し、アンチコドンにUUAを有するtRNAとして配列番号5～9のtRNAを設計した。配列番号5～9のtRNAについて、実施例1と同じ方法で、tRNA遺伝子の作製、tRNAの作製、tRNAのアミノアシル化、ポリペプチドへの蛍光標識アミノ酸の導入及び導入効率の評価を行った。配列番号2を基準値1.00にした相対値を表3に示す。

[0095] [表3]

	配列番号2	配列番号5	配列番号6	配列番号7	配列番号8	配列番号9
蛍光標識ポリペプチドの バンド/全蛍光バンド	1.00	0.79	0.83	1.04	1.15	1.05

[0096] 配列番号7、配列番号8及び配列番号9のtRNAが、蛍光標識アミノ酸の導入効率が高かった。このことから、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAにおいて、5'末端から3番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせがUA、GU又はUGであるtRNAの優位性

が示された。

[0097] <実施例 3>

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA を改変し、アンチコドンに UUA を有する tRNA として配列番号 10～14 の tRNA を設計した。配列番号 10～14 の tRNA について、実施例 1 と同じ方法で、tRNA 遺伝子の作製、tRNA の作製、tRNA のアミノアシル化、ポリペプチドへの蛍光標識アミノ酸の導入及び導入効率の評価を行った。配列番号 2 を基準値 1.00 にした相対値を表 4 に示す。

[0098] [表4]

	配列番号2	配列番号10	配列番号11	配列番号12	配列番号13	配列番号14
蛍光標識ポリペプチドのバンド／全蛍光バンド	1.00	0.71	0.57	0.86	1.03	0.83

[0099] 配列番号 13 の tRNA が、蛍光標識アミノ酸の導入効率が高かった。このことから、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA において、5' 末端から 4 番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせが GU である tRNA の優位性が示された。

[0100] <実施例 4>

マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA を改変し、アンチコドンに UUA を有する tRNA として配列番号 15～17 の tRNA を設計した。配列番号 15～17 の tRNA について、実施例 1 と同じ方法で、tRNA 遺伝子の作製、tRNA の作製、tRNA のアミノアシル化、ポリペプチドへの蛍光標識アミノ酸の導入及び導入効率の評価を行った。配列番号 2 を基準値 1.00 にした相対値を表 5 に示す。

[0101] [表5]

	配列番号2	配列番号15	配列番号16	配列番号17
蛍光標識ポリペプチドのバンド／全蛍光バンド	1.00	1.04	0.89	1.08

[0102] 配列番号 17 の tRNA が、蛍光標識アミノ酸の導入効率が高かった。こ

のことから、マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用 tRNA において、5' 末端から 4 番目の塩基とこの塩基に対合する塩基との組み合わせが GU であり且つ CCA 末端の 5' 側に隣接する塩基が G である tRNA の優位性が示された。

[0103] <実施例 5>

配列番号 2 及び 5～17 の tRNA にホルムアミドを加え、熱処理（95℃、3 分間）し、10×Loading Buffer (TaKaRa, 9157) に混合した。尿素含有のアクリルアミドゲル (SuperSept MRNA, 15%, 17well (Wako, 194-15881)) にて電気泳動し、染色試薬 (Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, 41003)) にて染色し、検出した。図 2 に染色後の電気泳動ゲルを示す。図 2 においてゲル上の数字が配列番号である。

[0104] 図 2 のゲルにおいて、非天然アミノ酸導入効率の高い配列番号 7～9、13 及び 17 に tRNA の高次構造の変化とシャープなバンド強度を確認した。

[0105] <実施例 6>

DNA (1) においてポリペプチド (1) をコードする塩基配列 (配列番号 21) に対して置換を施した DNA (a)～(d) を用意した。DNA (a)～(d) はそれぞれ、配列番号 21 に下記の置換を施した塩基配列を有する。

[0106] DNA (a) : 配列番号 21 において、4 番目のコドンで TAG に置換し、11 番目のコドンで TAA に置換した DNA。

DNA (b) : 配列番号 21 において、4 番目のコドンと 5 番目のコドンを TAG に置換し、11 番目のコドンを TAA に置換した DNA。

DNA (c) : 配列番号 21 において、4 番目のコドンと 6 番目のコドンを TAG に置換し、11 番目のコドンを TAA に置換した DNA。

DNA (d) : 配列番号 21 において、4 番目のコドンと 7 番目のコドンを

T A Gに置換し、11番目のコドンにT A Aに置換したDNA。

[0107] マイコプラズマ・カプリコラムのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAGコドン翻訳tRNAとして配列番号19のtRNAを用意し、このtRNAにN-メチルフェニルアラニン又はBODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合させた。

[0108] マイコプラズマ・ニューモニエのトリプトファン用tRNAの改変体であるUAAコドン翻訳tRNAとして配列番号2のtRNAを用意し、このtRNAにN-メチルフェニルアラニン又はBODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合させた。

[0109] 実施例1と同じ方法で、tRNA遺伝子の作製、tRNAの作製、tRNAのアミノアシル化、ポリペプチドへの蛍光標識アミノ酸の導入及び導入効率の評価を行った。図3に電気泳動のゲルを示す。図3の左側のゲルが、精製前の試料の電気泳動ゲルであり、図3の右側のゲルが、FLAGタグを利用した精製後の試料の電気泳動ゲルである。

[0110] 図3においてゲル上の数字は下記のポリペプチドを示す。

(1) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、N-メチルフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(2) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(3) DNA (b) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(4) DNA (c) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルフェニル

アラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFLーアミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(5) DNA (d) から翻訳したポリペプチドであり、Nーメチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFLーアミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

[0111] 図3の右側のゲルにおいて、比較的濃いバンドがポリペプチドである。精製後のポリペプチドのバンドが検出されたことから分るとおり、2種類のtRNA改変体を用いて蛍光標識アミノ酸とNーメチルフェニルアラニンとがポリペプチドに多重導入できていた。

[0112] <実施例7>

実施例6と同じ実験を、ただし、翻訳されるmRNAの3'末端にピューロマイシンを結合させることを追加して行った。UAGコドン翻訳tRNA及びUAAコドン翻訳tRNAには、Nーメチルフェニルアラニン、Nーメチルアラニン又はBODIPYFLーアミノフェニルアラニンを結合させた。図4に電気泳動のゲルを示す。

[0113] 図4においてゲル上の数字は下記のポリペプチドを示す。

(6) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、BODIPYFLーアミノフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、Nーメチルフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(7) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、Nーメチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFLーアミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(8) DNA (b) から翻訳したポリペプチドであり、Nーメチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFLーアミ

ノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(9) DNA (c) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(10) DNA (d) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(11) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、N-メチルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(12) DNA (a) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(13) DNA (b) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(14) DNA (c) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

(15) DNA (d) から翻訳したポリペプチドであり、N-メチルアラニンを結合したUAGコドン翻訳tRNAと、BODIPYFL-アミノフェ

ニルアラニンを結合したUAAコドン翻訳tRNAとを用いて翻訳したポリペプチド。

- [0114] 図4のゲルにおいて、下部の太いバンドがBODIPYFL-アミノフェニルアラニンであり、そのやや上のバンドがポリペプチドであり、98kDa付近の細いバンドがmRNA-ポリペプチド連結体である。

図4のゲルから分るとおり、蛍光標識アミノ酸とN-メチルフェニルアラニンとが多重導入されたmRNAディスプレイが実現できていた。

- [0115] 日本国特許出願第2021-156183号の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された全ての文献、特許出願、及び技術規格は、個々の文献、特許出願、及び技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に援用されて取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとして UUA を有し UAA コドンに対合する、tRNA。
- [請求項2] CCA 末端の 5' 側に隣接する塩基が A 又は G である、請求項 1 に記載の tRNA。
- [請求項3] 5' 末端から 3 番目の塩基と当該塩基に対合する塩基との組み合わせが UA、GU 又は UG である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の tRNA。
- [請求項4] 5' 末端から 4 番目の塩基と当該塩基に対合する塩基との組み合わせが GU である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の tRNA。
- [請求項5] 配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 13、配列番号 15 及び配列番号 17 からなる群から選ばれる 1 種の塩基配列を有する、tRNA。

配列番号 7 : GGUGGUGUAG UUUAGUGGCA GAA
CAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG G
UUCGAUUC UCCACCACC ACCA

配列番号 8 : GGGGGUGUAG UUUAGUGGCA GAA
CAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG G
UUCGAUUC UCCACCUC ACCA

配列番号 9 : GGUGGUGUAG UUUAGUGGCA GAA
CAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG G
UUCGAUUC UCCACCGCC ACCA

配列番号 13 : GGGGGUGUAG UUUAGUGGCA GA
ACAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG
GUUCGAUUC UCCACUCCC ACCA

配列番号 15 : GGGGGUGUAG UUUAGUGGCA GA

ACAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG
GUUCGAUUC UUCCACCCCC GCCA
配列番号 17 : GGGGGUGUAG UUUAGUGGCA GA
ACAACAGU CUUUAAAACU GUCUGUGUGG
GUUCGAUUC UUCCACUCCC GCCA

- [請求項6] 請求項1～請求項5のいずれか1項に記載のtRNAにアミノ酸が結合した、アミノアシルtRNA。
- [請求項7] 前記アミノ酸が非天然アミノ酸、修飾化アミノ酸及びそれらの誘導体からなる群から選ばれる1種である、請求項6に記載のアミノアシルtRNA。
- [請求項8] 前記アミノ酸がクロロアセチル化リシン、N-メチルアラニン、N-メチルフェニルアラニン及び蛍光標識アミノ酸からなる群から選ばれる1種である、請求項6に記載のアミノアシルtRNA。
- [請求項9] マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合するtRNAと、
マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合するtRNAと、を含む、
ポリペプチド合成用試薬。
- [請求項10] マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合するtRNAに、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、
マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用tRNAが改変されたtRNAであって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合するtRNAに、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシルtRNAと、を含む、

ポリペプチド合成用試薬。

[請求項11] 少なくとも2種類の非天然アミノ酸をポリペプチドに導入する方法であって、

 UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、
 マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合する tRNA に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

 マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合する tRNA に、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

 を含有する無細胞ペプチド合成システムによって前記核酸からポリペプチドを発現させること、を含む、

 非天然アミノ酸の導入方法。

[請求項12] 前記塩基配列が終止コドンであるUGAコドンをさらに含む、請求項11に記載の非天然アミノ酸の導入方法。

[請求項13] 少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドを作製する方法であって、

 UAGコドン及びUAAコドンを含む塩基配列を有する核酸と、
 マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとしてCUAを有しUAGコドンに対合する tRNA に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

 マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 tRNA が改変された tRNA であって、アンチコドンとしてUUAを有しUAAコドンに対合する tRNA に、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA と、

を含有する無細胞ペプチド合成システムによって前記核酸からポリペプチドを発現させること、を含む、
ポリペプチドの作製方法。

[請求項14] 前記塩基配列が終止コドンであるU G Aコドンを含み、請求項13に記載のポリペプチドの作製方法。

[請求項15] U A Gコドン及びU A Aコドンを含む塩基配列を有する核酸と、
マイコプラズマ・カプリコラム (*Mycoplasma capricolum*) のトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてC U Aを有しU A Gコドンに対合する t R N A に、第一の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル t R N A と、
マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*) のトリプトファン用 t R N A が改変された t R N A であって、アンチコドンとしてU U Aを有しU A Aコドンに対合する t R N A に、第二の非天然アミノ酸が結合したアミノアシル t R N A と、
を含有する無細胞ペプチド合成システムによって前記核酸からポリペプチドを発現させ、核酸ーポリペプチド連結体を作製すること、を含む、
核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項16] 前記核酸ーポリペプチド連結体を作製することが、m R N Aーポリペプチド連結体を作製すること、及び、前記m R N Aーポリペプチド連結体のm R N Aを逆転写しc D N Aーポリペプチド連結体を作製することを含む、

請求項15に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項17] 前記核酸ーポリペプチド連結体において核酸とポリペプチドとがピユーロマイシンリンカーによって連結している、請求項15又は請求項16に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法。

[請求項18] 少なくとも2種類の非天然アミノ酸をアミノ酸配列中に含むポリペプチドと、前記ポリペプチドをコードする塩基配列を有する核酸とが

連結した核酸－ポリペプチド連結体であって、

前記塩基配列がU A Gコドン及びU A Aコドンを含み、

前記塩基配列において前記U A Gコドンが前記ポリペプチド中の第一の非天然アミノ酸をコードし、

前記塩基配列において前記U A Aコドンが前記ポリペプチド中の第二の非天然アミノ酸をコードする、

核酸－ポリペプチド連結体。

[請求項19] m R N A－ポリペプチド連結体又はc D N A－ポリペプチド連結体である、請求項18に記載の核酸－ポリペプチド連結体。

[請求項20] 請求項15～請求項17のいずれか1項に記載の核酸ディスプレイライブラリの作製方法によって核酸ディスプレイライブラリを作製することと、

前記核酸ディスプレイライブラリから目的の活性を有する核酸－ポリペプチド連結体を選択し、選択した核酸－ポリペプチド連結体の核酸の塩基配列を同定することと、を含む、

スクリーニング方法。