

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104210 A1

(51) 国際特許分類: C12P 21/00, C12N 15/09

式会社 (NIPPON SANSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058442 東京都港区西新橋 1 丁目 1 6 番 7 号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007314

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 21 日 (21.05.2004)

(72) 発明者; および

(25) 国際出願の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 22 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 木川 隆則 (KIGAWA, Takanori) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 22 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 中島 理恵 (NAKAJIMA, Rie) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 22 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 田仲 昭子 (TANAKA, Akiko) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 22 号 独立行政法人

(26) 国際公開の言語: 日本語

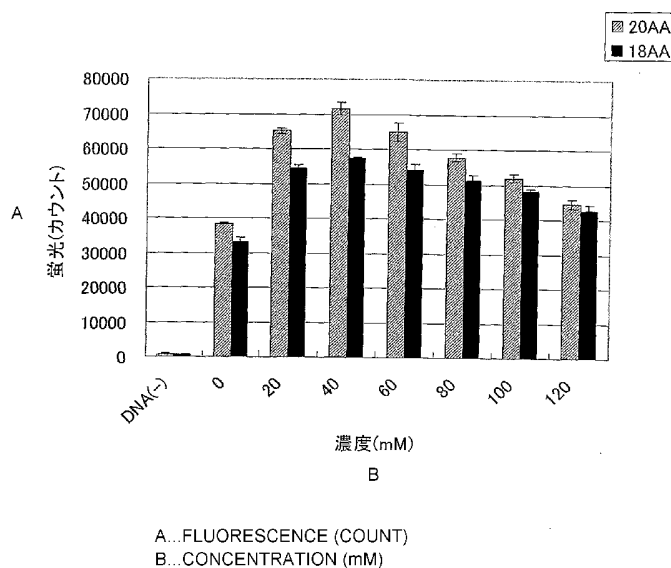
(30) 優先権データ:
特願2003-145390 2003 年 5 月 22 日 (22.05.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 日本酸素株

/ 続葉有 /

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN BY CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM AND PROTEIN SYNTHESIS REAGENT KIT

(54) 発明の名称: 無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法及びタンパク質合成用試薬キット



(57) Abstract: It is intended to provide a process for economically and quickly producing an isotope-labeled protein which is usable as a sample in NMR for analyzing protein stereostructures. A process for producing a protein characterized in that a protein is synthesized in a cell-free protein synthesis system by using as a substrate an amino acid mixture containing up to 19 amino acids selected from the group consisting of alanine, arginine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine, asparagine and glutamine.

(57) 要約: 本発明は、タンパク質立体構造解析のためのNMR測定試料となる同位体標識タンパク質を安価にかつ迅速に製造する方法を提供することを目的する。 本発明は、無細胞タンパク質合成

/ 続葉有 /



WO 2004/104210 A1



理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 横山 順 (YOKOYAMA, Jun) [JP/JP]; 〒1058442 東京都港区西新橋1丁目16番7号 日本酸素株式会社内 Tokyo (JP). 深井 義久 (FUKAI, Yoshihisa) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 松本 武久 (MATSUMOTO, Takehisa) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,

NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

系においてアラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質を合成することを特徴とするタンパク質の製造方法である。

明 細 書

無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法及びタンパク質合成用試薬キット

技術分野

本発明は、無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法、詳しくは無細胞タンパク質合成系において多くとも19種類のアミノ酸を含むアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質を合成することを特徴とするタンパク質、特に安定同位体標識タンパク質の製造方法、ならびにその方法を実施するためのタンパク質合成用試薬キットに関する。

背景技術

無細胞タンパク質合成系は、細胞抽出液を用いて試験管内でタンパク質を合成する系である。無細胞タンパク質合成系はDNA断片をそのまま発現の鋳型として利用できるため、従来の大腸菌、酵母、培養細胞などの生細胞を用いる発現系に必要とされた、目的タンパク質遺伝子のベクターへのライゲーション、トランスフォーメーション、培養、集菌、溶菌といった時間と手間のかかる工程が一切不要となり、短時間で容易にタンパク質を発現することができる。

近年、ゲノムにコードされたタンパク質の構造や機能を網羅的に解明しようとする、いわゆる構造・機能ゲノム科学研究が急速に発展し始め、解析対象とすべきタンパク質の数は飛躍的に多くなった。このために、多数のタンパク質試料を迅速に調製できる、ハイスループットなタンパク質発現系が必要となっており、その意味でも無細胞タンパク質合成系に対する注目が集まっている。

これまで、無細胞タンパク質合成系においては、タンパク質合成に必要なアミノ酸基質としてタンパク質を構成する20種類のアミノ酸を使用している（特開2000-175695号、特開2002-125698号など参照）。しかしながら、NMR法によるタンパク質の立体構造解析用試料を作成するためには安定同位体標識アミノ酸を用いなければならず、コストが高くなるという問題がある。特に、NMR測定用試料に用いられるAlgal由来の標識化アミノ酸のうち、システイン（Cys）、ト

リプトファン (Trp)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) はアミノ酸加水分解の過程で脱落してしまうために補充しなければならず、またこれらのアミノ酸は他のアミノ酸に比べて高いのでコストが上がる原因になっている。

これまで安定同位体標識タンパク質を製造した例としては、同位体標識アンモニウム塩の存在下でトランスグルタミナーゼなどの酵素をタンパク質に作用させ、タンパク質のアミノ酸残基の官能基を同位体標識アンモニウム塩に由来する同位体標識基で置換することによって標識する方法 (特開 2002-332295 号)、 ^{13}C 、 ^{15}N などの安定同位体で標識された標識アミノ酸を基質とし、アミノ酸生合成系・アミノ酸代謝系などのタンパク質合成系以外の酵素活性を低下させた無細胞タンパク質合成系において安定同位体標識タンパク質を製造する方法 (特許第 3145431 号) がある。しかしながら、前者は、タンパク質合成後にタンパク質のアミノ酸残基に酵素を作用させて同位体標識する方法であるが、そもそも利用する酵素触媒反応が本願発明のものとは異なり、またこの方法では酵素と接触する位置に存在するアミノ酸は標識されても、タンパク質の内側や、また表面部分でもポケットの内部に位置するようなアミノ酸については標識することができない。また後者はアミノ酸基質として 20 種類のアミノ酸を使用しており、また特定のアミノ酸を特異的に標識することについては何ら検討されていない。

従って、本発明の目的は、タンパク質、特に NMR 測定用試料となる安定同位体標識タンパク質を安価に製造するための方法及びタンパク質合成用試薬キットを提供することにある。

発明の開示

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、アスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) がアスパラギン酸 (Asp) 及びグルタミン酸 (Glu) からそれぞれ代謝・生成されることに着目し、無細胞タンパク質合成系においてアスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) を含まない 18 種類のアミノ酸を用いてタンパク質の合成を行ったところ、20 種類のアミノ酸を用いたときと同等な活性を有するタンパク質を合成できることを見出した。また、同時に、 ^{15}N にて標識したアンモニウム塩を無細胞タンパク質合成系に添加すると、アス

パラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) を入れなくてもアスパラギン酸 (Asp) 及びグルタミン酸 (Glu) からそれぞれ代謝・生成されたアスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) の側鎖を特異的に標識でき、また非標識のアンモニウム塩を用いれば、アスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) の側鎖を標識させずに所望のアミノ酸の主鎖のみを標識できることを見出した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

- (1) 無細胞タンパク質合成系において、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質を合成することを特徴とする、タンパク質の製造方法。
- (2) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、(1)に記載の方法。
- (3) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、(1)に記載の方法。
- (4) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、(1)に記載の方法。
- (5) 無細胞タンパク質合成系に、アンモニウム塩を添加することを特徴とする、(1)～(4)のいずれかに記載の方法。
- (6) アンモニウム塩を20～120mMの最終濃度となるように添加することを特徴とする、(5)に記載の方法。

- (7) アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、(5) 又は (6) に記載の方法。
- (8) 無細胞タンパク質合成系において安定同位体標識タンパク質を製造する方法であって、該系にアンモニウム塩を添加し、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも 19 種類含むアミノ酸混合物を基質として用い、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも 1 種が安定同位体で標識されていることを特徴とする、上記方法。
- (9) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、(8) に記載の方法。
- (10) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、(8) に記載の方法。
- (11) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、(8) に記載の方法。
- (12) アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、(8) ~ (11) のいずれかに記載の方法。
- (13) 以下の成分：
- (a) アンモニウム塩
- (b) アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、

アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも 19 種類含むアミノ酸混合物

(c) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液

を含み、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも 1 種が安定同位体で標識されていることを特徴とする、安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット。

(14) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、(13)に記載のキット。

(15) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、(13)に記載のキット。

(16) アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、(13)に記載のキット。

(17) アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、(13)～(16)のいずれかに記載のキット。

図面の簡単な説明

図 1 は、20 種類のアミノ酸混合物、又は 18 種類のアミノ酸混合物を基質として用いて無細胞系タンパク質合成によってそれぞれ得られた CAT タンパク質量の比較を示す。

図 2 は、酢酸アンモニウムの添加濃度とタンパク合成量との関係を示す。

図 3 は、本発明方法（透析法）にて調製した標識 Ras タンパク質精製試料の ^{15}N HSQC スペクトルを示す。

図 4 は、20 種類の ^{15}N 標識アミノ酸を用いて透析法にて調製した均一 ^{15}N 標識

Ras タンパク質の ^{15}N HSQC スペクトルを示す。

図 5 は、20 種類のアミノ酸混合物、又は 18 種類のアミノ酸混合物を基質として用い、種々の濃度の酢酸アンモニウム存在下で無細胞系タンパク質合成によってそれぞれ得られた GFP タンパク質量の比較を示す。

図 6 は、20 種類のアミノ酸混合物、又は 18 種類のアミノ酸混合物 (Asp, Glu 濃度を増量) を基質として用い、種々の濃度の酢酸アンモニウム存在下で無細胞系タンパク質合成によってそれぞれ得られた GFP タンパク質量の比較を示す。

図 7 A は、20 種類のアミノ酸混合物、又は 18 種類のアミノ酸混合物 (Asp, Glu 濃度を増量) を基質として用い、60mM 酢酸アンモニウム濃度下で無細胞系タンパク質合成した GFP タンパク質をイムノブロット法により検出した結果を示す (レーン 1 : pQBI T7-GFP 無添加 (20 種類のアミノ酸混合物による合成のコントロール)、レーン 2 : pQBI T7-GFP 無添加 (18 種類のアミノ酸混合物による合成のコントロール)、レーン 3 : 20 種類のアミノ酸混合物による合成、レーン 4 : 18 種類のアミノ酸混合物による合成)。

図 7 B は、20 種類のアミノ酸混合物、又は 18 種類のアミノ酸混合物 (Asp, Glu 濃度を増量) を基質として用い、60mM 酢酸アンモニウム濃度下で無細胞系タンパク質合成した Ras タンパク質をイムノブロット法により検出した結果を示す (レーン 1 : pK7-NHis-Ras 無添加 (20 種類のアミノ酸混合物による合成のコントロール)、レーン 2 : pK7-NHis-Ras 無添加 (18 種類のアミノ酸混合物による合成のコントロール)、レーン 3 : 20 種類のアミノ酸混合物による合成、レーン 4 : 18 種類のアミノ酸混合物による合成)。

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2003 年 5 月 22 日に出願された日本国特許出願 2003-145390 号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

1. 無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の製造方法

本発明によれば、無細胞タンパク質合成系において、多くとも19種類のアミノ酸を含むアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質を合成することを特徴とするタンパク質の製造方法が提供される。

本発明における「無細胞タンパク質合成系」とは、mRNAの情報を読み取ってリボソーム上でタンパク質を合成する無細胞翻訳系、DNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系と無細胞翻訳系の両者を包含する。

本発明における「タンパク質」とは、複数のアミノ酸残基から構成される任意の分子量のポリペプチドをいい、特にポリペプチドが立体構造を形成したものをいう。

本発明において「アミノ酸混合物」とは、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物をいい、具体的には、上記のアミノ酸群からグルタミンを除いた19種類のアミノ酸混合物、アスパラギンを除いた19種類のアミノ酸混合物、グルタミン、アスパラギンを除いた18種類のアミノ酸混合物などをいう。なお、本明細書において全てのアミノ酸はL体のアミノ酸をいう。また、タンパク質を構成する上記のアミノ酸群（20種類）以外の非天然型アミノ酸は、上記の「アミノ酸混合物」には含まれないが、これらを本合成系に添加することもできる。

本発明の無細胞タンパク質合成系によるタンパク質製造は、アミノ酸基質として上記のアミノ酸混合物を用いる以外は、従来から知られる無細胞タンパク質合成のための材料、すなわち無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、目的タンパク質をコードする鋳型となる核酸、エネルギー源（ATP、GTP、クレアチンホスフェート等の高エネルギーリン酸結合含有物）等を用いて行うことができる。

「無細胞タンパク質合成用細胞抽出液」とは、リボソーム、tRNAなどのタンパク質インビオ合成に関与する翻訳系又は転写系／翻訳系に必要な成分を含む植物細胞、動物細胞、真菌細胞、細菌細胞からの抽出液をいう。具体的には、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網赤血球、マウスL細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、

HeLa細胞、CHO細胞、出芽酵母等の抽出液が挙げられる。細胞抽出液の調製は、例えば Pratt, J.M. ら、Transcription and translation-a practical approach (1984)、pp. 179-209 に記載の方法に従い、上記細胞をフレンチプレスやガラスビーズにて破碎し、タンパク質成分やリボソームを可溶化するための数種類の塩を含有する緩衝液を加えてホモジナイズし、遠心分離にて不溶成分を沈殿させることによって行うことができる。

好ましい細胞抽出液としては大腸菌 S30 細胞抽出液を例示することができる。当該 S30 細胞抽出液は、大腸菌 A19 株 (rna, met) から既知の方法 (Zubay ら (1973) Ann. Rev. Genet. 7:267-287) により調製することができ、また市販品 (Promega 社や Novagen 社からも入手可能) を用いてもよい。

上記無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の量は、特に限定されないが、例えば、反応液全体の 10~40 重量%の範囲が好ましい。

「目的タンパク質をコードする核酸」は、当該目的タンパク質をコードし、転写及び／又は翻訳され得る適切な配列を含むものであれば特に限定されず、RNA、mRNA、DNA、cDNAのいずれをも含む。DNAを使用する場合、RNAポリメラーゼなどを必要とする転写反応が必要となり、収量が低下することから大量合成を必要とする場合は、mRNAを用いることが好ましい。目的タンパク質をコードするDNA又はRNAは、真核又は原核生物の細胞若しくは組織からゲノムDNA、mRNAとして周知の方法（フェノール／クロロホルム処理、エタノール沈殿、塩化セシウム密度勾配遠心など）で得るか、又は、cDNAクローニングで合成・単離することができる。あるいは、目的タンパク質のアミノ酸配列又はそれをコードするヌクレオチド配列が判明している場合には、DNA合成機を用いて化学的に合成することもできる。

上記核酸の無細胞タンパク質合成用反応液（以下、反応液ともいう）への添加濃度は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成活性、合成するタンパク質の種類等によって適宜設定することができるが、例えば、通常 0.1~10nM 程度とされる。

上記無細胞タンパク質合成系におけるエネルギー源は、生体内でエネルギー源として利用される物質であれば特に限定はされないが、好ましくはATP、GTP

P、クレアチンリン酸等の高エネルギーリン酸結合を有する物質が挙げられる。また、当該エネルギー源の反応液への添加濃度は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成活性、合成するタンパク質の種類等によって適宜設定することができる。

本発明においては、タンパク質合成能を向上させる上で、無細胞タンパク質合成系にアンモニウム塩を添加することが好ましい。

アンモニウム塩としては、例えば酢酸アンモニウム、安息香酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、塩化アンモニウム等が挙げられるが、酢酸アンモニウムが好ましい。アンモニウム塩の反応液への添加濃度は、20～120mM、好ましくは20～100mM、より好ましくは40～80mMである。

上記反応液には、必要に応じて、ATP再生に関与する酵素（例えば、ホスホエノールピルベートとピルビン酸キナーゼの組み合わせ又はクレアチンホスフェートとクレアチンキナーゼの組み合わせ）、各種のRNAポリメラーゼ（T7、T3、及びSP6 RNA polymerase等）、タンパク質の三次元構造を形成する働きを持つシャペロンタンパク質類（例えば、DnaJ、DnaK、GroE、GroEL、GroES及びHSP70等）を添加してもよい。

また、上記反応液には、必要に応じて、非タンパク質性成分を補強することができる。非タンパク質性成分とは、もともと無細胞タンパク質合成用細胞抽出液中に含まれている成分であるが、別途添加することでタンパク質合成能を向上させることができる成分であり、例えばtRNAが挙げられる。

さらに、上記反応液は、必要に応じて、タンパク質やRNAの保護及び／又は安定化のための各種の添加剤を含有させてもよい。当該添加剤としては、例えば、リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）阻害剤（胎盤RNaseインヒビター等）；還元剤（ジチオトレイトール等）；RNA安定化剤（スperlミジン等）；プロテアーゼ阻害剤（フェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）等）などが挙げられる。これらの反応液への添加濃度は、使用する無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成活性、合成する目的タンパク質の種類等に応じて適宜設定すればよい。

無細胞タンパク質合成には、従来から知られているバッチ法、透析法のいずれ

の方法を用いてもよい。

例えば、バッチ法を用いる場合、反応液には目的タンパク質をコードする核酸（好ましくは mRNA）、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、目的タンパク質の構成材料となる前記のアミノ酸混合物、ATP（アデノシン 5'-三リン酸）、GTP（グアノシン 5'-三リン酸）、CTP（シチジン 5'-三リン酸）、UTP（ウリジン 5'-三リン酸）、緩衝液、塩類、RNアーゼ阻害剤、抗菌剤のほか、必要により T7 RNA ポリメラーゼなどの RNA ポリメラーゼ（DNA を鋳型として用いる場合）、tRNA などを含むことができる。その他、ATP 再生系としてホスホエノールピルベートとピルビン酸キナーゼの組み合わせ又はクレアチンホスフェートとクレアチンキナーゼの組み合わせ、ポリエチレングリコール（例えば # 8000）、3', 5'-cAMP、葉酸類、還元剤（例えばジチオトレイトール）などを含むことができる。

ここで、緩衝液としては、例えば Hepes-KOH、Tris-OAc のような緩衝剤が使用できる。塩類としては、例えば酢酸マグネシウム、塩化マグネシウム、酢酸カリウム、塩化カルシウムなどを用いることができ、抗菌剤としては、例えばアジ化ナトリウム、アンピシリンなどを用いることができる。

反応条件は、使用する無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、合成する目的タンパク質等によって適宜設定すればよいが、温度は通常 20~40℃、好ましくは 23~37℃であり、時間は通常 1~5 時間、好ましくは 3~4 時間である。

また、透析法を用いて連続的に目的タンパク質を製造する場合、上記バッチ式の反応液を透析内液とし、反応液の 5~10 倍容量の透析外液に対して透析を行い、生成した目的タンパク質を透析内液又は透析外液から回収する。透析外液は、透析内液組成から無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、RNアーゼ阻害剤、目的タンパク質をコードする核酸、RNA ポリメラーゼを除いたものが使用できる。従って、透析外液は、例えば、緩衝液、ATP、GTP、CTP、UTP、塩類、目的タンパク質の構成材料となる前記のアミノ酸混合物、ATP 再生系としてホスホエノールピルベートとピルビン酸キナーゼ、抗菌剤などを含んでいればよい。

透析内液と透析外液を隔てる透析膜の分画分子量は、3,500~100,000、好ましくは 10,000~50,000 である。透析は、通常 20~40℃、好ましくは 23~37℃にて

攪拌しつつ行い、定期的（通常 24 時間毎）に新しい外液と交換する。また、新たな核酸（好ましくは mRNA）を定期的（通常 24 時間毎）に反応液に補給してもよい。透析外液は反応速度が低下した時点で新鮮なものと交換することが望ましい。

透析は、透析膜を介して内液と外液とを隔離して含む振とう若しくは攪拌（回転攪拌など）可能な透析装置を用いて行うことができる。小スケール反应用装置としては、例えば DispoDialyzer（登録商標）（Spectrum 社製）や Slidealyzer（登録商標）（Pierce 社製）等を用いることができる。また、大スケール反应用装置としては、Spectra/Por（登録商標）透析用チューブ（Spectrum 社製）等を用いることができる。また、振とう速度若しくは攪拌速度は低速、例えば 100～200rpm とし、反応時間は目的タンパク質の生成を監視しながら適当に選択することができる。

合成したタンパク質の精製は、生細胞からの分離と比べて混在する汚染物質の量及び種類が格段に少ないため、比較的容易に行うことができる。精製法としては、例えば硫酸アンモニウム若しくはアセトン沈殿、酸抽出、アニオン若しくはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト、等電点クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング等が挙げられ、精製はこれらの方法を当該タンパク質の性質に応じて単独に又は適宜組み合わせて行うことができる。また、当該タンパク質に予めタグと呼ばれるペプチド配列を付加させておき、タグを特異的に認識し吸着することを利用したアフィニティー精製法を用いることができる。当該精製法は、高純度のタンパク質を得る上で特に好ましい。当該タグとしては特に限定されないが、6×ヒスチジンタグ（6×His）、GST タグ及びマルトース結合性タグ等が一般的である。

以上のようにして合成・精製されたタンパク質の同定及び定量は、活性測定、免疫学的測定、分光学的測定、アミノ酸分析などによって、必要に応じて標準サンプルと比較しながら行うことができる。

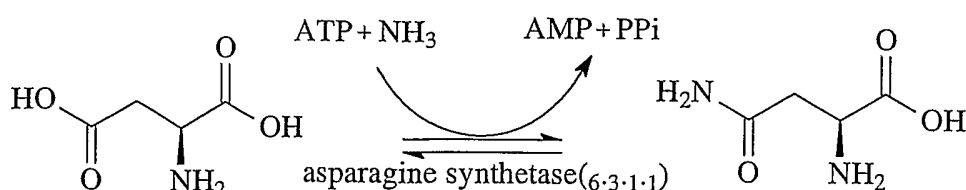
2. 無細胞タンパク質合成系による安定同位体標識タンパク質の製造方法

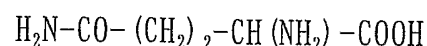
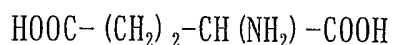
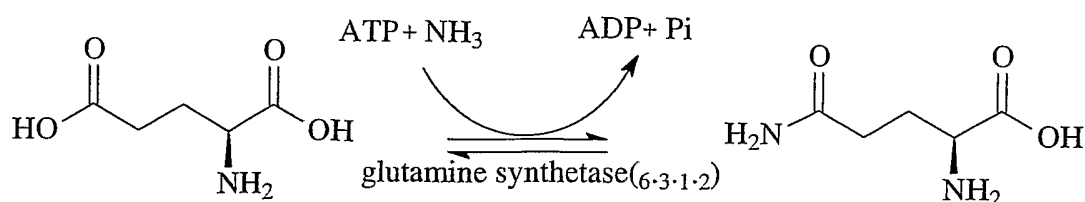
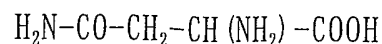
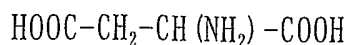
本発明によればまた、無細胞タンパク質合成系において安定同位体標識タンパク質を製造する方法であって、該系にアンモニウム塩を添加し、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物を基質として用い、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも1種が安定同位体で標識されていることを特徴とする、上記方法が提供される。

本方法は、無細胞タンパク質合成系にて NMR 測定用試料となる安定同位体標識タンパク質を合成するための方法であって、アンモニウム塩を系に添加し、アンモニウム塩及び/又はアミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種が安定同位体で標識されている以外は、上記1.と同様にして行えばよい。また、合成された安定同位体標識タンパク質は、NMR 測定用試料のために前記の各種手段により精製すればよい。

ここで、アンモニウム塩としては、下記式で表されるアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) からアスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) への代謝系においてアンモニアのドナーとなり、アスパラギンとグルタミンの側鎖アミノ基に転じる作用を有する限り、特に限定はされない。例えば酢酸アンモニウム、安息香酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム、塩化アンモニウム等が挙げられるが、酢酸アンモニウムが好ましい。アンモニウム塩の反応液への添加濃度は、20～120mM、好ましくは20～100mM、より好ましくは40～80mMである。また、安定同位体とは、 ^2H 、 ^{15}N 等をいう。

アスパラギン酸、グルタミン酸の代謝





また、「アミノ酸混合物」とは、前記と同様に、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物をいい、具体的には、上記のアミノ酸群からグルタミンを除いた19種類のアミノ酸混合物、アスパラギンを除いた19種類のアミノ酸混合物、グルタミン、アスパラギンを除いた18種類のアミノ酸混合物などをいう。

アミノ酸混合物として、例えば18種類のアミノ酸混合物を用いる場合、18種類のアミノ酸単品をそれぞれ混合したものでもよく、或いは市販の Algal mixtue を用い、これに含まれていないシステインやトリプトファン等のアミノ酸を適宜追加して18種類としたものでもよい。また、安定同位体とは、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 等をいう。

蛋白質の構造解析においては、多種類の標識蛋白質が必要となる場合が多い。このような場合には、数種の標識アミノ酸を組み合わせた基質用アミノ酸混合物を用意することが望ましい。従って、アミノ酸混合物に含まれるアミノ酸は少なくとも1種が標識されていればよく、全種が標識されていてもよい。標識するアミノ酸の数及び種類は、解析対象となるタンパク質の種類、解析目的等により適宜選択すればよい。

3. 安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット

前述のとおり、安定同位体で標識されたアンモニウム塩は、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) を含まないアミノ酸混合物を基質として用いる無細胞タンパク質合成系によるタンパク質合成においてアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) から代謝・生成したアスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) の側鎖を特異的に標識することができ、また非標識のアンモニウム塩を用いればアスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln) の側鎖の標識を抑え、所望のアミノ酸の主鎖のみが標識された試料も調製することが可能となる。従って、安定同位体で標識された又は非標識のアンモニウム塩、好ましくは安定同位体で標識された又は非標識の酢酸アンモニウムを、必要に応じて安定同位体で標識されたアミノ酸混合物とを適宜組み合わせ、無細胞タンパク質合成系によるタンパク質製造に必要な他の成分とともに、安定同位体標識タンパク質合成用キットの形態で提供することができる。

例えば、本発明の安定同位体標識タンパク質合成用キットは、以下の成分：

(a) アンモニウム塩

(b) アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも 19 種類含むアミノ酸混合物

(c) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液

を含み、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも 1 種が安定同位体で標識されていることを特徴とする。

本キットにおいて、アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも 1 種が安定同位体で標識されていてもよい。

また、アンモニウム塩の種類、アミノ酸混合物の意味については、2. に記載した通りである。

また、本キットには、ATP、GTP、CTP、UTPなどのリボヌクレオチド、基質溶液の pH を調節するための緩衝液などを含めることができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] 18 種類のアミノ酸を用いた無細胞タンパク質合成 (バッチ法)

以下に示す組成の反応液 (全量 30 μ l) を 37°C にて 1 時間インキュベートし、タンパク質合成反応を行った。なお、下記反応液において、「pK7-CAT」は、Kim ら (1996) Eur. J. Biochem. 239: 881-886 の記載に従って調製された CAT 発現ベクターである。

(バッチ法による無細胞タンパク質合成反応液組成)

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM
クレアチンキナーゼ (Roche 製)	250 μ g/ml
ポリエチレングリコール 8000	4.0%
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
大腸菌トータル tRNA (MRE600, Roche 製)	175 μ g/ml
酢酸アンモニウム	80 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	1 mM
T7 RNA ポリメラーゼ	66.7 μ g/ml
大腸菌 S30 抽出液 (Roche 製)	7.2 μ l
0.2 μ g/ml 鋳型 DNA (pK7-CAT)	

反応後、反応液を氷上において反応を停止させ、反応液中に含まれる CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) タンパク質の定量を、Shaw (1975) Methods Enzymol, p. 735-755 に従い以下の方法で行った。すなわち、ア

セチルコエンザイム A とクロラムフェニコールを基質として CAT によるクロラムフェニコールのアセチル化反応を行い、その結果生じた還元型コエンザイム A を 5, 5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB) を用いて発色定量した。37℃、412nm における吸光度の単位時間あたりの増加量より CAT の活性を定量し、これを指標として CAT タンパク質量を決定した。20 種類又は 18 種類のアミノ酸を用いて合成したタンパク質量を比較したところ、それぞれ 0.551mg、0.529mg で差がなかった (図 1)。これにより、アスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) を除いた 18 種類のアミノ酸混合物でも無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質の合成が可能であることがわかった。

[実施例 2] 酢酸アンモニウム濃度の検討 (バッチ法)

上記のバッチ法による無細胞タンパク質合成反応液において種々の濃度の酢酸アンモニウムを用いる以外は実施例 1 と同様にしてタンパク質合成を行い、CAT タンパク質量を定量した。結果を図 2 に示す。酢酸アンモニウムの濃度が増加するにつれて CAT タンパク質量が増加し、80mM で最高値に達することがわかった。

[実施例 3] 18 種類のアミノ酸を用いた無細胞タンパク質合成 (透析法)

(1) Ras タンパク質合成

下記 (i) に示す透析内液に、鋳型 DNA として Ras タンパク質をコードする遺伝子を含む、配列番号 1 に示す塩基配列からなる 1mg/ml の環状二本鎖 DNA 発現ベクター「pK7-NHis-Ras」を 0.012ml 加えて全量を 3ml とし、この透析内液を DispoDialyzer CE (分子量限界 10000 若しくは 50000: Spectrum 社製) に入れ、下記 (ii) に示す透析外液 30ml 中に浮遊させて試験管振とう培養液で 30℃ にて 4 時間振とうすることによってタンパク質合成を行った。

(透析法による無細胞タンパク質合成反応液組成)

(i) 透析内液:

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM

CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM
クレアチンキナーゼ (Roche 製)	250 μ g/ml
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
大腸菌トータル tRNA (MRE600, Roche 製)	175 μ g/ml
15 N 標識酢酸アンモニウム	80 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	2 mM
アジ化ナトリウム	0.05 %
T7 RNA ポリメラーゼ	66.7 μ g/ml
大腸菌 S30 抽出液 (Roche 製)	0.9 ml
1mg/ml 鋳型 DNA (pK7-NHis-Ras)	

(ii) 透析外液:

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
15 N 標識酢酸アンモニウム	80 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	2 mM
アジ化ナトリウム	0.05%

(2) 15 N 標識 Ras タンパク質の精製

上述のようにして合成した 15 N 標識 Ras タンパク質の精製を行った。タンパク

質の精製にはヒスチジントグとニッケルの親和性を利用し、操作は 4℃で行った。まず合成反応終了後、3 ml の反応液を 4.2 ml の洗浄緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0)/300 mM 塩化ナトリウム/10 mM イミダゾール] で希釈・回収し、1960×g, 5 分間遠心して沈殿を取り除いた。次に、得られた上清を 0.8 ml の Ni-NTA 樹脂 (キアゲン社) に通して吸着させ、9.6 ml の洗浄緩衝液を通すことで夾雑物を除去した。最後に 4 ml の溶出緩衝液 [50 mM リン酸ナトリウム (pH 8.0)/300 mM 塩化ナトリウム/500 mM イミダゾール] を通すことでサンプルを樹脂から遊離させた。以上の手順により、0.88 mg の精製サンプルを得た。

(3) NMR 測定試料の調製

精製サンプルを NMR 測定に適した溶媒にするために、20mM リン酸ナトリウム (pH 6.5)、100mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化マグネシウム、5mM DTT、0.01 重量% NaN_3 からなる溶液に置換した。その後、サンプルを 0.25 ml (サンプル濃度 0.28 mM) まで濃縮した。以上の操作には限外ろ過装置 (ビバスピニン 2; ザルトリウス社) を用いた。最後に 0.03 ml の重水を添加し、NMR 測定用試料とした。

(4) NMR 測定

NMR 測定用のサンプル管にはシゲミ社の対称型マイクロ試料管 (5 mm プローブ用) を用いた。NMR 測定は、700 MHz の NMR 装置 (Avance700; ブルカー社) で、温度 25℃のもとで行った。判定には、 ^1H - ^{15}N 2次元 HSQC スペクトル (以後 ^{15}N HSQC スペクトルと略記) を用いた。その際の測定条件は、下記表 1 に示す通りである。

表 1

(NMR 測定条件)

スペクトル	積算回数	中心周波数	スペクトル幅	データポイント数
^1H - ^{15}N HSQC		^1H : 700.2332911MHz	^1H : 9765.625 Hz	^1H : 1 0 2 4
		^{15}N : 70.9620093MHz	^{15}N : 2593.377617 Hz	^{15}N : 1 2 8

NMR 測定の結果、図 3 に示すように、 ^{15}N HSQC スペクトルには 6.5ppm から 7.5ppm にわたって分離したアミノプロトンのシグナルが認められた。これらのシグナルの現れ方は、20 種類の ^{15}N 標識アミノ酸を用いて上記の透析法により調製した均一 ^{15}N 標識 Ras タンパク質の ^{15}N HSQC スペクトル (図 4) と比較し、ア

スパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) の側鎖アミノ基に由来するピークに特徴的である。従って、得られた Ras タンパク質においては、合成系に添加された安定同位体標識酢酸アンモニウムにより修飾されたアスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) の側鎖のみが標識されていることが明らかとなった。

[実施例 4] 酢酸アンモニウム濃度の検討 (バッチ法)

以下に示す組成の反応液 (全量 30 μ l) を用いてタンパク質合成反応を行った。なお、下記反応液において、「pQBI T7-GFP」は、GFP 発現ベクターであり、WAKO Pure Chemical Industries, Ltd. より購入した。

(バッチ法による無細胞タンパク質合成反応液組成)

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM
クレアチンキナーゼ (Roche 製)	250 μ g/ml
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
大腸菌トータル tRNA (MRE600, Roche 製)	175 μ g/ml
酢酸アンモニウム	0~120 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	1 mM
T7 RNA ポリメラーゼ	66.7 μ g/ml
大腸菌 S30 抽出液 (Roche 製)	7.2 μ l
2 μ g/ml 鋳型 DNA (pQBI T7-GFP)	

上記反応液を 37℃ のヒートブロック上で 1 時間静置した。さらに、反応液を 4℃ にて 24 時間静置した後、PBS で 20 倍希釈し、GFP の蛍光強度を励起波長 485nm、測定波長 510nm にて測定した。データは反応液あたりの蛍光量で示した

(図 5)。

最大の GFP 合成量が得られた酢酸アンモニウム濃度は 20 種類のアミノ酸、18 種類のアミノ酸のいずれを用いた場合も共に 40mM であった。

[実施例 5] 18 種類のアミノ酸を用いた無細胞タンパク質合成 (バッチ法) における Asp, Glu の濃度、及び酢酸アンモニウム濃度の検討

以下に示す組成の反応液 (全量 30 μ l) を用いてタンパク質合成反応を行った。合成に用いた 18 種類のアミノ酸のうち、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) は通常の 1.5 倍の濃度 (1.5mM) とした。

なお、下記反応液において、「pQBI T7-GFP」は、GFP 発現ベクターであり、WAKO Pure Chemical Industries, Ltd. より購入した。

(バッチ法による無細胞タンパク質合成反応液組成)

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM
クレアチンキナーゼ (Roche 製)	250 μ g/ml
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
大腸菌トータル tRNA (MRE600、Roche 製)	175 μ g/ml
酢酸アンモニウム	0~120 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類のアミノ酸	各 1 mM
又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	
Asp, Glu	各 1.5mM
Asp, Glu を除く 16 種類のアミノ酸	各 1mM
T7 RNA ポリメラーゼ	66.7 μ g/ml

大腸菌 S30 抽出液 (Roche 製)

7.2 μ l

2 μ g/ml 鋳型 DNA (pQBI T7-GFP)

上記反応液を 37℃ のヒートブロック上で 1 時間静置した。さらに、反応液を 4℃ にて 24 時間静置した後、PBS で 20 倍希釈し、GFP の蛍光強度を励起波長 485nm、測定波長 510nm にて測定した。データは反応液あたりの蛍光量で示した (図 6)。

最大の GFP 合成量が得られた酢酸アンモニウム濃度は 20 種類のアミノ酸を用いる場合には 40mM であり、18 種類のアミノ酸を用いた場合 (アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) を通常の 1.5 倍の濃度 (1.5mM) とした条件下) では 60mM であった。また、18 種類のアミノ酸を用いた場合のピーク時における GFP 合成量は、20 種類のアミノ酸を用いた場合と同程度であった。従って、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu) を通常の 1.5 倍量添加することにより、従来の方法と同程度のアミノ酸合成量が得られることが示された。

[実施例 6] 20 種類又は 18 種類のアミノ酸を用いた無細胞タンパク質合成系 (バッチ法) におけるタンパク合成量の比較

20 種類のアミノ酸 (各アミノ酸濃度 1.0mM) 又は 18 種類のアミノ酸 (各アミノ酸濃度 1.0mM、アスパラギン酸 (Asp) とグルタミン酸 (Glu) 濃度 1.5mM) をそれぞれ用い、酢酸アンモニウム濃度 60mM 条件下で GFP タンパク質、Ras タンパク質の合成をそれぞれ行った。

反応液組成を下記に示す。なお、下記反応液において、「pQBI T7-GFP」、
「pK7-NHis-Ras」は、前述の通りである。

(バッチ法による無細胞タンパク質合成反応液組成)

HEPES-KOH (pH 7.5)	60 mM
ジチオスレイトール	1.8 mM
ATP	1.3 mM
CTP, GTP, UTP	各 0.9 mM
クレアチンリン酸	80 mM

クレアチンキナーゼ (Roche 製)	250 μ g/ml
ポリエチレングリコール 8000	4.0 %
3', 5'-cyclic AMP	0.66 mM
L (-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸	36 μ M
大腸菌トータル tRNA (MRE600、Roche 製)	175 μ g/ml
酢酸アンモニウム	60 mM
酢酸マグネシウム	10.7 mM
20 種類のアミノ酸	各 1 mM
又は Asn, Gln を除く 18 種類のアミノ酸	
Asp, Glu	各 1.5mM
Asp, Glu を除く 16 種類のアミノ酸	各 1mM
T7 RNA ポリメラーゼ	66.7 μ g/ml
大腸菌 S30 抽出液 (Roche 製)	7.2 μ l
2 μ g/ml 鋳型 DNA (pQBI T7-GFP 又は pK7-NHis-Ras)	

上記反応液を 37℃ のヒートブロック上で 1 時間静置した。SDS-PAGE にて分離後、抗 GFP 抗体 (GFP)、又は抗 HAT 抗体 (Ras) を用いてイムノブロット法によりタンパク質の検出を行った (図 7)。両タンパク質ともに 18 種類のアミノ酸を用いた場合でも 20 種類のアミノ酸を用いた場合と同程度の合成量が得られた。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

産業上の利用可能性

以上に示したように、無細胞タンパク質合成系においてアスパラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) を含まない 18 種類のアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質の合成を行っても、20 種類のアミノ酸を用いたときと同等な活性を有するタンパク質を合成することができた。また、 ^{15}N にて標識したアンモニウム塩又は非標識のアンモニウム塩を無細胞タンパク質合成系に添加すると、アス

パラギン (Asn) 及びグルタミン (Gln) の側鎖への標識を制御できた。従って、本発明は、安定同位体標識タンパク質を安価に製造することを可能とし、ハイスループットなタンパク質立体構造解析を行う上で非常に有用である。

請 求 の 範 囲

1. 無細胞タンパク質合成系において、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物を基質として用いてタンパク質を合成することを特徴とする、タンパク質の製造方法。
2. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、請求項1に記載の方法。
3. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、請求項1に記載の方法。
4. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、請求項1に記載の方法。
5. 無細胞タンパク質合成系に、アンモニウム塩を添加することを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の方法。
6. アンモニウム塩を20～120mMの最終濃度となるように添加することを特徴とする、請求項5に記載の方法。
7. アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、請求項5又は6に記載の方法。
8. 無細胞タンパク質合成系において安定同位体標識タンパク質を製造する方法であって、該系にアンモニウム塩を添加し、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイ

シン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物を基質として用い、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも1種が安定同位体で標識されていることを特徴とする、上記方法。

9. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、請求項8に記載の方法。

10. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、請求項8に記載の方法。

11. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、請求項8に記載の方法。

12. アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、請求項8～11のいずれかに記載の方法。

13. 以下の成分：

(a) アンモニウム塩

(b) アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アスパラギン、及びグルタミンから成る群から選択されるアミノ酸を多くとも19種類含むアミノ酸混合物

(c) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液

を含み、かつ、前記アンモニウム塩及び/又は前記混合物中のアミノ酸の少なくとも1種が安定同位体で標識されていることを特徴とする、安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット。

14. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリンを含む混合物である、請求項13に記載のキット。

15. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びアスパラギンを含む混合物である、請求項13に記載のキット。

16. アミノ酸混合物が、アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、及びグルタミンを含む混合物である、請求項13に記載のキット。

17. アンモニウム塩が酢酸アンモニウムである、請求項13～16のいずれかに記載のキット。

図 1

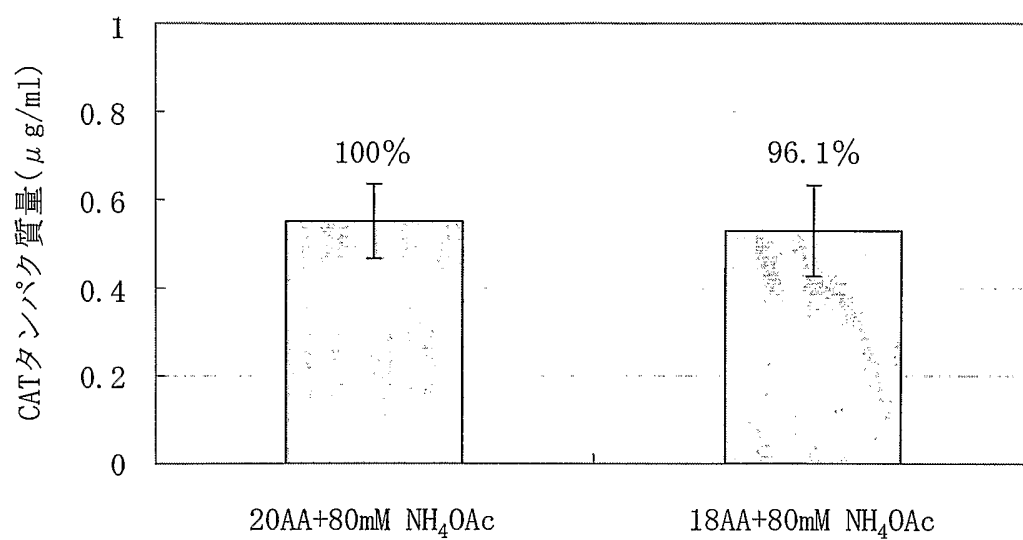


図 2

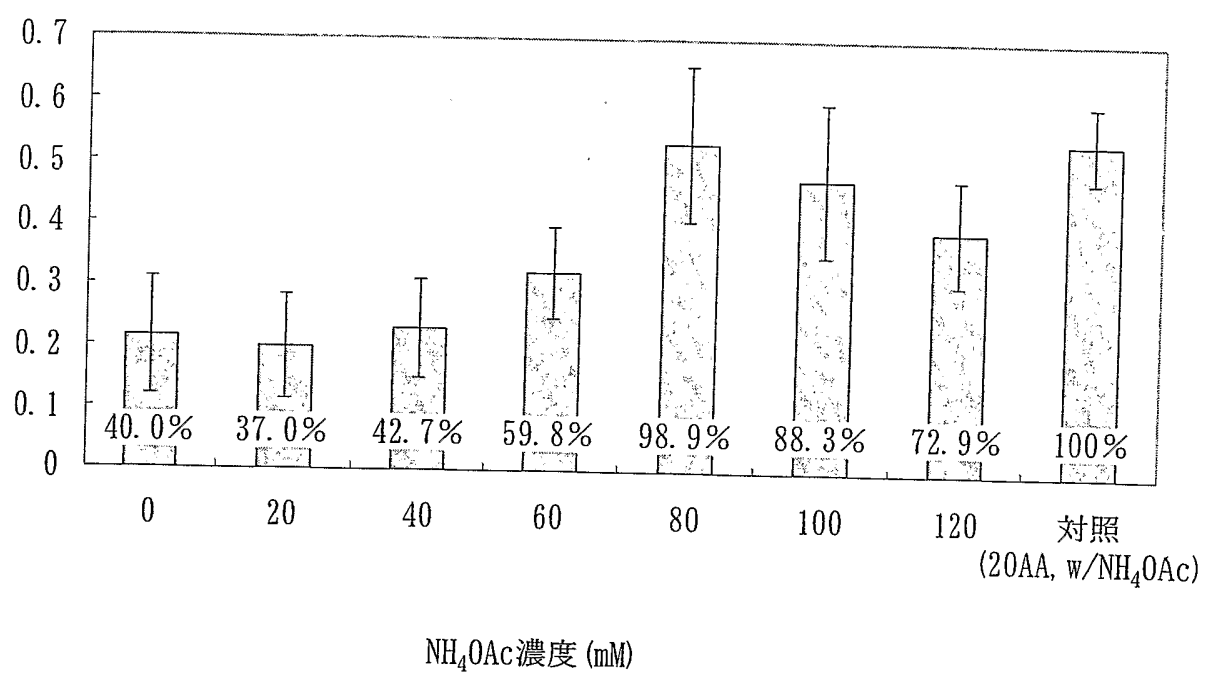


図 3

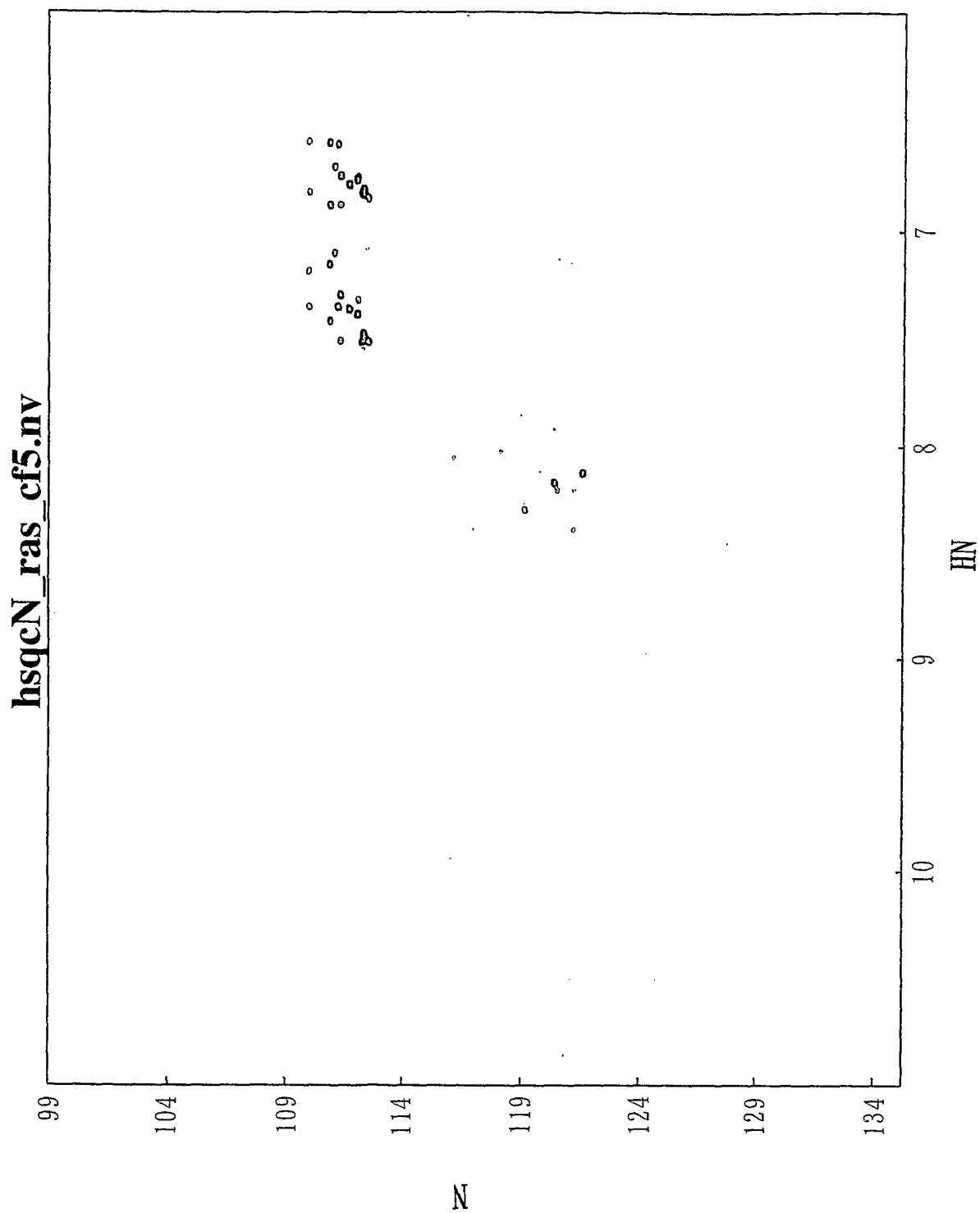


図4

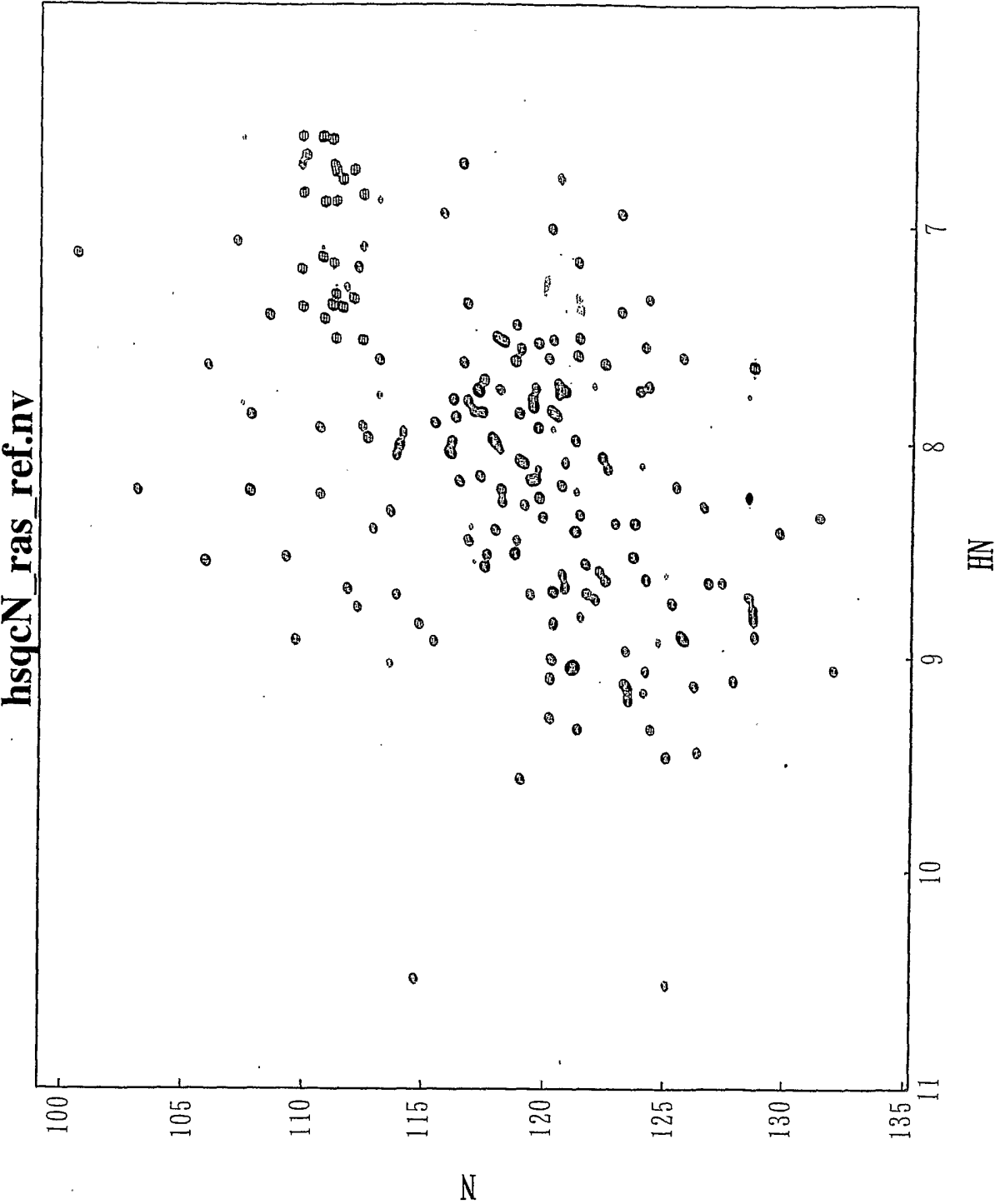


図 5

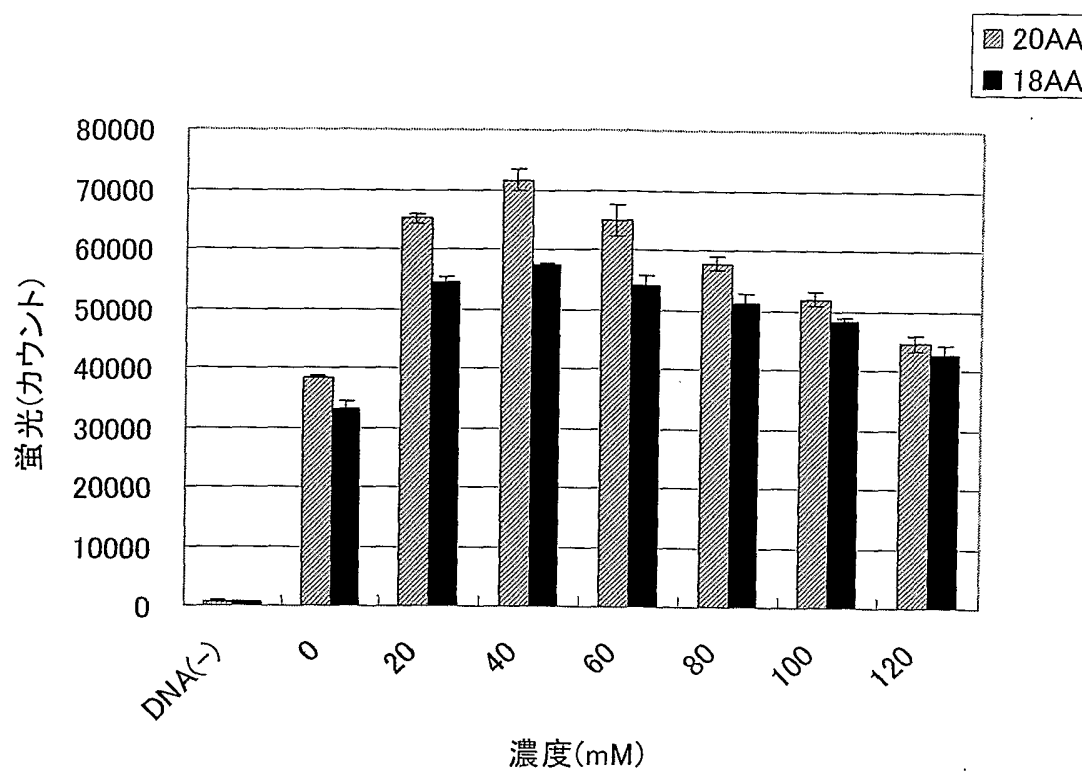


図 6

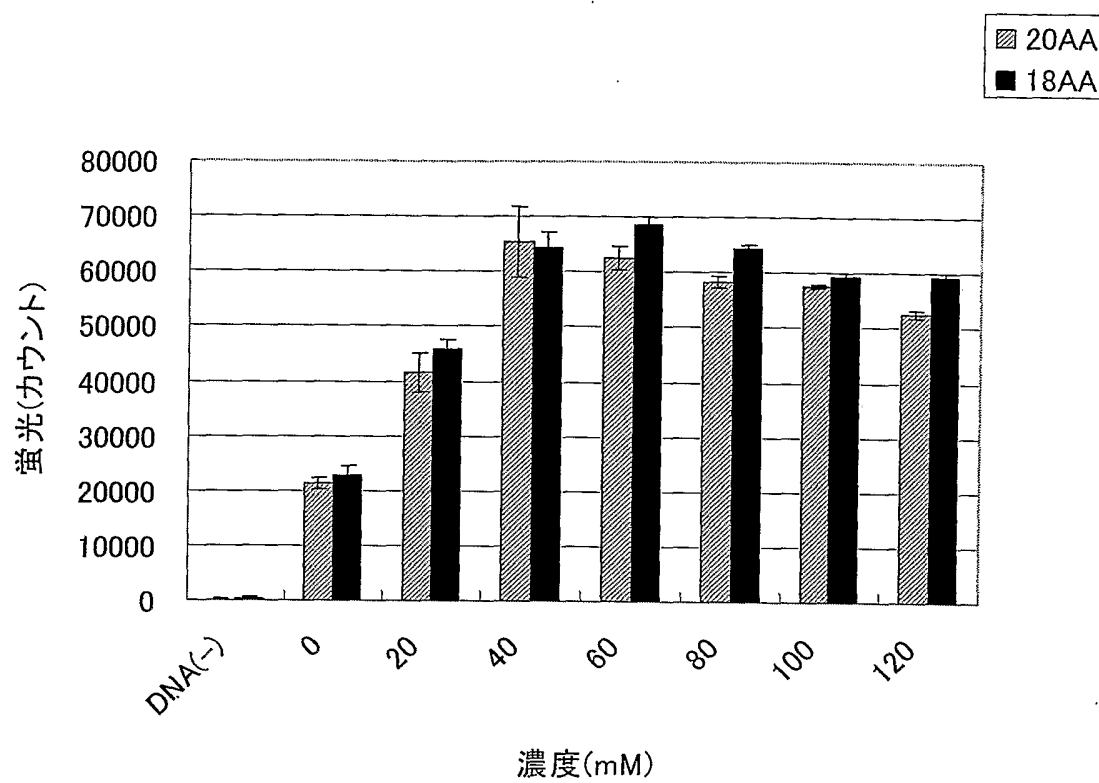


図 7 A

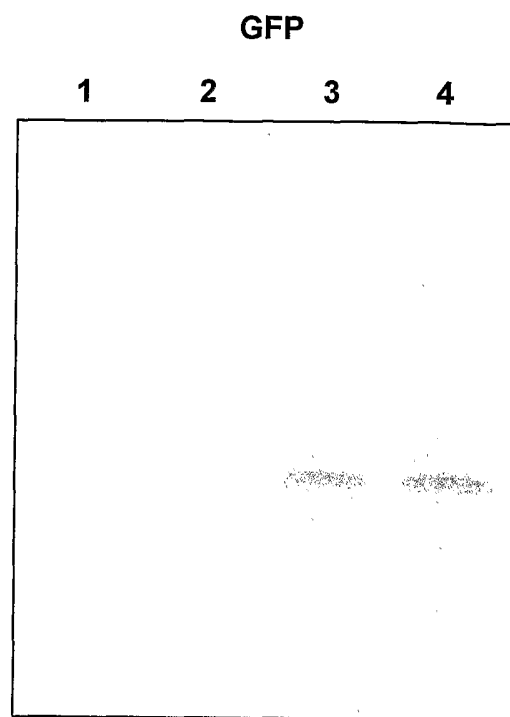
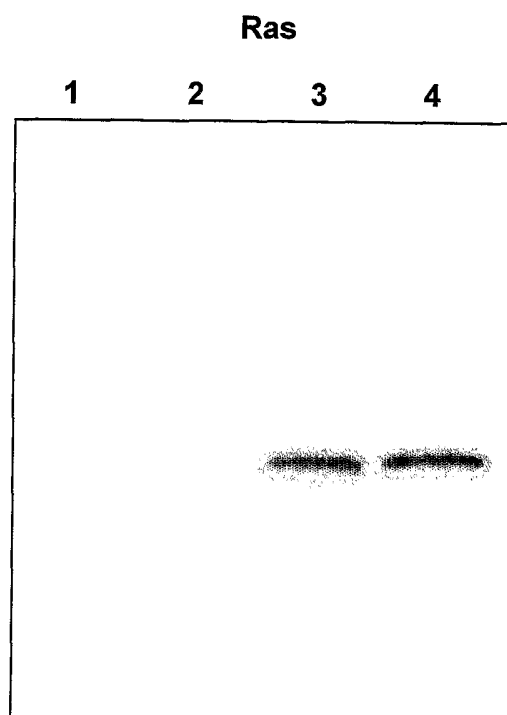


図 7 B



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<110> NIPPON SANSO CORPORATION

<120> A method for producing proteins by non-cellular protein synthesis systems and
A reagent kit therefore

<130> PH-2164-PCT

<150> JP 2003-145390

<151> 2003-05-22

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tgcacggatc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 60
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 120
tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 180
gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 240

actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca 300
gtggcgataa gtcgtgcttt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 360
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctgggagcga acgacctaca 420
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cagccttccc gaaggagaaa 480
aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 540
cagggggaaa cgccgggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 600
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctaig gaaaaacgcc agcaacgcgg 660
cctttttacg gttcctggcc ttttctggc cttttgtca catgttcttt cctgcgttat 720
ccccgatcc tggtgataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca 780
gccgaacgac cgagcgcagc gactcagtga gcgaggaagc ggaagaagct cgcacattca 840
gcagcgtttt tcagcgcgtt ttcatcagc gtttcaatgt tggatcaac accaggttta 900
actttgaact tatcggcact gacggttact gattttgaac ttttgcttg ccacggaacg 960
gtctgcgttg tcggaagat gcgtgatctg atccttcaac tcagcaaaag ttcgccaata 1020
cgcaaacgcg ctctccccgc gcgttggccg attcatiaat gcagctggca cgacaggttt 1080
cccgactgga attcagatct cgtccccgcg aaattaatac gactcactat agggagacca 1140
caacggtttc cctctagaaa taattttggt taactttaag aaggagatat acatatgaaa 1200
gatcatctca tccacaatgt ccacaaagag gagcacgctc atgcccacaa caaggattac 1260
gatatcccaa cgaccgaaaa cctgtatttt cagggatcca gcgctcttc gggaatgacc 1320
gaatacaaac tggttgtagt tggcgtcgtt ggtgtaggca aaagcgcgt gaccattcag 1380
ttgatccaga accattcgt agatgaglac gaccgacta ttgaagactc ttaccgtaag 1440
caggttgtta tcgacggtga gacctgtttg ctggacatcc ttgataccgc aggccaagaa 1500
gaatactctg ctatgcgtga tcagtatatg cgtaccggcg aaggcttcct gtgcgttttc 1560
gctatcaaca acaccaaate ttttgaagac atccatcaat accgtgaaca gatcaaacgt 1620
gttaaagact ctgatgacgt tccgatggtt ctggttggtg acaaatgcga cttggcagcg 1680
cgtactgttg aatctcgtca ggctcaggat ctggctcgtt ctacggaat tccgtacatc 1740
gaaacctctg ctaaaactcg tcaaggcgtt gaagacgctt tctacacctt gttcgtgaa 1800
atccgtcagc acaagctcgc taagctttga tagaattccg tgatagctcg agtcgaccgg 1860
ctgctaacaa agcccgaag gaagctgagt tggctgctgc caccgtgag caataactag 1920

cataaccctt tggggcctct aaacgggtct tgaggggttt ttgtctgaaa ggaggaacta 1980
tatccggala acctcgagct gcaggcatgc aagcttggca ctggccgtcg ttttacaacg 2040
tcgtgacttg gaaaaccctg gcgttacctc acttaatcgc ctgcagcac atccccctt 2100
cgccagcttg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac agttgcgcag 2160
cctgaatggc gaatgcgatt tattcaaca agccgccgtc ccgtcaagtc agcgtaatgc 2220
tctgccagtg ttacaacca tiaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg agcatcaaat 2280
gaaactgcaa ttatttcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct 2340
gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggatcggt 2400
ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttccctcg tcaaaaaata 2460
ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cgttgagaat ggcaaaagct 2520
tatgcatttc ttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac 2580
tcgcatcaac caaacgtta ttatttcgtg attgcgcctg agcgagacga aatacgcgat 2640
cgctgtttaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacactgcca 2700
gcgcatcaac aataatttca cctgaatcag gatattcttc taataacctgg aatgctgttt 2760
tccctgggat cgcagtgggt agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga 2820
tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat 2880
cattggcaac gctaccttgc ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg ggcttcccat 2940
acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat 3000
ataaatcagc atccatgttg gaatttaac gcggcttcga gcaagacgtt tcccgttgaa 3060
tatggctcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcattg 3120
atgatatatt ttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca acgtggcttt 3180
gttgaataaa tcgaactttt gctgagtga aggatcagat cacgcatctt cccgacaacg 3240
cagaccgttc cgtggcaaag caaaagtcca aaatcaccaa ctggccacc tacaacaag 3300
ctctcatcaa ccgtggctcc ctacatttct ggctggatga tggggcgatt caggcctggt 3360
atgagtcagc aacaccttct tcacgaggca gacctc 3396

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIGAWA T., "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins, FEBS Lett, 1999, Vol.442, pages 15 to 19	1, 5-8, 12, 13, 17
Y	IKURA M., Heteronuclear 3D NMR and isotopic labeling of calmodulin. Towards the complete assignment of the ¹ H NMR spectrum, Biochem.Pharmacol., 1990, Vol.40, pages 153 to 160	1, 5-8, 12, 13, 17
Y	Patzlaff J.S., "An isotope-edited FT-IR study of a symporter, the lactose permease", Biochemistry, 2002, Vol.41, pages 7366 to 7372	1, 5-8, 12, 13, 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June, 2004 (15.06.04)

Date of mailing of the international search report

29 June, 2004 (29.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007314

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IKURA M., A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C , and ^{15}N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin, Biochemistry, 1990, Vol.29, pages 4659 to 4667	1, 5-8, 12, 13, 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007314

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kigawa T., Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins, FEBS Lett., 1999, Vol. 442, p. 15-19	1、5-8、 12、13、 17
Y	Ikura M., Heteronuclear 3D NMR and isotopic labeling of calmodulin. Towards the complete assignment of the ¹ H NMR spectrum, Biochem Pharmacol., 1990, Vol. 40, p. 153-160	1、5-8、 12、13、 17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.2004

国際調査報告の発送日

29.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Patzlaff J.S., An isotope-edited FT-IR study of a symporter, the lactose permease, Biochemistry, 2002, Vol.41, p.7366-7372	1、5-8、 12、13、 17
Y	Ikura M., A novel approach for sequential assignment of ¹ H, ¹³ C, and ¹⁵ N spectra of proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin, Biochemistry, 1990, Vol.29, p.4659-4667	1、5-8、 12、13、 17

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：