

明 細 書

発明の名称： 翻訳用組成物及びペプチドの製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、翻訳用組成物及びペプチドの製造方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質翻訳に関わる因子のみを混ぜ合わせることで人工的に再構成した無細胞翻訳系（非特許文献1）は、生命現象の解明から新薬開発に至るまで幅広い領域で利用されている。無細胞翻訳系は微生物や細胞を使用しないため、毒性の高いタンパク質の合成に利用することが出来る。またアミノ酸、tRNA、アミノアシルtRNA合成酵素といった構成成分を目的に合わせて除去又は添加出来るため、コドンとアミノ酸の対応付けを変更すること（遺伝暗号のリプログラミング）も可能である。こうした特徴から、無細胞翻訳系は非天然アミノ酸含有タンパク質の合成や多様なビルディングブロックを導入したディスプレイライブラリーの構築にも応用されている。このように無細胞翻訳系は非常に有用な技術であるが、コドンの読み間違いによって意図していないペプチドが生み出されることがある。例えば、RF1を不活化させ、アンバーコドン（UAG）に非天然アミノ酸を割り当てたときに、同コドンに対して一定の割合でチロシン（UAU、UAC）、リシン（AAG）、グルタミン（GAG）が誤って導入されたことが報告されている（非特許文献2）。

[0003] コドンボックスを人工的に分割し、遺伝暗号のリプログラミングを行った例が報告されている。非特許文献3では、C-G-C/G、G-U-C/G及びG-G-C/Gに対して、1つの非天然アミノ酸と1つの天然アミノ酸を割り当てる試みがされている。同文献には、Glyが結合したtRNA^{Gly_{CCC}}によるGGCコドンの読み間違いの低減策として、GGCと相補的なアンチコドンGCCを有し且つアミノ酸がプレチャージされたtRNAが枯渇する前に翻訳反応を停止することが記載されているが、どのような翻訳用組成物であればコドンの読み間違いを低減できるのかは記載されていない。また、非特許文献4～7、特許文献1及び2でも、コドン

ボックスを人工的に分割する試みがされているが、コドンの読み間違いを低減する方法についての記載はない。

- [0004] tRNAのアンチコドンループに位置する32及び38位には、アンチコドンのトリプレットごとに特定の塩基が保存されていることが知られている。アンチコドンGGCを有するtRNA(Ala)_{GGC}を用いた報告によると、32及び38位に天然のtRNA(Ala)_{GGC}で保存されている塩基を用いた場合には、GUCコドンの読み間違いが起こりにくく、一方、32及び38位の塩基を変更した場合には、同tRNAによるGUCコドンの読み間違いが生じ、誤ってアラニン（GCC）が翻訳導入されたことが示されている（非特許文献8）。同文献は、天然の遺伝暗号表を用いた、tRNA(Ala)_{GGC}によるGUCコドンの読み間違いの検証にとどまり、遺伝暗号表をリプログラミングした際に生じ得るコドンの読み間違いについての記載はない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：W02019/139126

特許文献2：W02012/026566

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Shimizu et al., Nat Biotechnol. 2001 Aug; 19(8): 751-755

.

非特許文献2：Gan et al., Biochem. Biophys. Acta, 2017 Dec; 1861; 3047-3052.

非特許文献3：Iwane et al., Method Mol. Biol., 2018, 1728, 17-47.

非特許文献4：Passioura et al., J Am. Chem. Soc., 2018, 140, 11551-11555.

非特許文献5：Passioura et al., Cell Chem. Biol., 2018, 25, 906-915.

非特許文献6：Iwane et al., Nat. Chem., 2016, 8, 317-325.

非特許文献7：Azusa et al., Peptide Science 2009, 2010 Mar; 17-18.

非特許文献8：Murakami et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2009 Mar; 16; 353-358.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、tRNAによるコドンの読み間違いに起因して意図しないアミノ酸が誤って翻訳されてしまう割合を低減することを可能とする翻訳用組成物及び該翻訳用組成物を用いたペプチドの製造方法を提供することを目的の一つとする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、翻訳に使用するtRNAのアンチコドンループに特定の塩基を選択することにより、上記課題を解決できることを見出した。本開示はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

〔1〕 第一のアミノ酸が結合した第一のtRNAと、第二のアミノ酸が結合した第二のtRNAを含む翻訳用組成物であって、

前記第一のtRNAの 32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、
- (3) 32A、33U、37A、38U、
- (4) 32U、33U、37G、38U、
- (5) 32U、33U、37A、38U、又は
- (6) 32C、33U、37G、38A、

であり、

前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基が互いに異なり、

前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの2文字目の塩基が同一であり、

前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの3文字目の塩基が同一であり、

前記第一のアミノ酸及び前記第二のアミノ酸の少なくとも一つが非天然アミノ酸であり、

ここで、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Uはウラシルである、前記組成物。

〔2〕前記第一のtRNAのアンチコドンが $N_{11}N_{12}N_{13}$ （ここで、 N_{11} 、 N_{12} 、及び N_{13} は、互いに独立してA、C、G又はUである）である、〔1〕に記載の組成物。

〔3〕前記第二のtRNAのアンチコドンが $N_{21}N_{22}N_{23}$ （ここで、 N_{21} 、 N_{22} 、及び N_{23} は、互いに独立してA、C、G又はUである）である、〔1〕又は〔2〕に記載の組成物。

〔4〕前記第一のtRNAのtRNAボディがキメラtRNAボディである、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の組成物。

〔5〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がA又はGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がC又はUであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がC又はUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がA又はGである、

〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の組成物。

〔6〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がA又はGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がC又はUである、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の組成物。

〔7〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二

のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGである、

〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の組成物。

〔8〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGである、

〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の組成物。

〔9〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二

のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCである、

〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の組成物。

〔10〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであるか、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、又は、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGである、

〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の組成物。

〔11〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAである、

〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の組成物。

〔12〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであるか、又は、

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGである、

〔1〕～〔7〕および〔10〕のいずれかに記載の組成物。

〔13〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAである、

〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の組成物。

〔14〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであるか、又は

前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がUであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がGである、

〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の組成物。

〔15〕前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がAであって、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がCである、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載の組成物。

〔16〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの2文字目及び3文字目の塩基の組み合わせが、

- (i) 2文字目にG、かつ3文字目にG、
- (ii) 2文字目にA、かつ3文字目にG、
- (iii) 2文字目にC、かつ3文字目にC、
- (iv) 2文字目にG、かつ3文字目にC、
- (v) 2文字目にA、かつ3文字目にC、
- (vi) 2文字目にG、かつ3文字目にU、
- (vii) 2文字目にG、かつ3文字目にA、又は
- (viii) 2文字目にC、かつ3文字目にG、

である、〔1〕～〔15〕のいずれかに記載の組成物。

〔17〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの2文字目及び3文字目の塩基の組み合わせが、

- (i) 2文字目にG、かつ3文字目にG、
- (ii) 2文字目にA、かつ3文字目にG、
- (iii) 2文字目にC、かつ3文字目にC、
- (iv) 2文字目にG、かつ3文字目にC、
- (v) 2文字目にA、かつ3文字目にC、
- (vi) 2文字目にG、かつ3文字目にU、又は
- (vii) 2文字目にG、かつ3文字目にA、

である、〔１〕～〔１６〕のいずれかに記載の組成物。

〔１８〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの２文字目及び３文字目の塩基の組み合わせが、

- (i) ２文字目にG、かつ３文字目にG、
- (ii) ２文字目にA、かつ３文字目にG、又は
- (iii) ２文字目にC、かつ３文字目にC

である、〔１〕～〔１７〕のいずれかに記載の組成物。

〔１９〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの２文字目の塩基がGで、３文字目の塩基がGである、〔１〕～〔１８〕のいずれかに記載の組成物。

〔２０〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの２文字目の塩基がAで、３文字目の塩基がGである、〔１〕～〔１８〕のいずれかに記載の組成物。

〔２１〕前記第一及び前記第二のtRNAのアンチコドンの２文字目の塩基がCで、３文字目の塩基がCである、〔１〕～〔１８〕のいずれかに記載の組成物。

〔２２〕前記第一のtRNAの１～３１位及び３９～７４位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、配列番号：275、294、295、296、302、303、及び304からなる群より選択される少なくとも１つの塩基配列を有するtRNAにおける１～３１位及び３９～７４位（tRNAナンバリング則）の塩基配列のいずれにも由来しない、〔１〕～〔２１〕のいずれかに記載の組成物。

〔２３〕前記第一のtRNAの１～３１位及び３９～７４位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも１つの塩基配列を有するtRNAにおける１～３１位及び３９～７４位（tRNAナンバリング則）の塩基配列に由来する、〔１〕～〔２２〕のいずれかに記載の組成物。

〔２４〕前記第一のtRNAの１～３１位及び３９～７４位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列

番号：254からなる群より選択される少なくとも1つに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列である、〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の組成物。

〔25〕前記第一のtRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、〔24〕の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有する、〔1〕～〔24〕のいずれかに記載の組成物。

〔26〕前記第二のtRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、配列番号：275、294、295、296、302、303、及び304からなる群より選択される少なくとも1つの塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列のいずれにも由来しない、〔1〕～〔25〕のいずれかに記載の組成物。

〔27〕前記第二のtRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも1つの塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列に由来する、〔1〕～〔26〕のいずれかに記載の組成物。

〔28〕前記第二のtRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも1つの塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列である、〔1〕～〔27〕のいずれかに記載の組成物。

〔29〕前記第二のtRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、〔28〕の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有する、〔1〕～〔28〕のいずれかに記載の組成物。

〔30〕前記第一のtRNAと前記第二のtRNAにおける1～31位、及び、39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が同一であるか、又は80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有する、〔1〕～〔29〕のいずれかに記載の組成物。

〔31〕前記第一のtRNAと前記第二のtRNAにおける1～31位、及び、39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が同一である、〔1〕～〔30〕のいずれかに記載の組成物。

〔32〕前記キメラtRNAボディが、32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせと、それ以外の部位の塩基配列の由来が異なるキメラtRNAボディである、〔4〕～〔31〕のいずれかに記載の組成物。

〔33〕前記第一のtRNAの32～38位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、大腸菌の野生型tRNAの32～38位（tRNAナンバリング則）の塩基配列とは異なる、〔1〕～〔32〕のいずれかに記載の組成物。

〔34〕前記第一のtRNAがキメラアンチコドンループを有するtRNAである、〔1〕～〔33〕のいずれかに記載の組成物。

〔35〕前記第二のアミノ酸が非天然アミノ酸である、〔1〕～〔34〕のいずれかに記載の組成物。

〔36〕前記第一のアミノ酸が非天然アミノ酸である、〔1〕～〔35〕のいずれかに記載の組成物。

〔37〕前記第一のアミノ酸又は前記第二のアミノ酸のいずれか、又は両方が、N置換アミノ酸である、〔1〕～〔36〕のいずれかに記載の組成物。

〔38〕前記第一のtRNAが人工tRNAである、〔1〕～〔37〕のいずれかに記載の組成物。

〔39〕前記第二のtRNAが人工tRNAである、〔1〕～〔38〕のいずれかに記載の組成物。

〔40〕前記第一のtRNAの75、76位（tRNAナンバリング則）の塩基配列がCAである、〔1〕～〔39〕のいずれかに記載の組成物。

〔41〕前記第二のtRNAの75、76位（tRNAナンバリング則）の塩基配列がCA

である、〔1〕～〔40〕のいずれかに記載の組成物。

〔42〕前記第一のtRNAが、修飾塩基を有さないtRNAである、〔1〕～〔41〕のいずれかに記載の組成物。

〔43〕前記第二のtRNAが、修飾塩基を有さないtRNAである、〔1〕～〔42〕のいずれかに記載の組成物。

〔44〕前記第一のアミノ酸が、前記第一のtRNAの3'末端に結合している、〔1〕～〔43〕のいずれかに記載の組成物。

〔45〕前記第二のアミノ酸が、前記第二のtRNAの3'末端に結合している、〔1〕～〔44〕のいずれかに記載の組成物。

〔46〕前記第一のtRNAが、A、U、G、及びCからなる塩基配列を有するtRNAである、〔1〕～〔45〕のいずれかに記載の組成物。

〔47〕前記第二のtRNAが、A、U、G、及びCからなる塩基配列を有するtRNAである、〔1〕～〔46〕のいずれかに記載の組成物。

〔48〕前記第一のtRNAが、翻訳系外でアミノ酸が結合されたtRNAである、〔1〕～〔47〕のいずれかに記載の組成物。

〔49〕前記第二のtRNAが、翻訳系外でアミノ酸が結合されたtRNAである、〔1〕～〔48〕のいずれかに記載の組成物。

〔50〕前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが大腸菌由来のtRNAである、〔1〕～〔49〕のいずれかに記載の組成物。

〔51〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、
- (3) 32A、33U、37A、38U、又は
- (4) 32U、33U、37G、38U、

である、〔1〕～〔50〕のいずれかに記載の組成物。

〔52〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、又は
- (3) 32A、33U、37A、38U、

である、〔1〕～〔51〕のいずれかに記載の組成物。

〔53〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (3) 32A、33U、37A、38U、又は
- (4) 32U、33U、37G、38U、

である、〔1〕～〔52〕のいずれかに記載の組成物。

〔54〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32U、33U、37G、38A、又は32U、33U、37G、38Uである、

〔1〕～〔53〕のいずれかに記載の組成物。

〔55〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32U、33U、37G、38Aである、〔1〕～〔54〕のいずれかに記載の組成物。

〔56〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32A、33U、37G、38Uである、〔1〕～〔52〕のいずれかに記載の組成物。

〔57〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32A、33U、37A、38Uである、〔1〕～〔53〕のいずれかに記載の組成物。

〔58〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32U、33U、37G、38Uである、〔1〕～〔51〕のいずれかに記載の組成物。

〔59〕前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32U、33U、37A、38Uである、〔1〕～〔50〕のいずれかに記載の組成物。

〔 6 0 〕 前記第一のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、32C、33U、37G、38Aである、〔 1 〕 ～ 〔 5 0 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 1 〕 前記第二のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- （ 1 ） 32U、33U、37G、38A、
- （ 2 ） 32A、33U、37G、38U、
- （ 3 ） 32A、33U、37A、38U、
- （ 4 ） 32U、33U、37G、38U、
- （ 5 ） 32U、33U、37A、38U、又は
- （ 6 ） 32C、33U、37G、38A、

である、〔 1 〕 ～ 〔 6 0 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 2 〕 前記第二のtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- （ 1 ） 32U、33U、37G、38A、
- （ 2 ） 32A、33U、37G、38U、
- （ 3 ） 32A、33U、37A、38U、又は
- （ 4 ） 32U、33U、37G、38U、

である、〔 1 〕 ～ 〔 6 1 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 3 〕 前記第二のtRNAのtRNAボディがキメラtRNAボディである、〔 1 〕 ～ 〔 6 2 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 4 〕 無細胞翻訳用組成物である、〔 1 〕 ～ 〔 6 3 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 5 〕 再構成無細胞翻訳用組成物である、〔 1 〕 ～ 〔 6 4 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 6 〕 大腸菌由来の因子で再構成された無細胞翻訳用組成物である、〔 1 〕 ～ 〔 6 5 〕 のいずれかに記載の組成物。

〔 6 7 〕 大腸菌由来のリボソームを含む、〔 1 〕 ～ 〔 6 6 〕 のいずれかに記

載の組成物。

〔68〕前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含むmRNAを含む、〔1〕～〔67〕のいずれかに記載の組成物。

〔69〕前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドン及び前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含む、任意で、前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドン及び前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンは、同一のmRNAに含まれていても、異なるmRNAに含まれていてもよい、〔1〕～〔68〕のいずれかに記載の組成物。

〔70〕前記第一のtRNA又は前記第二のtRNAにアミノ酸を結合させることが可能なaaRS (amino acyl-tRNA synthetase) を含まない、〔1〕～〔69〕のいずれかに記載の組成物。

〔71〕〔1〕～〔70〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有し、1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）に配列番号：255に記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列を有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの組み合わせが、GCG及びCCGである組成物、並びに、CCG及びGCGである組成物を除く）。

〔72〕〔1〕～〔71〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの組み合わせが、GCG及びCCGである組成物、並びに、CCG及びGCGである組成物を除く）。

〔73〕〔1〕～〔72〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディ

を有する場合において、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの組み合わせが、A A G及びU A Gである組成物、A A G及びC A Gである組成物、並びにU A G及びC A Gである組成物を除く）。

〔74〕〔1〕～〔73〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの二文字目の塩基がいずれもCであり、三文字目の塩基がいずれもGである組成物を除く）。

〔75〕〔1〕～〔74〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの二文字目の塩基がいずれもAであり、三文字目の塩基がいずれもGである組成物を除く）。

〔76〕〔1〕～〔75〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAのアンチコドンの二文字目の塩基がいずれもCであり、三文字目の塩基がいずれもGである組成物を除く）。

〔77〕〔1〕～〔76〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（4）において特定される塩基の組み合わせを有する場合において、前記第一のtRNAアンチコドンの二文字目の塩基がAであり、三文字目の塩基がGである組成物を除く）。

〔78〕〔1〕～〔77〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNAが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（1）において特定される塩基の組み合わせを有する場合において、前記第一のtRNAのアンチコドンがUGG及びCGGである組成物を除く）。

〔79〕〔1〕～〔78〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA

Aが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（2）において特定される塩基の組み合わせを有する場合において、前記第一のtRNAのアンチコドンがAGG及びGGGである組成物を除く）。

〔80〕〔1〕～〔79〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA Aが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（6）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNAのアンチコドンがGCG及びCCGである組成物を除く）。

〔81〕〔1〕～〔80〕のいずれかに記載の組成物（但し、前記第一のtRNA Aが32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）に前記〔1〕（3）において特定される塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合において、前記第一のtRNAのアンチコドンがAGC及びGGCである組成物を除く）。

〔82〕前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAが伸長tRNAである、〔1〕～〔81〕のいずれかに記載の組成物。

〔83〕前記N置換アミノ酸が、N-メチルアミノ酸である、〔37〕～〔82〕のいずれかに記載の組成物。

〔84〕前記アミノ酸が、翻訳可能なアミノ酸である、〔1〕～〔83〕のいずれかに記載の組成物。

〔85〕前記第二のtRNAがキメラアンチコドンループを有するtRNAである、〔1〕～〔84〕のいずれかに記載の組成物。

〔86〕前記第一のアミノ酸を翻訳系外でtRNAに結合することにより前記第一のtRNAを調製する工程、及び／又は、前記第二のアミノ酸を翻訳系外でtRNAに結合することにより前記第二のtRNAを調製する工程を含む、〔1〕～〔85〕のいずれかに記載の翻訳用組成物の製造方法。

〔87〕前記第一のtRNA、及び／又は、前記第二のtRNAを調製する工程が、pCpA法、pdCpA法、フレキシザイムを用いた方法、及びaaRSによる方法、からなる群より選択される少なくとも一つの方法によって行われる、〔86〕に記載の方法。

〔88〕前記第一のtRNAをin vitro転写により調製する工程を含む、〔86〕

〕又は〔 8 7 〕に記載の方法。

〔 8 9 〕前記第二のtRNAをin vitro転写により調製する工程を含む、〔 8 6 〕～〔 8 8 〕のいずれかに記載の方法。

[0009] 〔 A 1 〕〔 1 〕～〔 8 5 〕のいずれかに記載の翻訳用組成物または〔 8 6 〕～〔 8 9 〕のいずれかに記載の方法によって製造された翻訳用組成物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。

〔 A 2 〕〔 1 〕～〔 8 5 〕のいずれかに記載の翻訳用組成物または〔 8 6 〕～〔 8 9 〕のいずれかに記載の方法によって製造された翻訳用組成物を用いて核酸を翻訳することを含む、前記第一のtRNAによる、前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンの読み間違いを低減する方法。

〔 A 3 〕前記核酸が、前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含むmRNAである、〔 A 1 〕又は〔 A 2 〕に記載の方法。

〔 A 4 〕前記核酸が、前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含むmRNAであり、任意で、前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドン及び前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンは、同一のmRNAに含まれていても、異なるmRNAに含まれていてもよい、〔 A 3 〕に記載の方法。

〔 A 5 〕前記核酸が含まれる核酸ライブラリーを翻訳してペプチドライブラリーを得ることを含む、〔 A 1 〕～〔 A 4 〕のいずれかに記載の方法。

〔 A 6 〕前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンが、該アンチコドンと3塩基すべてにおいてワトソン・クリック型塩基対を形成するコドンである、〔 A 1 〕～〔 A 5 〕のいずれかに記載の方法。

〔 A 7 〕前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンが、該アンチコドンと3塩基すべてにおいてワトソン・クリック型塩基対を形成するコドンである、〔 A 1 〕～〔 A 6 〕のいずれかに記載の方法。

〔 A 8 〕前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンの3文字目が、該アンチコドンの1文字目とwobble塩基対を形成する、〔 A 1 〕～〔 A 5 〕のいずれかに記載の方法。

〔A 9〕前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンの3文字目が、該アンチコドンの1文字目とwobble塩基対を形成する、〔A 1〕～〔A 6〕または〔A 8〕のいずれかに記載の方法。

〔A 10〕前記核酸がmRNAである、〔A 1〕～〔A 9〕のいずれかに記載の方法。

〔A 11〕〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法によって製造されたペプチドまたはペプチドライブラリー。

〔A 12〕〔1〕～〔85〕のいずれかに記載の翻訳用組成物または〔86〕～〔89〕のいずれかに記載の方法によって製造された翻訳用組成物を用いて製造されたペプチド。

〔A 13〕〔1〕～〔85〕のいずれかに記載の翻訳用組成物または〔86〕～〔89〕のいずれかに記載の方法によって製造された翻訳用組成物を用いて製造されたペプチドライブラリー。

〔A 14〕〔A 1〕～〔A 10〕のいずれかに記載の方法を用いてペプチドライブラリーを製造する工程、及び、該ペプチドライブラリーに標的分子を接触させる工程を含む、該標的分子に結合するペプチドの同定方法。

[0010] 〔B 1〕第一のコドンと相補的なアンチコドンをもつtRNAの32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）からなる群より選択される少なくとも1つの塩基を置換することを含む、前記tRNAによる第二のコドンの読み間違いを低減する方法であって、

前記第一のコドンと前記第二のコドンの一文字目は同じ塩基であり、

前記第一のコドンと前記第二のコドンの二文字目は同じ塩基であり、

前記第一のコドンと前記第二のコドンの三文字目は互いに異なる塩基である、前記方法。

〔B 2〕前記置換後の32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

（1）32U、33U、37G、38A、

（2）32A、33U、37G、38U、

- (3) 32A、33U、37A、38U、
- (4) 32U、33U、37G、38U、
- (5) 32U、33U、37A、38U、又は
- (6) 32C、33U、37G、38A、

であり、ここで、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Uはウラシルである、〔B 1〕に記載の方法。

〔B 3〕前記第一のコドンと相補的なアンチコドンをもつ tRNA の 32、37 及び 38 位 (tRNA ナンバリング則) からなる群より選択される少なくとも 1 つの塩基を置換することを含む、〔B 1〕又は〔B 2〕に記載の方法。

〔B 4〕前記第一のコドンが M_1M_2X であり、前記第二のコドンが M_1M_2Y であって、

前記 M_1 及び前記 M_2 はそれぞれ独立して A、C、G 又は U であり、

前記 X 及び前記 Y はそれぞれ A、C、G 及び U から選択される、互いに異なる塩基である、〔B 1〕～〔B 3〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが、以下の群より選択されるいずれかである、〔B 4〕に記載の方法：

(a1) U と G ; (a2) G と U ; (a3) U と A ; (a4) A と U ; (a5) C と A ; (a6) A と C ; (a7) C と G ; 及び (a8) G と C。

〔B 6〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが、以下の群より選択されるいずれかである〔B 4〕又は〔B 5〕に記載の方法：

(a1) U と G ; (a2) G と U ; (a3) U と A ; (a5) C と A ; 及び (a7) C と G。

〔B 7〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが、(a1) U と G、又は、(a2) G と U である、〔B 5〕に記載の方法。

〔B 8〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが (a1) U と G である、〔B 5〕～〔B 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 9〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが (a2) G と U である、〔B 5〕～〔B 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 10〕前記 X 及び前記 Y の塩基の組み合わせが (a3) U と A である、〔B 5〕

又は〔B 6〕に記載の方法。

〔B 1 1〕前記X及び前記Yの塩基の組み合わせが(a5) CとAである、〔B 5〕又は〔B 6〕に記載の方法。

〔B 1 2〕前記X及び前記Yの塩基の組み合わせが(a7) CとGである、〔B 5〕又は〔B 6〕に記載の方法。

〔B 1 3〕前記 M_1M_2 が、以下の群より選択されるいずれかの塩基配列である、〔B 4〕～〔B 1 2〕のいずれかに記載の方法：

(b1) CC；(b2) CU；(b3) GG；(b4) GU；(b5) GC；(b6) UC；(b7) CG；及び (b8) AC。

〔B 1 4〕前記 M_1M_2 が、以下の群より選択されるいずれかの塩基配列である〔B 1 3〕に記載の方法：

(b1) CC；(b2) CU；及び (b3) GG。

〔B 1 5〕前記 M_1M_2 の塩基配列が (b1) CCである、〔B 1 3〕又は〔B 1 4〕に記載の方法。

〔B 1 6〕前記 M_1M_2 の塩基配列が (b2) CUである、〔B 1 3〕又は〔B 1 4〕に記載の方法。

〔B 1 7〕前記 M_1M_2 の塩基配列が (b3) GGである、〔B 1 3〕又は〔B 1 4〕に記載の方法。

〔B 1 8〕前記第一のコドンと前記tRNAのアンチコドンとが、3塩基すべてにおいてワトソン－クリック型塩基対を形成する、〔B 1〕～〔B 1 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 1 9〕前記第一のコドンの3文字目の塩基と前記tRNAのアンチコドンの1文字目の塩基とが、wobble塩基対を形成する、〔B 1〕～〔B 1 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 2 0〕前記tRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも1つに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列

に由来する、〔B 1〕～〔B 19〕のいずれかに記載の方法。

〔B 21〕前記tRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも1つに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列である、〔B 1〕～〔B 20〕のいずれかに記載の方法。

〔B 22〕前記tRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が、〔B 20〕の(a)～(c)のいずれかに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有する、〔B 1〕～〔B 21〕のいずれかに記載の方法。

〔B 23〕アミノ酸を翻訳系外で前記tRNAに結合することを含む、〔B 1〕～〔B 22〕のいずれかに記載の方法。

〔B 24〕前記アミノ酸を翻訳系外でtRNAに結合することが、pCpA法、pdCpA法、フレキシザイムを用いた方法、及びaaRSを用いた方法、からなる群より選択される少なくとも一つの方法によって行われる、〔B 23〕に記載の方法。

〔B 25〕前記アミノ酸が非天然アミノ酸である、〔B 23〕又は〔B 24〕に記載の方法。

〔B 26〕前記非天然アミノ酸がN置換アミノ酸である、〔B 23〕～〔B 25〕のいずれかに記載の方法。

〔B 27〕in vitroでの転写により鋳型核酸から前記tRNAを合成することをさらに含む、〔B 1〕～〔B 26〕のいずれかに記載の方法。

〔B 28〕前記tRNAの改変前の37位（tRNAナンバリング則）の塩基がAである、〔B 1〕～〔B 27〕のいずれかに記載の方法。

〔B 29〕前記tRNAの改変前の33位（tRNAナンバリング則）の塩基がUである、〔B 1〕～〔B 28〕のいずれかに記載の方法。

〔B 30〕前記tRNAの改変前の32位（tRNAナンバリング則）の塩基がC又は

Uである、〔B 1〕～〔B 2 9〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 1〕前記tRNAの改変前の3 2位（tRNAナンバリング則）の塩基がCである、〔B 1〕～〔B 3 0〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 2〕前記tRNAの改変前の3 2位（tRNAナンバリング則）の塩基がUである、〔B 1〕～〔B 3 0〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 3〕前記tRNAの改変前の3 8位（tRNAナンバリング則）の塩基がA又はCである、〔B 1〕～〔B 3 2〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 4〕前記tRNAの改変前の3 8位（tRNAナンバリング則）の塩基がAである、〔B 1〕～〔B 3 3〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 5〕前記tRNAの改変前の3 8位（tRNAナンバリング則）の塩基がCである、〔B 1〕～〔B 3 3〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 6〕前記置換後の32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、
- (3) 32A、33U、37A、38U、又は
- (4) 32U、33U、37G、38U、である、

〔B 1〕～〔B 3 5〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 7〕前記置換後の32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、又は
- (3) 32A、33U、37A、38U、である、

〔B 1〕～〔B 3 6〕のいずれかに記載の方法。

〔B 3 8〕〔B 1〕～〔B 3 7〕のいずれかに記載の方法（但し、前記置換後の32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）の塩基の組み合わせが〔B 2〕（4）において特定される組み合わせであり、前記tRNAの1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列が配列番号：255に記載の塩基配列

を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位（tRNAナンバリング則）の塩基配列である場合において、前記第一のコドン及び前記第二のコドンの組み合わせが、CGC及びCGGである方法、並びに、CGG及びCGCである方法を除く）。

〔B 3 9〕塩基が置換されたtRNAを含む翻訳系において核酸を翻訳することをさらに含む、〔B 1〕～〔B 3 8〕のいずれかに記載の方法。

〔B 4 0〕前記N置換アミノ酸が、N－メチルアミノ酸である、〔B 2 6〕～〔B 3 9〕のいずれかに記載の方法。

〔B 4 1〕前記アミノ酸が、翻訳可能なアミノ酸である〔B 2 3〕～〔B 4 0〕のいずれかに記載の方法。

発明の効果

- [0011] 本開示において、その32、33、37及び38位（tRNAナンバリング則）において特定の塩基を有するtRNAを含む翻訳用組成物、および、当該tRNAを使用して核酸を翻訳することを含むペプチドの製造方法等が提供された。本開示における組成物および方法等を使用することにより、ペプチドの合成において、tRNAによるコドンの読み間違いに起因して意図しないアミノ酸が誤って翻訳されてしまう割合を低減することができる。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCCGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はcgg及びaggをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CCGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果（具体的な翻訳量は表6を参照）に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）とは以下に示す式から算出されたものである。
- 目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）＝配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly（配列番号：242）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M）／配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly（配列番号：241）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M）×100
- [図2]tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCCUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はagg及びcggをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CCUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果（具体的な翻訳量は表6を参照）に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）とは以下に示す式から算出されたものである。

チコドンとして有するtRNAの共存下、CCUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果

（具体的な翻訳量は表7を参照）に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）＝配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly（配列番号：242）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M）／配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly（配列番号：241）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M） $\times$ 100

[図3]tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はccc及びaccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果（具体的な翻訳量は表8を参照）に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）＝配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu（配列番号：244）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M）／配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu（配列番号：243）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M） $\times$ 100

[図4]tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はacc及びcccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果（具体的な翻訳量は表9を参照）に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）＝配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu（配列番号：244）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M）／配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu（配列番号：243）に相当するペプチドの翻訳量（ μ M） $\times$ 100

[図5]tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はcag及びaagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果

(具体的な翻訳量は表10を参照)に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%)とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図6] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はaag及びcagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果(具体的な翻訳量は表11を参照)に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%)とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図7] tRNA(AsnE2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はcag及びaagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果(具体的な翻訳量は表12を参照)に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%)とは以下に示す式から算出されたものである。

目的物に対する読み間違いペプチドの割合(%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図8] tRNA(AsnE2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はaag及びcagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果(具体的な翻訳量は表13を参照)に基づいており、縦軸の目的物に対する

読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) × 100

[図9] tRNA(Asp1)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はcag及びaagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表14を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) × 100

[図10] tRNA(Asp1)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCUUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はaag及びcagをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CUUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表15を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 240) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 239) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) × 100

[図11] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGAの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はucc及びaccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGAのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表16を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。

る。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図12] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGAの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はucc及びgccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGAのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表17を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図13] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はccc及びgccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表18を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図14] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はacc及びcccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表21を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile

:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 245) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図15] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はacc及びcccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表22を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 246) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図16] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンGGGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はacc及びcccをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、GGGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表23を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 248) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 247) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図17] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCCGの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はcgg及びaggをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CCGのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表24を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号 : 242) に相当するペ

プチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 249) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

[図18] tRNA(Glu2)の32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせの違いによる、コドンCCUの読み間違いの割合を示す図である。図中の値はagg及びcggをアンチコドンとして有するtRNAの共存下、CCUのコドンを持つmRNAを翻訳した結果 (具体的な翻訳量は表25を参照) に基づいており、縦軸の目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) とは以下に示す式から算出されたものである。目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (%) = 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 242) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) / 配列BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 249) に相当するペプチドの翻訳量 (μM) $\times 100$

発明を実施するための形態

[0013] 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。

[0014] 「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つの塩基の組合せ (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)、及びチミン (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)、及びウラシル (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、真核生物及び原核生物 (真正細菌及び古細菌) 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。本開示において、コドンの1文字目及び2文字目の塩基の後に、A、C、G及びUから選択される任意の塩基を意味する「M」を並べることにより、特定のコドンボックスを表すことがある。例えば、天然の遺伝暗号表においてSerが割り当てられている、コドンの1文字目がU、2文字目がCのコドンボックスは、「UCM」と表記され、Proが割り当てられているコドンボックスは「CCM」と表記される。

[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

[0015] 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 、及び M_3 はそれぞれコドンの1文字目、2文字目、及び3文字目の塩基を表す。

[0016] 「アンチコドン」とは、mRNA上のコドンに対応する、tRNA上の3つの連続した塩基のことである。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)、及びウラシル (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、及び3文字目の塩基と、アンチコドンの3文字目、2文字目、及び1文字目の塩基との間でそれぞれ相補的な塩基対が形成される。本開示において、「修飾塩基」とは、塩基の構造の一部が、A、C、G及びUとは異なる構造の塩基のことをいう。

[0017] 本開示において、第一のtRNAにおけるアンチコドンは「 $N_{11}N_{12}N_{13}$ 」で表されることがあり、第二のtRNAにおけるアンチコドンは「 $N_{21}N_{22}N_{23}$ 」で表されることがある。ここで、 N_{11} 、 N_{12} 、及び N_{13} ならびに N_{21} 、 N_{22} 、及び N_{23} はそれぞれアンチコドンの1文字目、2文字目、及び3文字目の塩基を表す。後述のtRNAナンバリング則に従うと、 N_{11} 、 N_{12} 、及び N_{13} ならびに N_{21} 、 N_{22} 、及び N_{23} はそれぞれtRNAの34位、35位、及び36位に番号付けされる。

[0018] 本開示において、塩基A、C、G、U、及びTを小文字で表記することがあるが、大文字と小文字は同義で用いられる。例えば、GGGとgggは同義で用いられる。

[0019] 本開示においては、熱力学的に安定な塩基対を互いに「相補的」とであるという。アデニンとウラシル (A-U)、グアニンとシトシン (G-C) といったワトソン・クリック型塩基対に加えて、グアニンとウラシル (G-U) による非ワトソン・クリック型のwobble塩基対も、本開示における「相補的」な塩基対に含まれる。特に、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则认为られている (ゆらぎ仮説)。

[0020] 本開示においては、コドンとアンチコドンの一定の関係を「相補的」と表現することがある。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・クリック型塩基対が形成さ

れ、コドンの3文字目とアンチコドンの1文字目の間にワトソン・クリック型又はwobble塩基対が形成されるような、コドンとアンチコドンの関係を「相補的」と称する。例えば、コドンUCUに相補的なアンチコドンはAGA及びGGAであり、アンチコドンGCGに相補的なコドンはCGC及びCGUである。

[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（真正細菌及び古細菌）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、真核生物及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つの連続した塩基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位又は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

ノ酸が結合した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及び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CCA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又は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における各塩基は、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）。本開示において、tRNAにおける塩基の番号付けは、同ナンバリング則に従ったものである。例えば、アンチコドンは34位～36位に、3'末端のCCA配列は74～76位にそれぞれ番号付けされている。

[0024] 本開示において、tRNAの特定の位置の塩基を表すために、tRNAナンバリング則（Sprinzl et al., Nucleic Acids Res (1998) 26: 148-153）と塩基の略称（A、C、G又はU）が用いられる。例えば「32U」は、tRNAナンバリング則に従う32位の塩基がU（ウラシル）であることを意味する。また、これらはtRNAの特定の位置の塩基の置換を表すためにも用いられる。例えば「C32U」は、tRNAナンバリング則に従う32位の塩基のC（シトシン）からU（ウラシル）への置換を意味する。

[0025] 「アンチコドンループ」とは、tRNA中の32～38位の塩基、すなわちアンチコドンの3つの連続した塩基を含み、アンチコドンの5'側及び3'側の2塩基ずつを含む7つの連続した塩基のことである。アンチコドンループにはアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、及びウラシル（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。

[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。「キメラtRNAボディ」とは、tRNAボディの一部分が特定の供給源又は種類のtRNAに由来する一方で、残りの部分が異なる供給源又は種類のtRNAに由来するtRNAボディのことをいう。キメラtRNAボディは、1種類のみのtRNAに由来するtRNAボディを含まない。キメラtRNAボディは、2種類以上のtRNAに由来するtRNAボディであればよく、3種類以上のtRNAに由来してもよい。本開示のキメラtRNAボディとしては、32、33、37及び38位の塩基の組み合わせと、それ以外の部位の塩基配列の由来が異なるキメラtRNAボディであってよい。キメラtRNAボディとしては、例えば、tRNAボディの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせがtRNA Pro2に由来し、残りの部分の塩基配列がtRNA Glu2に由来するtRNAボディが挙げられる。本開示において、あるtRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせの由来を決定するには、大腸菌に由来するtRNAの塩基配列 (配列番号：274～319) の32、33、37および38位の塩基の組み合わせを参照し、32、33、37および38位に同じ塩基の組み合わせを有するtRNAに由来すると決定できる。例えば、32、33、37および38位の塩基の組み合わせCUxxxACについては、配列番号：274～319を参照することで、tRNA Glu2又はtRNA Asp1に由来すると決定できる。この場合において、32、33、37および38位以外の部分の塩基配列がtRNA Glu2又はtRNA Asp1に由来するtRNAボディは、1種類のみのtRNAに由来するtRNAボディとなるため、キメラtRNAボディには含まれない。tRNAの32～38位の塩基配列情報に従い、以下の基準に従い由来するtRNAを決定できる：UUxxxAC=Ala1B、AUxxxAU=Ala2、CUxxxGA=Arg3、CUxxxAC=Glu2又はAsp1、UUxxxGU=Leu2、Leu1又はLeu3、UUxxxAA=Phe、Cys、Gly1、Gly3、Leu4、Leu5、Thr1、Thr2又はThr3、AUxxxGU=Pro2、UUxxxGA=Pro3又はPro1、CUxxxAA=Ser5、Arg2、Arg4、Arg5、Asn、Gly2、Ile1、Ile2、Lys、Met、Ser1、Ser2、Ser3、Thr4、Trp、Tyr1、Tyr2又はVal1、UU

xxxAU=Val2 (Val2A及びVal2Bの総称)、Gln1、Gln2、又はHis (ここでxxxはアンチコドンの3塩基を意味する)。例えば、32～38位の塩基配列がUUxxxGUであるtRNAにおける、32、33、37及び38位の塩基の組み合わせはtRNA Leu2、tRNA Leu1又はtRNA Leu3に由来すると決定される。

[0027] ある塩基、ある塩基の組み合わせ、または塩基配列がある起源に「由来する」とは、その塩基、ある塩基の組み合わせ、もしくは塩基配列、又はその塩基、ある塩基の組み合わせ、もしくは塩基配列と高度に類似する配列が、ある起源から単離されることをいう。例えば、あるtRNAを構成する塩基、ある塩基の組み合わせ、または塩基配列が、ある特定の種類のtRNAから単離される場合に、その塩基、ある塩基の組み合わせ、または塩基配列は、前記特定の種類のtRNAに「由来する」と表現される。

[0028] 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」又は「tRNA(Xxx)」: Xxxで識別される特定の塩基配列を持つtRNAボディを表す。例えばtRNA Glu2又はtRNA(Glu2)、tRNA Ser5又はtRNA(Ser 5)、tRNA AsnE2又はtRNA(AsnE2)、tRNA Asp1又はtRNA(Asp1)が挙げられる。
- ・「tRNA(Xxx)nnn」: Xxxで識別される特定のtRNAボディを持つtRNAであって、アンチコドン配列がnnnである全長tRNAを表す。例えばtRNA(Glu2)uga、tRNA(AsnE2)ugaが挙げられる。
- ・「tRNA(Xxx+Yyy)」: 32、33、37及び38位以外にXxxで識別される特定の塩基配列を持ち、32、33、37及び38位にYyyで識別される特定の塩基の組み合わせを持つキメラtRNAボディを表す。例えばtRNA(Glu2+Ser5)、tRNA(AsnE2+Phe)が挙げられる。
- ・「tRNA(Xxx+Yyy)nnn」: 32、33、37及び38位以外にXxxで識別される特定の塩基配列を持ち、32、33、37及び38位にYyyで識別される特定の塩基の組み合わせを持つキメラtRNAボディを持つtRNAであって、アンチコドン配列がnnnである全長tRNAを表す。例えばtRNA(Glu2+Ser5)uga、tRNA(AsnE2+Phe)ugaが挙げられる。
- ・上記のtRNAの名称の最後に「-CA」を付すことで、tRNAの3' 末端のCA配列

が除去されていることを表すことがある。例えば、tRNA(Glu2)-CA、tRNA(Glu2)uga-CA、tRNA(Glu2+Ser5)-CA、tRNA(Glu2+Ser5)uga-CAが挙げられる。

[0029] 本開示において、tRNAにおける32、33、37及び38位の塩基の特定の組み合わせを、それが由来するtRNAの名称で表記することがある。本開示において32～38位の塩基配列はXXxxxXXで表わされ、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせは次のように命名される：Ala1B配列=UUxxxAC、Ala2配列=AUxxxAU、Arg3配列=CUxxxGA、Glu2配列=CUxxxAC、Leu2配列=UUxxxGU、Phe配列=UUxxxAA、Pro2配列=AUxxxGU、Pro3配列=UUxxxGA、Ser5配列=CUxxxAA、Val2配列=UUxxxAU。

[0030] 「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有しており、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。開始tRNAの例として、tRNA fMet（配列番号：283、284）を挙げることができる。

[0031] 「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。伸長tRNAの例として、各種アミノ酸に対応したtRNA（配列番号：274～282、285～319）を挙げることができる。

[0032] 本開示における「翻訳系」とは、ペプチドを翻訳するための組成物（本開示において「翻訳用組成物」と呼ぶことがある。）として定義される。限定されるものではないが、典型的な翻訳系には、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（本開示において「無細胞翻訳用組成物」と同義で使用される。））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及び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又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）。限定されるものではないが、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tRNA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、及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。

[0033] アミノ酸・tRNA・アミノアシルtRNA合成酵素の特異的な組合せを翻訳系に含めることにより、翻訳系中でアミノアシルtRNAが合成され、それがペプチドの翻訳に用いられる。上記の代わりに、翻訳系外で調製したアミノアシル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（本開示において、「プレチャージ法」と呼ぶことがある）。プレチャージ法としては、翻訳系外でaaRSによってアミノ酸をtRNAに結合する方法、pdCpA法、pCpA法、及び人工RNA触媒（フレキシザイム）を用いた方法が例示される。特に、一部の非天然アミノ酸など、aaRS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、pdCpA法、pCpA法又はフレキシザイムを用いた方法などにより、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プレチャージ法が望ましい。

[0034] 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。

[0035] 「コドンの読み間違い」とは、特定のアンチコドンを持つアミノアシルtRNAが、当該アンチコドンと相補的ではないコドンを認識することによって、意図しないアミノ酸が翻訳導入されてしまうことをいう。例えば、コドンCCUに相補的なアンチコドンAGGを持つアミノアシルtRNAが、誤ってコドンCCGを認識することによって、当該tRNAにアシル化されたアミノ酸が意図せずに翻訳導入されてしまうことが挙げられる。なお、天然の遺伝暗号表では、コ

ドンCCGとCCUのいずれにもProが割り当てられているため、このような読み間違いの有無により翻訳導入されるアミノ酸に差異はない。しかし、遺伝暗号表をリプログラミングし、コドンCCGとCCUに別のアミノ酸を割り当てる場合に、このコドンの読み間違いが問題となり得る。

[0036] 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 C_1-C_{10} アルキル、 C_1-C_6 アルキル、 C_1-C_3 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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、 $-CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2C$

H_2- 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ などが挙げられる。

[0045] 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2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。

[0046] 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2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。

[0047] <組成物、キット、方法>

一局面において、本開示は、第一のアミノ酸が結合した第一のtRNAと第二のアミノ酸が結合した第二のtRNAとを含む翻訳用組成物および翻訳用キットに関する。また一局面において、本開示は、第一のアミノ酸が結合した第一のtRNAと第二のアミノ酸が結合した第二のtRNAとを使用して、核酸を翻訳する方法に関する。当該組成物、キットおよび方法を用いることにより、tRNAによるコドンの読み間違いに起因して意図しないアミノ酸が誤って翻訳されることを低減または抑制することができる。したがって、一局面において本開示は、tRNAによるコドンの読み間違いを低減または抑制しながらペプチドを製造する方法、ならびに当該方法のために用いるための組成物およびキッ

ト等に関する。

[0048] 本開示における組成物は、本開示におけるtRNAに加え、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ことができる。また一局面において本開示における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。さらなる局面において、本開示における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。

[0049] <tRNA及びtRNAボディ>

いくつかの態様において、本開示のtRNAの32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせは、

- (1) 32U、33U、37G、38A、
- (2) 32A、33U、37G、38U、
- (3) 32A、33U、37A、38U、
- (4) 32U、33U、37G、38U、
- (5) 32U、33U、37A、38U、又は
- (6) 32C、33U、37G、38A、であってよい。

いくつかの態様において、本開示のtRNAは、32、33、37、及び38位が前記(1)～(4)；前記(1)～(3)；若しくは、前記(1)、(3)及び(4)からなる群より選択される塩基の組み合わせであるtRNAであってよく、又は、前記(1)；前記(2)；前記(3)；前記(4)；前記(5)；若しくは、前記(6)の塩基の組み合わせであるtRNAであってもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAの32、33、37及び38位の塩基は、いずれも修飾塩基ではない。

[0050] 本開示において、本開示の第一のtRNAのアンチコドン $N_{11}N_{12}N_{13}$ で表すことがあり、本開示の第二のtRNAのアンチコドン $N_{21}N_{22}N_{23}$ で表すことがある。前記 N_{11} 、 N_{12} 、及び N_{13} ならびに $N_{21}N_{22}N_{23}$ はそれぞれ独立して、A、C、G、又はUであってよい。本開示のtRNAのアンチコドンの1文字目、2文字目、及び3文字

目はそれぞれ独立して、A、C、G、又はUであってよい。本開示のtRNAのアンチコドンの2文字目と3文字目の塩基配列は、CC、GC、AC、GU、CG、GG、AG、若しくはGAであってよく、又は、GG、AG、若しくはCCであってよい。いくつかの態様において、前記アンチコドンの2文字目と3文字目の塩基配列は、CGではない。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、アンチコドンに修飾塩基を有しないか、又は、アンチコドンの1文字目が修飾塩基であったり、同1文字目のヌクレオシドに後述する修飾を有してもよい。

[0051] 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又は真核生物由来のtRNAである。原核生物由来のtRNA又は真核生物由来の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、原核生物由来のtRNA又は真核生物由来のtRNAと最も高い塩基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、菌類及び原生生物に分類される。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、又は*Desulfitobacterium hafniense*などを挙げることができる。古細菌としては、例えば高度好塩菌、好熱菌、又はメタン菌（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。

[0052] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、参照tRNAの塩基配列に対して、1又は複数の塩基が異なっていてよく、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以上又は12以上の塩基が異なっていてよく、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個の塩基が異なっていてよく、15以下、14以下、13以下、12以下、11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、又は2以下の塩基が異なっていてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、参照tRNAの塩基配列と比べて、80%以上、8

5%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、あるいは98%以上の配列同一性を有していてもよい。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。

[0053] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、アンチコドンループ (32~38位) の塩基配列が、参照tRNAの塩基配列と異なっていてよい。ある態様において、本開示のtRNAは、キメラアンチコドンループを有していてよい。本開示における「キメラアンチコドンループ」とは、32、33、37および38位の塩基とアンチコドンの塩基配列の由来するtRNAが異なるアンチコドンループを意味する。例えば、アンチコドンUGAが含まれるアンチコドンループがキメラアンチコドンループに該当するか否かは次のように判定できる。まず、アンチコドンUGAを有するtRNAとして、大腸菌に由来するtRNA Ser1 (配列番号: 306) が同定されるため、アンチコドンUGAはtRNA Ser1に由来すると決定できる (アンチコドンの由来を決定する際には、配列番号: 274~319に記載のtRNAの塩基配列を参照してよい)。ここで、前記tRNA Ser1のアンチコドンループの塩基配列はCUugaAAである。そのため、アンチコドンループに含まれる32、33、37および38位の塩基がSer5配列 (32C、33U、37A、及び38A) 以外の塩基の組み合わせである場合に、同アンチコドンループは、キメラアンチコド

ンループと判定される。ある態様において、本開示のtRNAのアンチコドンループは、配列番号：274～282、285～304、及び306～319のいずれかに記載の塩基配列を有するtRNAに含まれるアンチコドンループ（tRNAナンバリング則の32～38位）と異なっていてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAのボディは、参照tRNAのボディの塩基配列に対して、1又は複数の塩基が異なっていてよく、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以上又は12以上の塩基が異なっていてよく、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12個の塩基が異なっていてよく、15以下、14以下、13以下、12以下、11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、又は2以下の塩基が異なっていてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAボディは、参照tRNAボディの塩基配列と比べて、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、あるいは98%以上の配列同一性を有していてもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、その32、33、37及び38位からなる群より選択される少なくとも一つにおいて、参照tRNAの塩基と異なっていてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAボディは、32、33、37及び38位からなる群より選択される少なくとも一つにおいて、参照tRNAボディの塩基と異なっていてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、天然には存在しないtRNAであることを特徴とする。ある態様において、本開示のtRNAボディは、配列番号：275に記載の塩基配列を有するtRNAに由来しないtRNAボディであってもよく、及び／又は、配列番号：294、295、及び296に記載の塩基配列を有するtRNAのいずれにも由来しないtRNAボディであってもよく、及び／又は、配列番号：302、303、及び304に記載の塩基配列を有するtRNAのいずれにも由来しないtRNAボディであってもよい。ある態様において、本開示のtRNAボディの32、33、37及び38位がLeu2配列の場合には、tRNAボディは配列番号：294、295、及び296に記載の塩基配列を有するtRNAのいずれにも由来しなくてよく、Ala2配列の場合には、tRNAボディは配列番号：275に記載の塩基配列を

有するtRNAに由来しなくてよく、Pro2配列又はPro3配列の場合には、tRNAボディは配列番号：302、303、及び304に記載の塩基配列を有するtRNAのいずれにも由来しなくてよい。

[0054] 本開示における参照tRNA及び参照tRNAボディは、それぞれ任意の生物（例えば大腸菌）に由来する天然tRNA又はそのボディであってもよいし、又は天然tRNAとは異なる配列を人工的に合成した非天然tRNA又はそのボディであってもよいし、あるいは、天然tRNAなどの配列を人工的に合成したtRNA（人工tRNA）又はそのボディであってもよいし、由来の異なるtRNAを人工的に組み合わせたtRNAキメラ又はそのボディであってもよい。

[0055] 本開示における参照tRNA又は参照tRNAボディは、それぞれ任意の塩基配列を有するtRNA又はtRNAボディ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、参照tRNA又は参照tRNAボディは、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、及び tRNA Sec（セレノシステイン）（配列番号：274～282、285～319）、並びに、tRNA Glu2、tRNA AsnE2、及びtRNA Asp1（配列番号：322～324）からなる群より選択される少なくとも一つのtRNA又はそのボディであってよい。tRNA fMet（配列番号：283、284）、tRNA Pyl（ピロリシン）、tRNA AsnE2（Ohta, A.; Murakami, H.; Higashimura, E.; Suga, H. Chem. Biol. 2007, 14, 1315-1322.を参照）やそのボディなども参照として用い得る。また、tRNA Glu2のTステムをtRNA Pro1に移植し、更に変異を加えたtRNAキメラであるtRNA Pro1E2（W02019/077887を参照）やそのボディなども参照として用い得る。特定の態様において、本開示のtRNA又はtRNAボディはtRNA Glu2、tRNA Asp1、及びtRNA AsnE2からなる群から選択される少なくとも一つのtRNA又はそのボディであってよい。いくつかのtRNAボディについて、1～74位の例示的な塩基配列を配列番号：253～255、320、321に示す。なお、ここで例示した参照tRNAボディは、本開示におけるキメラtRNAボディにおける、アンチコドンループ以外の部分の由来元の配列とし

て使用してもよい。

[0056] いくつかの態様において、本開示のtRNA又はtRNAボディが有する参照tRNA又は参照tRNAボディとの差異は、参照tRNA又は参照tRNAボディの配列情報（例えば、塩基配列情報）に基づき、当該配列の一部を改変することで生じさせてもよい。この場合、一度、本開示のtRNA又はtRNAボディの配列情報が得られれば、その後は参照配列情報を必要とせずに、本開示のtRNA又はtRNAボディを調製することが可能である。本開示において「改変」とは、既存のtRNA又はtRNAボディの塩基配列（既存配列）に対して、以下の群から選択される少なくとも1種類の改変を、少なくとも1個、又は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12個以上導入することを意味する：(i) 付加（既存配列に任意の新たな塩基を付け足すこと）、(ii) 欠失（既存配列から任意のヌクレオチドを削除すること）、(iii) 置換（既存配列における任意の塩基を別の任意の塩基に置き換えること）、(iv) 挿入（既存配列における任意の2つのヌクレオチドの間に新たな任意のヌクレオチドを追加すること）、(v) 修飾（既存配列における任意のヌクレオチドの構造の一部（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又はtRNAボディのどの構造（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。特定の態様において、本開示のtRNA又はtRNAボディの改変は、tRNAの32、33、37、及び38位からなる群、又は32、37及び38位からなる群より選択される少なくとも1つ、2つ以上、3つ以上、又は4つの塩基に対して行われる。いくつかの態様において、本開示のtRNA及びtRNAボディは、実際に参照tRNA又は参照tRNAボディに基づき改変されたものでなくてもよい。参照tRNA又は参照tRNAボディに対して前記のような改変がされた場合に得られる塩基配列を有しているtRNA又はtRNAボディも、本開示のtRNA及びtRNAボディに含まれる。

[0057] 本開示における改変としては、例えば、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせが、本開示のtRNAの該当箇所の塩基の組み合わせと同じになるように、塩基を置換することが挙げられる。置換前の塩基は特に限定されな

いが、例えば、置換前の32位の塩基はC又はUであってよく、置換前の37位の塩基はAであってよく、置換前の38位の塩基はA又はCであってよく、及び／又は、置換前の33位の塩基はUであってよい。いくつかの態様において、32、33、37又は38位の塩基が既に所望の塩基である場合には、置換を必要としない。例えば、置換前のtRNAの33位の塩基がUであり、33位の所望の塩基もUである場合には、33位の塩基の置換を必要としない。

[0058] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、キメラtRNAボディを有してよい。キメラtRNAボディとしては、tRNAボディのアンチコドンループ部分（すなわち、32、33、37及び38位）とその他の部分が異なるtRNAボディに由来するキメラtRNAボディが例示される。キメラtRNAボディの1～74位の塩基配列としては、以下が例示される。

[0059] [表2]

キメラ tRNA ボディの名称	配列番号	tRNA ボディにおけるアンチコドンループ以外の部分の由来	32、33、37 及び 38 位の塩基の組み合わせの由来
tRNA(Glu2+Leu2)-CA	256	tRNA Glu2	tRNA Leu2
tRNA(Glu2+Pro3)-CA	257		tRNA Pro3
tRNA(Glu2+Pro2)-CA	258		tRNA Pro2
tRNA(Glu2+Ala2)-CA	259		tRNA Ala2
tRNA(Glu2+Val2)-CA	260		tRNA Val2
tRNA(Glu2+Arg3)-CA	261		tRNA Arg3
tRNA(Asp1+Leu2)-CA	262	tRNA Asp1	tRNA Leu2
tRNA(Asp1+Pro3)-CA	263		tRNA Pro3
tRNA(Asp1+Pro2)-CA	264		tRNA Pro2
tRNA(Asp1+Ala2)-CA	265		tRNA Ala2
tRNA(Asp1+Val2)-CA	266		tRNA Val2
tRNA(Asp1+Arg3)-CA	267		tRNA Arg3
tRNA(AsnE2+Leu2)-CA	268	tRNA AsnE2	tRNA Leu2
tRNA(AsnE2+Pro3)-CA	269		tRNA Pro3
tRNA(AsnE2+Pro2)-CA	270		tRNA Pro2
tRNA(AsnE2+Ala2)-CA	271		tRNA Ala2
tRNA(AsnE2+Val2)-CA	272		tRNA Val2
tRNA(AsnE2+Arg3)-CA	273		tRNA Arg3

[0060] いくつかの態様において、本開示のtRNAの32～38位の塩基配列は、大腸菌

の野生型tRNA、又は天然に存在するtRNAの32～38位の塩基配列と異なってよい。限定はされないが、いくつかの態様において、本開示のtRNAが32U、33U、37G、38Aの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、アンチコドンがUGG及び／又はCGGであるtRNAは、本開示のtRNAから除外されてもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAが32A、33U、37G、38Uの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、アンチコドンがAGG及び／又はGGGであるtRNAは、本開示のtRNAから除外されてもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAが32A、33U、37A、38Uの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、アンチコドンがAGC及び／又はGGCであるtRNAは、本開示のtRNAから除外されてもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAが32C、33U、37G、38Aの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、アンチコドンがUCG及び／又はCCGであるtRNAは、本開示のtRNAから除外されてもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAが32U、33U、37G、38Uの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、アンチコドンの二文字目の塩基がAであり、かつ三文字目の塩基がGであるtRNAは、本開示のtRNAから除外されてもよい。

[0061] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、そのアンチコドンループ以外の塩基配列は特に限定されないが、tRNA Ala、tRNA Pro及びtRNA Leu以外から選択されてもよい。ここで、前記アンチコドンループ以外の塩基配列とは、tRNAの1～31位及び39～76位の塩基配列であってよい。

[0062] いくつかの態様において、本開示のtRNAの1～31位及び39～74位の塩基配列は、特に限定されないが、(a) 配列番号：253、(b) 配列番号：255、及び(c) 配列番号：254からなる群より選択される少なくとも1つに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位の塩基配列に由来してよい。特定の態様において、本開示のtRNAの1～31位及び39～74位の塩基配列は、前記(a)～(c)からなる群より選択される少なくとも1つに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位の塩基配列であってよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAの1～31位及び39～74位の塩基配列は、前記(a)～(c)

のいずれかに記載の塩基配列を有するtRNAにおける1～31位及び39～74位の塩基配列と配列同一性が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、あるいは98%以上であってよい。

[0063] いくつかの態様において、本開示のtRNAの75位の塩基はC、76位の塩基はAであってよい。本開示のtRNAの75及び76位は、pCpA（シチジン及びアデノシンを含むジヌクレオチド）であっても、pdCpA（デオキシシチジン及びアデノシンを含むジヌクレオチド）であってもよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAは、その3' 末端に、より具体的には、3' 末端のアデノシン残基に、より具体的には3' 末端である76位のアデノシン残基にアミノ酸が結合しているtRNAであってよい。

[0064] 本開示における修飾としては、tRNAのアンチコドンの1文字目の塩基、又はヌクレオシドに対して行われる修飾（例えば、ライシジン、ライシジン誘導体、アグマチジン、又はアグマチジン誘導体への置換）が例示される。ここで、ライシジン誘導体とは、ライシジンの構造の一部（例えば塩基部分）に修飾を加えて作製されている分子であって、アンチコドンの一部として用いられた場合に、ライシジンと同等のコドン識別能（相補的塩基対の形成能）を有している分子を意味する。また、アグマチジン誘導体とは、アグマチジンの構造の一部（例えば塩基部分）に修飾を加えて作製されている分子であって、アンチコドンの一部として用いられた場合に、アグマチジンと同等のコドン識別能（相補的塩基対の形成能）を有している分子を意味する。本開示において、ここに例示したような修飾、又はその他の修飾を受けている塩基を「修飾塩基」と称することがある。本開示において、塩基配列又は核酸配列中の「L」はライシジンを意味する。

[0065] 天然tRNAにおけるライシジンは、tRNA Ile-ライシジン合成酵素（tRNA Ile-lysine synthetase; TilS）と呼ばれる酵素の作用により合成される。TilSは、イソロイシンに対応したtRNA（tRNA Ile2）を基質として特異的に認識し、そのアンチコドンの1文字目（N1）におけるシチジン（C）をライシジン

(k2C) に改変（変換）する活性を有している。本開示のtRNAにおけるライシジンは、T₁ISを介して合成されたものであってもよいし、T₁ISを介さずに合成されたものであってもよい。

[0066] いくつかの態様において、本開示のtRNAは、修飾塩基を含まないtRNAであってもよい。本開示において、*in vitro*転写によって調製したtRNAを「転写tRNA」と呼ぶことがある。本開示のtRNAは転写tRNAであってもよく、修飾塩基を含まない転写tRNAであってもよい。本開示において、天然に存在する天然tRNAと区別するために「人工tRNA」という用語を使用することがある。本開示のtRNAは人工tRNAであってもよく、修飾塩基、又は修飾ヌクレオシドを含まない人工tRNAであってもよい。修飾塩基を含まないtRNA、修飾ヌクレオシドを含まないtRNA、転写tRNA及び人工tRNAの調製方法は特に限定されないが、例えば鋳型DNAから、T7 RNAポリメラーゼ等のRNAポリメラーゼを用いた*in vitro*転写反応によりtRNAを合成し、必要に応じてRNAを精製することにより調製してよい。RNAの精製にはRNeasy kit (Qiagen社) 等が使用できる。いくつかの態様において、本開示のtRNAの塩基は、A、C、G及びUから構成されてよい。ある態様において、本開示のtRNAはA、C、G、及びU からなる塩基を有してよい。

[0067] いくつかの態様において、本開示のtRNAにはアミノ酸が結合してよい。アミノ酸は、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。ある態様において、前記3' 末端のアデノシン残基は、tRNAナンバリング則の76位であってよい。tRNAに結合しているアミノ酸の具体的な種類は、以下に記載のアミノ酸の中からそれぞれ適宜選択することができるが、例えば、非天然アミノ酸が挙げられる。

[0068] 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、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸を含む。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）、及びプロリン（Pro）からなる。天然アミノ酸は通常、L型アミノ酸である。

[0069] 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（本開示において、「N置換アミノ酸」と呼ぶことがある。）
、ヒドロキシカルボン酸（ヒドロキシ酸）などを挙げることができる。N置換アミノ酸としては、N-メチルアミノ酸、N-エチルアミノ酸、N-プロピルアミノ酸、N-ブチルアミノ酸が例示されるが、これらに限定されない。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、又は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C₅－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル」とは、アリール及び／又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「C₅－C₁₀アリールC₁－C₆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。

[0070] 非天然アミノ酸の主鎖のアミノ基は、非置換のアミノ基（－NH₂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、又は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ができる。

[0071] 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romo（－Br）、ヨード（－I）などが挙げられる。

[0072] 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 ($-\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$)、カルボニルアミノ ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$)、オキシカルボニルアミノ ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{OR}$)、スルホニルアミノ ($-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{R}$)、アミノスルホニル ($-\text{SO}_2-\text{NHR}$)、スルファモイルアミノ ($-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$)、チオカルボキシル ($-\text{C}(=\text{O})-\text{SH}$)、カルボキシルカルボニル ($-\text{C}(=\text{O})-\text{CO}_2\text{H}$) などが挙げられる。

[0073] オキシ ($-\text{OR}$) 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。

[0074] カルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{R}$) の例としては、ホルミル ($-\text{C}=\text{O}-\text{H}$)、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。

[0075] オキシカルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{OR}$) 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。

[0076] 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。

[0077] チオカルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{SR}$) 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。

[0078] 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。

[0079] アミノカルボニル ($-\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$) 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、 $-\text{C}=\text{O}-\text{NHR}$ 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、及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。

[0080] カルボニルアミノ ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$) 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、 $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{R}$ 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、及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。

[0081] オキシカルボニルアミノ ($-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{OR}$) 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、 $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-\text{OR}$ 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、及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。

[0082] スルホニルアミノ ($-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{R}$) 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、 $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{R}$ 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、及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。

[0083] アミノスルホニル ($-\text{SO}_2-\text{NHR}$) 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、 $-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 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、及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。

[0084] スルファモイルアミノ ($-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$) 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、 $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 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、及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。

[0085] S 原子を含む置換基の例としては、チオール ($-\text{SH}$)、チオ ($-\text{S}-\text{R}$)、スルフィニル ($-\text{S}=\text{O}-\text{R}$)、スルホニル ($-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}$)、スルホ ($-\text{SO}_3\text{H}$) などが挙げられる。

[0086] チオ ($-\text{S}-\text{R}$) 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。

[0087] スルフィニル ($-\text{S}=\text{O}-\text{R}$) 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。

- [0088] 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。
- [0089] 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。
- [0090] 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。
- [0091] 3級アミノ ($-NR(R')$) におけるN原子上の2つの置換基R及び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、ヘテロアリール、及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。
- [0092] 置換アミジノ ($-C(=NR)-NR'R''$) におけるN原子上の3つの置換基R、R'、及び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、アリール、ヘテロアリール、及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）（アリール）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。
- [0093] 置換グアニジノ ($-NR-C(=NR''')-NR'R''$) におけるN原子上の4つの置換基R、R'、R''、及び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、アリール、ヘテロアリール、及びア

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。

- [0094] アミノカルボニルアミノ ($-NR-CO-NR'R''$) におけるN原子上の3つの置換基R、R'、及び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、アリール、ヘテロアリール、及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。
- [0095] B原子を含む置換基の例としては、ボリル ($-BR(R')$) やジオキシボリル ($-B(OR)(OR')$) などが挙げられる。B原子上の2つの置換基R及び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、アリール、ヘテロアリール、及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。
- [0096] 本開示におけ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型及び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又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事ができる。
- [0097] 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い。本開示において「翻訳可能な」アミノ酸とは、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を意味する。あるアミノ酸が翻訳可能か否かは、当該アミノ酸を結合させた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）。
- [0098] 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、Pic2 ((2S)-piperidine-2-carboxylic acid)、dA ((2R)-2-aminopropanoic acid)、MeHph

((2S)-2-(methylamino)-4-phenyl-butanoic acid)、SPh2Cl ((2S)-2-amino-3-(2-chlorophenoxy)propanoic acid)、MeG (2-(methylamino)acetic acid)、nBuG (2-(butylamino)acetic acid)などを例示することができる。

[0099] 本開示における非天然アミノ酸は、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。

[0100] <tRNAの調製>

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の塩基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つの典型的な塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、及びウラシル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塩基なども含まれていることがある。天然tRNAにおける修飾塩基（例えばライシジンなど）は、tRNAが転写により合成された後に、その修飾を行うための酵素（例えばTilSなど）の作用によって、当該tRNAに特異的に導入されると考えられている。

[0101] アミノアシルtRNAも化学的及び／又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（ヌクレオシドとしてデオキシシチジン及びアデノシンを含むジヌクレオチド）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（ヌクレオシドとしてシチジン及びアデノシンを含むジヌクレオチド）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）。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触媒である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。

[0102] 一局面において、本開示は、ペプチド翻訳に適した一揃いのtRNAを提供する。一揃いのtRNAには、複数の異なる種類のtRNAが含まれ、それらのtRNAから複数の異なる種類のアミノ酸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を含む翻訳用組成物を提供する。別の局面において、本開示は、前記翻訳用組成物の製造方法を提供する。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を提供することを含む、ペプチドの製造方法を提供する。一局面において、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。以下の記載は、これらのペプチド翻訳に適した一揃いのtRNA、翻訳用組成物、翻訳用組成物の製造方法、コドンの読み間違いを低減する方法、及びペプチドの製造方法に関するものである。

[0103] いくつかの態様において、本開示における一揃いのtRNAは、上述した本開示のtRNA（本開示において「第一のtRNA」と呼ぶことがある。）と、第二のtRNAを含んでよい。前記第二のtRNAとしては任意のtRNAを使用してよいが、前記第一のtRNAとは独立して、上述した本開示のtRNAであってもよい。

[0104] いくつかの態様において、本開示における一揃いのtRNAに含まれる第一のtRNAと第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基は互いに異なっていてよい。前記第一のtRNAと前記第二のtRNAのアンチコドンの2文字目の塩基が同一であり、かつ、前記第一のtRNAと前記第二のtRNAのアンチコドンの3文字目の塩基が同一であってよい。いくつかの態様において、前記第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンと前記第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンは、同一コドンボックス内に存在してよい。いくつかの態様において、本開示の第一のtRNA及び本開示の第二のtRNAを用いることで、一つのコドンボックスから少なくとも2種類のアミノ酸を翻訳することができる。いくつかの態様において、前記第一のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がA又はGであって、かつ、前記第二のtRNAのアンチコドンの1文字目の塩基がC又はUであってよい。いくつかの態様において、前記第一のtRNAと前記第二のtRNAの各アンチコドンの一文字目の塩基としては、以下の組み合わせが例示される：(A, C) ; (C, A) ; (G, C) ; (C, G) ; (A, U) ; (U, A) ; (G, U) ; (U, G)。ここで、(A, C)は、第一のtRNAのアンチコドンの一文字目の塩基がAであり、第二のtRNAのアンチコドンの一文字目の塩基がCであることを表す。

[0105] いくつかの態様において、本開示における一揃いのtRNAに含まれる第一のtRNAと第二のtRNAのそれぞれのtRNAボディは、互いに異なってもよく、同

一であってもよい。いくつかの態様において、第一のtRNAと第二のtRNAの1～31位及び39～74位の塩基配列が同一であるか、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、あるいは98%以上の配列同一性を有していてもよい。

[0106] いくつかの態様において、本開示における一揃いのtRNAに含まれる第一のtRNAと第二のtRNAには、互いに異なるアミノ酸が結合している。本開示において、第一のtRNAに結合しているアミノ酸を第一のアミノ酸と称し、第二のtRNAに結合しているアミノ酸を第二のアミノ酸と称することがある。ある態様において、本開示における第一のアミノ酸及び第二のアミノ酸から選択される少なくとも一つが非天然アミノ酸であってもよい。すなわち、本開示における一揃いのtRNAの少なくとも一つ、又は両方が非天然アミノ酸を結合している。いくつかの態様において、第一のtRNA及び第二のtRNAの一方、又は両方が、非天然アミノ酸が翻訳系外でtRNAに結合されたtRNAであってもよい。

[0107] 限定はされないが、いくつかの態様において、第一のtRNA及び第二のtRNAのいずれか、又は両方が、32U、33U、37G、及び38Uの塩基の組み合わせを有するキメラtRNAボディを有する場合、以下の(L1)～(L4)からなる群より選択される少なくとも一つのアンチコドンの組み合わせを有する前記第一のtRNA及び前記第二のtRNAを含む一揃いのtRNAは、本開示の一揃いのtRNAから除外されてよい：

(L1) GCG及びCCG、並びに、CCG及びGCG；

(L2) AAG及びUAG、AAG及びCAG、並びに、UAG及びCAG；

(L3) アンチコドンの二文字目の塩基がいずれもCであり、三文字目の塩基がいずれもGである；並びに

(L4) アンチコドンの二文字目の塩基がいずれもAであり、三文字目の塩基がいずれもGである。

[0108] 本開示における翻訳用組成物は、本開示のtRNAを含む限り限定されないが

、翻訳に必要な構成成分を含んでよく、本開示における翻訳系と同じ構成成分を含んでよい。本開示における翻訳用組成物は、無細胞翻訳系であってよく、再構成型の無細胞翻訳系であってよい。限定を意図しないが、いくつかの態様において、本開示における翻訳用組成物は、大腸菌由来の因子で再構成された無細胞翻訳系であってよく、リボソーム、翻訳開始因子、翻訳終結因子、翻訳伸長因子、アミノ酸、アミノアシルtRNA合成酵素（aaRS）などを含んでもよい。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物は、大腸菌由来のリボソームを含んでいてよい。いくつかの態様において、本開示のtRNAは大腸菌由来のtRNAであってよい。

[0109] いくつかの態様において、本開示における翻訳用組成物には、本開示における一揃いのtRNAが含まれていてよい。本開示における翻訳用組成物には、本開示における一揃いのtRNAが1セット、2セット、3セット、4セット、5セット、6セット、7セット若しくは8セット含まれていてよく、又は、1セット以上、2セット以上、3セット以上、4セット以上、5セット以上、若しくは6セット以上含まれていてよく、又は、8セット以下、7セット以下、6セット以下、5セット以下、4セット以下、3セット以下、若しくは2セット以下含まれていてよい。さらなる態様において、本開示の翻訳用組成物には上記以外のtRNAが含まれていてもよい。

[0110] いくつかの態様において、本開示における翻訳用組成物に含まれる本開示における一揃いのtRNAは、当該翻訳用組成物にaaRSが含まれる場合には、当該aaRSとオルソゴナルな関係にあるtRNAであってよい。aaRSとオルソゴナルな関係にあるtRNAとは、翻訳用組成物中に存在するaaRSによってはアミノアシル化されないが、リボソームには取り込まれてアミノ酸を翻訳導入することができるtRNAを意味する。このようなtRNAとしては、tRNA Glu2、tRNA Asn E2、tRNA Asp1、tRNA Pro1E2などのtRNA又はこれらに由来するtRNAが例示される。必要に応じて、これらtRNAを認識するaaRSが翻訳用組成物中から除かれる。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物は、一揃いのtRNAのいずれかにアミノ酸を結合することが可能なaaRSを含まなくてよい。

[0111] いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットによれば、コドンの読み間違いを低減し得る。本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットは、コドンの読み間違いにより意図しないアミノ酸が翻訳導入される割合を低減し得る。本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットは、鋳型mRNAに含まれるコドンが、同コドンと相補的ではないアンチコドンを有するtRNAによって翻訳されてしまう割合を低減し得る。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットは、アンチコドンの2文字目と3文字目が、それぞれコドンの2文字目と1文字目に相補的であって、かつワトソン-クリック型の塩基対を形成し得る関係にあり、さらに、前記アンチコドンの1文字目が、前記コドンの3文字目に対して相補的ではないtRNAによる、前記コドンの読み間違いを低減し得る。いくつかの態様においては、この読み間違いの低減によって、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットを用いることで、同一コドンボックス内に2種以上のアミノ酸を割り当てることが可能となる。特定の態様においては、同一コドンボックス内に2種以上の非天然アミノ酸を割り当てることが可能となる。例えば、アンチコドンAGGを有するtRNAによるコドンCCGの読み間違いを低減することによって、コドンCCGにアミノ酸を割り当てたまま、アンチコドンAGGに相補的なコドン（例えばCCU）に別のアミノ酸を割り当てること、すなわち同一コドンボックス（この場合CCMボックス）に異なる2種類のアミノ酸を割り当てることが可能となる。

このように、同一コドンボックスに2種以上のアミノ酸を割り当てた際に生じるコドンの読み間違いに起因する、誤ったアミノ酸の翻訳導入頻度を低減することにより、遺伝暗号表に割り当てアミノ酸の数を増やし、正確なペプチド翻訳を実現することが可能となる。

[0112] いくつかの態様において、本開示によればtRNA自体の特性を変えることができ得るため、翻訳用組成物中に含まれる又は翻訳用キットを構成するアミノアシルtRNA量の調整や翻訳反応を途中で停止するなどの方法と比べて利便性が高い。特定の理論に拘束されることを意図しないが、例えばアミノアシ

ルtRNAが枯渇することによるコドンの読み間違いを防ぐために、翻訳系中のアミノアシルtRNA量を増やすことを試みた場合、逆方向の読み間違いが生じることとも考えられる。本開示における翻訳用組成物および翻訳用キットは、翻訳系中のアミノアシルtRNA量を増やすことなく正確なペプチド翻訳を実現できる点でも有用である。ある態様においては、本開示における翻訳用組成物および翻訳用キットを、前記のアミノアシルtRNA量の調整や翻訳反応を途中で停止するなどの手法と併せて利用することで、より高い、コドンの読み間違い低減効果が得られ得る。一態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットにおいては、同一コドンボックスの異なるコドンに割り当てられた異なるアミノ酸を結合する複数種のtRNAが、互いに読み間違い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、本開示の一態様において、前記複数種のtRNA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。

[0113] いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットは、コドンの読み間違いを低減しつつ、UCM、CUM、CCM、CGM、ACM、GUM、GCM、GGMのような、天然の遺伝暗号表において1種のアミノ酸のみが割り当てられているコドンボックスに、複数種のアミノ酸、特に非天然アミノ酸を含む複数種のアミノ酸を割り当ててを可能にする。アミノ酸の割り当て方は特に制限されないが、例えば、1種類目のアミノ酸を M_1M_2U 若しくは M_1M_2C のコドンに割り当て、2種類目のアミノ酸を M_1M_2A 若しくは M_1M_2G のコドンに割り当ててよく、又は1種類目のアミノ酸を M_1M_2U のコドンに割り当て、2種類目のアミノ酸を M_1M_2G のコドンに割り当ててもよい。

[0114] いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットは、第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを持つ少なくとも一種類のmRN

A、及び／又は、第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含む少なくとも一種類のmRNAを含んでよい。ある態様において、前記二つのコドンは、同一mRNA上に存在しても、異なるmRNA上に存在してもよい。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物は、互いに配列の異なる複数種類のmRNAを含んでいてよく、mRNAライブラリーを含んでいてもよい。

[0115] いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットの製造方法は、第一及び／又は第二のtRNAをin vitro転写で調製する工程を含んでいてもよい。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットの製造方法は、アミノ酸を翻訳系外でtRNAに結合することにより本開示のtRNAを調製することを含んでよい。アミノ酸を翻訳系外でtRNAに結合することにより、第一のtRNA及び第二のtRNAを調製することを含んでもよい。いくつかの態様において、本開示の翻訳用組成物および翻訳用キットの製造方法は、上述した本開示のtRNAの調製方法を含んでもよい。いくつかの態様において、前記アミノ酸は非天然アミノ酸であってもよい。

[0116] いくつかの態様において、本開示のペプチドの製造方法は、本開示の翻訳用組成物または翻訳用キットを用いて鋳型となる核酸を翻訳することを含んでよい。翻訳方法は限定されないが、無細胞翻訳 (in vitro translation)、例えば、再構成無細胞翻訳系を用いた翻訳が挙げられ、より具体的には、大腸菌由来の再構成無細胞翻訳系を用いた翻訳が例示される。

[0117] いくつかの態様において、本開示のペプチドの製造方法は、本開示の翻訳用組成物または翻訳用キットを用いて、第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含むmRNA、及び／又は、第一のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンを含むmRNAを翻訳することを含んでよい。ある態様において、前記二つのコドンは、同一mRNAに含まれていても、異なるmRNAに含まれていてもよい。いくつかの態様において、本開示のペプチドの製造方法は、本開示の翻訳用組成物を用いて、互いに配列の異なる複数種類の核酸を翻訳することを含んでよく、核酸ライブラリーを翻訳することを含んでもよく、mRNAライブラリーを翻訳することを含んでもよい。mRNAには、所望の又はランダムな

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、及び当該mRNAのペプチドへの翻訳を併せて行うことができる。

[0118] いくつかの態様において、前記のアンチコドンに相補的なコドンは、前記アンチコドンの3塩基すべてにおいてワトソン-クリック型塩基対を形成するコドンであってよく、又は、コドンの3文字目が前記アンチコドンの1文字目とwobble塩基対を形成するコドンであってもよい。

[0119] いくつかの態様において、本開示のペプチドの製造方法は、UCM、CUM、CCM、CGM、ACM、GUM、GCM、及びGGMからなる群より選択される少なくとも1つ、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、又は6つ以上のコドンボックスに複数種類のアミノ酸を割り当てることを含んでよい。このような場合であっても、正確なペプチド翻訳が可能となり得る。

[0120] いくつかの態様において、本開示のペプチドの製造方法によれば、同一コドンボックス内に存在し、かつ、3文字目が以下(i)～(iv)からなる群より選択される少なくとも一つの組み合わせであるコドンに異なる種類のアミノ酸を割り当てつつ、コドンの読み間違いを低減し得る：(i)UとG、(ii)CとG、(iii)UとA、及び(iv)CとA。いくつかの態様において、本開示の翻訳方法によれば、UCM₃、CUM₃、CCM₃、CGM₃、ACM₃、GUM₃、GCM₃又はGGM₃のコドンであって、前記M₃が前記(i)～(iv)からなる群より選択される少なくとも一つの組み合わせであるコドンに異なる種類のアミノ酸を割り当てつつ、コドンの読み間違いを低減し得る。

[0121] 本開示において、tRNAによるコドンの読み間違いの低減は、異なるアミノ酸が結合した、異なるアンチコドンを持つ複数のtRNAを用いて、一種類の鋳型mRNAを翻訳することにより、評価してよい。前記複数のtRNAとしては、翻訳対象となる特定のコドンに相補的なアンチコドンを持つtRNA、及び前記コドンと同じコドンボックスに存在するコドンと相補的であって、前記ア

ンチコドンと異なるアンチコドンを有するtRNAを選択してよい。

[0122] 例えば、アンチコドンAGGを有するtRNAによる、コドンCCGの読み間違いを評価するために、アンチコドンAGGを有しアミノ酸AA₁が結合したtRNA、及びアンチコドンCCGを有しアミノ酸AA₂が結合したtRNAを含む翻訳系を用いて、コドンCCGを含む鋳型mRNAを翻訳する。この場合、コドンCCGと相補的なCGGをアンチコドンに有するtRNAによって翻訳導入されるAA₂が目的とする翻訳アミノ酸であり、コドンCCGと相補的でないAGGをアンチコドンに有するtRNAによって翻訳導入されるAA₁が読み間違いによって生じた翻訳アミノ酸である。このような翻訳産物の割合を指標に、読み間違いの低減を評価してよい。

[0123] 前記評価に用いる鋳型mRNAとしては、実施例に記載のMR-1～MR-7から選択し使用してもよいし、評価対象とするコドンに合わせて他のmRNAを使用してもよい。前記鋳型mRNAを翻訳するための翻訳系は、原核生物由来の再構成無細胞タンパク質合成系（例えばPURE system）を使用してよい。また、翻訳条件としては、本開示における「翻訳条件1」を使用してよい。より詳細な翻訳方法、及び評価方法は実施例に記載されている。

[0124] 本開示において、tRNAによるコドンの読み間違いの低減は、目的物（target molecule）に対する読み間違いペプチドの割合（％）によって評価することができる。前記割合は以下の式を用いて算出される。32、33、37および38位の塩基の組み合わせを改変していない対照のtRNAと比べて、前記割合が低い場合に、評価対象のtRNAがコドンの読み間違いの低減効果を有すると判断する。前記割合の低下率は特に限定されないが、本開示のtRNAは、対照と比較して、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、又は50%以上の前記割合の低下を示してもよい。本開示において、正しく読まれた際に得られるペプチドを、正しく読まれたときの翻訳産物や目的物と称することがある。

[数1]

$$\text{目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (\%)} = \frac{\text{読み間違いが起きた際に得られるペプチドの翻訳量 (\mu M)}}{\text{正しく読まれた際に得られるペプチドの翻訳量 (\mu M)}} \times 100$$

[0125] ペプチドの翻訳量は、次の方法によって求めてよい。すなわち、翻訳反応終了後に得られた翻訳産物溶液を希釈し、LC-FLR-MSの装置を用いて分析する。希釈倍率としては10倍が例示される。得られた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する。定量は、標品を用いて検量線を作成し、相対定量により含有量を算出することで行う。前記標品としては、LCT-67もしくはLCT-12を利用してよい。

LCT-67の配列は、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:Ile:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 237)、LCT-12の配列は、BdpF:Thr:Ile:Phe:Pro:Gly:Phe:Ile:Ile:Thr:Thr:Gly:Thr:Gly:Thr:Gly:Thr:Gly:Ala (配列番号: 238) で表される。

[0126] 一局面において、本開示は、本開示における翻訳用組成物を用いて製造されたペプチド、及びペプチドライブラリーを提供する。本開示におけるペプチドには、翻訳後に化学修飾を行うなどして得られたペプチドも含まれ、また、核酸が連結されたペプチド-核酸複合体が含まれる。

[0127] 翻訳後化学修飾の例としては、直鎖ペプチドの環状化が挙げられる。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、薀頭 (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。

[0128] ペプチド-核酸複合体を用いたペプチドライブラリー（ディスプレイライブラリー）から標的分子に結合し得るペプチドを同定する方法が知られている。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ことができる。

[0129] 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及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。

[0130] 一局面において、本開示は、tRNAによるコドンの読み間違いを低減する方法、tRNAによるコドンの読み間違いを低減するための組成物およびキットを提供する。このような組成物およびキットは、本開示におけるtRNAを含んでよい。またこの方法は、tRNAを改変することにより本開示のtRNAを得ることを含んでよい。具体的には、第一のコドンと相補的なアンチコドンをもつtRNAの32、33、37及び38位からなる群より選択される少なくとも1つの塩基を置換することを含む、前記tRNAによる第二のコドンの読み間違いを低減する方法であって、ここで、前記置換後のtRNAが本開示のtRNAであって、前記第一のコドンと前記第二のコドンの一文字目は同じ塩基であり、前記第一のコドンと前記第二のコドンの二文字目は同じ塩基であり、前記第一のコドンと前記第二のコドンの三文字目は互いに異なる塩基であってよい。

[0131] いくつかの態様において、本開示のコドンの読み間違いを低減する方法においては、前記第一のコドンが M_1M_2X であり、第二のコドンが M_1M_2Y であって、

前記 M_1 及び前記 M_2 はそれぞれ独立してA、C、G 又はU であり、前記X 及び前記Y はそれぞれA、C、G 及びU から選択される、互いに異なる塩基であってよい。前記X 及び前記Y の塩基の組み合わせが、以下の(a1)～(a8)からなる群より選択されるいずれかであってよい：(a1) U とG；(a2) G とU；(a3) U とA；(a4) A とU；(a5) C とA；(a6) A とC；(a7) C とG；及び (a8) G とC。本開示において、前記X及び前記Yの塩基の組み合わせが M_{31} と M_{32} であるとは、前記Xが塩基 M_{31} であり、かつ前記Yが塩基 M_{32} であることを意味する。ある態様においては、前記X 及び前記Y の塩基の組み合わせが、前記(a1)～(a3)、(a5)及び(a7)からなる群、又は前記(a1)及び(a2)からなる群から選択されるいずれかであってもよい。いくつかの態様においては、前記 M_1M_2 が、以下の(b1)～(b8)からなる群より選択されるいずれかの塩基配列であってよい：(b1) C C；(b2) CU；(b3) GG；(b4) GU；(b5) GC；(b6)UC；(b7) CG；及び (b8) AC。ある態様においては、前記 M_1M_2 が、前記(b1)～(b3)からなる群より選択されるいずれかの塩基配列であってよい。

[0132] いくつかの態様において、本開示のコドンの読み間違いを低減する方法では、前記第一のコドンと前記tRNAのアンチコドンとが、3塩基すべてにおいてワトソン－クリック型塩基対を形成してよく、又は、前記第一のコドンの3文字目の塩基と前記tRNAのアンチコドンの1文字目の塩基とがwobble塩基対を形成してもよい。

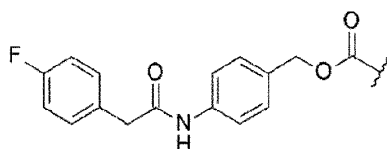
[0133] いくつかの態様において、本開示のコドンの読み間違いを低減する方法は、本開示の第一のtRNAによる、本開示の第二のtRNAのアンチコドンに相補的なコドンの読み間違いを低減する方法であってよい。いくつかの態様において、本開示のコドンの読み間違いを低減する方法は、上述した本開示のtRNAの調製方法を含んでよい。

実施例

[0134] 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。

A A 酢酸アンモニウム

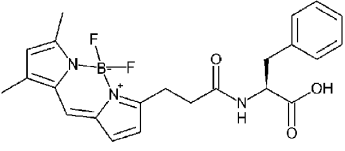
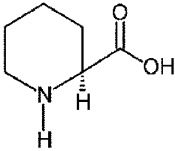
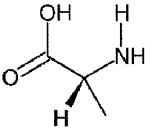
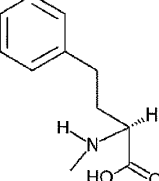
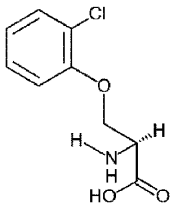
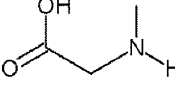
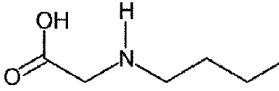
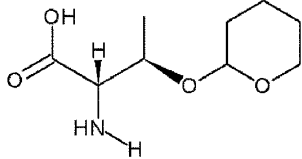
CH ₂ CN	シアノメチル基
DBU	1, 8-ジアザビスクロ [5. 4. 0] -7-ウンデセン
DCM	ジクロロメタン
DIC	N, N-ジイソプロピルカルボジイミド
DIPEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
DMF	ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
FA	ギ酸
Fmoc	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基
F-Pnaz	4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジ ルオキシカルボニル基:



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

[0135] また、本実施例では、以下の略号を用いた。Gly又はG（グリシン）、Ile又はI（イソロイシン）、Leu又はL（ロイシン）、Phe又はF（フェニルアラニン）、Pro又はP（プロリン）、Thr又はT（トレオニン）。これらに加えて、本開示において、表3に記載の略号を用いた。本開示におけるアミノ酸配列では、BdpFL-Pheを「BdpF」と表記することがある。

[0136] [表3]

略称	構造式	略称	構造式
BdpFL -Phe		Pic2	
dA		MeHph	
SPh2Cl		MeG	
nBuG		Thr (THP)	

[0137] また、LCMSの分析条件を、下記の表4に示す。

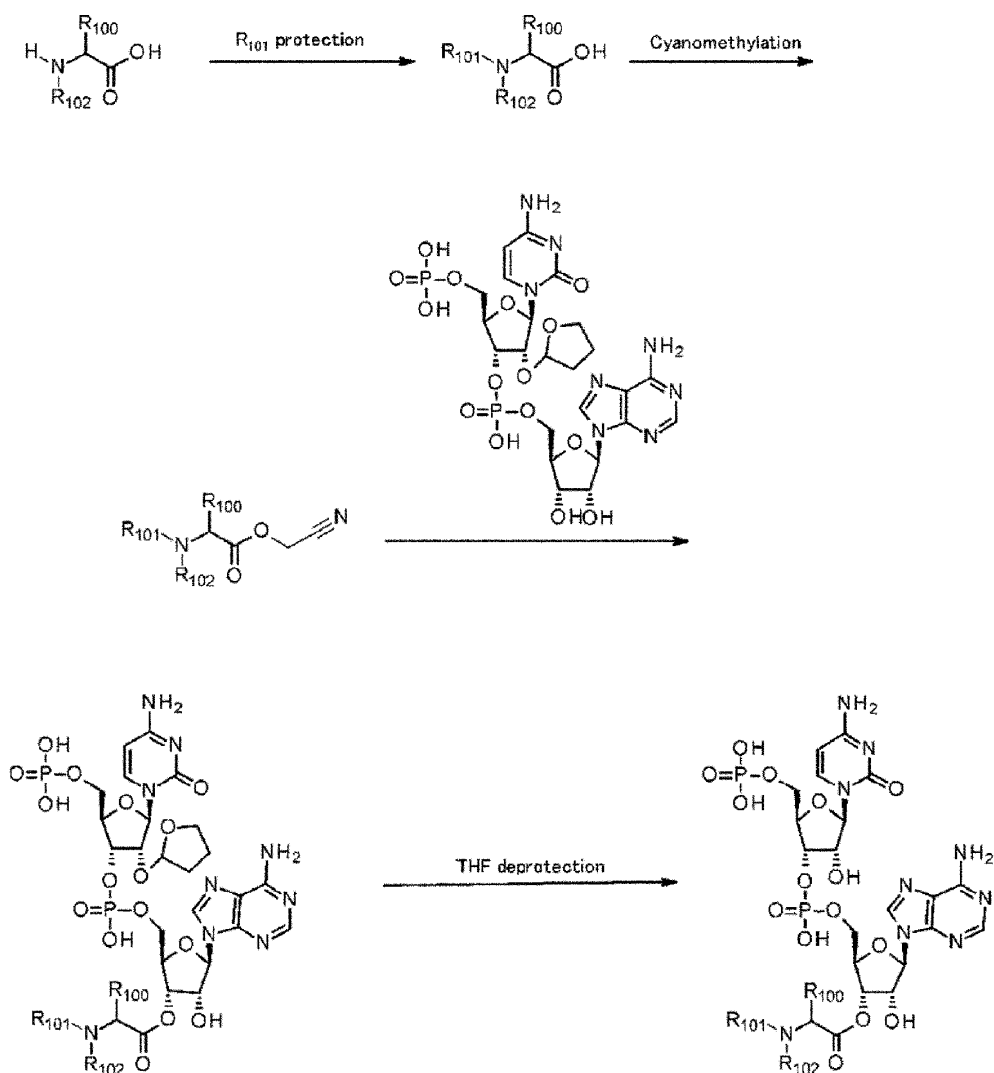
[0138]

[表4]

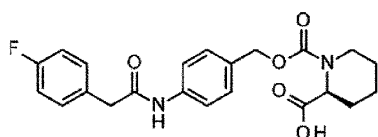
分取条件	装置	カラム (I.D. x 長さ (mm))	移動相	勾配 (A/B)	流速 (ml/分)	カラム温度 (°C)	波長
SOD FA05_01	Acquity UPLC/S00	Aldrich Ascentis Express C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A: 0.1% FA, H2O B: 0.1% FA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (1.0分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.4分 間)	1.0	35	210-400nm PDA total
SOD FA05_02	Acquity UPLC/S002	Aldrich 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-20AD	Shim Pack XR 00S 1.7 μ m (2.1 x 50)	A: 0.1% FA, H2O B: 0.1% FA, CH3CN	90/10 $\Rightarrow$ 0/100 (1.1 分間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.6分 間)	1.2	40	190-400nm PDA total
SMD method 2	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS 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 3	Shimadzu LCMS-2020 LC-20ADXR	CORTECS 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 (0.5分 間)	1.0	40	190-400nm PDA total
SMD method 4	Shimadzu LCMS-2020 LC-30AD	Halo C18 2.0 μ m (2.1 x 30)	A: 0.05% TFA, H2O B: 0.05% TFA, CH3CN	95/5 $\Rightarrow$ 0/100 (0.7分 間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.25分 間)	0.8	40	190-400nm PDA total
SOD AA50/long	Acquity UPLC/S002	Aldrich Ascentis Express C18 5.0 μ m (2.1 x 50)	A: 10mM AcONH4, H2O B: MeOH	50/50 $\Rightarrow$ 0/100 (4.5 分間) $\Rightarrow$ 0/100 (0.5分 間)	0.9	35	210-400nm PDA total
LTQ TEA/HFIP05_01	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A: 15mM TEA, 400mM HFIP, H2O B: 15mM TEA, 400mM HFIP, MeOH	95/5 $\Rightarrow$ 10/90 (9.0分 間) $\Rightarrow$ 10/90 (1.0分 間)	0.2	30	190-400nm PDA total
LTQ TEA/HFIP05_02	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A: 15mM TEA, 400mM HFIP, H2O B: 15mM TEA, 400mM HFIP, MeOH	95/5 $\Rightarrow$ 95/5 (8.0分 間) $\Rightarrow$ 10/90 (2.0分 間)	0.2	30	190-400nm PDA total
LTQ TEA/HFIP05_03	Acquity UPLC/LTQ Orbitrap XL	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m (2.1 x 50)	A: 15mM TEA, 400mM HFIP, H2O B: 15mM TEA, 400mM HFIP, MeOH	95/5 $\Rightarrow$ 70/30 (9.0分 間) $\Rightarrow$ 10/90 (1.0分 間)	0.2	30	190-400nm PDA total

[0139] 実施例 1. アミノアシル pCpA の合成

以下のスキームに従い、アミノアシル pCpA (SS14、SS15、SS16、SS45) を合成した。



[0140] (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-P n a z -P i c 2-OH) の合成



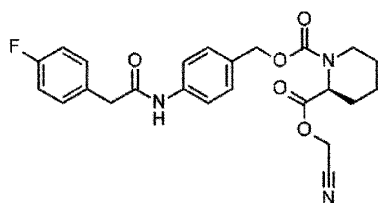
[0141] 窒素雰囲気下、(S)-ピペリジン-2-カルボン酸 (42.6 mg、0.33 mmol)、特許文献 (WO2018143145A1) 記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)ア

セトアミド) ベンジル (化合物 t s 1 1) (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 S S 1 7、F-P n a z-P i c 2-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 S Q D F A 0 5 _ 0 1)

[0142] (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 S S 1 8、F-P n a z-P i c 2-OCH₂CN) の合成

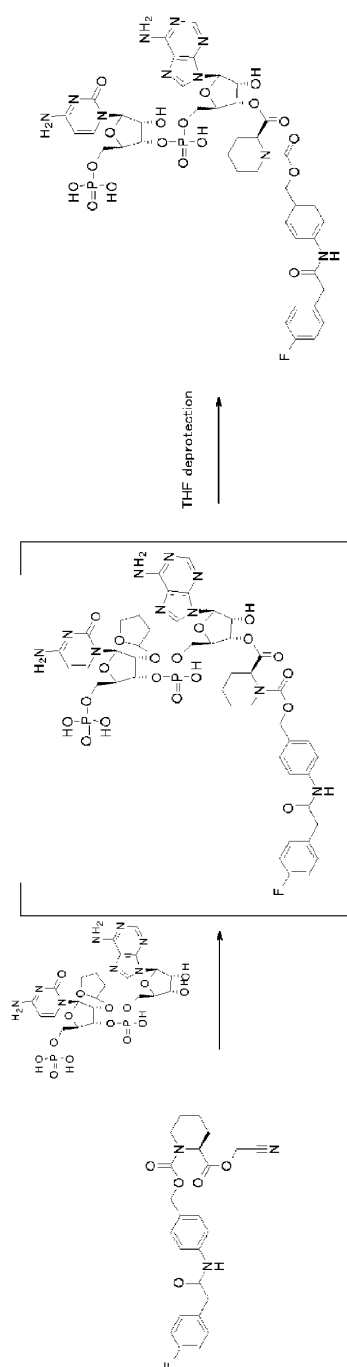


[0143] 窒素雰囲気下、((S)-1-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)ピペリジン-2-カルボン酸 (化合物 S S 1 7、F-P n a z-P i c 2-OH) (30 mg、0.072 mmol) 及び N-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン (DIPEA) (20.23 μ L、0.116 mmol) をアセトニトリル (90 μ L) に溶解し、2-ブromoアセトニトリル (5.34 μ L、0.080 mmol) を0℃において加え、室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮し、粗生成物(S)-ピペリジン-1,2-ジカルボン酸 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 S S 1 8、F-P n a z-P i c 2-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)

[0144] (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



[0145] 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)(113mg、0.156mmol)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- OCH_2CN)(35.4mg、0.078mmol)のアセトニトリル溶液(2.00mL)を投与し、室温で150分撹拌した。反応液を0℃に冷却した後に、トリフルオロ酢酸(2.00mL)を加えた。反応液を0℃で45分撹拌したのちに、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)(6.0mg、7.3%)を得た。

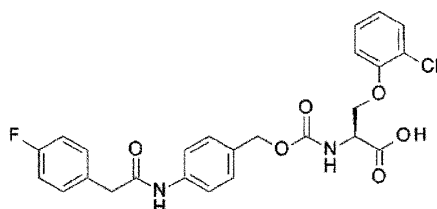
LCMS (ESI) $m/z = 1047.5$ (M-H) -

保持時間: 0.50分(分析条件SQDFA05_01)

[0146] 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、20mmol)とイミダゾール(6.81g、100mmol)の水溶液に酢酸を添加し、pH8、20mM N, N, N-トリメチルヘキサデカン-1-アミニウム、100mMイミダゾールの緩衝液A(1L)を得た。

[0147] 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) の合成

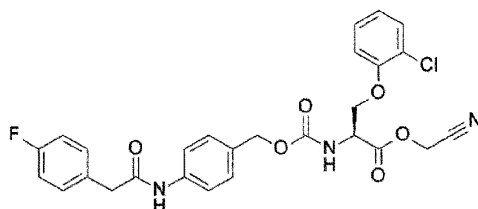


- [0148] 窒素雰囲気下、特許文献（WO 2018225864）記載の方法で合成したO-(2-クロロフェニル)-L-セリン（化合物a a 6 3）（1.25 g、5.80 mmol）、特許文献（WO 2018143145 A1）記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル（化合物t s 1 1）（2 g、4.71 mmol）の混合物に室温にてDMSO（15 mL）、トリエチルアミン（0.95 g、9.42 mmol）を添加した。反応混合物を室温において16時間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液／0.1%ギ酸アセトニトリル溶液）にて精製し、O-(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S S 1 9、F-P n a z-S P h 2 C l-O H）（1.8 g、73%）を得た。

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

保持時間：1.26分（分析条件SMD method1）

- [0149] シアノメチル O-(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S S 2 0、F-P n a z-S P h 2 C l-O C H₂C N）の合成



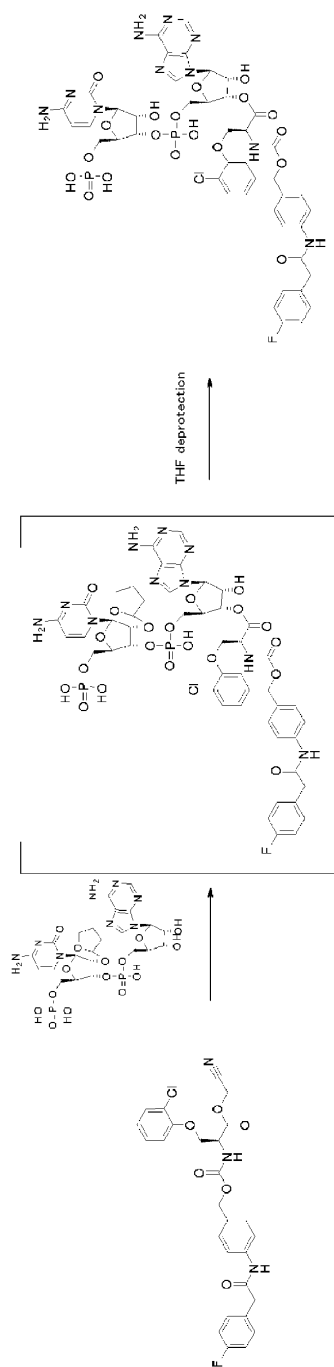
- [0150] 窒素雰囲気下、O-(2-クロロフェニル)-N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-L-セリン（化合物S S 1 9、F-P n a z-S P h 2 C l-O H）（800 mg、1.60 mmol）及びN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン（D I P E A）（0.412 g、3.19 mmol）をDCM（15 mL）に溶解し、2-ブロモアセトニトリル（760 mg、6.34 mmol）を室温において加え、室温で16時間攪拌した。反応液を濃縮し、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

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-P n a z-S P h 2 C l-O C H₂C N）（220mg、26%）を得た。得られた生成物をアセトニトリル（5mL）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 method2）

[0151] (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 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-P n a z-S P h 2 C l-p C p A）の合成



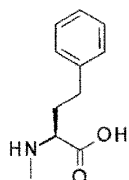
[0152] 緩衝液A (100 mL) に、リン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3 - ((((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ

)(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)(400mg、0.55mmol)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-OCH₂CN)(220mg、0.41mmol)のアセトニトリル溶液(5mL)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(2.3mL)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)(20.7mg、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)

[0153] ((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



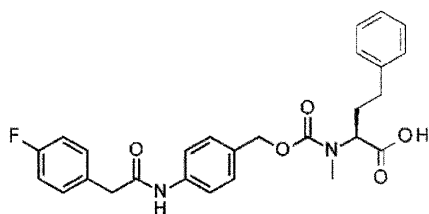
[0154] 特許文献(WO2018225864)記載の方法で合成した(S)-2-(((9H-フルオレン-9-イル)メトキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物aa11)(150mg、0.361mmol)に室温にてDCM(903μL)、水(903μL)及びピペリジン(178μL、1.805mmol)を室温にて添加した。反応混合物を室温において30分間攪拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液)にて精製し、((S)-2-(メチルアミノ)-4-フェニルブタン酸(化合物SS21、MeHph-OH)(55m

g、79%)を得た。

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

保持時間: 0.15分 (分析条件SQDFA05_02)

- [0155] (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

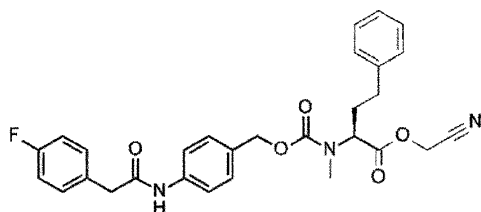


- [0156] 窒素雰囲気下、((S)-2-(メチルアミノ)-4-フェニルブタン酸 (化合物SS21、MeHph-OH) (35.1mg、0.182mmol)、特許文献(WO2018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル (化合物ts11) (85mg、0.20mmol)の混合物に室温にてDMSO (727μL)を添加した。トリエチルアミン (76μL、0.545mmol)を50℃にて添加した。反応混合物を40℃において16時間撹拌したのち、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.1%ギ酸水溶液/0.1%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) (80mg、92%)を得た。

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

保持時間: 0.85分 (分析条件SQDFA05_02)

- [0157] (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

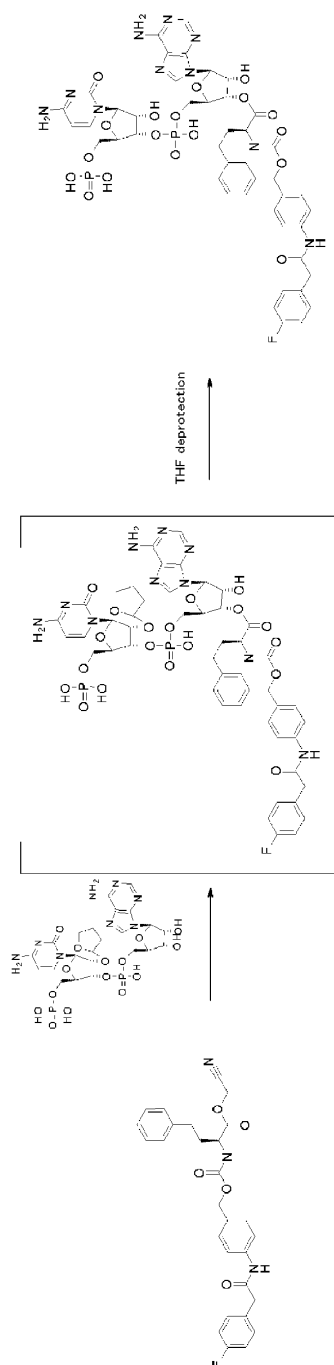


[0158] 窒素雰囲気下、(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)(メチル)アミノ)-4-フェニルブタン酸（化合物SS22、F-Pnaz-MeHph-OH）（77mg、0.16mmol）及びN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン（DIPEA）（31μL、0.176mmol）の混合物にアセトニトリル（533μL）を室温にて加えた。その後、2-ブロモアセトニトリル（86μL、1.280mmol）を室温において加え、反応混合物を40℃において1時間撹拌した。反応液を濃縮し、粗生成物(S)-2-((((4-(2-(4-フルオロフェニル)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-OCH₂CN）を得た。得られた粗生成物をアセトニトリル（5.00mL）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）

[0159] (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



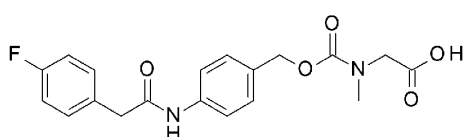
[0160] 緩衝液A (100 mL) に、リン酸二水素 ((2R, 3R, 4R, 5R) - 5 - (4 - アミノ - 2 - オキソピリミジン - 1 (2H) - イル) - 3 - ((((2R, 3S, 4R, 5R) - 5 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 3, 4 - ジヒドロキシテトラヒドロフラン - 2 - イル) メトキシ

)(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p c 0 1)(127mg、0.176mmol)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-P n a z-M e H p h-OCH₂CN)(83mg、0.16mmol)のアセトニトリル溶液(5.00mL)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(5.00mL)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-P n a z-M e H p h-p C p A)(26mg、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)

[0161] 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-メチルグリシン(化合物SS46、F-P n a z-M e G-OH)の合成



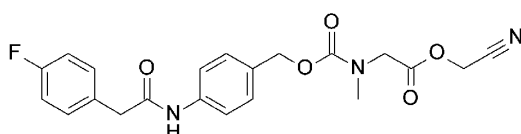
[0162] 窒素雰囲気下、サルコシン(483mg、5.42mmol)、特許文献(WO2018143145A1)記載の方法で合成した炭酸-(4-ニトロフェニル)-4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル(化合物ts11)(2.0g、4.71mmol)の混合物に室温にてDMSO(15mL)、トリエチルアミン(953.4mg、9.42mmol)を添加した。反応混合物を室温において16時間攪拌したのち、逆相シ

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-メチルグリシン（化合物SS46、F-P n a z-M e G-OH）（1.4 g、79%）を得た。

LCMS (ESI) $m/z = 397$ (M+Na) +

保持時間：0.88分（分析条件SMD method 3）

[0163] 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-メチルグリシナート（化合物SS47、F-P n a z-M e G-OCH₂CN）の合成



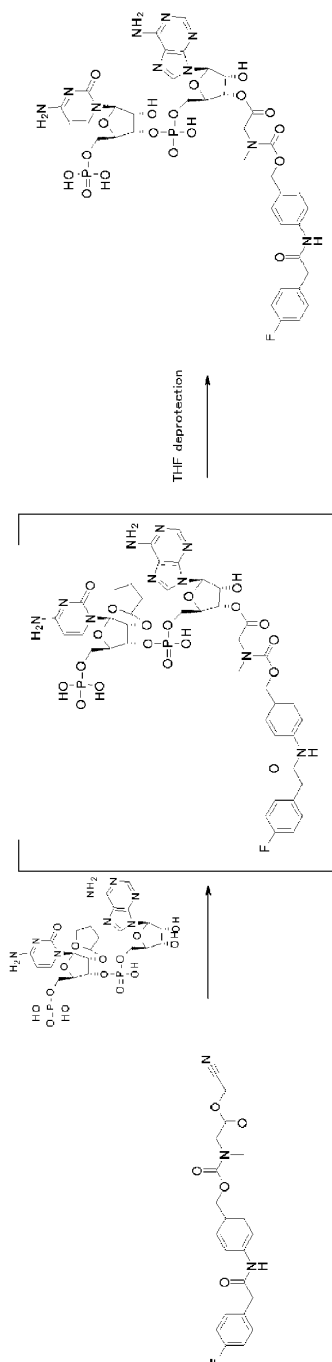
[0164] 窒素雰囲気下、N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチルグリシン（化合物SS46、F-P n a z-M e G-OH）（1.38 g、3.69 mmol）及びN-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン（DIPPA）（0.95 g、7.38 mmol）をDMF（28 mL）に溶解し、2-ブロモアセトニトリル（1.74 g、14.75 mmol）を室温において加え、室温で16時間撹拌した。反応液を濃縮し、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル／石油エーテル）にて精製し、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチルグリシナート（化合物SS47、F-P n a z-M e G-OCH₂CN）（1.2 g、79%）を得た。

LCMS (ESI) $m/z = 436$ (M+Na) +

保持時間：0.70分（分析条件SMD method 4）

[0165] (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-メチルグリシナ
ート (化合物SS45、F-P n a z -M e G -p C p A) の合成



[0166] 緩衝液A (100mL) に、文献 (Helv. Chim. Acta, 90, 297-310) 記載

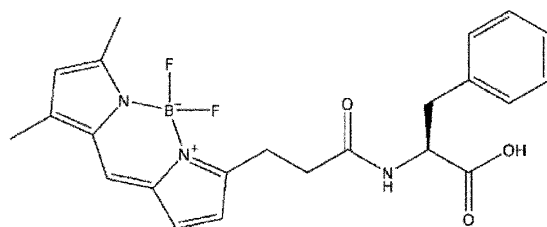
の方法で合成したリン酸二水素（（2R, 3R, 4R, 5R）-5-（4-アミノ-2-オキソピリミジン-1（2H）-イル）-3-（（（（（2R, 3S, 4R, 5R）-5-（6-アミノ-9H-プリン-9-イル）-3, 4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル）メトキシ）（ヒドロキシ）ホスホリル）オキシ）-4-（（テトラヒドロフラン-2-イル）オキシ）テトラヒドロフラン-2-イル）メチル（化合物pc01）（422mg, 0.58mmol）を溶解させ、シアノメチル N-(((4-(2-(4-フルオロフェニル)アセトアミド)ベンジル)オキシ)カルボニル)-N-メチルグリシナート（化合物SS47、F-Pnaz-MeG-OCH₂CN）（120.7mg, 0.29mmol）のアセトニトリル溶液（5mL）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5時間攪拌した。反応液にトリフルオロ酢酸（2.3mL）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SS45、F-Pnaz-MeG-pCpA）（76.7mg, 26%）を得た。

LCMS (ESI) $m/z = 1007.5$ (M-H) -

保持時間：0.48分（分析条件SQDFA05_02）

[0167] 実施例2. BdpFL-Phc-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-Phc-OH）の合成



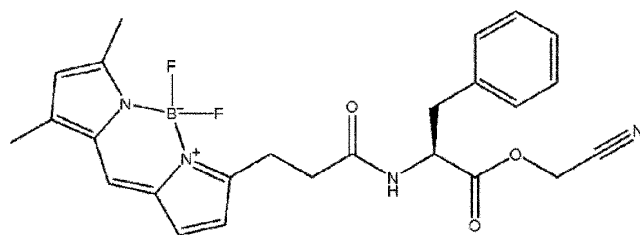
[0168] 窒素雰囲気下、3-（2-カルボキシエチル）-5, 5-ジフルオロ-7

, 9-ジメチル-5H-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 (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) を室温で加えたのち、40℃で終夜撹拌した。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℃で終夜撹拌した。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)

[0169] (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



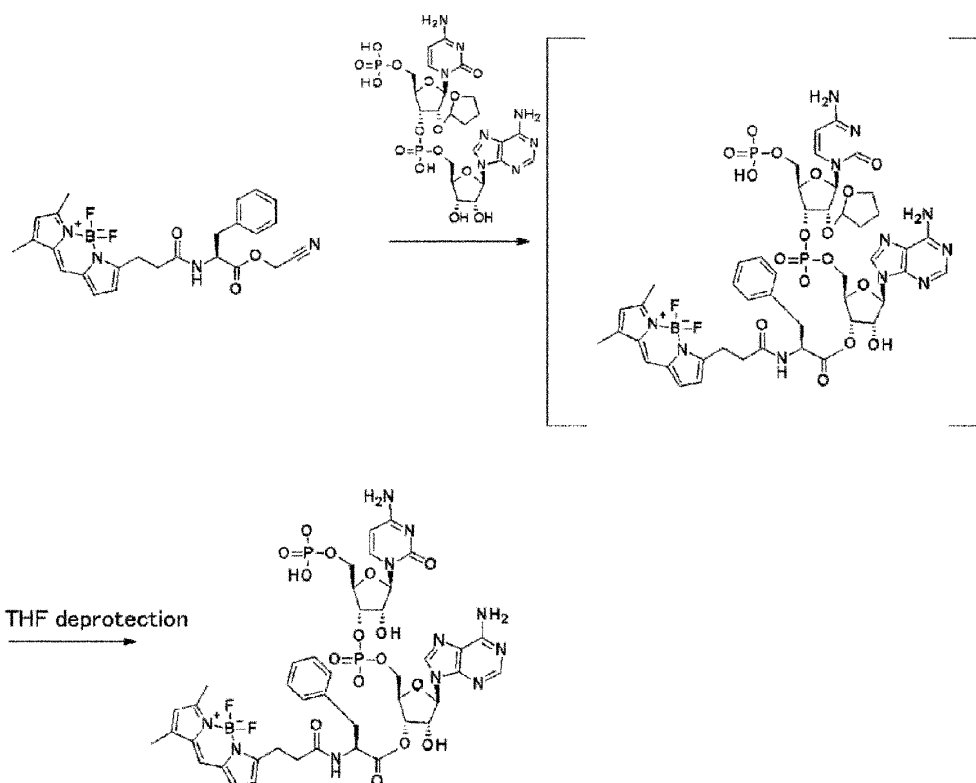
[0170] 窒素雰囲気下、(3-(5, 5-ジフルオロ-7, 9-ジメチル-5H-4λ4, 5λ4-ジピロロ[1, 2-c:2', 1'-f][1, 3, 2]ジアザボリニン-3-イル) プロパノイル)-L-フェニルアラニン (50 mg, 0.114 mmol) 及び N-エチル-イソプロピルプロパン-2-アミン (DIPEA) (31.0 μL, 0.177 mmol) をアセト

ニトリル (500 μ L) に溶解し、2-ブロモアセトニトリル (12 μ L, 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-4 λ 4,5 λ 4-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)

[0171] 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)フォスフォル)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-5 λ 4-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



[0172] 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 pc 01) (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 MT 03、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 分撹拌した。反応液に 0℃ で TFA (0.56 mL) を加え、5 分撹拌したのち、室温にて 10 分撹拌した。反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0

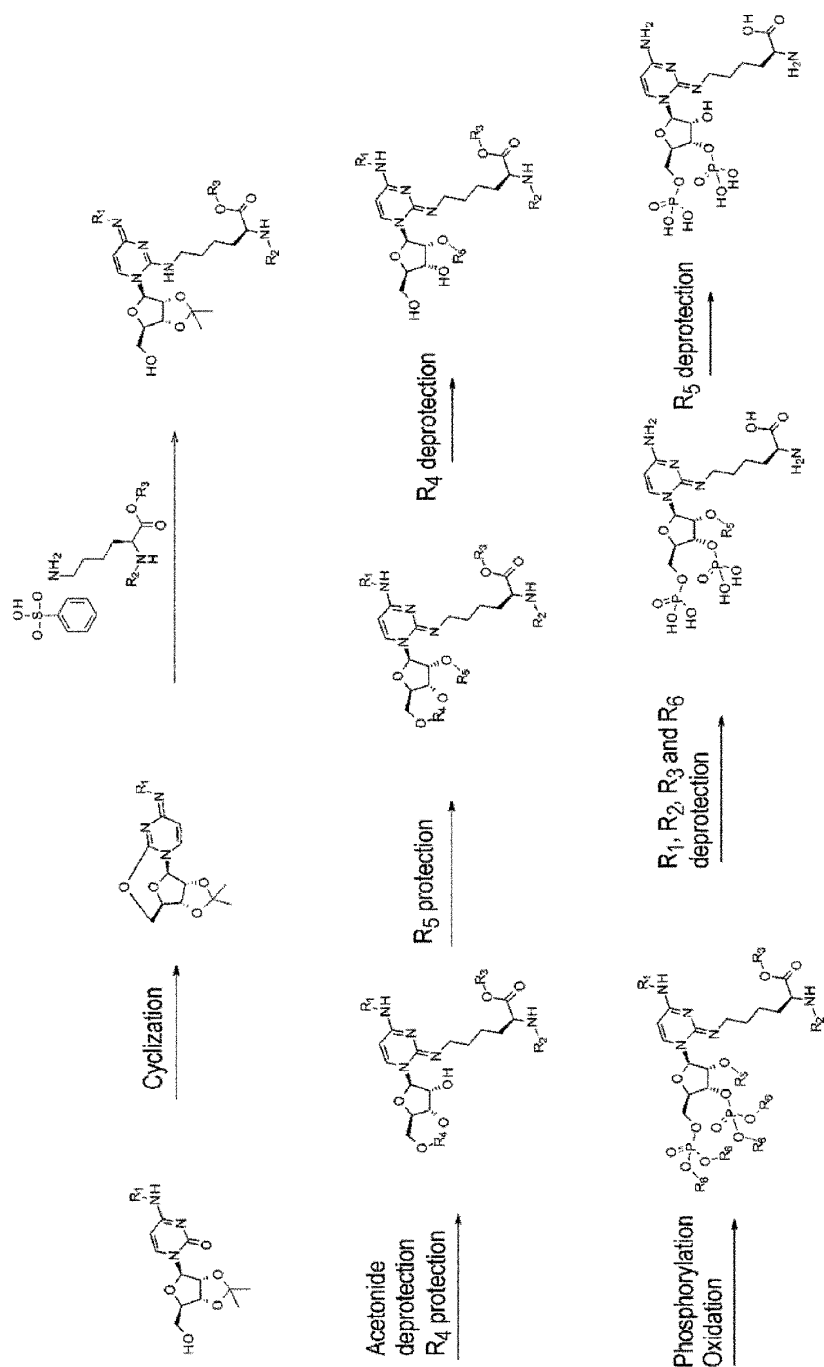
. 05% TFA MeCN/H₂O) にて精製し、表題化合物 (化合物MT 01、BdpFL-Phe-pCpA) (2.1 mg、8.5%収率) を得た。

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

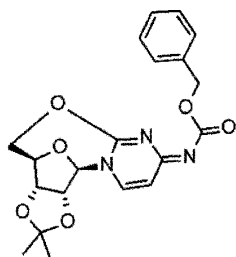
保持時間: 0.56分 (分析条件SQDFA05_02)

[0173] ligation法によりtRNA断片の3'末端にLysidineユニットを導入するためのLysidine-diphosphateの合成

tRNA断片の3'末端にLysidineユニットをligation法により導入するために用いるLysidineのdiphosphateの合成法を改良した。すなわち、以下のスキームに従い、Lysidine-diphosphate (SSO₄、pLp) を合成した。



[0174] ((3aR, 4R, 12R, 12aR)-2, 2-ジメチル-3a, 4, 12, 12a-テトラヒドロ-5H, 8H-4, 12-
 エポキシ[1, 3]ジオキソロ[4, 5-e]ピリミド[2, 1-b][1, 3]オキサゾシン-8-イリ
 デン)カルバミン酸ベンジル (化合物 S 2 4) の合成

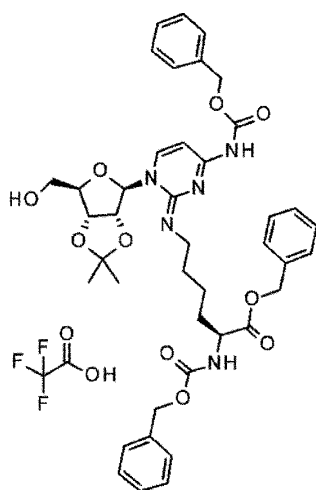


[0175] 窒素雰囲気下、文献 (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 2003, 14(4), 183-194) 既知化合物2', 3'-O-イソプロピリデン-4-N-(ベンジル-オキシカルボニル)-シチジン (718, 2 mg、1.72 mmol) 及びトリフェニルホスフィン (474 mg、1.81 mmol) の混合物に室温にてDCM (17.2 mL) を添加した。混合物を氷浴で冷却後、アゾジカルボン酸ジイソプロピル (385 μ L、1.98 mmol) を加えて室温に昇温後室温で1.5時間攪拌した。反応液を濃縮し、トルエン (20 mL) を加えたのち、生じた沈殿物をろ過により回収した。トルエンを用いて得られた固体を3回洗浄し、((3aR, 4R, 12R, 12aR)-2,2-ジメチル-3a, 4, 12, 12a-テトラヒドロ-5H, 8H-4, 12-エポキシ[1,3]ジオキソロ[4,5-e]ピリミド[2,1-b][1,3]オキサゾシン-8-イリデン)カルバミン酸ベンジル (化合物SS24) (525, 7 mg、76%) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 400.3 (M+H) +

保持時間: 0.48分 (分析条件SQDFA05_02)

[0176] ベンジル (2S)-6-[[1-[(3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-3a, 4, 6, 6a-テトラヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸 (化合物SS25) の合成

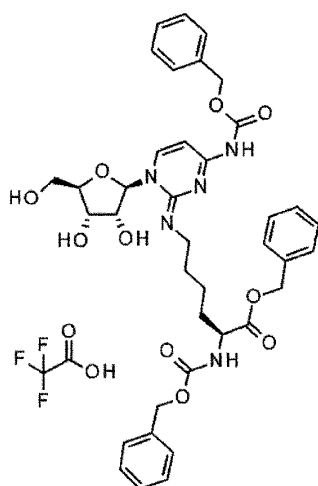


[0177] 窒素雰囲気下、((3aR, 4R, 12R, 12aR)-2,2-ジメチル-3a,4,12,12a-テトラヒドロ-5H,8H-4,12-エポキシ[1,3]ジオキソロ[4,5-e]ピリミド[2,1-b][1,3]オキサゾシン-8-イリデン)カルバミン酸ベンジル（化合物SS24）（300 mg、0.75 mmol）及び塩化リチウム（159 mg、3.76 mmol）の混合物に室温にてTHF（7.5 mL）を添加し氷浴で冷却した。その混合物に、ベンジル（(ベンジルオキシ)カルボニル)-L-リシナート ベンゼンスルホナート（813 mg、2.01 mmol）及びDBU（673 μ L、4.51 mmol）の混合物にTHF（7.5 mL）を加えたものを氷浴下で添加し、反応混合物を0℃で30分間攪拌した。反応液に氷浴下でDMSOを加え、室温に昇温後反応液を濃縮しTHFを留去した。残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.05% TFA水溶液／0.05% TFAアセトニトリル溶液）にて精製し、ベンジル (2S)-6-[[1-[(3aR,4R,6R,6aR)-6-(ヒドロキシメチル)-2,2-ジメチル-3a,4,6,6a-テトラヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸（化合物SS25）（726.6 mg）を定量的に得た。

LCMS (ESI) m/z = 768.6 (M-H) -

保持時間：0.74分（分析条件SQDFA05_02）

- [0178] ベンジル (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-ジヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 S S 2 6) の合成



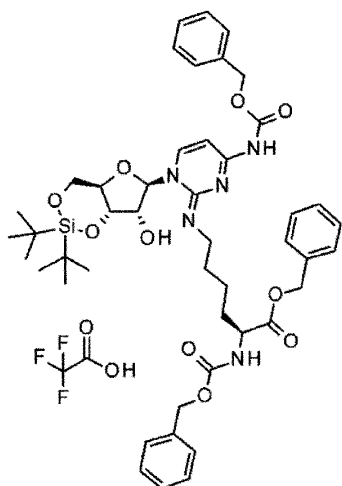
- [0179] ベンジル (2S)-6-[[1-[(3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(ヒドロキシメチル)-2, 2-ジメチル-3a, 4, 6, 6a-テトラヒドロフロ[3, 4-d][1, 3]ジオキサール-4-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 S S 2 5) (281.1 mg, 0.318 mmol) を TFA (4.24 mL) と超純水 (2.12 mL) の混合溶媒に氷浴で冷却しながら溶解し、混合物を室温で50分間攪拌した。トルエン及びアセトニトリルを加え反応液を濃縮した。この操作を数回繰り返して水及びTFAを留去し、粗生成物ベンジル (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-ジヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 S S 2 6) (272.6 mg) を得た。得られた粗生成物ベンジル (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3, 4-ジヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリ

デン]アミノ]ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸(化合物SS26)をそのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI) $m/z = 728.5$ (M-H) -

保持時間: 0.69分(分析条件SQDFA05_02)

[0180] ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aS)-2,2-ジテルト-ブチル-7-ヒドロキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3,2-d][1,3,2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸(化合物SS27)の合成



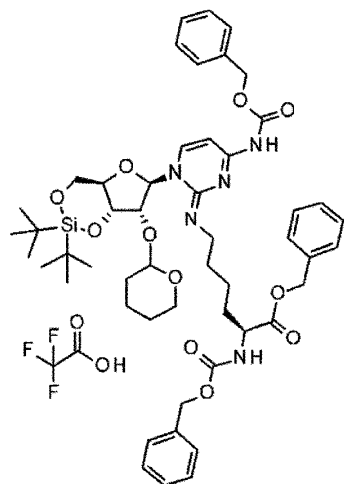
[0181] 窒素雰囲気下、前工程にて得られた粗生成物ベンジル (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3,4-ジヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸(化合物SS26) (258mg、0.306mmol)をDMF (3.06mL)に溶解し、混合物を氷浴で冷却後ビス(トリフルオロメタンスルホン酸)ジ-tert-ブチルシリル (396 μ L、1.22mmol)を加えて氷浴下で2時間攪拌した。反応液に氷浴下で飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、得られた混合物を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.05% TFA水溶液/0.05% TFAアセトニトリル溶液)にて精製し、ベンジ

ル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aS)-2, 2-ジテルト-ブチル-7-ヒドロキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3, 2-d][1, 3, 2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 SS 27) (234.0 mg、78%、2 steps) を得た。

LCMS (ESI) $m/z = 868.8$ (M-H) -

保持時間: 0.88 分 (分析条件 SQDFA05_02)

[0182] ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aR)-2, 2-ジテルト-ブチル-7-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3, 2-d][1, 3, 2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 SS 28) の合成



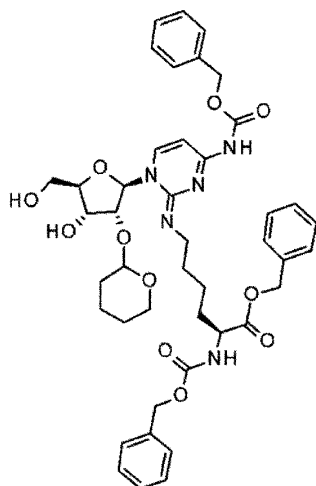
[0183] 窒素雰囲気下、ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aS)-2, 2-ジテルト-ブチル-7-ヒドロキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3, 2-d][1, 3, 2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 SS 27) (30 mg、0.03 mmol) 及び TFA (6.98 μ L、0.09 mmol) を DCM (610 μ L) に室温にて溶解し、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (83 μ L、0.915 mmol) を

加えた。反応混合物を室温で13時間攪拌後、トルエンを加え反応液を濃縮し、粗生成物ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aR)-2,2-ジテルト-ブチル-7-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3,2-d][1,3,2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸(化合物SS28)をTHP保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマー混合物として得た。得られた粗生成物ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6R, 7R, 7aR)-2,2-ジテルト-ブチル-7-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3,2-d][1,3,2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート;2,2,2-トリフルオロ酢酸(化合物SS28)をそのまま次工程に用いた。

LCMS (ESI) $m/z = 952.8$ (M-H) -

保持時間: 3.17分、3.38分(分析条件SQDAA50long)

[0184] (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R,3R,4R,5R)-4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサノ酸ベンジル(化合物SS29)の合成



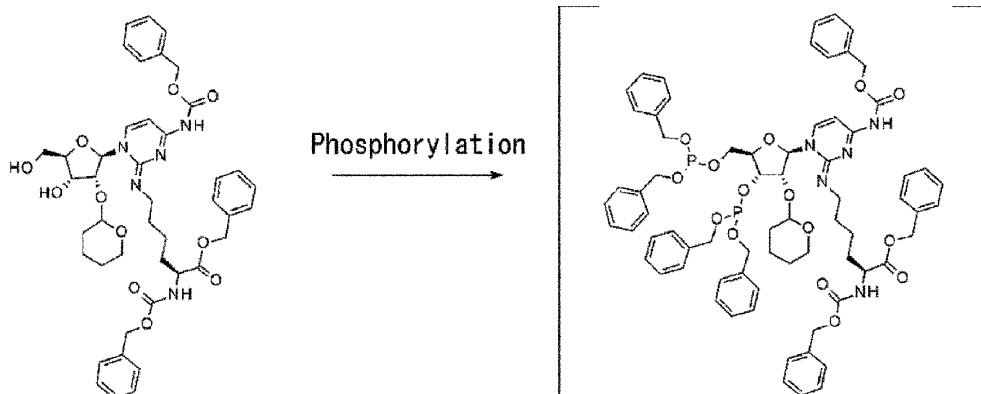
[0185] 窒素雰囲気下、前工程にて得られた粗生成物ベンジル (2S)-6-[[1-[(4aR, 6

R, 7R, 7aR)-2, 2-ジテルト-ブチル-7-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-4a, 6, 7, 7a-テトラヒドロ-4H-フロ[3, 2-d][1, 3, 2]ジオキサシリン-6-イル]-4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ピリミジン-2-イリデン]アミノ]-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)ヘキサノアート; 2, 2, 2-トリフルオロ酢酸 (化合物 SS 28) を THF (610 μ L) に室温にて溶解し、テトラブチルアンモニウムフルオリド (~ 1 mol/L テトラヒドロフラン溶液) (305 μ L、 ~ 0.305 mmol) を室温に加え、反応混合物を室温で30分間攪拌した。反応液に DMSO を加えて濃縮し THF を留去した。残渣を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 mM AA 水溶液 / 10 mM AA アセトニトリル溶液) にて精製し、(2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4R, 5R)-4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸ベンジル (化合物 SS 29) (21.51 mg、87%、2 steps) を THP 保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマー混合物として得た。

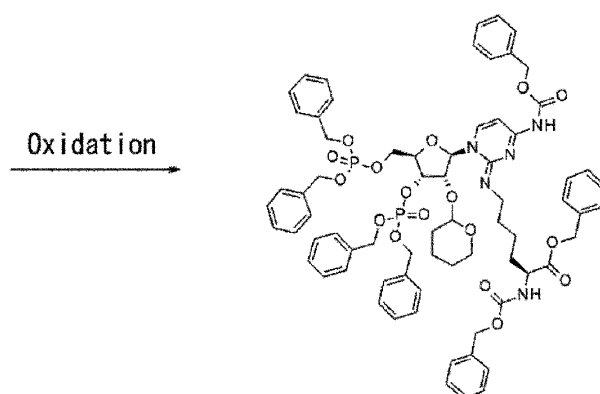
LCMS (ESI) $m/z = 812.7$ (M-H) -

保持時間: 1.74 分 (分析条件 SQDAA50 long)

[0186] (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4R, 5R)-4-ジベンジルオキシホスホリルオキシ-5-(ジベンジルオキシホスホリルオキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸ベンジル (化合物 SS 30) の合成



化合物SS29



化合物SS30

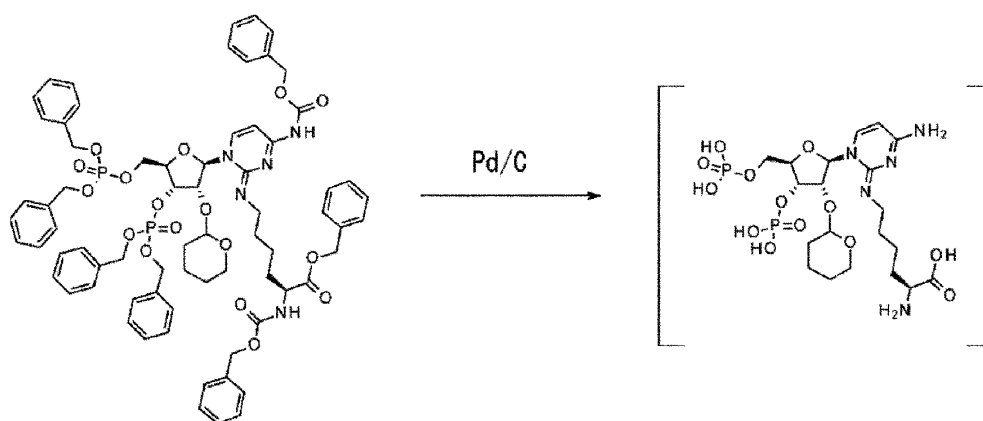
[0187] 窒素雰囲気下、(2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4R, 5R)-4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸ベンジル (化合物SS29) (21.51 mg、0.026 mmol) 及び1H-テトラゾール (22.22 mg、0.317 mmol) をアセトニトリル (1.06 mL) に室温にて溶解し、ジベンジル N,N-ジイソプロピルホスホロアミダイト (53.2 μ l、0.159 mmol) を加えて室温で1時間攪拌した。デス-マーチンペルヨージナン (135 mg、0.317 mmol) を加えて室温で15分間攪拌した後に、反応液を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10 mM

AA水溶液／10 mM AAアセトニトリル溶液)にて精製し、(2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4R, 5R)-4-ジベンジルオキシホスホリルオキシ-5-(ジベンジルオキシホスホリルオキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸ベンジル (化合物SS30) (36.59 mg, 2 steps) をTHP保護上の不斉炭素に由来するジアステレオマー混合物として定量的に得た。

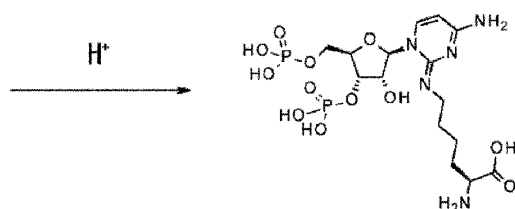
LCMS (ESI) $m/z = 1332.8$ (M-H) -

保持時間: 3.08分、3.11分 (分析条件SQDAA50long)

[0188] (2S)-2-アミノ-6-[[4-アミノ-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3-ヒドロキシ-4-ホスホノオキシ-5-(ホスホノオキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸 (化合物SS04、pLp) の合成



化合物SS30



化合物SS04

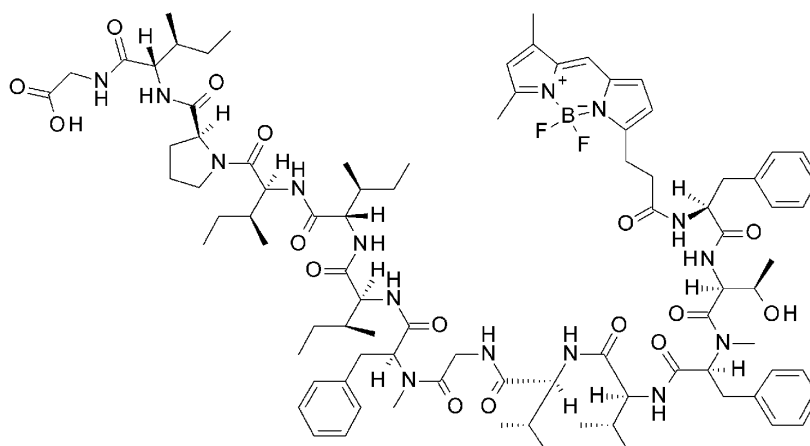
[0189] (2S)-2-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-6-[[4-(ベンジルオキシカルボニルアミノ)-1-[(2R, 3R, 4R, 5R)-4-ジベンジルオキシホスホリルオキシ-5-(ジベンジルオキシホスホリルオキシメチル)-3-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ-テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸ベンジル (化合物SS30) (36.59 mg、0.027 mmol) をメタノール (649 μ L) と超純水 (152 μ L) の混合溶媒に室温にて溶解し、窒素雰囲気下でパラジウム / 炭素 (Pd 10%) (5.84 mg、5.48 μ mol) を加えた。水素雰囲気下、室温で18時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、超純水を用いて数回洗浄した。得られたろ液 (24.66 mL) に1 mol/L塩酸 (2.74 mL、2.74 mmol) を加え、室温にて1時間静置した。反応液をセライトろ過し、超純水を用いて数回洗浄した。ろ液を凍結乾燥したのち得られた粉体を再度超純水 (1.52 mL) を用いて溶解し、遠心分離を行い上澄みを回収することで (2S)-2-アミノ-6-[[4-アミノ-1-[(2R, 3R, 4S, 5R)-3-ヒドロキシ-4-ホスホノオキシ-5-(ホスホノオキシメチル)テトラヒドロフラン-2-イル]ピリミジン-2-イリデン]アミノ]ヘキサン酸 (化合物SS04、pLp) の水溶液 (1.37 mL、17.47 mM、87%、2 steps) を得た。

LCMS (ESI) m/z = 530.1 (M-H) -

保持時間: 1.60分 (分析条件LTQTEA/HFIP05_02)

[0190] 実施例3

実施例3-1. N末端にBdpFLを持つペプチド (LCT-67) の合成



[0191] 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（WO2018225864）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（WO2013100132B2）。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-ボラー-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。得られた残渣を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: 237 に示す。

LCMS (ESI) m/z = 1751.2 (M-H) -

保持時間: 0.97 分 (分析条件 SQDFA05_02)

[0192] 実施例 3-2 N末端に BdpFL を持つペプチド (LCT-12) の合成

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（WO2013100132B2）。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7.5 mMに調製した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（140 μ L）を室温にて加え、40℃で終夜攪拌した後、減圧下濃縮した。得られた残査を0.05 M 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：238に示す。

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

保持時間：0.74分（分析条件SQDFA05_01）

[0194] 実施例4 アミノアシルtRNAの合成

実施例4-1 tRNAの調製

鋳型DNA（TD-1～TD-107）から、T7 RNA polymeraseを用いたin vitro転写反応によりtRNA（TR-1～TR-107）を合成し、RNeasy kit（Qiagen社）により精製した。

[0195] 鋳型DNA 配列番号：1（TD-1）

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0196] 鋳型DNA 配列番号：2 (TD-2)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0197] 鋳型DNA 配列番号：3 (TD-3)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0198] 鋳型DNA 配列番号：4 (TD-4)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0199] 鋳型DNA 配列番号：5 (TD-5)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0200] 鋳型DNA 配列番号：6 (TD-6)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0201] 鋳型DNA 配列番号：7 (TD-7)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaagGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0202] 鋳型DNA 配列番号：8 (TD-8)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaagGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0203] 鋳型DNA 配列番号：9 (TD-9)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaagGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0204] 鋳型DNA 配列番号：10 (TD-10)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaagATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0205] 鋳型DNA 配列番号：11 (TD-11)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcagAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0206] 鋳型DNA 配列番号：12 (TD-12)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0207] 鋳型DNA 配列番号：13 (TD-13)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0208] 鋳型DNA 配列番号：14 (TD-14)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcagACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0209] 鋳型DNA 配列番号：15 (TD-15)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0210] 鋳型DNA 配列番号：16 (TD-16)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0211] 鋳型DNA 配列番号：17 (TD-17)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0212] 鋳型DNA 配列番号：18 (TD-18)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcagGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0213] 鋳型DNA 配列番号：19 (TD-19)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcagGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0214] 鋳型DNA 配列番号：20 (TD-20)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcagATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0215] 鋳型DNA 配列番号：21 (TD-21)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaggAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0216] 鋳型DNA 配列番号：22 (TD-22)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0217] 鋳型DNA 配列番号：23 (TD-23)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0218] 鋳型DNA 配列番号：24 (TD-24)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0219] 鋳型DNA 配列番号：25 (TD-25)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0220] 鋳型DNA 配列番号：26 (TD-26)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0221] 鋳型DNA 配列番号：27 (TD-27)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0222] 鋳型DNA 配列番号：28 (TD-28)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaggGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0223] 鋳型DNA 配列番号：29 (TD-29)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaggGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0224] 鋳型DNA 配列番号：30 (TD-30)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaggATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0225] 鋳型DNA 配列番号：31 (TD-31)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcggAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0226] 鋳型DNA 配列番号：32 (TD-32)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcggACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0227] 鋳型DNA 配列番号：33 (TD-33)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcggAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0228] 鋳型DNA 配列番号：34 (TD-34)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcggACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0229] 鋳型DNA 配列番号：35 (TD-35)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcggGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0230] 鋳型DNA 配列番号：36 (TD-36)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcggATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0231] 鋳型DNA 配列番号：37 (TD-37)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcggGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0232] 鋳型DNA 配列番号：38 (TD-38)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcggGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0233] 鋳型DNA 配列番号：39 (TD-39)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcggGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0234] 鋳型DNA 配列番号：40 (TD-40)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcggATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0235] 鋳型DNA 配列番号：41 (TD-41)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTaccAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0236] 鋳型DNA 配列番号：42 (TD-42)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0237] 鋳型DNA 配列番号：43 (TD-43)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0238] 鋳型DNA 配列番号：44 (TD-44)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0239] 鋳型DNA 配列番号：45 (TD-45)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0240] 鋳型DNA 配列番号：46 (TD-46)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0241] 鋳型DNA 配列番号：47 (TD-47)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0242] 鋳型DNA 配列番号：48 (TD-48)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTaccGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0243] 鋳型DNA 配列番号：49 (TD-49)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaccGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0244] 鋳型DNA 配列番号：50 (TD-50)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATaccATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0245] 鋳型DNA 配列番号：51 (TD-51)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcccAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0246] 鋳型DNA 配列番号：52 (TD-52)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcccACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0247] 鋳型DNA 配列番号：53 (TD-53)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcccAAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0248] 鋳型DNA 配列番号：54 (TD-54)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcccACGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0249] 鋳型DNA 配列番号：55 (TD-55)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCCTcccGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0250] 鋳型DNA 配列番号：56 (TD-56)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcccATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0251] 鋳型DNA 配列番号：57 (TD-57)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcccGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0252] 鋳型DNA 配列番号：58 (TD-58)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCTTcccGAGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0253] 鋳型DNA 配列番号：59 (TD-59)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcccGTGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0254] 鋳型DNA 配列番号：60 (TD-60)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCAGGACACCGCCATcccATGGCGGTAAC

AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0255] 鋳型DNA 配列番号：61 (TD-61)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagAAGCAGGGGGT

CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTCCGC

[0256] 鋳型DNA 配列番号：62 (TD-62)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagACGCAGGGGGT

CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTCCGC

[0257] 鋳型DNA 配列番号：63 (TD-63)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagAAGCAGGGGGT

CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTCCGC

[0258] 鋳型DNA 配列番号：64 (TD-64)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0259] 鋳型DNA 配列番号：65 (TD-65)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTaagGAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0260] 鋳型DNA 配列番号：66 (TD-66)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0261] 鋳型DNA 配列番号：67 (TD-67)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagGTGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0262] 鋳型DNA 配列番号：68 (TD-68)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTaagGAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0263] 鋳型DNA 配列番号：69 (TD-69)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATaagGTGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0264] 鋳型DNA 配列番号：70 (TD-70)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATaagATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0265] 鋳型DNA 配列番号：71 (TD-71)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagAAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0266] 鋳型DNA 配列番号：72 (TD-72)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0267] 鋳型DNA 配列番号：73 (TD-73)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagAAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0268] 鋳型DNA 配列番号：74 (TD-74)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagACGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0269] 鋳型DNA 配列番号：75 (TD-75)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagGAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0270] 鋳型DNA 配列番号：76 (TD-76)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0271] 鋳型DNA 配列番号：77 (TD-77)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCCTcagGTGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0272] 鋳型DNA 配列番号：78 (TD-78)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTcagGAGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0273] 鋳型DNA 配列番号：79 (TD-79)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATcagGTGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0274] 鋳型DNA 配列番号：80 (TD-80)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCATcagATGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0275] 鋳型DNA 配列番号：81 (TD-81)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagAATCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0276] 鋳型DNA 配列番号：82 (TD-82)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0277] 鋳型DNA 配列番号：83 (TD-83)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagAATCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0278] 鋳型DNA 配列番号：84 (TD-84)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0279] 鋳型DNA 配列番号：85 (TD-85)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTaagGATCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0280] 鋳型DNA 配列番号：86 (TD-86)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagATTCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0281] 鋳型DNA 配列番号：87 (TD-87)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagGTTCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0282] 鋳型DNA 配列番号：88 (TD-88)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTaagGATCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0283] 鋳型DNA 配列番号：89 (TD-89)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATaagGTTCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0284] 鋳型DNA 配列番号：90 (TD-90)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATaagATTCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0285] 鋳型DNA 配列番号：91 (TD-91)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagAATCCGTATGTC

ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0286] 鋳型DNA 配列番号：92 (TD-92)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0287] 鋳型DNA 配列番号：93 (TD-93)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagAATCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0288] 鋳型DNA 配列番号：94 (TD-94)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagACTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0289] 鋳型DNA 配列番号：95 (TD-95)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTcagGATCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0290] 鋳型DNA 配列番号：96 (TD-96)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0291] 鋳型DNA 配列番号：97 (TD-97)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagGTTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0292] 鋳型DNA 配列番号：98 (TD-98)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTcagGATCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0293] 鋳型DNA 配列番号：99 (TD-99)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATcagGTTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0294] 鋳型DNA 配列番号：100 (TD-100)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGAATcagATTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0295] 鋳型DNA 配列番号：101 (TD-101)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTgccACGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0296] 鋳型DNA 配列番号：102 (TD-102)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTgccGTGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0297] 鋳型DNA 配列番号：103 (TD-103)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTgccGAGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0298] 鋳型DNA 配列番号：104 (TD-104)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGTCCCCTTCGTCTAGAGGCCCAGGACACCGCCCTtccACGGCGGTAAC
AGGGGTTTGAATCCCCTAGGGGACGC

[0299] 鋳型DNA 配列番号：105 (TD-105)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCGGGGTGGAGCAGCCTGGTAGCTCGTCGGGCTcatAACCCGAAGAT
CGTCGGTTCAAATCCGGCCCCCGCAAC

[0300] 鋳型DNA 配列番号：106 (TD-106)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGAGCGGTAGTTCAGTCGGTTAGAATACCTGCTTtagGTGCAGGGGGT
CGCGGGTTCGAGTCCCGTCCGTTCCGC

[0301] 鋳型DNA 配列番号：107 (TD-107)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGATTtagGTTCCGTATGTC
ACTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGCCGC

[0302] tRNA 配列番号：108 (TR-1)

tRNA(Glu2+Ser5)aag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0303] tRNA 配列番号：109 (TR-2)

tRNA(Glu2+Ala1B)aag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0304] tRNA 配列番号：110 (TR-3)

tRNA(Glu2+Phe)aag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0305] tRNA 配列番号：111 (TR-4)

tRNA(Glu2)aag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0306] tRNA 配列番号：112 (TR-5)

tRNA(Glu2+Arg3)aag-CA RNA配列：

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCCAGGACACCGCCCUaagGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0307] tRNA 配列番号：113 (TR-6)

tRNA(Glu2+Val2)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaagAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0308] tRNA 配列番号 : 114 (TR-7)

tRNA(Glu2+Leu2)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaagGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0309] tRNA 配列番号 : 115 (TR-8)

tRNA(Glu2+Pro3)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaagGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0310] tRNA 配列番号 : 116 (TR-9)

tRNA(Glu2+Pro2)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaagGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0311] tRNA 配列番号 : 117 (TR-10)

tRNA(Glu2+Ala2)aag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaagAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0312] tRNA 配列番号 : 118 (TR-11)

tRNA(Glu2+Ser5)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0313] tRNA 配列番号 : 119 (TR-12)

tRNA(Glu2+Ala1B)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0314] tRNA 配列番号 : 120 (TR-13)

tRNA(Glu2+Phe)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0315] tRNA 配列番号 : 121 (TR-14)

tRNA(Glu2)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0316] tRNA 配列番号 : 122 (TR-15)

tRNA(Glu2+Arg3)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0317] tRNA 配列番号 : 123 (TR-16)

tRNA(Glu2+Val2)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0318] tRNA 配列番号 : 124 (TR-17)

tRNA(Glu2+Leu2)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0319] tRNA 配列番号 : 125 (TR-18)

tRNA(Glu2+Pro3)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcagGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0320] tRNA 配列番号 : 126 (TR-19)

tRNA(Glu2+Pro2)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCAUcagGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0321] tRNA 配列番号 : 127 (TR-20)

tRNA(Glu2+Ala2)cag-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUcagAUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0322] tRNA 配列番号 : 128 (TR-21)

tRNA(Glu2+Ser5)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0323] tRNA 配列番号 : 129 (TR-22)

tRNA(Glu2+Ala1B)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggACGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0324] tRNA 配列番号 : 130 (TR-23)

tRNA(Glu2+Phe)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0325] tRNA 配列番号 : 131 (TR-24)

tRNA(Glu2)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggACGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0326] tRNA 配列番号 : 132 (TR-25)

tRNA(Glu2+Arg3)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0327] tRNA 配列番号 : 133 (TR-26)

tRNA(Glu2+Val2)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaggAUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0328] tRNA 配列番号 : 134 (TR-27)

tRNA(Glu2+Leu2)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUaggGUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0329] tRNA 配列番号 : 135 (TR-28)

tRNA(Glu2+Pro3)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUaggGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0330] tRNA 配列番号 : 136 (TR-29)

tRNA(Glu2+Pro2)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaggGUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0331] tRNA 配列番号 : 137 (TR-30)

tRNA(Glu2+Ala2)agg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaggAUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0332] tRNA 配列番号 : 138 (TR-31)

tRNA(Glu2+Ser5)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0333] tRNA 配列番号 : 139 (TR-32)

tRNA(Glu2+Ala1B)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggACGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0334] tRNA 配列番号 : 140 (TR-33)

tRNA(Glu2+Phe)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggAAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0335] tRNA 配列番号 : 141 (TR-34)

tRNA(Glu2)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggACGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0336] tRNA 配列番号 : 142 (TR-35)

tRNA(Glu2+Arg3)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0337] tRNA 配列番号 : 143 (TR-36)

tRNA(Glu2+Val2)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggAUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0338] tRNA 配列番号 : 144 (TR-37)

tRNA(Glu2+Leu2)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggGUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0339] tRNA 配列番号 : 145 (TR-38)

tRNA(Glu2+Pro3)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcggGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0340] tRNA 配列番号 : 146 (TR-39)

tRNA(Glu2+Pro2)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUcggGUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0341] tRNA 配列番号 : 147 (TR-40)

tRNA(Glu2+Ala2)cgg-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUcggAUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0342] tRNA 配列番号 : 148 (TR-41)

tRNA(Glu2+Ser5)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0343] tRNA 配列番号 : 149 (TR-42)

tRNA(Glu2+Ala1B)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0344] tRNA 配列番号 : 150 (TR-43)

tRNA(Glu2+Phe)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0345] tRNA 配列番号 : 151 (TR-44)

tRNA(Glu2)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0346] tRNA 配列番号 : 152 (TR-45)

tRNA(Glu2+Arg3)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0347] tRNA 配列番号 : 153 (TR-46)

tRNA(Glu2+Val2)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0348] tRNA 配列番号 : 154 (TR-47)

tRNA(Glu2+Leu2)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUaccGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCUAGGG
GACGC

[0349] tRNA 配列番号 : 155 (TR-48)

tRNA(Glu2+Pro3)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUUaccGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0350] tRNA 配列番号 : 156 (TR-49)

tRNA(Glu2+Pro2)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaccGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0351] tRNA 配列番号 : 157 (TR-50)

tRNA(Glu2+Ala2)acc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUaccAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0352] tRNA 配列番号 : 158 (TR-51)

tRNA(Glu2+Ser5)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0353] tRNA 配列番号 : 159 (TR-52)

tRNA(Glu2+Ala1B)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0354] tRNA 配列番号 : 160 (TR-53)

tRNA(Glu2+Phe)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccAAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0355] tRNA 配列番号 : 161 (TR-54)

tRNA(Glu2)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccACGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0356] tRNA 配列番号 : 162 (TR-55)

tRNA(Glu2+Arg3)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0357] tRNA 配列番号 : 163 (TR-56)

tRNA(Glu2+Val2)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0358] tRNA 配列番号 : 164 (TR-57)

tRNA(Glu2+Leu2)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0359] tRNA 配列番号 : 165 (TR-58)

tRNA(Glu2+Pro3)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUcccGAGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0360] tRNA 配列番号 : 166 (TR-59)

tRNA(Glu2+Pro2)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUcccGUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0361] tRNA 配列番号 : 167 (TR-60)

tRNA(Glu2+Ala2)ccc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCAUcccAUGGCGGUACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0362] tRNA 配列番号 : 168 (TR-61)

tRNA(Asp1+Ser5)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCGCCUaagAAGCAGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0363] tRNA 配列番号 : 169 (TR-62)

tRNA(Asp1+Ala1B)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUUaagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0364] tRNA 配列番号 : 170 (TR-63)

tRNA(Asp1+Phe)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUUaagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0365] tRNA 配列番号 : 171 (TR-64)

tRNA(Asp1)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUaagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0366] tRNA 配列番号 : 172 (TR-65)

tRNA(Asp1+Arg3)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUaagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0367] tRNA 配列番号 : 173 (TR-66)

tRNA(Asp1+Val2)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUUaagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0368] tRNA 配列番号 : 174 (TR-67)

tRNA(Asp1+Leu2)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUUaagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0369] tRNA 配列番号 : 175 (TR-68)

tRNA(Asp1+Pro3)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUUaagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UUCCGC

[0370] tRNA 配列番号 : 176 (TR-69)

tRNA(Asp1+Pro2)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCAUaagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0371] tRNA 配列番号 : 177 (TR-70)

tRNA(Asp1+Ala2)aag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCAUaagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0372] tRNA 配列番号 : 178 (TR-71)

tRNA(Asp1+Ser5)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUcagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0373] tRNA 配列番号 : 179 (TR-72)

tRNA(Asp1+Ala1B)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUcagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0374] tRNA 配列番号 : 180 (TR-73)

tRNA(Asp1+Ph2)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUcagAAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0375] tRNA 配列番号 : 181 (TR-74)

tRNA(Asp1)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUcagACGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0376] tRNA 配列番号 : 182 (TR-75)

tRNA(Asp1+Arg3)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCCUcagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0377] tRNA 配列番号 : 183 (TR-76)

tRNA(Asp1+Val2)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUcagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0378] tRNA 配列番号 : 184 (TR-77)

tRNA(Asp1+Leu2)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUcagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0379] tRNA 配列番号 : 185 (TR-78)

tRNA(Asp1+Pro3)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUUCUcagGAGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0380] tRNA 配列番号 : 186 (TR-79)

tRNA(Asp1+Pro2)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCAUcagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0381] tRNA 配列番号 : 187 (TR-80)

tRNA(Asp1+Ala2)cag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCUCAUcagAUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0382] tRNA 配列番号 : 188 (TR-81)

tRNA(AsnE2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0383] tRNA 配列番号 : 189 (TR-82)

tRNA(AsnE2+Ala1B)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0384] tRNA 配列番号 : 190 (TR-83)

tRNA(AsnE2+Phe)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0385] tRNA 配列番号 : 191 (TR-84)

tRNA(AsnE2+Glu2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0386] tRNA 配列番号 : 192 (TR-85)

tRNA(AsnE2+Arg3)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACUaagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0387] tRNA 配列番号 : 193 (TR-86)

tRNA(AsnE2+Val2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0388] tRNA 配列番号 : 194 (TR-87)

tRNA(AsnE2+Leu2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0389] tRNA 配列番号 : 195 (TR-88)

tRNA(AsnE2+Pro3)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0390] tRNA 配列番号 : 196 (TR-89)

tRNA(AsnE2+Pro2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUaagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0391] tRNA 配列番号 : 197 (TR-90)

tRNA(AsnE2+Ala2)aag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUaagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0392] tRNA 配列番号 : 198 (TR-91)

tRNA(AsnE2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACucagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0393] tRNA 配列番号 : 199 (TR-92)

tRNA(AsnE2+Ala1B)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUucagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0394] tRNA 配列番号 : 200 (TR-93)

tRNA(AsnE2+Phe)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUucagAAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0395] tRNA 配列番号 : 201 (TR-94)

tRNA(AsnE2+Glu2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACucagACUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0396] tRNA 配列番号 : 202 (TR-95)

tRNA(AsnE2+Arg3)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGACucagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0397] tRNA 配列番号 : 203 (TR-96)

tRNA(AsnE2+Val2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUucagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAG
GCCGC

[0398] tRNA 配列番号 : 204 (TR-97)

tRNA(AsnE2+Leu2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0399] tRNA 配列番号 : 205 (TR-98)

tRNA(AsnE2+Pro3)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCagGAUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0400] tRNA 配列番号 : 206 (TR-99)

tRNA(AsnE2+Pro2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0401] tRNA 配列番号 : 207 (TR-100)

tRNA(AsnE2+Ala2)cag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUCagAUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0402] tRNA 配列番号 : 208 (TR-101)

tRNA(Glu2)gcc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUgcccAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0403] tRNA 配列番号 : 209 (TR-102)

tRNA(Glu2+Leu2)gcc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUgcccGUGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0404] tRNA 配列番号 : 210 (TR-103)

tRNA(Glu2+Pro3)gcc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCUgcccGAGGCGGUAAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0405] tRNA 配列番号 : 211 (TR-104)

tRNA(Glu2)ucc-CA RNA配列 :

GUCCCCUUCGUCUAGAGGCCAGGACACCGCCCUuccACGGCGGUAACAGGGGUUCGAAUCCCCUAGGG
GACGC

[0406] tRNA 配列番号 : 212 (TR-105)

tRNA(fMet)cau-CA RNA配列 :

GGCGGGGUGGAGCAGCCUGGUAGCUCGUCGGGCUcauAACCCGAAGAUCGUCGGUUCAAAUCCGGCCCC
CGCAAC

[0407] tRNA 配列番号 : 213 (TR-106)

tRNA(Asp1+Leu2)_uag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCUUuagGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCCUCCG
UUCCGC

[0408] tRNA 配列番号 : 214 (TR-107)

tRNA(AsnE2+Leu2)_uag-CA RNA配列 :

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUUuagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0409] 実施例4-2 ライゲーション反応によるtRNA-CAの作製

tRNA5' 断片、pLp、及びtRNA3' 断片を以下に記載の手順により、ライゲーション反応を用いて連結することで各種tRNA-CAを作製した。tRNA5' 断片及びtRNA3' 断片は化学合成品(株式会社ジーンデザイン)を用いた。各tRNA断片及び全長の配列を以下に示す。なお、TR-108の作製のためにはFR-1及びFR-2を、TR-109の作製のためにはFR-3及びFR-4を、それぞれtRNA5' 断片及びtRNA3' 断片として用いた。

[0410] 配列番号 : 217 (FR-1)

tRNA(Asp1)5' RNA配列

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUGAAUACCUGCUU

[0411] 配列番号 : 218 (FR-2)

tRNA(Asp1)3' ag RNA配列

AGGUGCAGGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCGUUCCGC

tRNA 配列番号 : 215 (TR-108)

tRNA(Asp1+Leu2)Lag-CA RNA配列 :

GGAGCGGUAGUUCAGUCGGUUAGAAUACCGCUULagGUGCAGGGGUCGCGGGUUCGAGUCCCGUCCG
UCCGC

[0412] 配列番号 : 219 (FR-3)

tRNA(AsnE2)5' RNA配列

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUU

[0413] 配列番号 : 220 (FR-4)

tRNA(AsnE2)3' ag RNA配列

AGGUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGAGCCGC

[0414] tRNA 配列番号 : 216 (TR-109)

tRNA(AsnE2+Leu2)Lag-CA RNA配列

GGCUCUGUAGUUCAGUCGGUAGAACGGCGGAUULagGUUCCGUAUGUCACUGGUUCGAGUCCAGUCAGA
GCCGC

[0415] 50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、20 mM MgCl₂、1 mM ATP、0.125~0.25 mM pLp、25 μM tRNA5' 断片、0.6 U/μL T4 RNA ligase (New England Biolabs)、10% DMSOの組成の反応溶液を15℃にて一晩静置する事によりtRNA断片5' とpLpとのライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は、フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によって回収した。

[0416] 未反応のtRNA5' 断片が次のライゲーション反応に持ち越されないようにするため、過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₄)により、tRNA5' 断片の3' 末端のリボースを開裂させた。具体的には、10 μM ライゲーション産物、10 mM 過ヨウ素酸ナトリウム存在下で、氷上、暗所で30分静置することにより開裂反応を行った。反応後、100 mMグルコースを1/10体積量加え、氷上、暗所で30分静置することにより過剰な過ヨウ素酸ナトリウムを分解した。反応産物は、エタノール沈殿によって回収した。

[0417] 過ヨウ素酸処理後のライゲーション産物の5' 末端をリン酸化、3' 末端を脱リン酸化するためT4 PNK(T4 polynucleotide kinase)処理を行った。10 μ

Mの過ヨウ素酸処理後のライゲーション産物、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl_2 、5 mM DTT、300 μM ATP、0.5 U/ μL T4 PNK(TaKaRa)の組成の反応溶液を37℃にて30分から60分静置することにより反応を行った。反応産物は、フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によって回収した。

[0418] PNK処理後の反応産物とtRNA3'断片とのライゲーション反応を行った。まず、10 μM のPNK処理後の反応産物、10 μM tRNA3'断片、50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、15 mM MgCl_2 の組成の溶液を65℃にて7分間加熱後、室温で30分から1時間静置することでPNK処理後の反応産物とtRNA3'断片とのアニーリングを行った。次に、tRNA3'断片の5'末端をリン酸化するためT4 PNK処理を行った。T4 PNK処理は、アニーリングを行った溶液に、DTT(終濃度3.5 mM)、ATP(終濃度300 μM)、T4 PNK(終濃度0.5 U/ μL)を加え、37℃にて30分静置する事で行った。続いて、この溶液に、T4 RNA ligase(New England Biolabs)を終濃度0.9 U/ μL となるよう加え、37℃にて30分から40分静置することでライゲーション反応を行った。ライゲーション産物は、フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によって回収した。

[0419] ライゲーション法により作製したtRNA-CAは、高速逆相クロマトグラフィー(HPLC)(15 mM TEAと400 mM HFIPの水溶液/15 mM TEAと400 mM HFIPのメタノール溶液)にて分取精製を行った後、変性尿素10%ポリアクリルアミド電気泳動にて目的の長さを有していることを確認した。

[0420] RNaseT₁により切断したtRNA断片の分析

ライゲーション反応を利用して調製したtRNA-CAをRNaseで断片化し分析することで、pLpで導入したライシジン(L)が目的の部位に導入されていることを確認した。

[0421] 10 μM tRNA-CA、5 U/ μL RNaseT₁ (Epicentre又はThermoFisher Scientific)、10 mM酢酸アンモニウム(pH 5.3)を含む反応溶液を37℃にて1時間静置する事によりRNAをG塩基の3'側で特異的に切断し、pLpで導入したライシジ

ン (L) を含むRNA断片を分析した。

[0422] CUU_LAGp

LCMS (ESI) $m/z = 1020 \quad ((M-2H)/2) -$

保持時間: 3.84分 (分析条件LTQTEA/HFIP05_03)

pLpがligationされていない場合に想定される断片 (CUUAGp) とRNAの他の部分由来の断片 (UUCAGp) の分子量が等しいため、断片化していない状態のRNA (TR-108) の分析も併せて行った。

LCMS (ESI) $m/z = 1109 \quad ((M-22H)/22) -$

保持時間: 3.92分 (分析条件LTQTEA/HFIP05_01)

pLpがligationされていない場合に想定されるRNA及びライシジンの代わりにウリジンが入っていた場合に想定されるRNAのマスキロマトグラムと比較し、大部分pLpのライゲーションが進行したことを確認した。

[0423] AUU_LAGp

LCMS (ESI) $m/z = 1032 \quad ((M-2H)/2) -$

保持時間: 4.16分 (分析条件LTQTEA/HFIP05_03)

pLpがライゲーションされていない場合に想定される断片 (AUUAGp) 及びライシジンの代わりにウリジンが入っていた場合に想定される断片 (AUUUAGp) のマスキロマトグラムと比較し、大部分pLpのライゲーションが進行したことを確認した。

[0424] アミノアシルpCpAを用いた伸長アミノアシルtRNAの調製

25 μ M 転写tRNA(Glu2+Ser5)aag-CA (TR-1)、50mM HEPES-KOH pH7.5、20mM MgCl₂、1mM ATP、0.6 Unit/ μ L T4 RNAリガーゼ (New England bio lab社)、0.25mM アミノアシルpCpA (SS15のDMSO溶液) となるように、ヌクレアーゼフリー水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。T4 RNAリガーゼ及びアミノアシルpCpAを加える前の反応液は、95°Cで2分間加熱後、室温で5分放置し、あらかじめtRNAのリフォールディングを行った。

[0425] ライゲーション反応液に、酢酸ナトリウムを0.3Mになるように加え、フェ

ノール・クロロホルム抽出を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-1) を調製した。AA_tR-1はエタノール沈殿により回収し、翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0426] 同様に、転写tRNA (TR-2～TR-103、TR-106～TR-109) に対して、アミノアシルpCpA (SS15) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-2～AA_tR-103、AA_tR-132、AA_tR-133、AA_tR-136、AA_tR-137) を調製した。これらのアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0427] 同様に、転写tRNA (TR-4、TR-14、TR-24、TR-34、TR-44、TR-54、TR-64、TR-74、TR-81、TR-91、TR-104) に対して、アミノアシルpCpA (SS16) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-104～AA_tR-114) を調製した。これらのアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0428] 同様に、転写tRNA (TR-44、TR-47、TR-48、TR-50) に対して、アミノアシルpCpA (SS14) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-115～AA_tR-118) を調製した。これらのアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

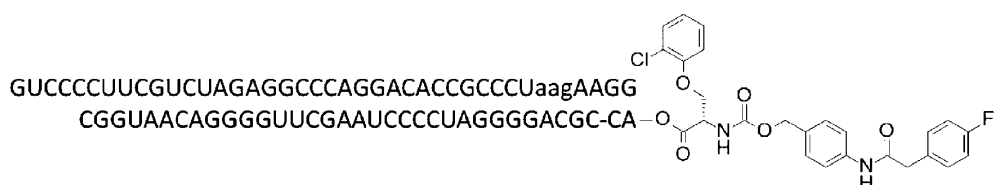
[0429] 同様に、転写tRNA (TR-44、TR-47、TR-48、TR-50、TR-24、TR-34) に対して、アミノアシルpCpA (SS45) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-119～AA_tR-122、AA_tR-129、AA_tR-130) を調製した。これらのアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0430] 同様に、転写tRNA (TR-44、TR-47、TR-48、TR-50、TR-77、TR-97) に対して、アミノアシルpCpA (特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した化合物TS24) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム

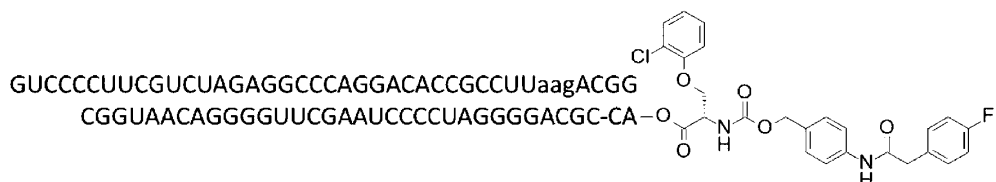
抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-123~AA_tR-126、AA_tR-134、AA_tR-138) を調製した。これらのアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0431] 同様に、転写tRNA (TR-54、TR-67、TR-87) に対して、アミノアシルpCpA (特許文献(W02018143145A1)記載の方法で合成した化合物ts14) を前述の方法でライゲーション反応、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、伸長アミノアシルtRNA (AA_tR-127、AA_tR-131、AA_tR-135) を調製した。このアミノアシルtRNAは翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

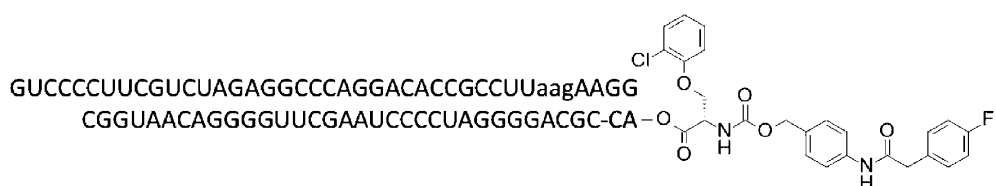
[0432] AA_tR-1 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)aag



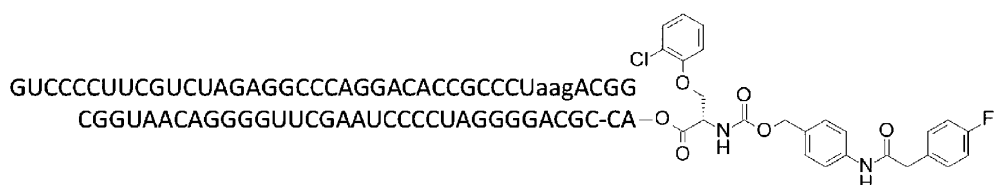
[0433] AA_tR-2 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)aag



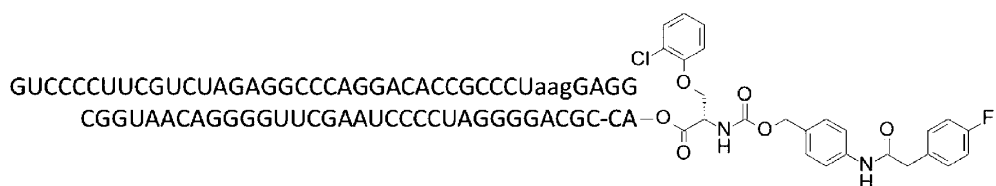
[0434] AA_tR-3 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)aag



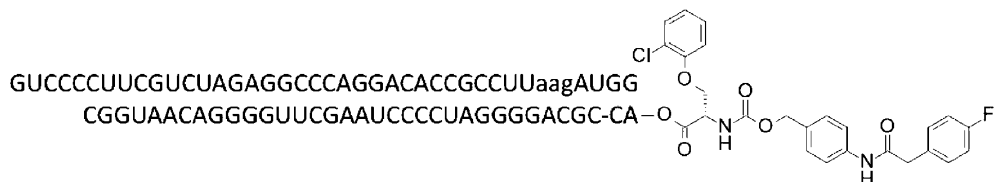
[0435] AA_tR-4 SPh2Cl-tRNA(Glu2)aag



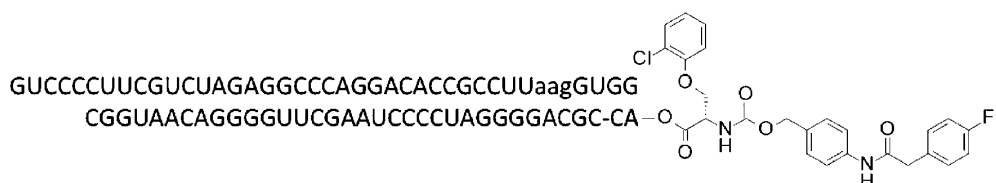
[0436] AA_tR-5 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)aag



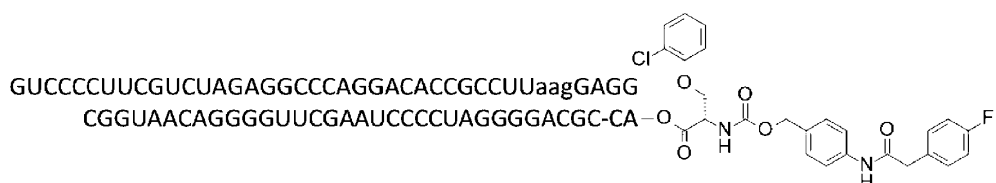
[0437] AAtR-6 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)aag



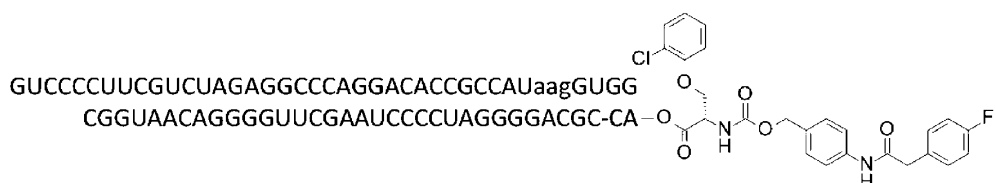
[0438] AAtR-7 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)aag



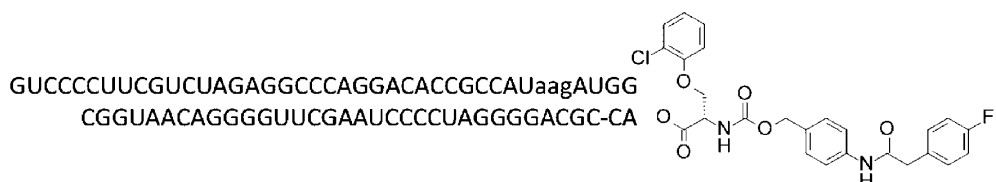
[0439] AAtR-8 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)aag



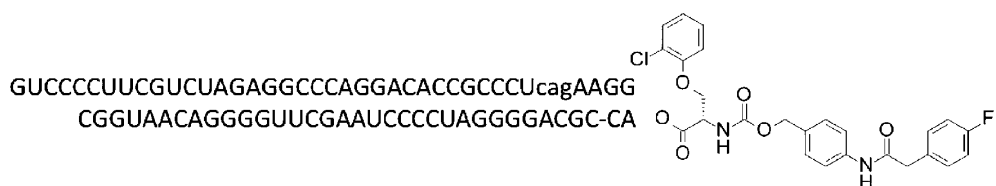
[0440] AAtR-9 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)aag



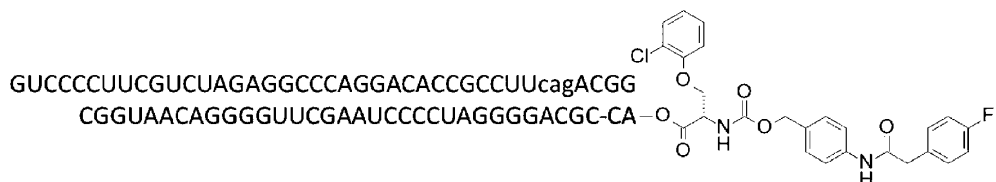
[0441] AAtR-10 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)aag



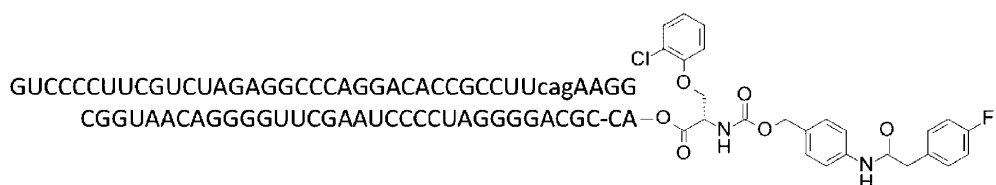
[0442] AAtR-11 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)cag



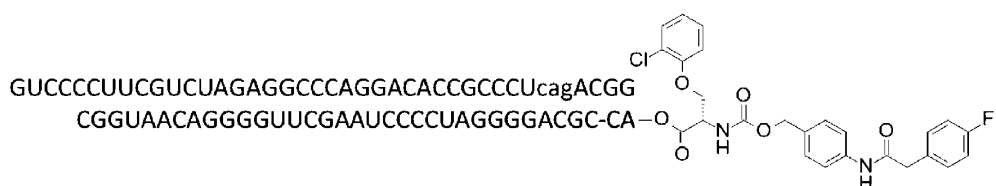
[0443] AAtR-12 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)cag



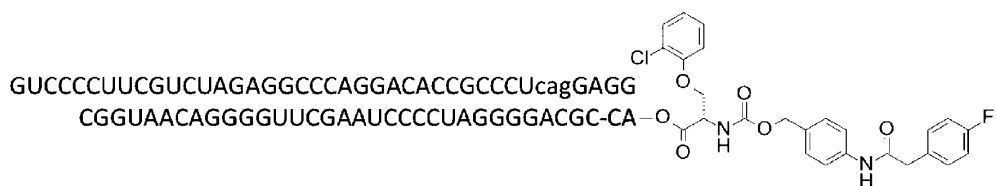
[0444] AAtR-13 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)cag



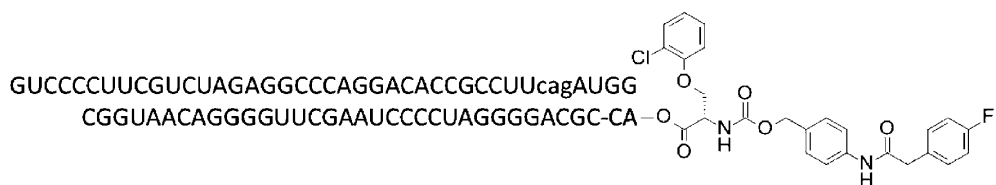
[0445] AAtR-14 SPh2Cl-tRNA(Glu2)cag



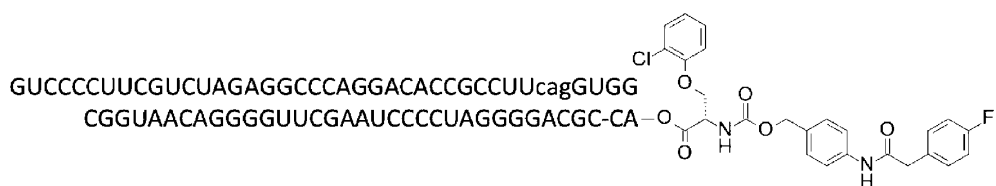
[0446] AAtR-15 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)cag



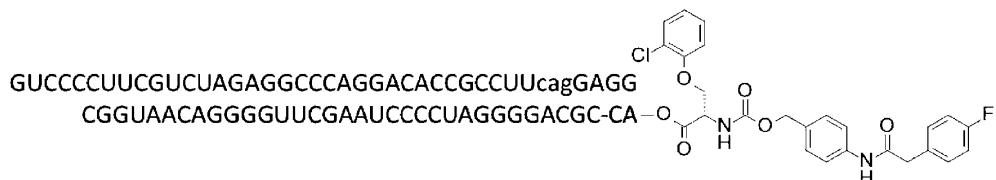
[0447] AAtR-16 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)cag



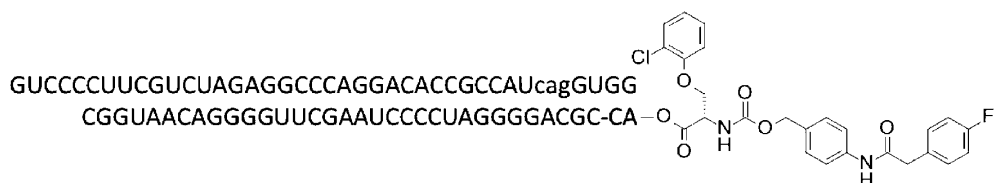
[0448] AAtR-17 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)cag



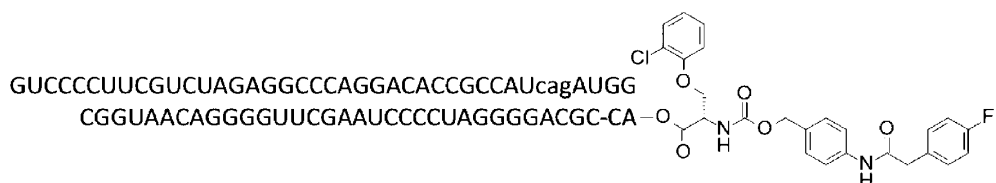
[0449] AAtR-18 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)cag



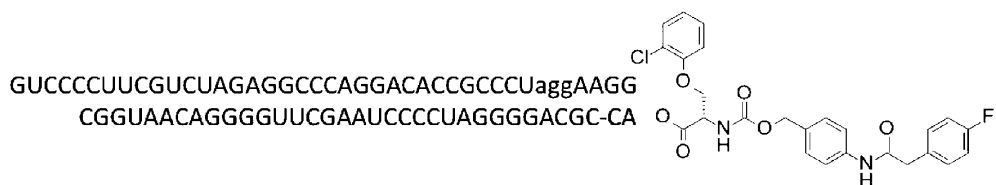
[0450] AAtR-19 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)cag



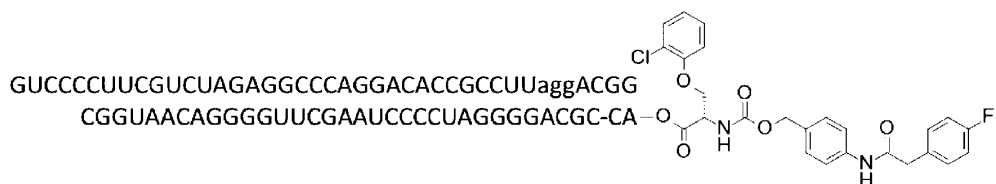
[0451] AAtR-20 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)cag



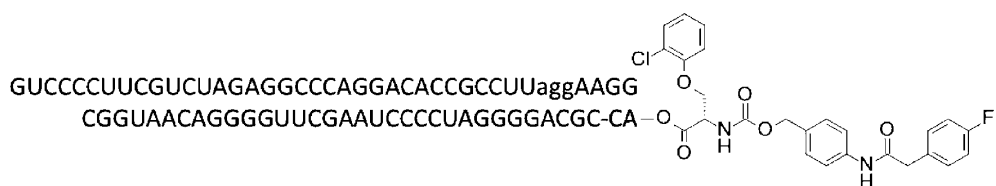
[0452] AAtR-21 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)agg



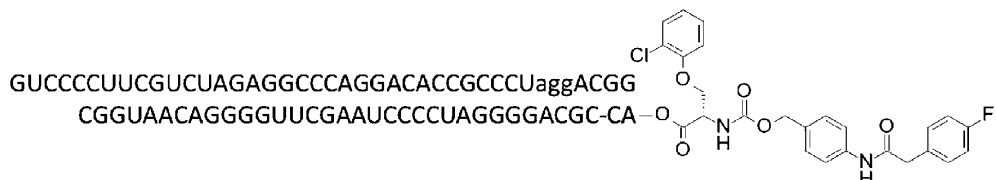
[0453] AAtR-22 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)agg



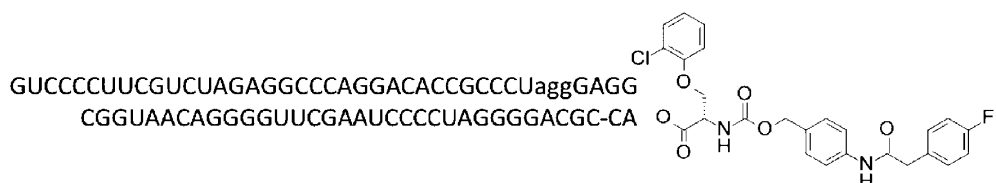
[0454] AAtR-23 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)agg



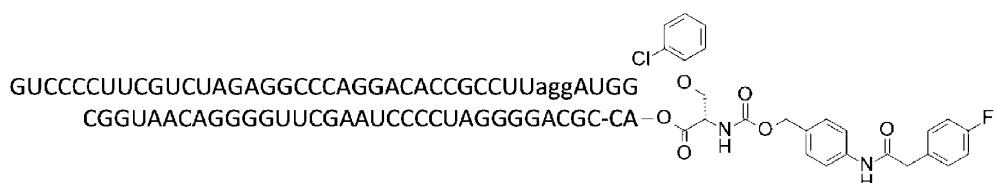
[0455] AAtR-24 SPh2Cl-tRNA(Glu2)agg



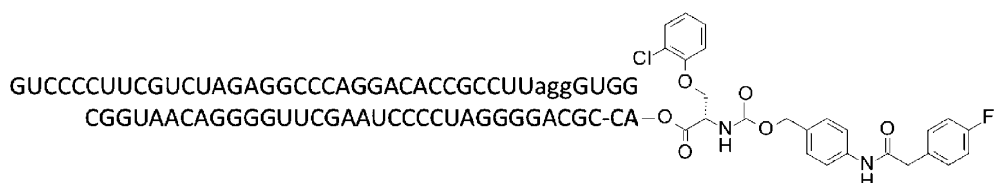
[0456] AAtR-25 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)agg



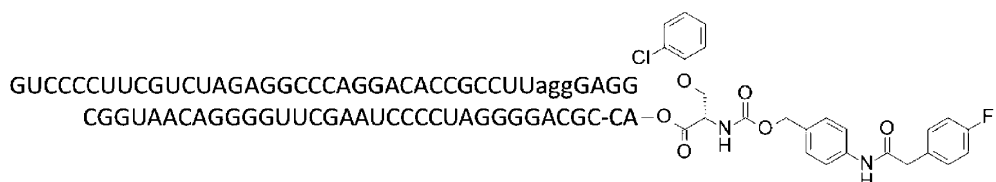
[0457] AAtR-26 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)agg



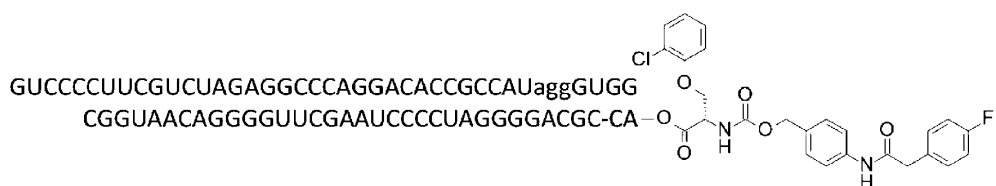
[0458] AAtR-27 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)agg



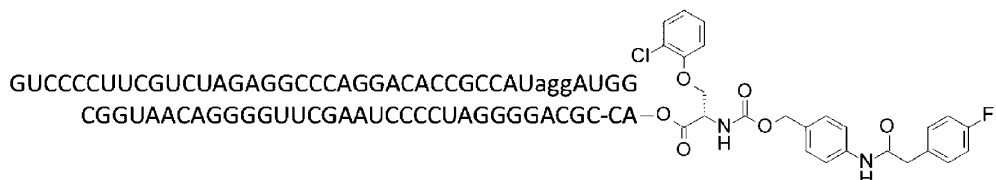
[0459] AAtR-28 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)agg



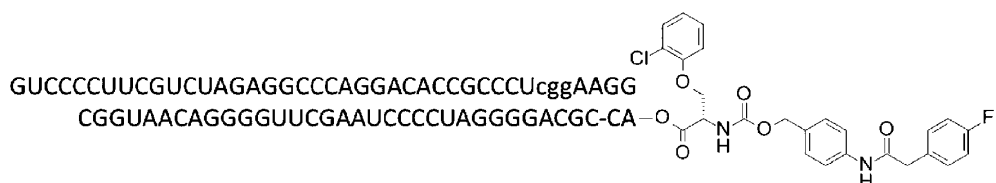
[0460] AAtR-29 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)agg



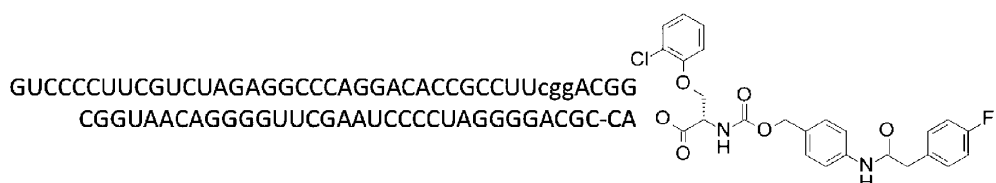
[0461] AAtR-30 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)agg



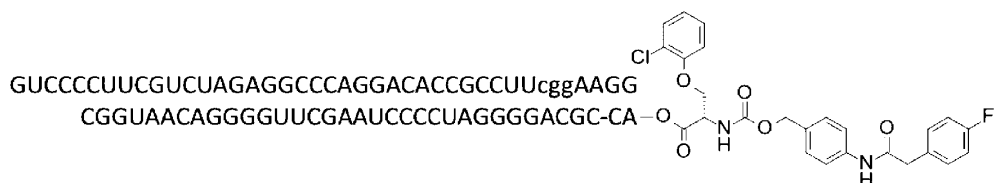
[0462] AAtR-31 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)cgg



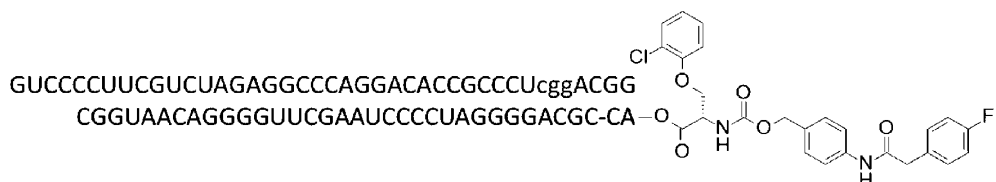
[0463] AAtR-32 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)cgg



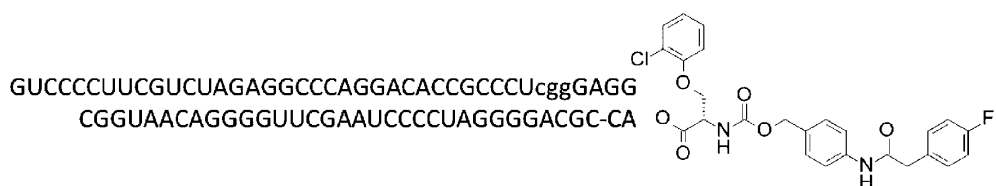
[0464] AAtR-33 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)cgg



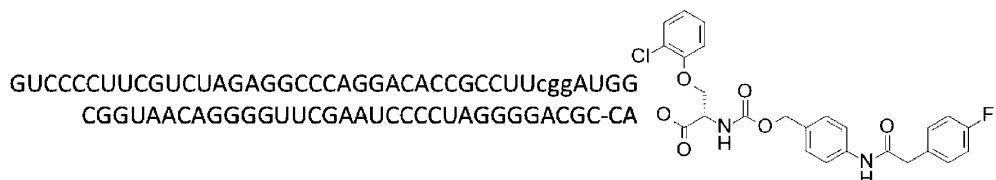
[0465] AAtR-34 SPh2Cl-tRNA(Glu2)cgg



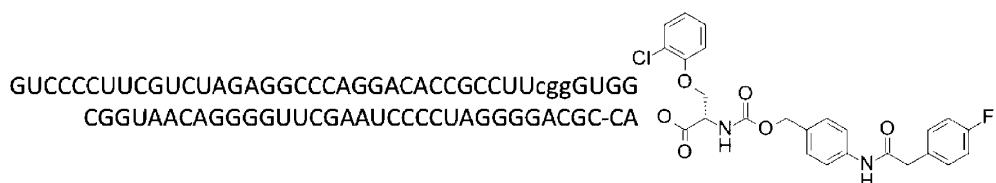
[0466] AAtR-35 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)cgg



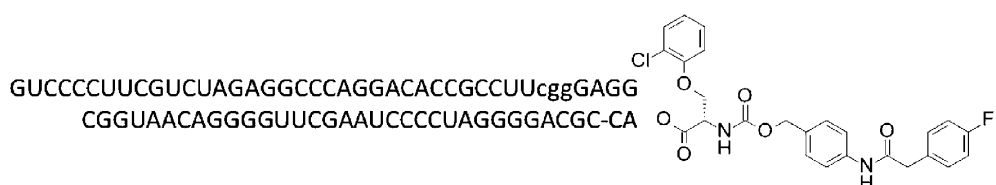
[0467] AAtR-36 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)cgg



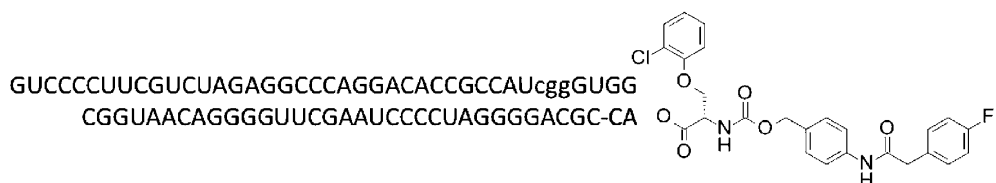
[0468] AAtR-37 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)cgg



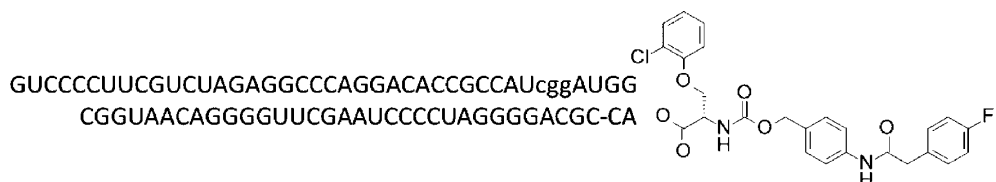
[0469] AAtR-38 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)cgg



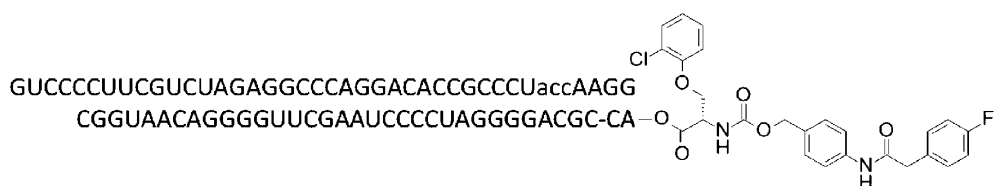
[0470] AAtR-39 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)cgg



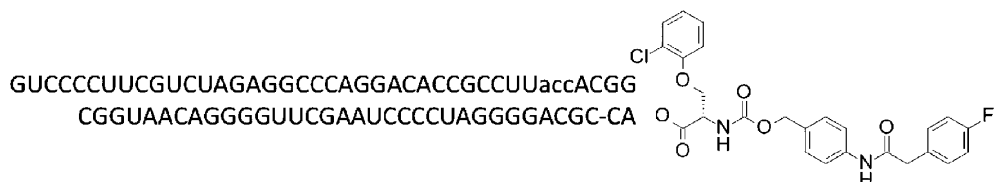
[0471] AAtR-40 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)cgg



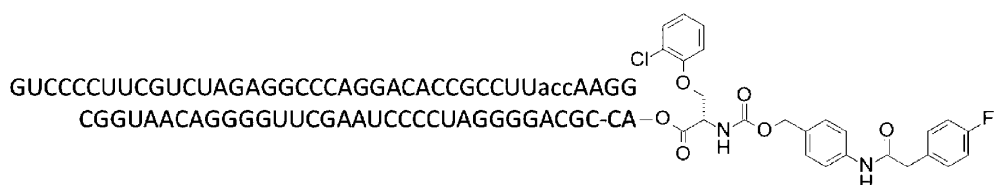
[0472] AAtR-41 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)acc



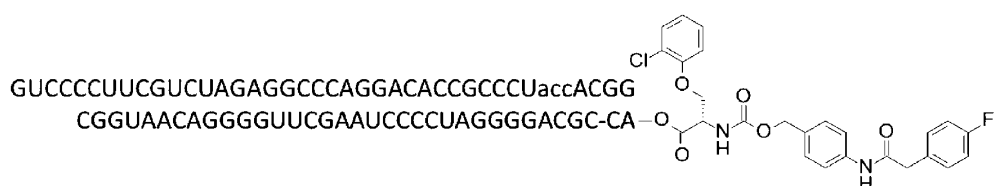
[0473] AAtR-42 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)acc



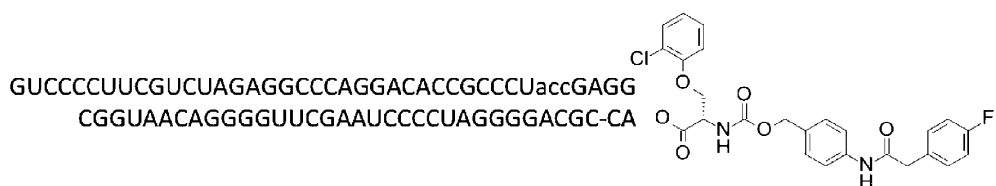
[0474] AAtR-43 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)acc



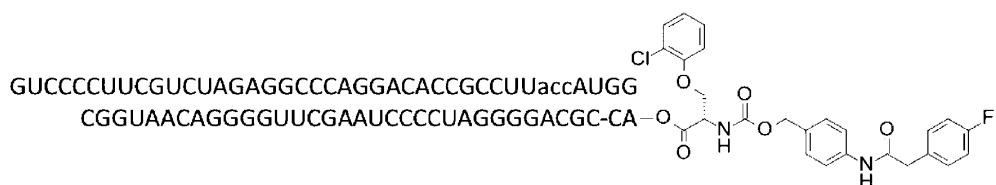
[0475] AAtR-44 SPh2Cl-tRNA(Glu2)acc



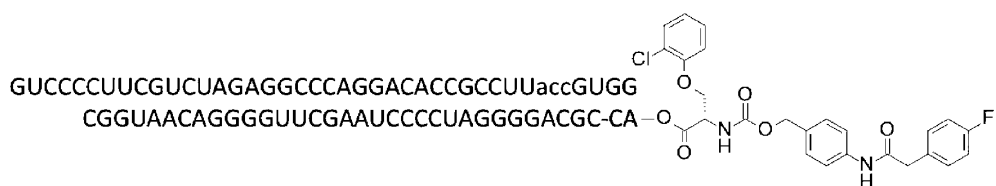
[0476] AAtR-45 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Arg3)acc



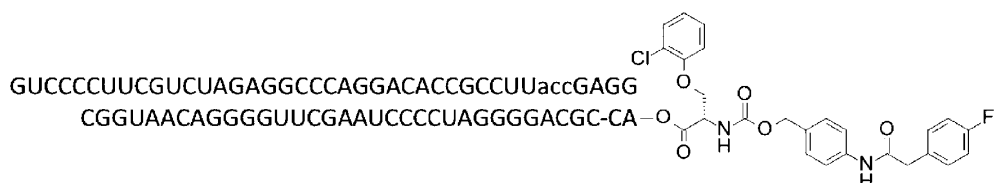
[0477] AAtR-46 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Val2)acc



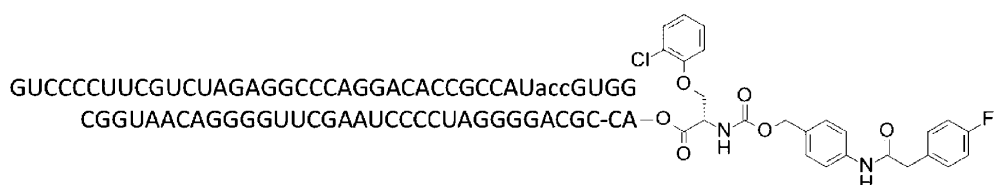
[0478] AAtR-47 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)acc



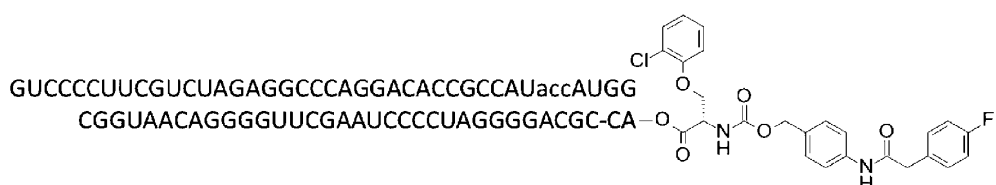
[0479] AAtR-48 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)acc



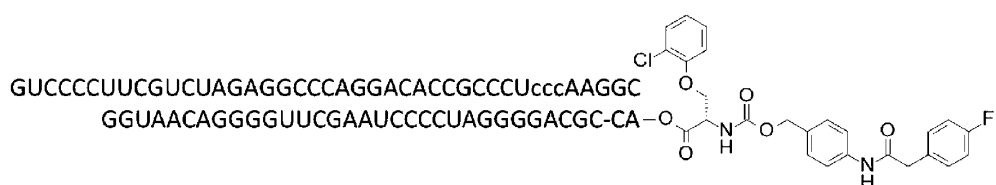
[0480] AAtR-49 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro2)acc



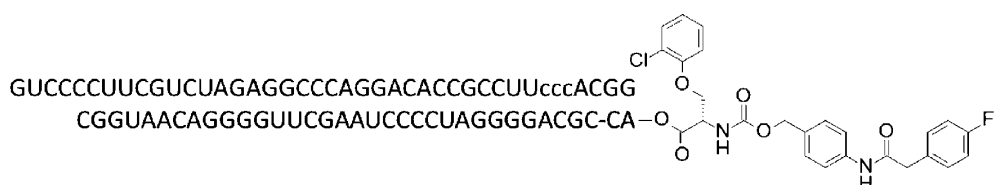
[0481] AAtR-50 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)acc



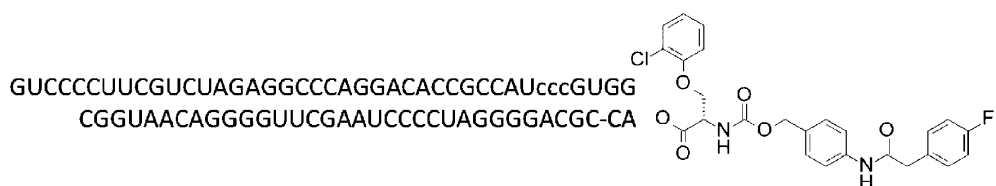
[0482] AAtR-51 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ser5)ccc



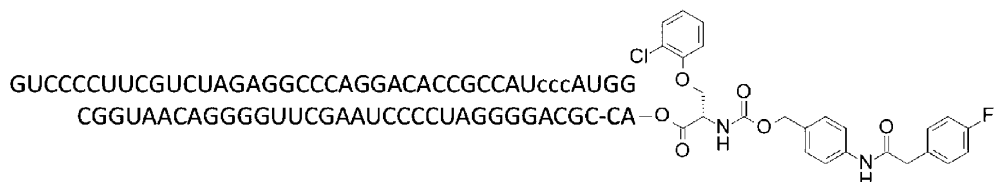
[0483] AAtR-52 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala1B)ccc



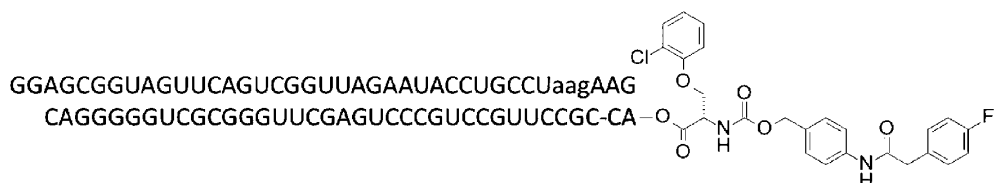
[0484] AAtR-53 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Phe)ccc



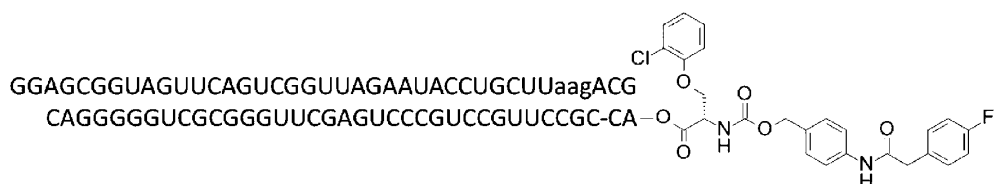
[0491] AAtR-60 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Ala2)ccc



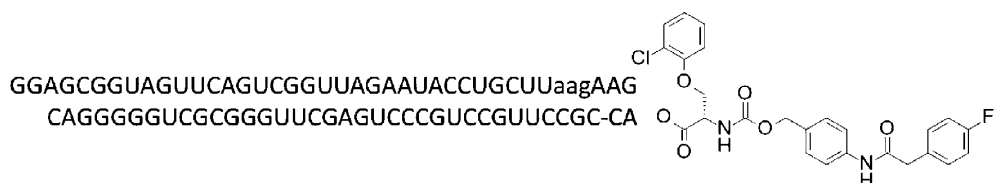
[0492] AAtR-61 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ser5)aag



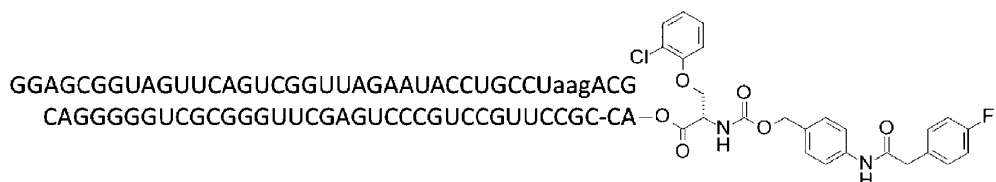
[0493] AAtR-62 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala1B)aag



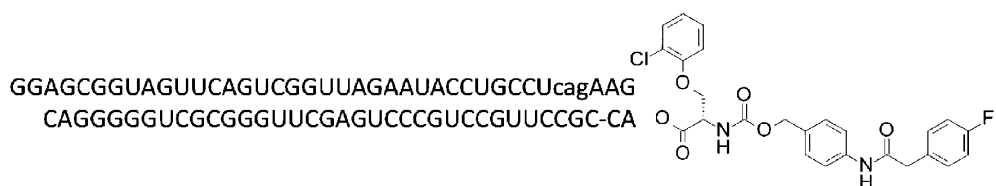
[0494] AAtR-63 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Phe)aag



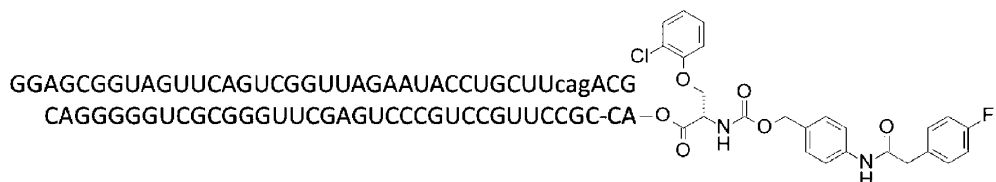
[0495] AAtR-64 SPh2Cl-tRNA(Asp1)aag



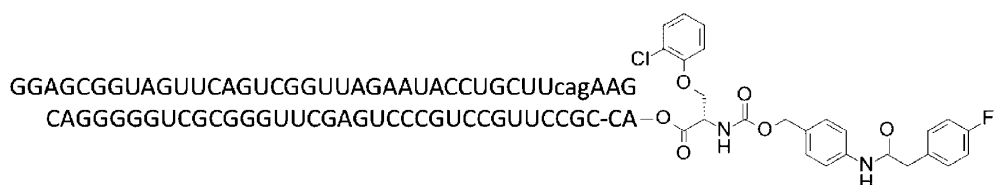
[0496] AAtR-65 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Arg3)aag



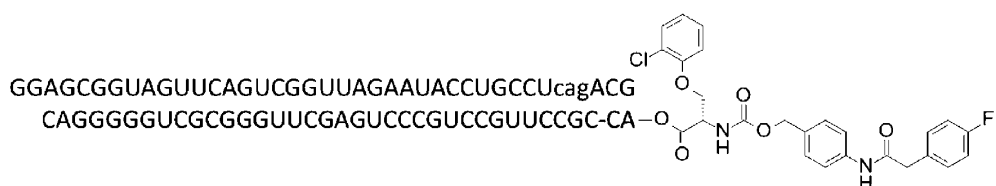
[0503] AAtR-72 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala1B)cag



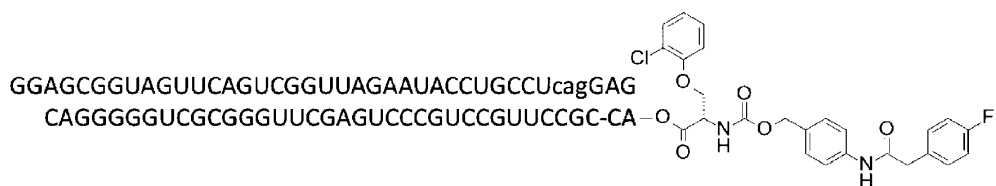
[0504] AAtR-73 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Phe)cag



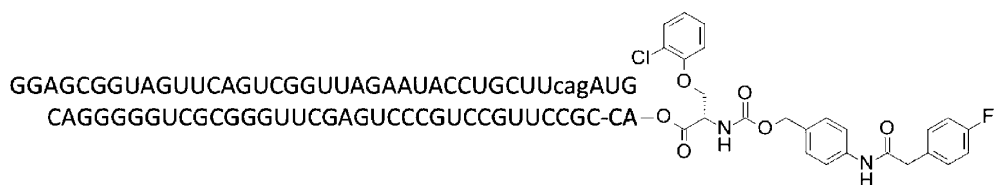
[0505] AAtR-74 SPh2Cl-tRNA(Asp1)cag



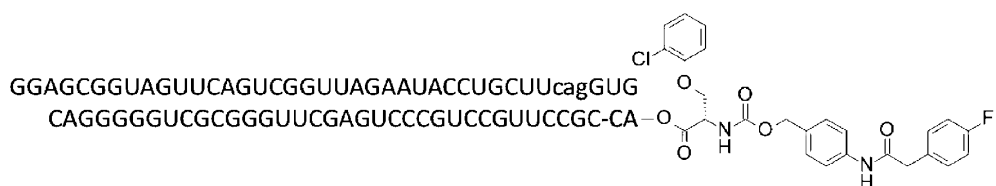
[0506] AAtR-75 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Arg3)cag



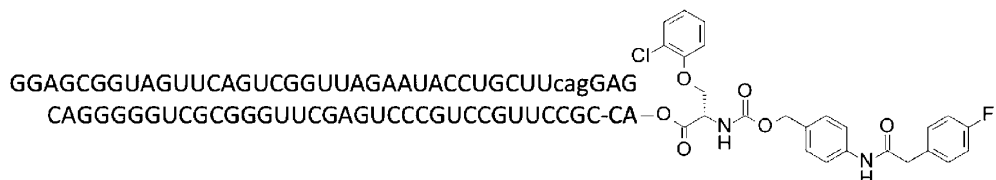
[0507] AAtR-76 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Val2)cag



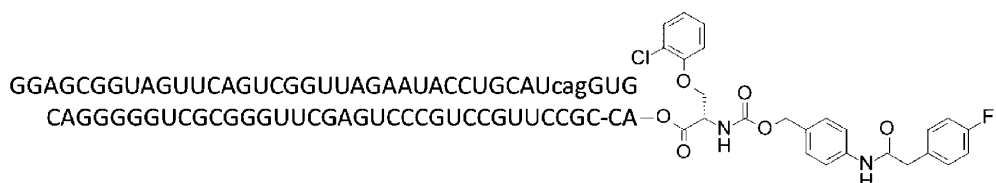
[0508] AAtR-77 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)cag



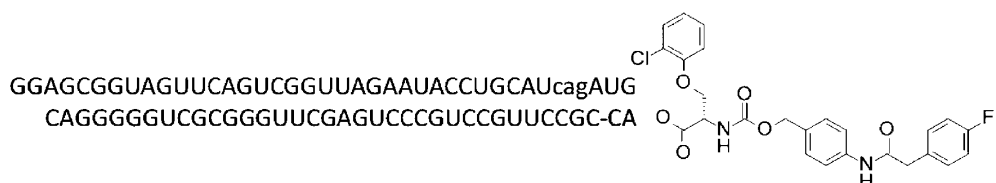
[0509] AAtR-78 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro3)cag



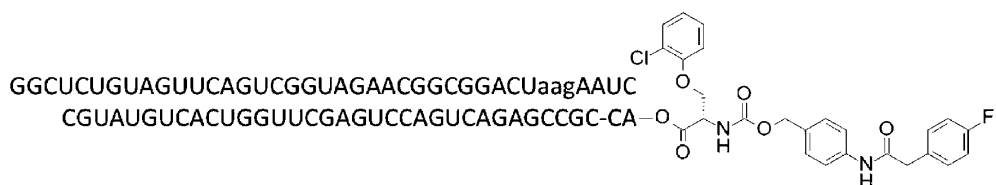
[0510] AAtR-79 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Pro2)cag



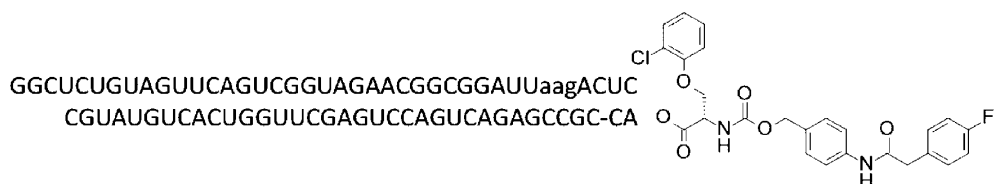
[0511] AAtR-80 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Ala2)cag



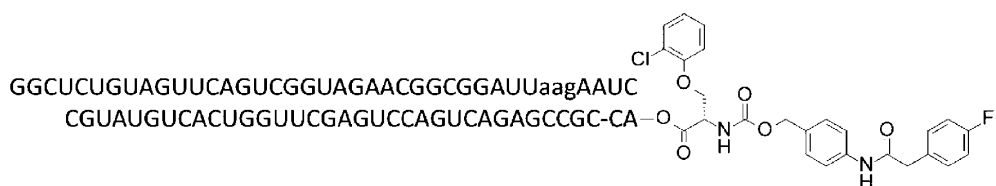
[0512] AAtR-81 SPh2Cl-tRNA(AsnE2)aag



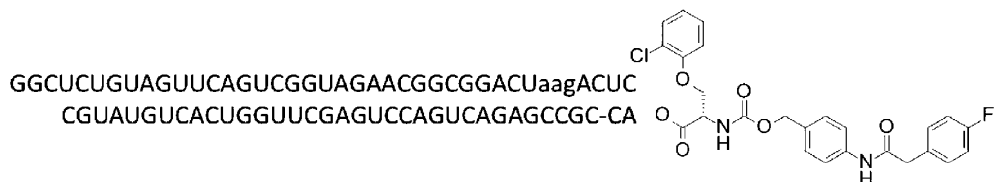
[0513] AAtR-82 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala1B)aag



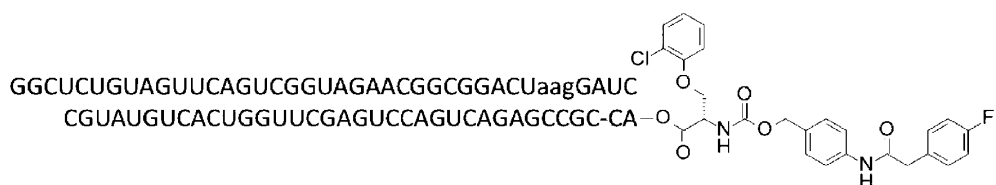
[0514] AAtR-83 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Phe)aag



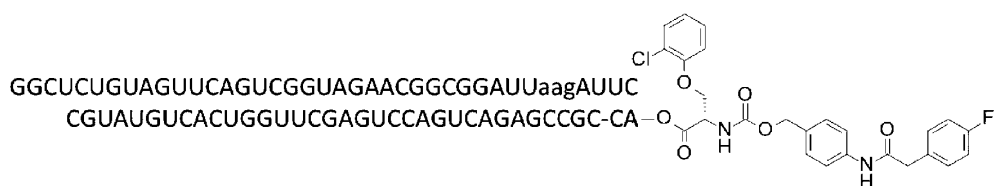
[0515] AAtR-84 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Glu2)aag



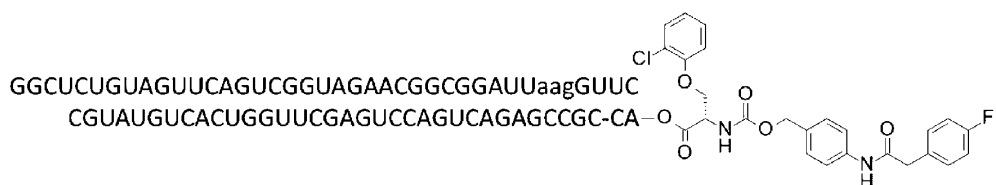
[0516] AAtR-85 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Arg3)aag



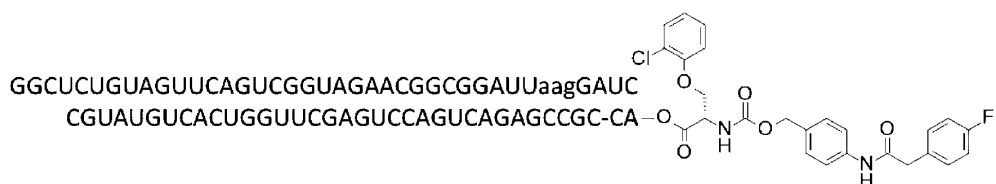
[0517] AAtR-86 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Val2)aag



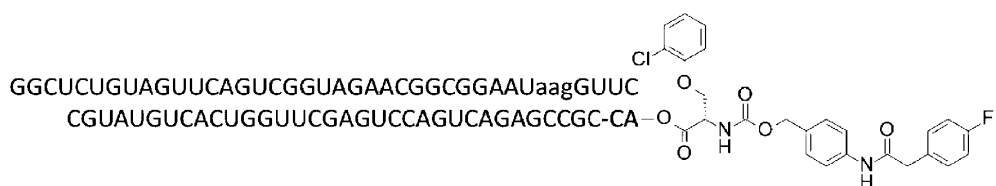
[0518] AAtR-87 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)aag



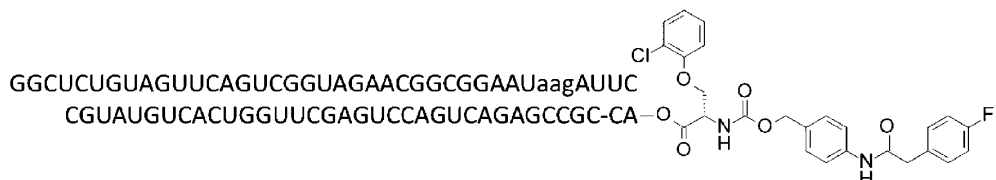
[0519] AAtR-88 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro3)aag



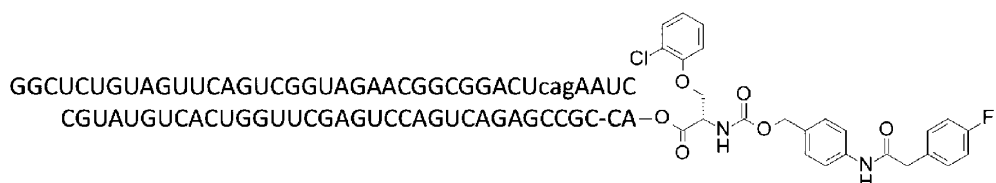
[0520] AAtR-89 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro2)aag



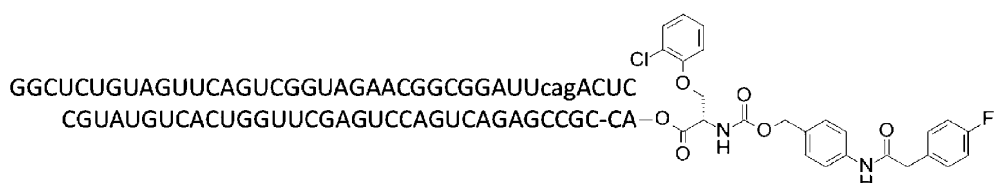
[0521] AA_tR-90 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂+Ala₂)aag



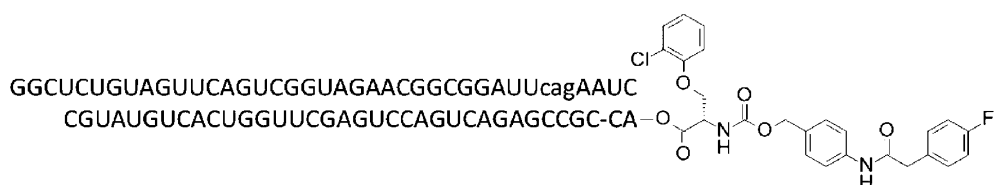
[0522] AA_tR-91 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂)cag



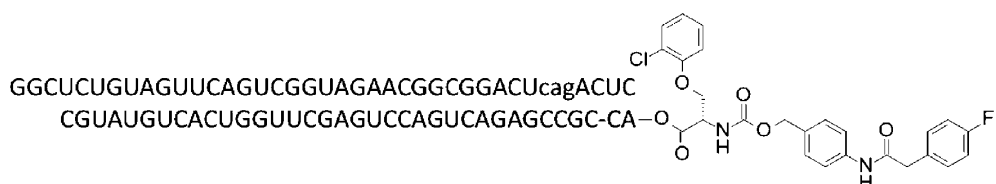
[0523] AA_tR-92 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂+Ala₁B)cag



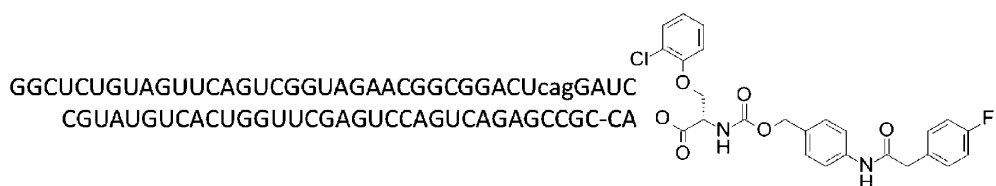
[0524] AA_tR-93 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂+Phe)cag



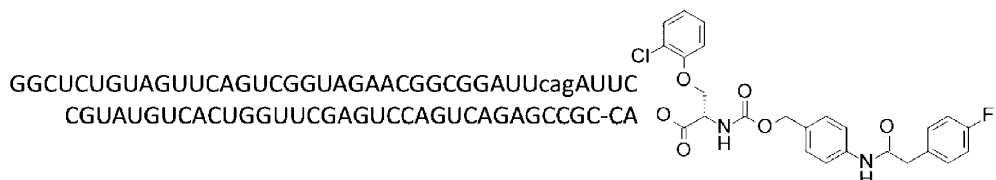
[0525] AA_tR-94 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂+Glu₂)cag



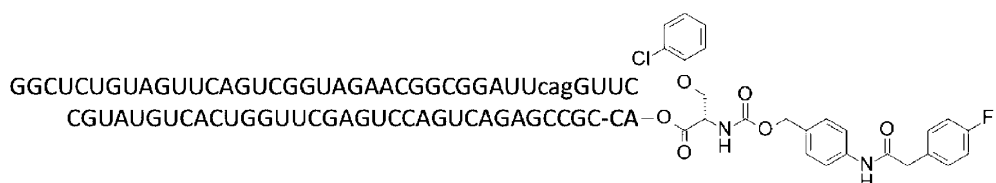
[0526] AA_tR-95 SPh₂Cl-tRNA(AsnE₂+Arg₃)cag



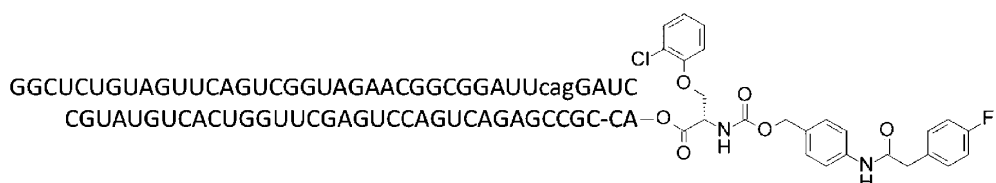
[0527] AAtR-96 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Val2)cag



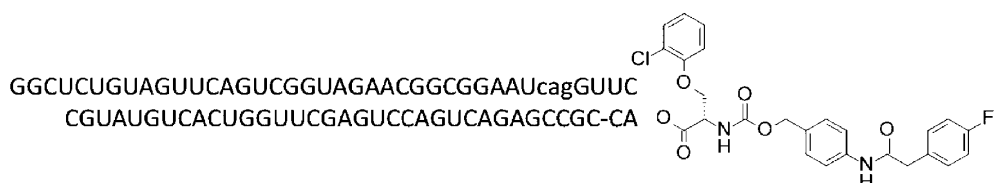
[0528] AAtR-97 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)cag



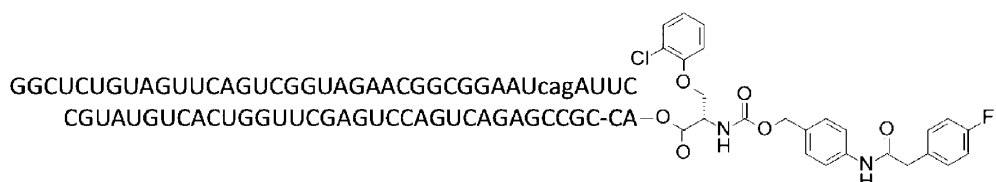
[0529] AAtR-98 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro3)cag



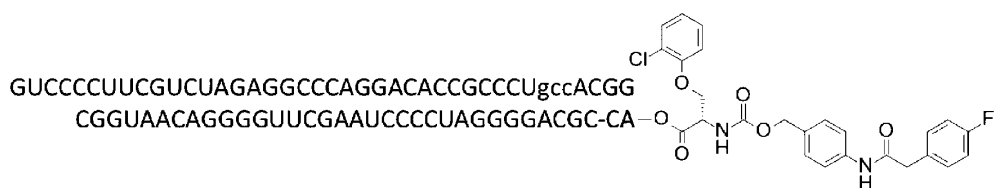
[0530] AAtR-99 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Pro2)cag



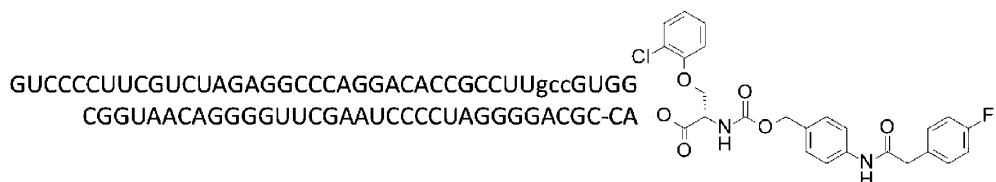
[0531] AAtR-100 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Ala2)cag



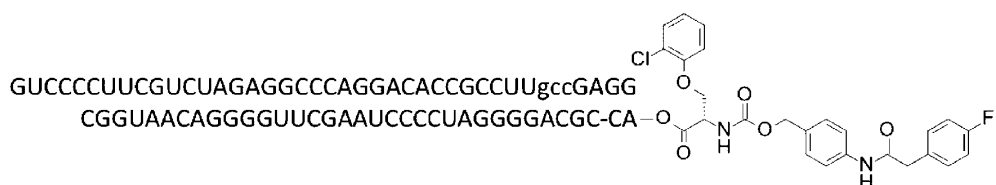
[0532] AAtR-101 SPh2Cl-tRNA(Glu2)gcc



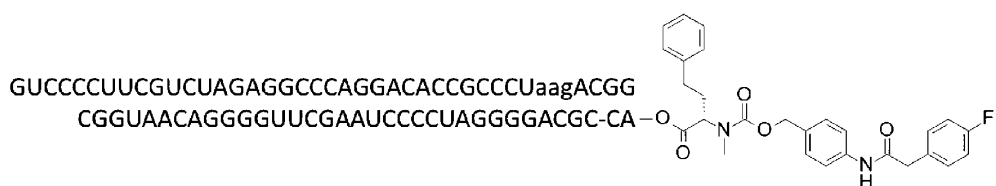
[0533] AAtR-102 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Leu2)gcc



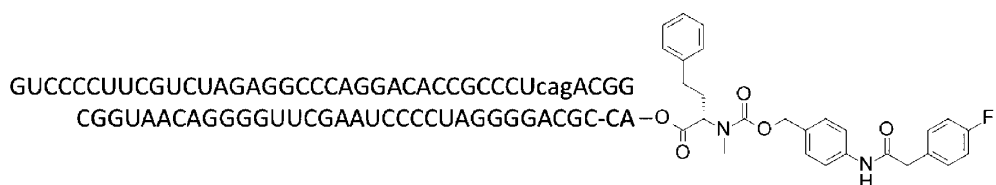
[0534] AAtR-103 SPh2Cl-tRNA(Glu2+Pro3)gcc



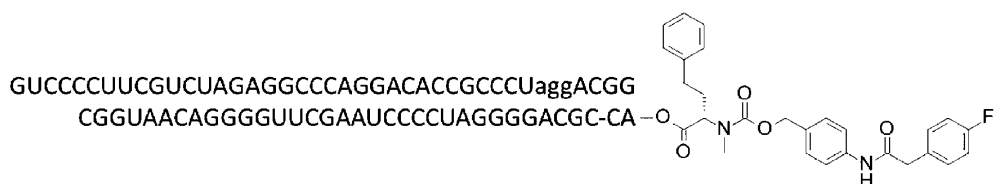
[0535] AAtR-104 MeHph-tRNA(Glu2)aag



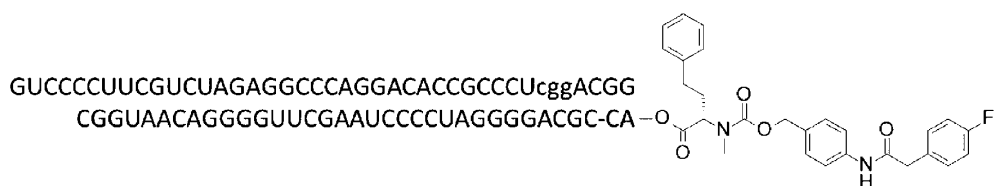
[0536] AAtR-105 MeHph-tRNA(Glu2)cag



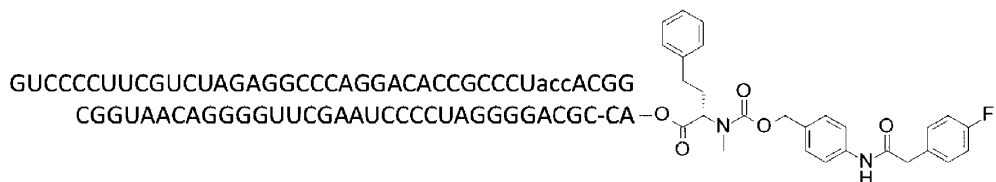
[0537] AAtR-106 MeHph-tRNA(Glu2)agg



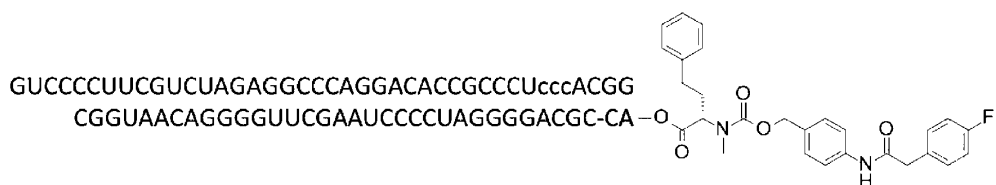
[0538] AAtR-107 MeHph-tRNA(Glu2)cgg



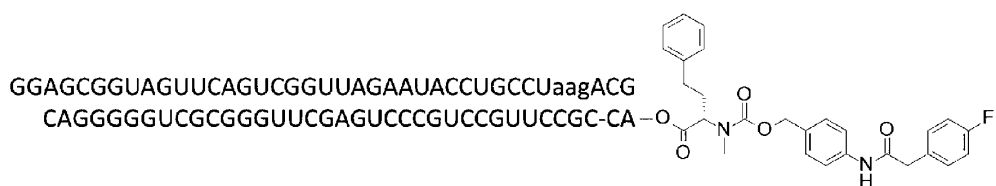
[0539] AAtR-108 MeHph-tRNA(Glu2)acc



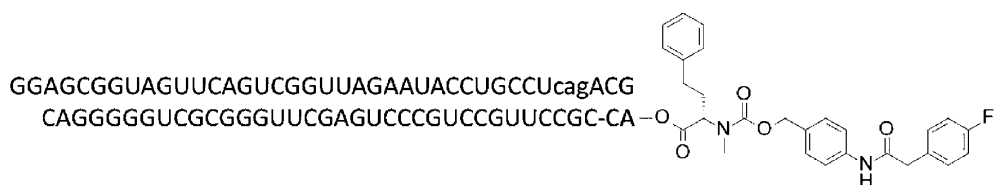
[0540] AAtR-109 MeHph-tRNA(Glu2)ccc



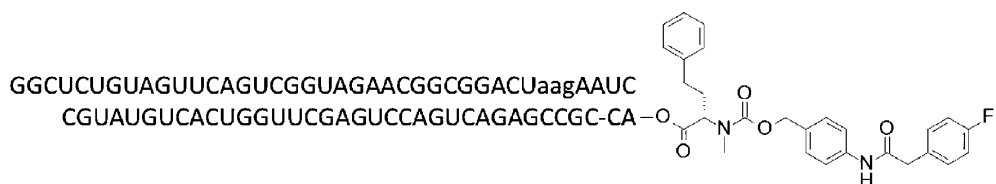
[0541] AAtR-110 MeHph-tRNA(Asp1)aag



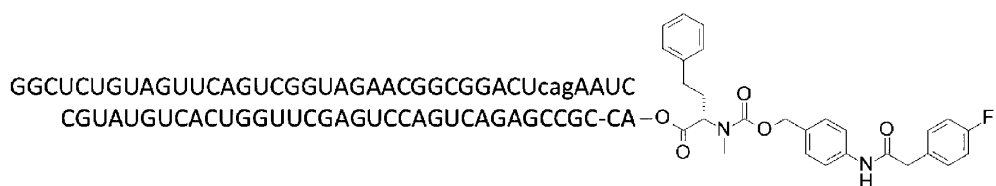
[0542] AAtR-111 MeHph-tRNA(Asp1)cag



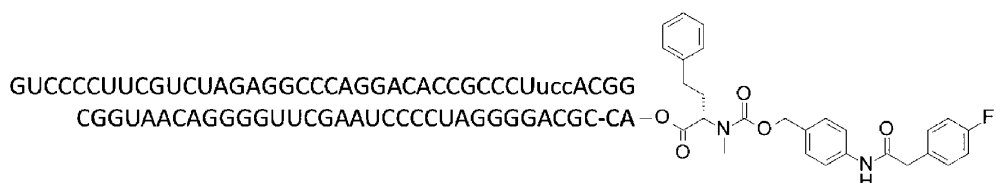
[0543] AAtR-112 MeHph-tRNA(AsnE2)aag



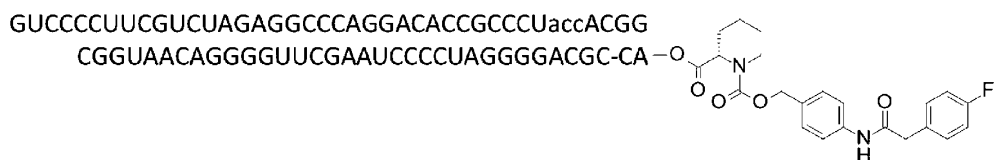
[0544] AAtR-113 MeHph-tRNA(AsnE2)cag



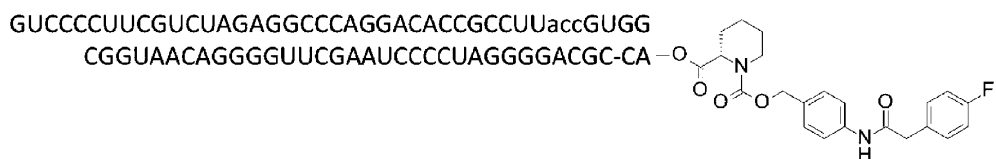
[0545] AAtR-114 MeHph-tRNA(Glu2)ucc



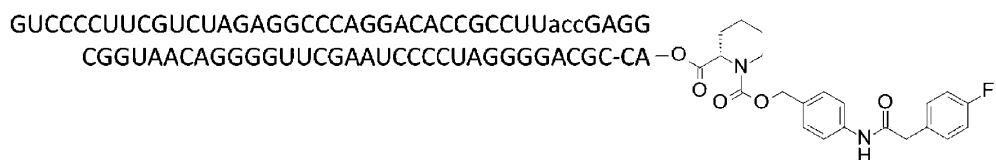
[0546] AAtR-115 Pic2- tRNA(Glu2)acc



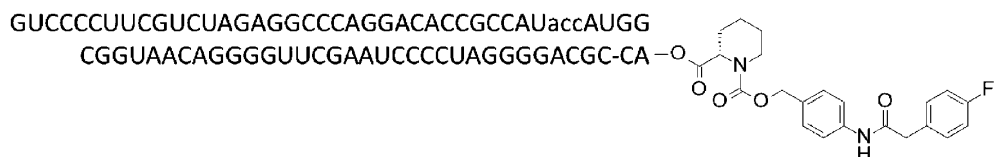
[0547] AAtR-116 Pic2- tRNA(Glu2+Leu2)acc



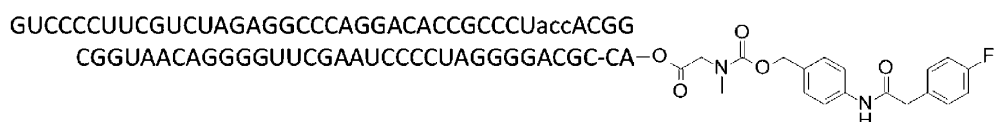
[0548] AAtR-117 Pic2- tRNA(Glu2+Pro3)acc



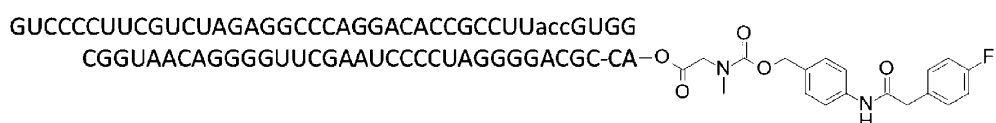
[0549] AAtR-118 Pic2- tRNA(Glu2+Ala2)acc



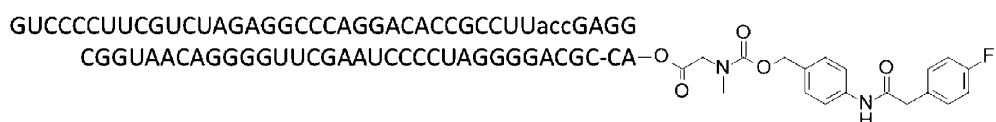
[0550] AAtR-119 MeG- tRNA(Glu2)acc



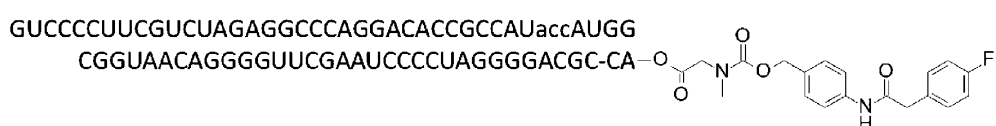
[0551] AAtR-120 MeG- tRNA(Glu2+Leu2)acc



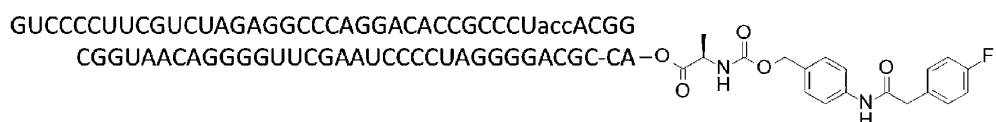
[0552] AAtR-121 MeG- tRNA(Glu2+Pro3)acc



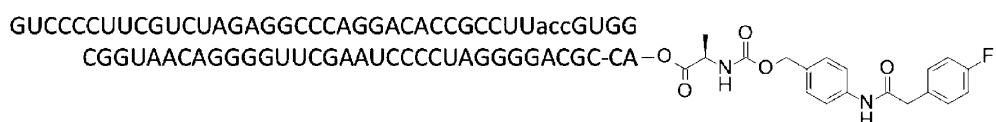
[0553] AAtR-122 MeG- tRNA(Glu2+Ala2)acc



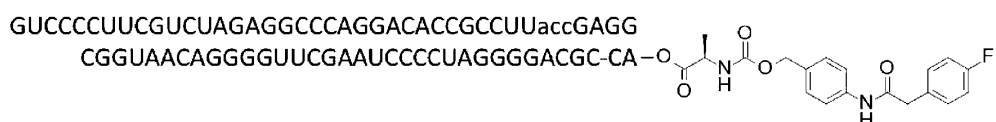
[0554] AAtR-123 dA- tRNA(Glu2)acc



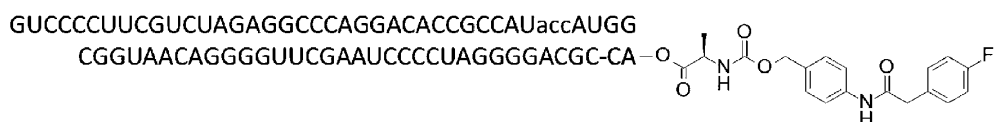
[0555] AAtR-124 dA- tRNA(Glu2+Leu2)acc



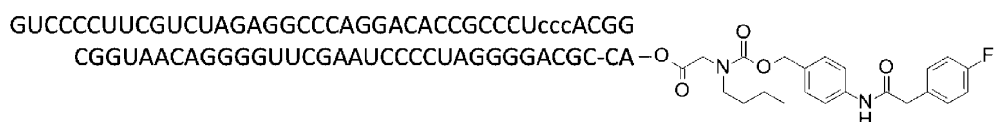
[0556] AAtR-125 dA- tRNA(Glu2+Pro3)acc



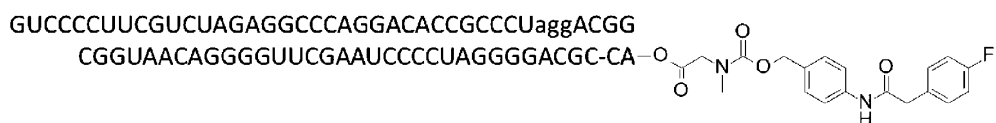
[0557] AAtR-126 dA- tRNA(Glu2+Ala2)acc



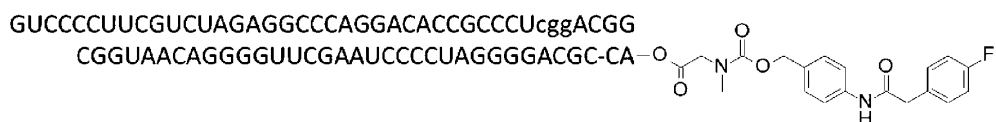
[0558] AAtR-127 nBuG- tRNA(Glu2)ccc



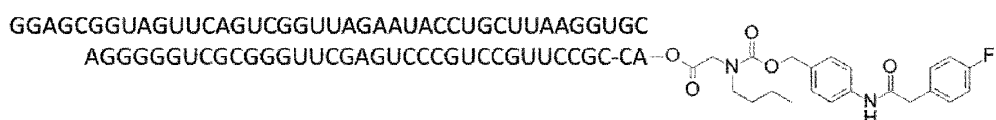
[0559] AAtR-129 MeG- tRNA(Glu2)agg



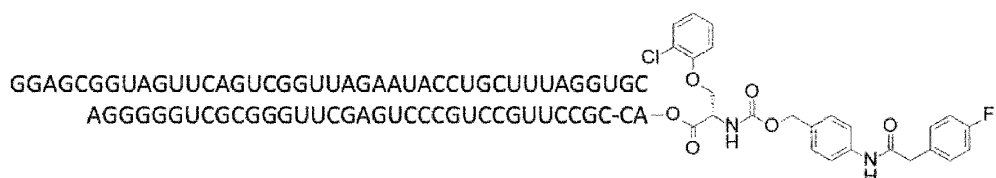
[0560] AAtR-130 MeG- tRNA(Glu2)cgg



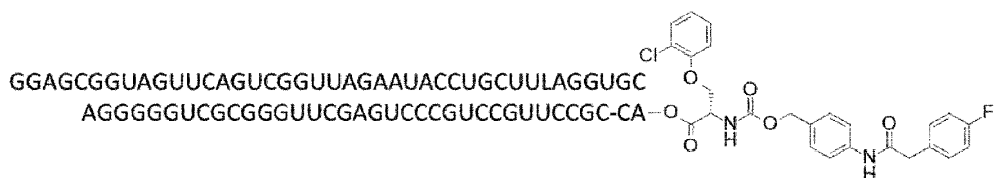
[0561] AAtR-131 nBuG-tRNA(Asp1+Leu2)aag



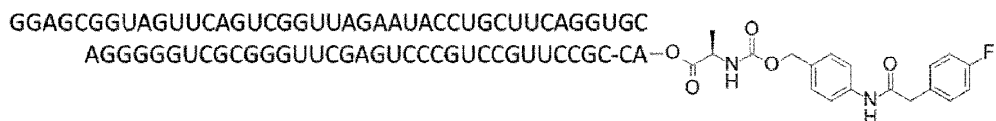
[0562] AAtR-132 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)uag



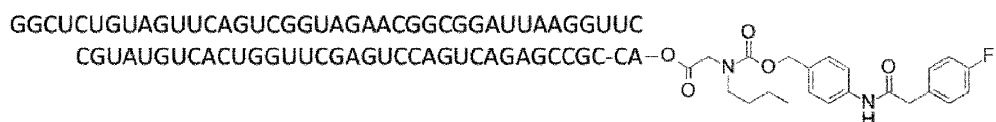
[0563] AAtR-133 SPh2Cl-tRNA(Asp1+Leu2)Lag



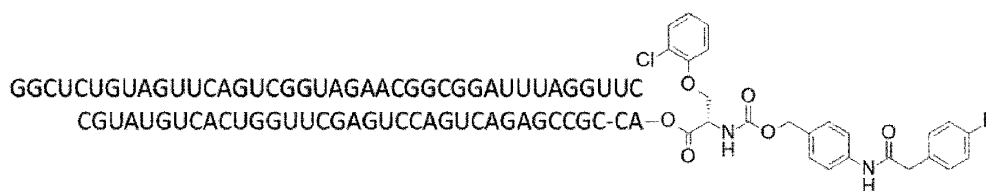
[0564] AAtR-134 dA-tRNA(Asp1+Leu2)cag



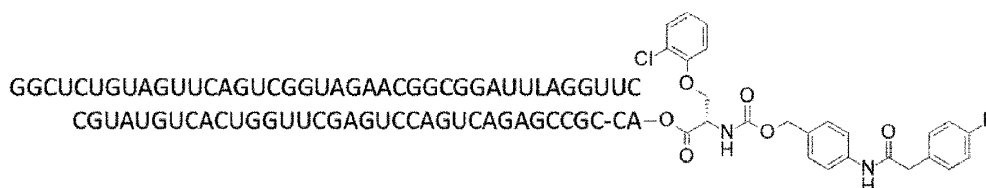
[0565] AAtR-135 nBuG-tRNA(AsnE2+Leu2)aag



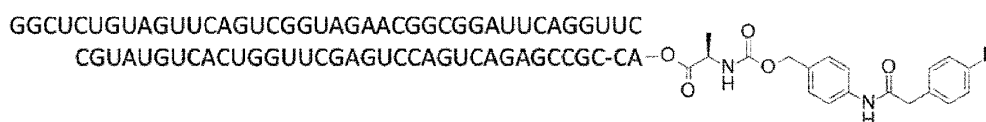
[0566] AAtR-136 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)uag



[0567] AAtR-137 SPh2Cl-tRNA(AsnE2+Leu2)Lag



[0568] AAtR-138 dA-tRNA(AsnE2+Leu2)cag

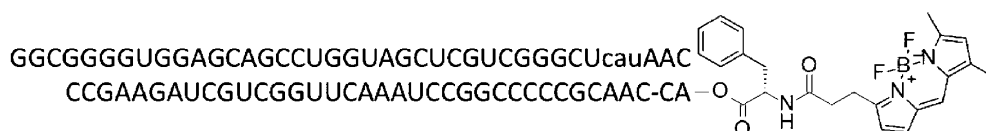


[0569] アミノアシルpCpAを用いた開始アミノアシルtRNAの調製

25 μ M 転写tRNA(fMet)cau-CA (TR-105)、50mM HEPES-KOH pH7.5、20mM MgCl₂、1mM ATP、0.6 Unit/ μ L T4 RNAリガーゼ (New England bio lab社)、0.25mM アミノアシルpCpA (MT01) となるように、ヌクレアーゼフリー水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。T4 RNAリガーゼ及びアミノアシルpCpAを加える前の反応液は、95°Cで2分間加熱後、室温で5分放置し、あらかじめ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0.3Mになるように加え、フェノール・クロロホルム抽出を行い、開始アミノアシルtRNA (AAtR-128) を調製した。AAtR-128はエタノール沈殿により回収し、翻訳混合物に添加する前に1mM酢酸ナトリウム水溶液に溶解した。

[0570] AAtR-128 BdpFL-Phe-tRNA(fMet)cau



実施例 5 mRNAの調製

鋳型DNA (MD-1～MD-8) 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 (MR-1～MR-8) を合成し、RNeasy mini kit (Qiagen社) により精製した。

[0571] 鋳型DNA 配列番号 : 221 (MD-1)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TcttATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[0572] 鋳型DNA 配列番号 : 222 (MD-2)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TctgATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[0573] 鋳型DNA 配列番号 : 223 (MD-3)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TcctATTATTGCTATTGGTTAAGCTTCG

[0574] 鋳型DNA 配列番号 : 224 (MD-4)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT
TccgATTATTGCTATTGGTTAAGCTTCG

[0575] 鋳型DNA 配列番号 : 225 (MD-5)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TggtATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[0576] 鋳型DNA 配列番号 : 226 (MD-6)

DNA配列 :

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT
TgggATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[0577] 鋳型DNA 配列番号 : 227 (MD-7)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTCTATT

TggaATTATTCCGATTCTATAAGCTTCG

[0578] 鋳型DNA 配列番号：228 (MD-8)

DNA配列：

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTTTATTATTGGTTT

TctaATTATTCCGATTGGTTAAGCTTCG

[0579] 鋳型mRNA 配列番号：229 (MR-1)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUcuuAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

[0580] 鋳型mRNA 配列番号：230 (MR-2)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUcugAUUAUCCGAUUGGUUA

AGCUUCG

[0581] 鋳型mRNA 配列番号：231 (MR-3)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUccuAUUAUUGCUAUUGGUUA

AGCUUCG

[0582] 鋳型mRNA 配列番号：232 (MR-4)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUGGUUUUccgAUUAUUGCUAUUGGUUA

AGCUUCG

[0583] 鋳型mRNA 配列番号：233 (MR-5)

RNA配列：

GGGUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUACAUAUGACUUUUAUUUUCUAUUUgguAUUAUCCGAUUCUAUA

AGCUUCG

[0584] 鋳型mRNA 配列番号：234 (MR-6)

RNA配列：

GGGUUAAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUAUGACUUUUUAUUAUUCUAAUUUgggAUUAUUCGGAUUCUAUA
AGCUUCG

[0585] 鋳型mRNA 配列番号：235 (MR-7)

RNA配列

GGGUUAAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUAUGACUUUUUAUUAUUCUAAUUUggaAUUAUUCGGAUUCUAUA
AGCUUCG

[0586] 鋳型mRNA 配列番号：236 (MR-8)

RNA配列：

GGGUUAAACUUUAAGAAGGAGAUUAACAUUAUGACUUUUUAUUAUUGGUUUUcuaAUUAUUCGGAUUGGUUA
AGCUUCG

[0587] 実施例 6 ペプチドの翻訳合成

実施例 6 - 1

tRNAの32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが翻訳の正確性に与える影響を評価するために、同一コドンボックス内の異なるコドンに対応するアンチコドンをもつ2種類の伸長アミノアシルtRNAの存在下で翻訳実験を行った。

具体的には、鋳型mRNA (MR-2) をアミノアシルtRNA (AA-tR-1～AA-tR-10のいずれかとAA-tR-105) を用い、鋳型mRNA (MR-1) をアミノアシルtRNA (AA-tR-11～AA-tR-20のいずれかとAA-tR-104) を用い、鋳型mRNA (MR-4) をアミノアシルtRNA (AA-tR-21～AA-tR-30のいずれかとAA-tR-107) を用い、鋳型mRNA (MR-3) をアミノアシルtRNA (AA-tR-31～AA-tR-40のいずれかとAA-tR-106) を用い、鋳型mRNA (MR-6) をアミノアシルtRNA (AA-tR-41～AA-tR-50のいずれかとAA-tR-109) を用い、鋳型mRNA (MR-5) をアミノアシルtRNA (AA-tR-51～AA-tR-60のいずれかとAA-tR-108) を用いて翻訳し、ペプチドを翻訳合成した。なお、本明細書において、「AA-tR」と「AATR」は同義に用いられる。すなわち、「AA-tR-105」と「AATR-105」は同じtRNAを表す。

[0588] 翻訳条件 1

アンチコドンaggを持つtRNAによるコドンCCGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。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（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）、0.24 μ Mもしくは0.26 μ M EF-G、0.24 μ M RF2、0.17 μ M RF3、0.5 μ M RRF、3.7 μ M もしくは4 μ g/mL クレアチンキナーゼ、2.8 μ M もしくは3 μ g/mL ミオキナーゼ、1.9unit/mLもしくは2unit/mL 無機ピロフォスファターゼ、1.0 μ g/mLもしくは1.1 μ g/mL ヌクレオシドニリン酸キナーゼ、2.5 μ M もしくは2.7 μ M IF1、0.37 μ M もしくは0.4 μ M IF2、1.4 μ M もしくは1.5 μ M IF3、37.2 μ M もしくは40 μ M EF-Tu、49 μ Mもしくは54.1 μ M もしくは54.9 μ M もしくは59 μ M EF-Ts、0.93 μ M もしくは1 μ M EF-P-Lys、0.4unit/ μ L RNasin（登録商標）Ribonuclease inhibitor（Promega社、N2111）、1.1 μ M もしくは1.2 μ M リボソーム、0.5mM PGA）に、ARS mix（0.09 μ M GlyRS、0.4 μ Mもしくは0.97 μ M IleRS、0.68 μ Mもしくは1.64 μ M PheRS、0.16 μ Mもしくは0.39 μ M ProRS、0.09 μ Mもしくは0.22 μ M ThrRS、2.73 μ M AlaRS、0.04 μ Mもしくは0.097 μ M LeuRS、0.04 μ M SerRS、0.02 μ M ValRSの内からmRNAにコードされているアミノ酸のARSを選択したもの）、1 μ M 鋳型mRNA（MR-4）、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、開始アミノアシルtRNA（AA-tR-128）を10 μ M、伸長アミノアシルtRNA（AA-tR-21～AA-tR-30の中からいずれか1つ、及びAA-tR-107）をそれぞれ10 μ Mになるように翻訳反応混合物に添加し、37℃で1時間静置し翻訳を行った。以下、この翻訳条件を「翻訳条件1」と呼ぶことがある。

翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly（配列番号：241（Pep-3）本明細書において、このようにアミノ酸をコロンで区切ってアミノ酸配列を表記することがある）が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによるコドンの読み間違いが起きる

とBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号 : 242 (Pep-4)) が翻訳される。

- [0589] アンチコドンcggを持つtRNAによるコドンCCUの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-3) 、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-31 ~AAtR-40の中からいずれか1つ、及びAAtR-106) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物としては、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号 : 241 (Pep-3)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号 : 242 (Pep-4)) が翻訳される。

- [0590] アンチコドンaccを持つtRNAによるコドンGGGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-6) 、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-41 ~AAtR-50の中からいずれか1つ、及びAAtR-109) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244 (Pep-6)) が翻訳される。

- [0591] アンチコドンcccを持つtRNAによるコドンGGUの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-5) 、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-51 ~AAtR-60の中からいずれか1つ、及びAAtR-108) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244 (Pep-6)) が翻訳される。

p-6)) が翻訳される。

- [0592] アンチコドンaagを持つtRNAによるコドンCUGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-2)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-1～AAtR-10の中からいずれか1つ、及びAAtR-105) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 240 (Pep-2)) が翻訳される。

- [0593] アンチコドンcagを持つtRNAによるコドンCUUの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-1)、伸長アミノアシルtRNA (AAtR-11～AAtR-20の中からいずれか1つ、及びAAtR-104) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 240 (Pep-2)) が翻訳される。

- [0594] 実施例 6 - 2

tRNAボディを変更し実施例 6 - 1 と同様の実験を行った。具体的には、鋳型mRNA (MR-2) をアミノアシルtRNA (AAtR-61～AAtR-70のいずれかとAAtR111) を用い、鋳型mRNA (MR-1) をアミノアシルtRNA (AAtR-71～AAtR-80のいずれかとAAtR-110) を用い、鋳型mRNA (MR-2) をアミノアシルtRNA (AAtR-81～AAtR-90のいずれかとAAtR-113) を用い、鋳型mRNA (MR-1) をアミノアシルtRNA (AAtR-91～AAtR-100のいずれかとAAtR-112) を用いて翻訳し、ペプチドを翻訳合成した。

- [0595] 翻訳条件

アンチコドンaagを持つtRNAによるコドンCUGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-2)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-81～AAtR-90の中からいずれか1つ、及びAAtR-113) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240 (Pep-2)) が翻訳される。

[0596] アンチコドンcagを持つtRNAによるコドンCUUの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-1)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-91～AAtR-100の中からいずれか1つ、及びAAtR-112) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240 (Pep-2)) が翻訳される。

[0597] アンチコドンaagを持つtRNAによるコドンCUGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-2)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-61～AAtR-70の中からいずれか1つ、及びAAtR-111) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240 (Pep-2)) が翻訳される。

[0598] アンチコドンcagを持つtRNAによるコドンCUUの読み間違いの量を評価する

翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-1)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-71～AAtR-80の中からいずれか1つ、及びAAtR-110)を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 239 (Pep-1)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号: 240 (Pep-2)) が翻訳される。

[0599] 実施例6-3

使用するコドンを変更して実施例6-1及び6-2と同様の実験を行った。具体的には、鋳型mRNA (MR-7)をアミノアシルtRNA (AAtR-44、AAtR-47又はAAtR-48のいずれかとAAtR-114)を用い、鋳型mRNA (MR-7)をアミノアシルtRNA (AAtR-101～AAtR-103のいずれかとAAtR-114)を用い、鋳型mRNA (MR-6)をアミノアシルtRNA (AAtR-101～AAtR-103のいずれかとAAtR-109)を用いて翻訳し、ペプチドを翻訳合成した。

[0600] 翻訳条件

アンチコドンaccを持つtRNAによるコドンGGAの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-7)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-44、AAtR-47及びAAtR-48の中からいずれか1つ、並びにAAtR-114)を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 244 (Pep-6)) が翻訳される。

[0601] アンチコドンgccを持つtRNAによるコドンGGAの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-7)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-101～AAtR-103の中からいずれか1つ、及びAAtR-114)を使用した以外は、前記

翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Me Hph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244 (Pep-6)) が翻訳される。

[0602] アンチコドンgccを持つtRNAによるコドンGGGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-6) 、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-101~AAtR-103の中からいずれか1つ、及びAAtR-109) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Me Hph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号 : 244 (Pep-6)) が翻訳される。

[0603] 実施例 6-4

アンチコドンの 1 文字目が修飾されたtRNA (アンチコドンの 1 文字目のヌクレオシドがライシジンであるtRNA) を用いて実施例 6-1 ~ 6-3 と同様の実験を行った。具体的には、鋳型mRNA (MR-1、MR-8、又はMR-2) をアミノアシルtRNA (AAtR-132若しくはAAtR-133のいずれかと、AAtR-131及びAAtR-134) 、又はアミノアシルtRNA (AAtR-136若しくはAAtR-137のいずれかと、AAtR-135及びAAtR-138) を用いた以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳し、ペプチドを翻訳合成した。以下の翻訳産物の翻訳量を比較した。

BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 250 (Pep-12))

BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 251 (Pep-13))

BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly (配列番号 : 252 (P

ep-14))

[0604] 実施例 6 - 5

アミノ酸を変更し実施例 6 - 1 ~ 6 - 4 と同様の実験を行った。具体的には、鋳型mRNA (MR-6) をアミノアシルtRNA (AAtR-115~AAtR-118のいずれかとAAtR-109、もしくはAAtR-119~AAtR-122のいずれかとAAtR-109、もしくはAAtR-123~AAtR-126のいずれかとAAtR-127) を用い、鋳型mRNA (MR-4) をアミノアシルtRNA (AAtR-21~AAtR-30のいずれかとAAtR-130) を用い、鋳型mRNA (MR-3) をアミノアシルtRNA (AAtR-31~AAtR-40のいずれかとAAtR-129) を用いて翻訳し、ペプチドを翻訳合成した。

[0605] 翻訳条件

アンチコドンaccを持つtRNAによるコドンGGGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-6)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-115~AAtR-118の中からいずれか1つ、及びAAtR-109) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Me Hph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 245 (Pep-7)) が翻訳される。

[0606] アンチコドンaccを持つtRNAによるコドンGGGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-6)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-119~AAtR-122の中からいずれか1つ、及びAAtR-109) を使用した以外は、前記翻訳条件 1 に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Me Hph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 243 (Pep-5)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 246 (Pep-8)) が翻訳される。

[0607] アンチコドンaccを持つtRNAによるコドンGGGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-6)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-123~AAtR-126の中からいずれか1つ、及びAAtR-127) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 247 (Pep-9)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu (配列番号: 248 (Pep-10)) が翻訳される。

[0608] アンチコドンaggを持つtRNAによるコドンCCGの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-4)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-21~AAtR-30の中からいずれか1つ、及びAAtR-130) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 249 (Pep-11)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPH2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 242 (Pep-4)) が翻訳される。

[0609] アンチコドンcggを持つtRNAによるコドンCCUの読み間違いの量を評価する翻訳実験を行った。鋳型mRNA (MR-3)、及び伸長アミノアシルtRNA (AAtR-31~AAtR-40の中からいずれか1つ、及びAAtR-129) を使用した以外は、前記翻訳条件1に従い翻訳を行った。

正しく読まれたときの翻訳産物として、BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 249 (Pep-11)) が翻訳されるように前記鋳型mRNAを設計した。アミノアシルtRNAによる読み間違いが起きるとBdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPH2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly (配列番号: 242 (Pep-4)) が翻訳される。

[0610] 実施例7 翻訳ペプチドの分析

実施例 6－1～6－5 の翻訳反応により得られた翻訳産物溶液を10倍希釈し、LC-FLR-MSの装置を用いて分析した。得られた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、別途記載がない限り定量評価は実施例 3 にて合成したLCT-67を標品とした検量線を作成し、相対定量により含有量を算出した。別途記載がない限りLC-MSは下記表 5 のMethod1の条件に従い分析した。また、求めたペプチド翻訳量に基づき、目的物に対する読み間違いペプチドの割合（％）を以下の式を用いて算出した。本明細書において、正しく読まれた際に得られるペプチドを、正しく読まれたときの翻訳産物や目的物と称することがある。

[数1]

$$\text{目的物に対する読み間違いペプチドの割合 (\%)} = \frac{\text{読み間違いが起きた際に得られるペプチドの翻訳量 (\mu M)}}{\text{正しく読まれた際に得られるペプチドの翻訳量 (\mu M)}} \times 100$$

[0611] 分析条件

[表5]

	Method1	Method2
装置	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof	Aquity UPLC-FLR-Xevo G2-XS Tof
カラム	waters BEHC18 (2.1x50mm, ϕ 1.7 μ m)	waters BEHC18 (2.1x100mm, ϕ 1.7 μ m)
移動相	A=0.1% FA with H ₂ O B=0.1% FA with CH ₃ CN	A=0.1% FA with H ₂ O B=0.1% FA with CH ₃ CN
グラジエント (%B)	0-0.2min=10% 0.2-3.6min=98% 3.6-4.0min=10%	0-0.4min=60% 0.4-9.0min=98% 9.0-10min=60%
流速 (ml/min)	0.5	0.5
カラム温度	40	40
蛍光測定波長 (Ex/Em)	491nm/515nm	491nm/515nm
Ms mode	ESI-	ESI-

[0612] 結果

評価した結果、32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせを改変したtRNAによるコドンの読み間違いの割合は、32、33、37及び38位の塩基の組み合わせが、Ser5配列、Ala1B配列、及びPhe配列の場合に増加し、Pro3配列、Pro2配列、Ala2配列、Leu2配列、Arg3配列及びVal2配列の場合に減少するという傾向にあった（図1～図6、表6～表11）。中でも、Pro3配列、Pro2配列、Ala2配列及びLeu2配列の場合に減少する傾向が大きかった。tRNA ボディを変更した場合についても、読み間違いの順位に影響はなかった（図7～図10、表12～表15）。評価するコドン、及びアンチコドンの組み合わせを変更した場合についても、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを特定のものに改変することによるコドンの読み間違いの低減効果が確認された（図11～図13、表16～表18）。アミノアシル化するアミノ酸を変更した場合についても、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを特定のものに改変することによる読み間違いの低減効果が確認された（図14～図18、表21～表25）。このことから、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変することにより、コドンの読み間違いを低減し得ることが示された。また、tRNAの32、33、37及び38位に関する複数の塩基の組み合わせについて、コドンの読み間違いの起こり易さが明らかになったことで、使用するtRNAに合わせて、アミノ酸の翻訳量を一定以上に保ちつつ、コドンの読み間違いを低減するようなtRNA配列のカスタマイズが可能となった。

[0613] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにagg又はcggを持つtRNAによる、CCGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AA_tR-24) と比較して、前記塩基の組み合わせをPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AA_tR-27～30) において、コドンの読み間違いの低減がみられた（図1）。

[0614]

[表6]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-21	MR-4	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.58
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.75
AATR-22		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.51
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.66
AATR-23		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.58
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-24		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.36
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.93
AATR-25		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.48
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.19
AATR-26		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.44
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.15
AATR-27		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.32
AATR-28		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.41
AATR-29		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.11
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.89
AATR-30		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.11
AATR-107		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.60

[0615] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにcgg又はaggを持つtRNAによる、CCUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AATR-34)と比較して、前記塩基の組み合わせをPhe配列、Arg3配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR33及びAATR35~40)において、コドンの読み間違いの低減がみられ、特にPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減効果が高かった(図2)。

[0616]

[表7]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-31	MR-3	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.44
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.96
AATR-32		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.39
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.70
AATR-33		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-34		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.32
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-35		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.21
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.94
AATR-36		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.40
AATR-37		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.13
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.42
AATR-38		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.14
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.68
AATR-39		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.07
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	3.00
AATR-40		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.06
AATR-106		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.60

[0617] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにacc又はcccを持つtRNAによる、GGGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AATR-44)と比較して、前記塩基の組み合わせをArg3配列、Phe配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR-43及びAATR-45～50)において、コドンの読み間違いの低減がみられ、特にPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減効果が高かった(図3)。

[0618]

[表8]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-41	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.91
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.51
AATR-42		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.68
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.48
AATR-43		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.57
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.29
AATR-44		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.77
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.79
AATR-45		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.58
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.31
AATR-46		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.34
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.53
AATR-47		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.05
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.23
AATR-48		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.68
AATR-49		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.08
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.15
AATR-50		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	3.23

[0619] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにccc又はaccを持つtRNAによる、GGUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AATR-54) においてもコドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低かったものの、前記塩基の組み合わせをPhe配列、Ala1B配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、Pro3配列、Arg3配列、又はVal2配列に改変したtRNA (AATR-52、AATR-53及び、AATR-55～60) においても、コドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低く保たれており、上記実施例と同様の傾向がみられた(図4)。

[0620]

[表9]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-51	MR-5	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.15
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.54
AATR-52		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.43
AATR-53		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.97
AATR-54		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.40
AATR-55		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.57
AATR-56		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.22
AATR-57		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.01
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.39
AATR-58		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.63
AATR-59		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.71
AATR-60		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-108		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	2.55

[0621] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにcag又はaagを持つtRNAによる、CUGコドンの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AATR-4)と比較して、前記塩基由来の組み合わせをPro2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR-8及び9)において、コドンの読み間違いの低減がみられ、Ala2配列においてもコドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低く保たれた(図5)

。

[表10]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-1	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.28
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.85
AATR-2		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.35
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.86
AATR-3		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.26
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.92
AATR-4		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62
AATR-5		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.80
AATR-6		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.17
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.82
AATR-7		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.56
AATR-8		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.06
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	2.27
AATR-9		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.05
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.85
AATR-10		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-105		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.67

[0622] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにaag又はcagを持つtRNAによる、CUUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA Glu2 (AATR-14) においてもコドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低かったものの、前記塩基由来の組み合わせをPhe配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、Pro3配列、Arg3配列、又はVal2配列に改変したtRNA (AATR-13及び、AATR-15～20) においても、コドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低く保たれており、上記実施例と同様の傾向がみられた(図6)。

[0623]

[表11]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-11	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.61
AATR-12		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.10
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62
AATR-13		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.74
AATR-14		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.51
AATR-15		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.56
AATR-16		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.48
AATR-17		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.54
AATR-18		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.65
AATR-19		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.94
AATR-20		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-104		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.62

[0624] これらの結果から、tRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせがSer5配列やAla1B配列の場合に、目的物に対する読み間違いペプチドの割合が高いことが示された。前記塩基の組み合わせとしてSer5配列を有するtRNAに対して、32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変することによって、コドンの読み間違いを低減できるかを検証するために以下の実験を行った。

[0625] 32、33、37及び38位の塩基の組み合わせがSer5配列であるtRNAとして、tRNA AsnE2を選択した。tRNA(AsnE2)ボディを持ち、32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにaag又はcagを持つtRNAによる、CUGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA(AsnE2) (AATR-81)と比較して、前記塩基由来の組み合わせをArg3配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR-85~90)において、コドンの読み間違いの低減がみられ、特にPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減効果が高かった(図7)。

[表12]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-81	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.69
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.60
AATR-82		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.77
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.58
AATR-83		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.63
AATR-84		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.71
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.59
AATR-85		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.63
AATR-86		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.65
AATR-87		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.19
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.64
AATR-88		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.30
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.57
AATR-89		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.61
AATR-90		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-113		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.70

[0626] tRNA(AsnE2)ボディを持ち、32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにcag又はaagを持つtRNAによる、CUUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA(AsnE2) (AATR-91)と比較して、前記塩基由来の組み合わせをArg3配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR-95~100)において、コドンの読み間違いの低減がみられ、特にPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減効果が高かった(図8)。

[0627]

[表13]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-91	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.36
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.69
AATR-92		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.49
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.65
AATR-93		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.40
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.68
AATR-94		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.39
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.66
AATR-95		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.74
AATR-96		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.14
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.74
AATR-97		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.05
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.79
AATR-98		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84
AATR-99		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.83
AATR-100		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-112		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.84

[0628] 以上の結果から、コドンの読み間違いを生じやすいtRNAであっても、32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変することで、コドンの読み間違いを低減することができることが示された。

[0629] 他のtRNAボディにおけるコドンの読み間違い低減効果を検証した。tRNA(Asp1)ボディを持ち、32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにaag又はcagを持つtRNAによる、CUGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA(Asp1)(AATR-64)と比較して、前記塩基由来の組み合わせをArg3配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA(AATR-65~70)において、コドンの読み間違いの低減がみられた(図9)。

[0630]

[表14]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-61	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.52
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-62		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.48
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.33
AATR-63		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.35
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.42
AATR-64		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.27
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.40
AATR-65		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.22
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-66		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.29
AATR-67		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.22
AATR-68		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.28
AATR-69		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.23
AATR-70		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-111		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.33

[0631] tRNA(Asp1)ボディを持ち、32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにcag又はaagを持つtRNAによる、CUUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせを改変していないtRNA(Asp1) (AATR-74) においてもコドンの読み間違いによるペプチド翻訳量は低かったものの、前記塩基由来の組み合わせをPhe配列、Val2配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNA (AATR-76～80) においてもコドンの読み間違いが低減されており、上記実施例と同様の傾向がみられた(図10)。

[0632]

[表15]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-71	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.12
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.44
AATR-72		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.11
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.45
AATR-73		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.40
AATR-74		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.38
AATR-75		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.09
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-76		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-77		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.07
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.29
AATR-78		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.37
AATR-79		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.30
AATR-80		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.08
AATR-110		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	1.26

[0633] 上記の実施例で用いたコドンとは3文字目の塩基が異なるコドンを使用した場合の読み間違い低減効果を検証した。32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにucc又はaccを持つtRNAによる、GGAコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。アンチコドンaccを持つtRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列又はPro3配列に改変したところ、コドンGGAの読み間違いが低減された(図11)。

[0634] [表16]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-44	MR-7	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.55
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.79
AATR-47		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.14
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.20
AATR-48		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.15
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.35

[0635] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにucc又はgccを持つtRNAによる、GGAコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。アンチコドンgccを持つtRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列又はPro3配列に改変したところ、コドンGGAの読み間違いが低減された(図12)。

[0636]

[表17]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-101	MR-7	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.87
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.97
AATR-102		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.16
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.05
AATR-103		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.24
AATR-114		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.18

[0637] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにccc又はgccを持つtRNAによる、GGGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。アンチコドンgccを持つtRNAの32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列又はPro3配列に改変したところ、コドンGGGの読み間違いが低減された(図13)。

[0638] [表18]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-101	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.22
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.38
AATR-102		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.13
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.47
AATR-103		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.12
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.46

[0639] 以上の結果から、コドンの3文字目の塩基の種類によらず、コドンの読み間違い低減効果が認められることが示された。このことは、コドンボックス内のいずれのコドンを採用する場合であっても、本開示によるコドンの読み間違い低減効果が得られることを示すものである。異なる種類のアミノ酸を同一コドンボックス内に複数割り当てるようにコドンのリプログラミングする際、使用するコドンにかかわらず本開示における効果が得られることは、リプログラミングの自由度を高めることができ有益である。

[0640] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにaag、uag又はcagを持つtRNAによる、CUU、CUA又はCUGコドンの読み分け評価をライシジン修飾有無の条件で行った。tRNAボディとしてtRNA(Asp1+Leu2)及びtRNA(AsnE2+Leu2)を使用した。翻訳結果を下表に示した。tRNAに対する修飾技術と組み合わせ可能であることが示された。なお、定量評価はLCT-12を標品とした検量線を作成し、相対定量により含有量を算出した。LC-MSは表5のMethod2条件に従い分析した。

[0641] [表19]

アミノアシル tRNA	鋳型 mRNA 配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
AATR-131	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.14
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.04
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-131	MR-8	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.16
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.39
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.03
AATR-131	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-132		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.13
AATR-131		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-133		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-134		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.15

[0642]

[表20]

アミノアシル tRNA	鋳型 mRNA 配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量 (μ M)
AATR-135	MR-1	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.18
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.22
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.26
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-135	MR-8	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.45
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.01
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.64
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.02
AATR-135	MR-2	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-136		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.12
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.34
AATR-135		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-137		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.00
AATR-138		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Gly	0.45

[0643] アミノ酸の種類を変えて、コドンの読み間違い低減効果を検証した。32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにacc又はcccを持つtRNAによる、GGGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減がみられた（図14）。

[0644] [表21]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-115	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.56
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.47
AATR-116		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.06
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.24
AATR-117		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.08
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.37
AATR-118		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:Pic2:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.07
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.18

[0645] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにacc

又はcccを持つtRNAによる、GGGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減がみられた（図15）。

[0646] [表22]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-119	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.28
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.95
AATR-120		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.16
AATR-121		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.04
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.29
AATR-122		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-109		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:MeHph:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	1.11

[0647] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにacc又はcccを持つtRNAによる、GGGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをLeu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減がみられた（図16）。

[0648] [表23]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-123	MR-6	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.28
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.94
AATR-124		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.03
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.81
AATR-125		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.05
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.95
AATR-126		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:dA:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.02
AATR-127		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Leu:Phe:nBuG:Ile:Ile:Pro:Ile:Leu	0.88

[0649] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにcgg又はaggを持つtRNAによる、CCGコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、又はPro3配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減がみられた（図17）。

[0650]

[表24]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-21	MR-4	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.57
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.37
AATR-22		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.43
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.94
AATR-23		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.53
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-24		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.32
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.14
AATR-25		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.27
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.72
AATR-26		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.36
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.45
AATR-27		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.18
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.04
AATR-28		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.25
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.50
AATR-29		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.12
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.59
AATR-30		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.10
AATR-130		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.07

[0651] 32、33、37、及び38位の塩基の組み合わせが改変され、アンチコドンにagg又はcggを持つtRNAによる、CCUコドンの読み分けの翻訳結果を下表に示した。32、33、37及び38位の塩基の組み合わせをPhe配列、Pro2配列、Leu2配列、Ala2配列、Pro3配列、Arg3配列又はVal2配列に改変したtRNAにおいて、コドンの読み間違いの低減がみられ、中でもPro2配列、Leu2配列、Ala2配列、及びPro3配列においてその効果が顕著であった(図18)。

[0652] [表25]

アミノアシルtRNA	鋳型mRNA配列	翻訳ペプチド化合物	翻訳量(μ M)
AATR-31	MR-3	BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.35
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.15
AATR-32		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.33
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.90
AATR-33		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.26
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.41
AATR-34		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.22
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.92
AATR-35		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.19
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.26
AATR-36		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.18
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.07
AATR-37		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.09
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.05
AATR-38		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.09
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.24
AATR-39		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.07
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	2.38
AATR-40		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:SPh2Cl:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	0.06
AATR-129		BdpF:Thr:Phe:Ile:Ile:Gly:Phe:MeG:Ile:Ile:Ala:Ile:Gly	1.99

[0653] 以上の結果から、tRNAに結合しているアミノ酸の種類を変えても同様の効果が得られることが示された。よって、tRNAに結合しているアミノ酸の種類によらず、また、アミノ酸の組み合わせによらず、コドンの読み間違い低減効果が得られることが示された。

[0654] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例及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及び例示は、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及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

[0655] 本開示における翻訳用組成物およびペプチドの製造方法等を使用することにより、ペプチドを核酸から翻訳して合成する際に、tRNAによるコドンの読み間違いに起因して意図しないアミノ酸が誤って翻訳されてしまう割合を低減することができる。本開示における組成物および方法等は、特にペプチドの翻訳合成の分野において有用である。