(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4328530号
(P4328530)
(45)発行日　平成21年9月9日(2009.9.9)　(24)登録日　平成21年6月19日(2009.6.19)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 21/02 (2006.01)　　C12P 21/02 C
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 28　(全 31 頁)

(21)出願番号　特願2002-571940(P2002-571940)
(86)(22)出願日　平成14年3月7日(2002.3.7)
(65)公表番号　特表2004-524847(P2004-524847A)
(43)公表日　平成16年8月19日(2004.8.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/006812
(87)国際公開番号　WO2002/072890
(87)国際公開日　平成14年9月19日(2002.9.19)
審査請求日　平成17年3月7日(2005.3.7)
(31)優先権主張番号　60/273,827
(32)優先日　平成13年3月8日(2001.3.8)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502221282
ライフ　テクノロジーズ　コーポレーション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２００８，カールスバッド，　バン　アレン　ウェイ　５７９１
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(72)発明者　チャッタージー　デブ　ケイ.
アメリカ合衆国　メリーランド州　ノース　ポトマック　フォレスト　リッジ　コート　６
(72)発明者　ロンゴ　メアリー　シー.
アメリカ合衆国　メリーランド州　ジャーマンタウン　リーテルバーク　コート　５
最終頁に続く

(54)【発明の名称】改良インビトロ合成系

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下を含む、インビトロタンパク質合成システムまたはインビトロ核酸合成システム：
少なくとも一種のヌクレアーゼの活性を減少させる変異を有し且つGamを発現しない大腸菌細胞由来の、少なくとも一種の抽出物であって、Gamタンパク質の添加によって修飾される少なくとも一種の抽出物。
【請求項２】
DNA鋳型およびRNA鋳型からなる群より選択される少なくとも一種の核酸鋳型をさらに含む、請求項1記載のインビトロ合成システム。
【請求項３】
少なくとも一種のDNA鋳型を含み、かつインビトロ転写/翻訳システムである、請求項2記載のインビトロ合成システム。
【請求項４】
前記Gamタンパク質が可溶性Gamタンパク質である、請求項1記載のインビトロ合成システム。
【請求項５】
少なくとも一種のエネルギー源を含む、請求項1記載のインビトロ合成システム。
【請求項６】
以下を含む、インビトロ合成のためのキット：
少なくとも一種のヌクレアーゼの活性を減少させる変異を有し且つGamを発現しない大

腸菌細胞由来の、少なくとも一種の抽出物であって、Gamタンパク質の添加によって修飾される少なくとも一種の抽出物；および
一つもしくは複数のヌクレオチドもしくはその誘導体、一つもしくは複数のアミノ酸もしくはその誘導体、一つもしくは複数のポリメラーゼ、一つもしくは複数のコファクター、一つもしくは複数の緩衝液もしくは緩衝液塩、一つもしくは複数のエネルギー源、一つもしくは複数の核酸鋳型、またはキットもしくはアッセイ法の効率を決定するための一つもしくは複数の試薬。
【請求項７】
以下を含む組成物：
（a）ヌクレアーゼの活性を減少させる少なくとも1つの変異を有する細菌細胞由来の抽出物；
（b）合成のための化学的エネルギーを供給する少なくとも二種の添加されたエネルギー源；および
（c）添加されたGamタンパク質。
【請求項８】
少なくとも一種の核酸鋳型をさらに含む、請求項7記載の組成物。
【請求項９】
前記鋳型により核酸生成物が生じる、請求項8記載の組成物。
【請求項１０】
核酸生成物がDNAである、請求項9記載の組成物。
【請求項１１】
核酸生成物がRNAである、請求項9記載の組成物。
【請求項１２】
少なくとも二種のエネルギー源を含む、請求項5記載のインビトロ合成システム。
【請求項１３】
少なくとも二種のエネルギー源を含む、請求項6記載のキット。
【請求項１４】
前記ヌクレアーゼがDNaseである、請求項1記載のインビトロタンパク質合成システムまたはインビトロ核酸合成システム。
【請求項１５】
前記DNaseが、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼII、エキソヌクレアーゼIII、エキソヌクレアーゼIVA、エキソヌクレアーゼIVB、RecBCD（エキソヌクレアーゼV）、エキソヌクレアーゼVII、エキソヌクレアーゼVIII、RecJ、dRpase、エンドヌクレアーゼI、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼIV、エンドヌクレアーゼV、エンドヌクレアーゼVII、エンドヌクレアーゼVIII、エンドヌクレアーゼA、fpg、uvrABC、mutH、vsrエンドヌクレアーゼ、ruvC、ecoK、ecoB、mcrBC、mcrA、mrr、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII、トポイソメラーゼIII、またはトポイソメラーゼIVである、請求項14記載のインビトロタンパク質合成システムまたはインビトロ核酸合成システム。
【請求項１６】
前記ヌクレアーゼがDNaseである、請求項6記載のキット。
【請求項１７】
前記DNaseが、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼII、エキソヌクレアーゼIII、エキソヌクレアーゼIVA、エキソヌクレアーゼIVB、RecBCD（エキソヌクレアーゼV）、エキソヌクレアーゼVII、エキソヌクレアーゼVIII、RecJ、dRpase、エンドヌクレアーゼI、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼIV、エンドヌクレアーゼV、エンドヌクレアーゼVII、エンドヌクレアーゼVIII、エンドヌクレアーゼA、fpg、uvrABC、mutH、vsrエンドヌクレアーゼ、ruvC、ecoK、ecoB、mcrBC、mcrA、mrr、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII、トポイソメラーゼIII、またはトポイソメラーゼIVである、請求項16記載のキット。
【請求項１８】

前記ヌクレアーゼがDNaseである、請求項7記載の組成物。
【請求項１９】
前記DNaseが、エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼII、エキソヌクレアーゼIII、エキソヌクレアーゼIVA、エキソヌクレアーゼIVB、RecBCD（エキソヌクレアーゼV）、エキソヌクレアーゼVII、エキソヌクレアーゼVIII、RecJ、dRpase、エンドヌクレアーゼI、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼIV、エンドヌクレアーゼV、エンドヌクレアーゼVII、エンドヌクレアーゼVIII、エンドヌクレアーゼA、fpg、uvrABC、mutH、vsrエンドヌクレアーゼ、ruvC、ecoK、ecoB、mcrBC、mcrA、mrr、トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII、トポイソメラーゼIII、またはトポイソメラーゼIVである、請求項18記載の組成物。
【請求項２０】
少なくとも二種の異なるエネルギー源の各々が、合成のための高エネルギー三リン酸化合物を生成または再生する、請求項11記載の組成物。
【請求項２１】
少なくとも二種の異なるエネルギー源が、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、カルバモイルリン酸、アセチルリン酸、クレアチンリン酸、ホスホピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、およびグルコース-6-リン酸からなる群より選択される、請求項20記載の組成物。
【請求項２２】
少なくとも二種のエネルギー源のうち二つが、ホスホエノールピルビン酸およびアセチルリン酸である、請求項21記載の組成物。
【請求項２３】
少なくとも二種の異なるエネルギー源の各々が、合成のための高エネルギー三リン酸化合物を生成または再生する、請求項13記載のキット。
【請求項２４】
少なくとも二種の異なるエネルギー源が、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、カルバモイルリン酸、アセチルリン酸、クレアチンリン酸、ホスホピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、およびグルコース-6-リン酸からなる群より選択される、請求項23記載のキット。
【請求項２５】
少なくとも二種のエネルギー源のうち二つが、ホスホエノールピルビン酸およびアセチルリン酸である、請求項24記載のキット。
【請求項２６】
少なくとも二種の異なるエネルギー源の各々が、合成のための高エネルギー三リン酸化合物を生成または再生する、請求項7記載の組成物。
【請求項２７】
少なくとも二種の異なるエネルギー源が、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、カルバモイルリン酸、アセチルリン酸、クレアチンリン酸、ホスホピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、およびグルコース-6-リン酸からなる群より選択される、請求項26記載の組成物。
【請求項２８】
少なくとも二種のエネルギー源のうち二つが、ホスホエノールピルビン酸およびアセチルリン酸である、請求項27記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の背景
発明の分野
本発明は、効率的に転写および/または翻訳されてタンパク質の産生量が改善されるような、入力（input）mRNAまたは入力DNAからのタンパク質のインビトロ産生に関する。本

発明はまた、核酸分子のインビトロ産生に関する。

【背景技術】

【０００２】

関連技術

インビトロタンパク質合成は、（インビボでのタンパク質産生のために使用される細胞またはタンパク質合成のための細胞系を維持するために必要な）所望でないタンパク質を不必要に産生することなく所望のタンパク質を特異的に産生するという点で、有利である。細胞がタンパク質工場として使用される場合、細胞は、所望のタンパク質を産生することに加えて、所望でないタンパク質を含む（細胞を維持するために必要とされる）他の必要な分子を産生する。無細胞系は非常に一般的が、その理由は、その調製のために利用可能な標準的なプロトコールが存在することおよび多数の供給源から市販されていることである。

【０００３】

インビトロタンパク質合成は、遺伝子発現の細胞性の調節を本質的に受けないので、細胞傷害性タンパク質、不安定タンパク質、または不溶性タンパク質の産生において有利である。生成物の濃度によってその発現レベルが調節されるため、あらかじめ決定された濃度を上回るタンパク質の過剰産生をインビボで得ることは困難であり得る。細胞中に蓄積されるタンパク質の濃度は、一般的に、その細胞の生存能力に影響を与える。それゆえに、所望のタンパク質の過剰産生を得ることは困難である。単離および精製のプロセスにおいて、多くの種のタンパク質は不溶性または不安定であり、かつ細胞内のプロテアーゼによって分解されるか、または封入体中で凝集するかのいずれかであるため、損失の割合は高くなる。インビトロ合成によりこれらの問題の多くが回避される。また、多重構成の種々のタンパク質の同時かつ迅速な発現を通して、この技術は、研究用のコンビナトリアルアレイの開発のためおよびタンパク質スクリーニングのための価値あるツールを提供し得る。さらに、様々な種の非天然アミノ酸が、特定の目的のためにタンパク質へと効率的に組み込まれ得る（Norenら、Science 244: 182-188 (1989)）。しかし、そのすべての有望な局面にも関わらず、インビトロ系は、実用的な代替物として広範に受け入れられているわけではない。これは、タンパク質合成の乏しい収量を引き起こすような、反応時間の短さに一部起因する。

【０００４】

タンパク質合成は、所望のタンパク質をコードするRNAポリヌクレオチド鋳型によって導かれる。タンパク質合成はまず、所望のタンパク質をコードするRNAポリヌクレオチドを産生する用に転写されるDNA鋳型によって導かれ得る。従ってDNA鋳型は、転写対象のDNA、ならびに、タンパク質を産生するように翻訳されるmRNA鋳型の転写を触媒するRNAポリメラーゼに対する結合部位を最小限含む。1つの系において転写および翻訳が共役する場合、この系はインビトロ転写翻訳系（IVTT）と呼ばれる。

【０００５】

IVTTすなわち、無細胞抽出物を使用するタンパク質合成は、タンパク質の分析のための重要なツールになりつつある。完全なゲノム配列の利用可能性は、その機能が未知またはごくわずかしか理解されていない、無数の遺伝子およびオープンリーディングフレームの分子構造および構成に関する豊富な情報を提供する。従って、IVTT、およびより一般的にはインビトロでのタンパク質合成の有用性は、迅速かつ効率的なタンパク質合成および機能的分析のために、将来、なおより重要になると予想されている。

【０００６】

現代の分子生物学の技術により、生物体のDNAに含まれる遺伝子から発現した他の細胞成分およびDNAの操作が可能になった。生細胞において、DNAが転写されてmRNAが作製され、次いでこのmRNAは翻訳のための鋳型として使用され、それによって、DNAによって決定される配列を有するタンパク質が作製される。分子生物学の現代のツールを開発する際に、制御された条件下で、かつ規定されたインプットを用いる、インビトロでの転写および/または翻訳のプロセスの種々の段階を実施する方法に向けて研究が行われてきた。これ

らの手順は本質的に、生細胞中におけるずっと不均一な混合物中で引き起こされるのと同様のプロセスを模倣するものである。

【０００７】

現代の組換え技術が出現する前にも、精製mRNA転写物からのインビトロタンパク質合成を可能にする細胞抽出物が開発された。現在まで、タンパク質合成ならびにRNAの構造および機能の研究のために、いくつかの系が使用可能となっている。研究においてタンパク質を合成するために、翻訳抽出物は、研究における遺伝子およびタンパク質に対応するmRNAにより「プログラム」されなければならない。mRNAはDNAから作製され得るか、または、精製された形態で外因的に添加され得る。歴史的には、このようなmRNA鋳型は、天然の供給源から精製され、または、より最近開発された技術を用いて、インビトロ反応でバクテリオファージRNAポリメラーゼを使用して、クローニングされたDNAから合成的に調製された。

【０００８】

より近年は、同じ反応においてRNAとタンパク質の両方の合成を実行する、共役または相補的な、転写および翻訳系を使用する技術（IVTT）が開発されている。現代技術のために使用される細胞抽出物は、（mRNAを産生するための）転写および（タンパク質を合成するための）翻訳の両方に必要とされるすべての成分を単一の系で含まなければならない。このような系において入力鋳型はDNAであり、これは通常、RNAよりも入手がはるかに容易であり、かつ、はるかに容易に操作可能である。

【０００９】

初期の共役系は細菌抽出物に基づいていた（LedermanおよびZubay、Biochim.Biophys.Acta、149: 253 (1967)）。原核生物は通常、その細胞質の中で共役反応を実行するので、この細菌に基づく系はインビボプロセスを密接に反映したものであった。この一般的な系は、原核生物の遺伝子の研究のために広範な用途を見出してきた。しかし、その非効率性および比較的高いヌクレアーゼ含量のために、この一般的な細菌系は一般に真核生物の遺伝子について有用でない。

【００１０】

ヌクレアーゼは、種々の基質要求性を有するホスホジエステラーゼである。ヌクレアーゼは、その特異性によって、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼに分類される。これらのヌクレアーゼは、ホスホジエステル結合（例えば、DNAまたはRNAのポリヌクレオチドを形成するホスホジエステル結合）を切断する。DNaseはDNA分子内のホスホジエステル結合を切断する。RNaseはRNA分子内のホスホジエステル結合を切断する。

【００１１】

エキソヌクレアーゼは、ポリヌクレオチド鎖の切断を開始するために遊離末端を必要とするが、その一方でエンドヌクレアーゼは、遊離末端が利用可能でない場合でさえ、例えば、共有結合的に閉じたポリヌクレオチド環中でも、ポリヌクレオチド分子中で切断を伴う。いくつかのヌクレアーゼは、内部（endo）活性と外部（exo）活性の両方を有する。一本鎖DNA（ss-DNA）に特異的なヌクレアーゼもあり、二本鎖DNA（ds-DNA）に特異的なヌクレアーゼもある。いくつかのヌクレアーゼは、両方のタイプのDNAを切断し得る。

【００１２】

3'から5'の方向に作用するヌクレアーゼもあり、一方、5'から3'の方向に作用するヌクレアーゼもある。いくつかは方向特異性を有さず、両方向で作用する。いくつかのエンドヌクレアーゼは、切断のための認識部位において、ヌクレオチド配列特異的または部位特異的である。また、ヌクレアーゼ活性を有するタンパク質と同じタンパク質または複合体上でそのその他の非切断機能を示すヌクレアーゼが存在する。異なる機能は特定の機能的ドメインに起因し得ることもある。本明細書において、「ヌクレアーゼ」とは、特定のヌクレアーゼまたは（例えば、これらに限定されるわけではないが内部活性またはDNase活性など）特定の活性を有するヌクレアーゼを特に意味しない限りは、一般的な意味でのヌクレアーゼを指す。

【００１３】

原核生物系抽出物に加えて、真核生物系抽出物もまた開発されている。これらの真核生物系は、外因的に添加された大腸菌（E.coli）のRNAポリメラーゼまたはコムギ胚芽RNAポリメラーゼを使用して、外因性DNAを転写する。これらの系は、効率の低さのため、ならびに、cDNAクローニング技術が広範に成功する前にこれらが開発および使用されたという事実のため、真核生物遺伝子の一般的研究においては限られた成功をもたらすことしかできなかった。他の共役系は、ウイルスタンパク質合成の研究のために開発されているが、一般的に非ウイルス性鋳型に対しては有用でない。

【００１４】

1980年代の半ばに、特にT7、SP6、およびT3などのファージポリメラーゼを使用する、より効率的なインビトロ転写系の開発により、タンパク質合成系がコムギ胚芽およびウサギ網状赤血球由来の翻訳抽出物を使用して、クローニングされたmRNA配列をインビトロでより効率的に翻訳すると規定されることが可能になった。例えば、PeraraおよびLingappa（J. Cell Biol. 101: 2292-2301 (1985)）は、SP6 RNAポリメラーゼ転写反応が、タンパク質の産生のために網状赤血球溶解に直接付加され得ることを示した。

【００１５】

この知見は、翻訳の前にmRNAを精製する必要性に対して光明を与えた。後に他の研究者は、反応物中にファージポリメラーゼおよび適切な転写のコファクターを含めることによって、転写および翻訳が網状赤血球溶解物中で共役し得ることを示した（Spirinら、Science、242: 1162-1164 (1988); Craigら、Nucleic Acids Res.、20: 4987-4995 (1992)）。より最近では、Thompsonらに付与された米国特許第5,324,637号により、真核生物における共役した転写および翻訳系が説明された。Thompsonは網状赤血球溶解物およびファージポリメラーゼを使用したが、ここでは2つの反応の共役は、特定の条件、顕著には、マグネシウムイオンの濃度によって促進され、これは、同じ反応混合物中で転写および翻訳の両方が起こるのを可能にした。

【００１６】

転写系および翻訳系に関する共役したアプローチは多くのタンパク質について有用であるが、翻訳の効率は使用されるDNA鋳型のタイプ（例えば、スーパーコイルプラスミドDNAまたは線状DNA）に依存して広範囲に変動する。さらに、共役反応で合成されたmRNAの量を制御することは、大部分の共役条件（例えば、Thompsonに開示された条件）では難しい。翻訳の効率および忠実度は、反応の間に添加されたmRNAおよび存在するmRNAの量に依存するので、反応が同時に起きるようなこれらの共役系を使用して得られた結果の望ましくない変動性については、従来の反応条件下で、転写および翻訳は種々の鋳型間で両立しないという説明が可能である。

【００１７】

引き続いて多くの改良がなされ（例えば、Kimら、Eur. J. Biochem.、239: 881-886(1996); PatnaikおよびSwartz、Biotechniques、24: 862-868(1998); ならびにKimおよびSwartz、Biotech. and Bioeng.、66: 180-188(1999)を参照されたい）、IVTT系が改良された。しかし、これらの系が関心対象のタンパク質の広範な分析のために十分な量のタンパク質を産生しないという点は、従来のIVTT系の主たる問題の1つである。

【００１８】

従来の非効率的なタンパク質合成は、部分的には、エネルギー供給の維持、転写のためのDNA鋳型の安定性、および翻訳のためのmRNAの安定性といった因子に起因し得る。

【００１９】

DNA鋳型の安定性の問題は、線状の基質（例えば、PCRに由来する生成物または制限酵素消化断片）が、タンパク質を生成するために無細胞抽出物中で使用される場合に、特に明白である。線状のDNA断片は、大腸菌の細胞内エキソヌクレアーゼ、特にRecBCD（Prattら、Nucleic Acids Res.、9: 4459-4474(1981); Benzingerら、J.Virol.、15: 861-871(1975); LorenzおよびWackernagel、Microbiol Rev.、58、563-602(1994)）により、およびそのその他のヌクレアーゼによってさえも、急速な分解を受けやすい。

【００２０】

ほとんどの場合、プラスミドDNAは安定性がより高いため、IVTT系においては目的の遺伝子を含有するスーパーコイルプラスミドDNAが使用される（Kudlickiら、Anal. Biochem.、206: 389-393(1992)）。線状DNAは、DNAヌクレアーゼ、特にDNAエキソヌクレアーゼ（例えば、RecBCD）によって、より読み取り可能に分解される。エキソヌクレアーゼをもたないRecBCD変異株が作製されている。この変異株は、それほど急速に線状DNAを分解しないが、このような変異株は極度に増殖が不十分であり、従って満足できる結果をもたらさない（Yuら、PNAS、97: 5978-5983(2000)）。

【００２１】

無細胞タンパク質合成のための大腸菌抽出物が、大腸菌のRecD変異体を使用して作製された(Lesleyら、J. Biol. Chem.、266: 2632-2639(1991)。しかし、剪断された染色体DNAは、変異したヌクレアーゼによって分解されないため、RecD変異体大腸菌を使用して作製した無細胞抽出物は、高レベルの染色体DNA混入物を含んでいた。この問題を解決するために、ミクロコッカス小球菌（micrococcal）ヌクレアーゼを添加し、混入した染色体DNAを分解してバックグラウンドを最小化している。同様に、全体のRNase E欠失変異体が作製されているが、これらの完全な欠失変異体の細胞増殖もまた不十分であり、無細胞抽出物を提供するためには不適切である。

【００２２】

さらに、このような変異体から作製された無細胞抽出物は、タンパク質産生を増大させなかった。また未知の理由により、このタンパク質合成は、PCR産物がT7プロモーターを含有したにも関わらず、T7 RNAポリメラーゼ添加と無関係である。

【００２３】

大腸菌はまた、二本鎖DNAに対して特異性を有するデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）を含む（LinnおよびDeutscher、n: Nucleases、Cold Spring Harbor Laboratory Press、455-468(1993)）。またこれらのヌクレアーゼは、鋳型DNAの分解の原因となり得、それによってタンパク質産生を減少させる。

【００２４】

上述したように、共役IVTT系における不十分なタンパク質合成は、DNAの不安定性またはmRNAの不安定性のいずれかに起因し得る。非共役合成系においては、不十分なタンパク質合成は、特にmRNAの不安定性から生じ得る。

【００２５】

大腸菌は、多数のRNaseを含むことが知られている（LinnおよびDeutscher、In: Nucleases、Cold Spring Harbor Laboratory Press、455-468(1993)）。ペリプラズム（periplasmic）酵素であるRNaseIは、大腸菌における主要な非特異的RNaseの1つであり、基質としてのオリゴRNAに作用する（Meadorら、Eur. J. Biochem.、187: 549(1990); ならびにMeadorおよびKennel、Gene、95: 1(1990)）。いくつかのRNaseは大腸菌においてmRNA分解に関与し、これには、エンドヌクレアーゼ（例えば、RNase E、RNase K、およびRNase III）および3'-エキソヌクレアーゼ（例えば、RNase IIおよびポリヌクレオチドホスホリラーゼ）が含まれる（Grosら、Nature、190: 581-585(1961); Emoryら、Genes Dev.、6: 135-148(1992); Belasco, J.G.、Control of mRNA stability、Academic Press、3-12(1993); Lopezら、Mol. Microbiol.、33: 188-199、1999; MohantyおよびKushner、PNAS、97: 11966-11971(2000)）。本発明は部分的に、これらの酵素を変異させるかまたは阻害することは、結果として無細胞抽出物中でのタンパク質合成を増大させ得るという前提に基づいている。

【００２６】

RNase変異体は当技術分野で公知である。例えば、RNaseI、RNaseII、およびRNase IIIを欠く大腸菌が新規リボヌクレアーゼの特徴付けのために使用された、NiyogiおよびDatta、J. Biol.Chem.、250: 7307-12 (1975)を参照されたい。RNaseI欠損変異体が、IYTT用の材料の潜在的供給源として使用されているが、効率的なタンパク質産生に関しては不満足な結果であった（Kudlickiら、Anal. Biochem.、206: 389-393 (1992)およびEllmanら、Methods in Enzymology、202: 301-336 (1991)）。他の変異体、例えばヌクレアーゼ変

異体を変異させる方法および選択する方法は、当技術分野で公知である。

【００２７】

従来の合成系から得られる不十分なタンパク質合成もまた、部分的には、アミノ酸の維持および合成反応の補助のためのエネルギー供給に関連する因子に起因し得る。

【００２８】

国際公開公報第00/55353号は、翻訳に必要なATPを補充するための2つの方法を開示している。これらの方法に従って、PEP（ホスホエノールピルビン酸）またはピルビン酸がATPのエネルギー源を再生するために使用される。開示された第1の方法は、当技術分野ですでに公知であって、ADPからATPを再生するためにピルビン酸キナーゼと共に使用されるホスホエノールピルビン酸（PEP）を含む。国際公開公報第00/55353号の第2の方法では、ピルビン酸は、ATPを再生するためにピルビン酸オキシダーゼと共に使用される。

【００２９】

エネルギー源およびアミノ酸の両方が、タンパク質合成に関係なくこれらの系で欠乏している（国際公開公報第00/55353号；KimおよびChoi、J. Biotech.、84: 27-32(2000)）。タンパク質合成は、アミノ酸およびエネルギー源の2度目の添加によって回復され得る。

【００３０】

これらの方法は、ATPを再生するために有用であり得るが、最初に利用可能であるかまたは再生したATPを不十分量使用することにより、タンパク質収量の減少がなお生じ得る。例えば、ホスファターゼはATPを加水分解でき、これによって所望のIVTTプロセスのために利用可能でないATPエネルギーが産生される。大腸菌のアルカリホスファターゼは、ATPを加水分解し得る公知のホスファターゼの1つである（例えば、Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology、Hyone-Myong Eun、Academic Press、307-333頁を参照されたい）。「ホスファターゼ」を含まない名称を有する多くの酵素（例えば、「ヘリカーゼ」）もまた、ATPを加水分解する。従って、タンパク質合成を駆動することを目的とするエネルギー産生システムから作製されるATPは、活性ホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼまたはヘリカーゼ）によって潜在的に浪費され得、結果としてタンパク質合成の減少をもたらす。

【００３１】

コムギ胚芽無細胞系において、ATPおよびGTPの加水分解を減少させることによって、ホスファターゼ免疫枯渇（immunodepletion）がタンパク質合成を改善することが示された（Kawarasakiら、J. Biotech. 61: 199-208(1998)）。ATP再生のために一般的に使用される基質であるホスホエノールピルビン酸（PEP）がタンパク質合成を限定するホスファターゼによって分解されることもまた、示唆されている（KimおよびSwartz、Biotech. and Bioeng.、66: 180-188(1999); SwartzおよびKim、米国特許第6,168,931号 (2001); KimおよびChoi、J. Biotech. 84: 27-32 (2000)）。

【００３２】

当技術分野の現在の状況を鑑みると、タンパク質の産生を増大させる改良IVTT系を開発することが必要である。鋳型由来のmRNAを含むmRNAを安定化もしくは維持することによって、合成に使用されるエネルギーを保存することによって、および/または鋳型からの十分なタンパク質合成に必要なエネルギーを供給するための十分なエネルギーを再生する基質を供給することによって、鋳型DNAを安定化または維持するための組成物および方法を提供するという点において、本発明は、この必要性を満たす。

【００３３】

本明細書中に引用されたすべての刊行物および特許出願は、本明細書において各々全体が参照として組み入れられる。

【発明の開示】

【００３４】

発明の概要

本発明はインビトロ合成系に関し、より具体的には、インビトロペプチド/タンパク質

合成系またはインビトロ核酸合成系、ならびにこのようなインビトロ合成の効率を改善する方法およびキット、ならびに関連する組成物に関する。より具体的には、本発明は、合成用のエネルギー供給の改善を提供することによって、および/または、より効率的で延長された合成反応のためのタンパク質もしくは核酸の合成用の核酸鋳型を維持することによって、タンパク質合成または核酸合成の効率を改善する系、方法、およびキットを特徴とする。本発明は、共役型の転写/翻訳系および非共役型の翻訳系を含む、任意の種のインビトロタンパク質合成系においても使用され得る。本発明の好ましい合成系は、少なくとも一種の細胞抽出物、少なくとも一種のエネルギー源、および少なくとも一種の核酸鋳型を含む。

【００３５】

組成物および方法は、細胞抽出物を用いる合成を増大させるために提供される。1つの局面において、合成のために抽出物または成分を提供する細胞を、合成反応における望ましくない成分/タンパク質/酵素を阻害または不活性化するために修飾または変異させる。例えば本発明に従って、RNase EなどのRNaseにおいて、またはアルカリホスファターゼおよびエンドヌクレアーゼAなどのその他の酵素において、変異が作製され得る。さらに、核酸鋳型に作用するヌクレアーゼのインヒビター（例えば、RecBCDを阻害するためのλファージのGamタンパク質）または合成反応におけるそのその他の望ましくないもしくは有害な成分/タンパク質/酵素のインヒビターなどのインヒビターが、インビトロにおける所望の生成物の産生を増大させるために使用され得る。

【００３６】

代替的に、または修飾/変異細胞抽出物および/もしくはインヒビターに加えて、有害な成分/タンパク質/酵素の合成系路は、例えば、有害な成分/タンパク質/酵素の正常な量を誘導できないもしくは酵素活性のためのコファクターを供給できないような増殖のストラテジーによって、または有害な遺伝子もしくはタンパク質の転写もしくは翻訳のインヒビターによって、遮断され得るまたは減速され得る。酵素活性の減少を生じる増殖ストラテジーを利用することは、酵素を調節または阻害するための本発明の1つの態様である。本発明はまた、これらの修飾/変異細胞および/または遺伝子に関し、かつこれらの細胞を増殖させることができる培地に関する。

【００３７】

従って本発明は、より一般的にはより効率的な合成に関し、この合成は、例えば以下を含む：

高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成に関与する少なくとも一種の酵素/成分/タンパク質が存在しないか、除去されたか、または（例えば、発現に関与するかまたはこのようなタンパク質/成分/酵素をコードする一種または複数の遺伝子を調節、変異、または修飾することによって）その活性を減少もしくは不活性化するように修飾されているような、細胞由来の少なくとも一種の抽出物；高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成に関与する、少なくとも一種の酵素/成分/タンパク質の少なくとも一種のインヒビター；ならびに/あるいは、合成プロセスのための化学的エネルギーを供給する少なくとも2つのエネルギー源。本発明に従って、これらの特徴のいずれか1つまたはいくつかが、種々のインビトロ合成系において組み合わされうりかつ使用され得る。認識されるように、本発明はまた、所望される場合、タンパク質合成反応の種々の中間体を調製するためにも使用され得る。例えば本発明は、RNAを調製するために（DNA鋳型の転写の間に）使用され得、かつこのようなRNAが単離されてもよく、または標準的な分子生物学的技術によってさらに処理されてもよい。

【００３８】

より具体的には、本発明は、以下のうち1つまたは複数（またはそれらの組み合わせ）を含むインビトロ合成系を含む態様を特徴とする：

i）高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成を触媒する少なくとも一種の活性（例えば、酵素活性）（例えば、ヌクレアーゼ、ホ

スファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の除去、調節、阻害、または不活性化；
ii）合成のための少なくとも一種の細胞抽出物の使用、ここで、抽出物は、高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成を触媒する少なくとも一種の酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の（修飾していない抽出物と比較した）活性の減少または不活性化を示すように修飾されている；ならびに
iii）合成のためのエネルギーを供給する少なくとも二種のエネルギー源。

【００３９】

本発明はまた、本発明を実行するための組成物、および本発明を実行する際に作製される組成物を特徴とする。このような組成物は、本発明の構成成分（例えば、インヒビター、細胞抽出物、エネルギー源など）のいずれか1つまたは組み合わせを含み得、かつ/または、転写反応および/もしくは翻訳反応の間に使用される基質（例えば、ヌクレオチド、アミノ酸、ポリメラーゼ、酵素、コファクター、緩衝液、および緩衝液塩）を含み得る。さらに、このような組成物は、任意の数の、転写反応および/または翻訳反応の生成物（例えば、RNA、ペプチド、タンパク質など）を含み得る。好ましくは、本発明の組成物は、少なくとも一種の酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の少なくとも一種のインヒビターからなる群より選択される少なくとも1つの成分；例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される少なくとも1つの機能の活性の減少を示すように修飾されている、タンパク質合成のための少なくとも一種の抽出物；ならびに、合成のためにエネルギーを供給する少なくとも二種のエネルギー源を含み得る。

【００４０】

本発明はまた、インビトロ合成のための改良方法を特徴とする。このような方法は、RNAまたは他の核酸分子、およびペプチドまたはタンパク質を含む、種々のインビトロ産物の産生を提供する。1つの局面において、RNAまたは他の核酸分子は、一種または複数の核酸鋳型および少なくとも1つの本発明の成分（例えば、インヒビター、エネルギー源、細胞抽出物など）を混合すること、ならびに、全てまたは一部の鋳型に相補的な一種または複数の核酸分子（例えば、RNA）を産生するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートすることによって産生され得る。別の局面において、ペプチドまたはタンパク質は、一種または複数の核酸鋳型（好ましくはRNA）および少なくとも1つの本発明の成分（インヒビター、エネルギー源など）を混合すること、ならびに、全てまたは一部の鋳型によってコードされる一種または複数のペプチドまたはタンパク質を産生するのに十分な条件下で、混合物をインキュベートすることによって産生され得る。本発明の方法は、産生された生成物をさらに処理するためのさらなる段階をさらに含み得る。例えば、産生された核酸分子およびタンパク質は、他の生成物を産生するために使用され得る。それらは、活性アッセイまたは機能性アッセイにおいて使用され得るか、またはさらに精製され得る。理解されるように、本発明の方法はまた、例えば、一種または複数のヌクレオチドまたはその誘導体（これらは検出可能に標識されていてもよい）、一種または複数のアミノ酸またはその誘導体、一種または複数のポリメラーゼ、一種または複数のコファクター、一種または複数の緩衝液および/または緩衝液塩、一種または複数のエネルギー源（ATP、PEPなど）、一種または複数の細胞抽出物、一種または複数の核酸鋳型などの、1つまたは複数のその他の成分の存在下で実行され得る。本発明の方法は、好ましくは、以下からなる群より選択される1つまたは複数の本発明の成分（またはその組み合わせ）を含む：
少なくとも一種の酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の少なくとも一種のインヒビター；
少なくとも一種の酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の活性の減少を示すように修飾された、合成のための少なくとも一種の抽出物；ならびに、
合成のためのエネルギーを供給する少なくとも二種のエネルギー源。本方法は、好ましく

は、一種または複数の核酸鋳型を、以下からなる群より選択される少なくとも1つの成分と接触させる段階、および、全てまたは一部の鋳型によってコードされる少なくとも一種のタンパク質を産生するのに十分な条件下で混合物をインキュベートする段階を必要とする：
少なくとも一種の酵素/成分/タンパク質が存在しないか、除去されたか、または高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成を触媒するかあるいはその活性を不活性化するようなその活性を減少もしくは不活性化するように修飾されているかもしくは変異されているような、細胞由来の少なくとも一種の抽出物；
高エネルギーリン酸結合の加水分解またはホスホジエステル結合の加水分解もしくは形成を触媒する、少なくとも一種の酵素/成分/タンパク質の少なくとも一種のインヒビター；ならびに
合成のための化学的エネルギーを供給して混合物を形成する、少なくとも二種のエネルギー源。望ましいならば、当技術分野で公知の任意の検出方法を用いて、生成物（例えば、RNAおよびタンパク質）の産生をモニタリングすることができる。酵素の阻害は、化学的なインヒビターを添加する代わりに、または化学的なインヒビターを添加することに加えて、選択された増殖条件によって達成され得る。またインヒビターは、インサイチュでも合成され得る。例えば、少なくとも一種のインヒビター（例えば、Gam）をコードする一種または複数の遺伝子は、本発明において使用される細胞抽出物を調製するために使用される細胞または細胞培養物中で発現され得る。従って、任意の数の所望のインヒビターが、別々に添加する必要なく、インビトロ反応混合液に提供され得る。1つの局面において、このようなインヒビターは、組換え的に産生される（例えば、少なくとも一種の阻害遺伝子がクローニングおよび発現される）。

【００４１】

より具体的には、本発明は、以下からなる群より選択される少なくとも一種または少なくとも二種または少なくとも三種の成分を含む、インビトロ合成の方法に関する：少なくとも一種の酵素（例えばヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の少なくとも一種のインヒビター；少なくとも一種の酵素（例えばヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の活性の減少を示すように天然型または野生型の抽出物から修飾されている、合成のための少なくとも一種の細胞または抽出物；ならびに、タンパク質および/または核酸合成のためにエネルギーを供給する少なくとも二種のエネルギー源。

【００４２】

インビトロ合成のためのキットもまた、本発明の特徴である。このようなキットは、本発明を実行するための任意の数の試薬もしくは成分、またはその組み合わせを含み得る。本発明のキットは、好ましくは、以下からなる群より選択される1つまたは複数の構成成分を含む：
一種または複数の本発明の成分（例えば、インヒビター、エネルギー源、細胞抽出物など）、一種または複数のヌクレオチドまたはその誘導体、一種または複数のアミノ酸またはその誘導体、一種または複数のポリメラーゼ、一種または複数のコファクター、一種または複数の緩衝液または緩衝液塩、一種または複数のエネルギー源、一種または複数の細胞抽出物、一種または複数の核酸鋳型、キットの効率を決定するためまたは生成物（例えば、核酸およびタンパク質の生成物）の産生についてアッセイするための一種または複数の試薬、ならびに、本発明の方法を実行するためまたは本発明のキットおよび/もしくはその成分を使用するための使用説明書またはプロトコール。本発明のキットは、任意の数の個別の容器、チューブ、バイアルなどの中に上記の成分の1つまたは複数を含み得るか、またはこのような成分は、このような容器中において様々に組み合わされ得る。より詳細には、本発明のキットは、以下からなる群より選択される少なくとも一種の成分を含み得る：
少なくとも1つの酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の少なくとも一種のインヒビター；少なくとも1つの酵素

（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼからなる群より選択される酵素）の活性の減少を示すように修飾されている、タンパク質合成のための少なくとも一種の抽出物；ならびに、合成のためにエネルギーを供給する少なくとも二種のエネルギー源。

【００４３】

多くのヌクレアーゼが公知であり、これらは本発明に従って除去、調節、変異、または阻害され得る。1つの局面において、このようなヌクレアーゼをコードする遺伝子は、インビトロ合成抽出物がそこから作製されるような細胞中で変異または修飾され得る。このような遺伝子の多くは公知であるか、または当技術分野で周知の技術または本明細書中に記載された技術によって容易に同定および修飾され得る。さらに、このようなヌクレアーゼの発現は、細胞の増殖条件を制御することによって調節され得る。さらに、化合物/分子/タンパク質は、一種または複数のこのようなヌクレアーゼを阻害するために使用されて、このようなヌクレアーゼが合成を弱めるのを妨害することができる。このようなインヒビターは公知であるか、または、本発明における使用のために容易に同定され得る。このような変異細胞または選択的増殖細胞を用いて合成を開始することによって、あるいは合成系に対するヌクレアーゼのインヒビターを添加することまたはインヒビターを含めることによって、優れた合成の結果が得られ得る。

【００４４】

インヒビターは、任意の公知の方法によって、本発明の系において使用され得るか、または本発明の系に含めることができる。例えばインヒビターは、核酸鋳型の導入の前、導入の間、または導入の後に、系に添加され得る。またインヒビターは、抽出物を調製するために使用される細胞中で転写もしくは発現され得るか、またはタンパク質合成反応の間に転写または発現され得る。インヒビターは生合成化合物であってもよいが、本発明のインヒビターは生物学的に産生され得る化合物に限定されるわけではない。

【００４５】

本発明により除去、阻害、変異、修飾、または調節され得るヌクレアーゼの例には以下が含まれる：エキソヌクレアーゼI、エキソヌクレアーゼII、エキソヌクレアーゼIII、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIII（εサブユニット）、エキソヌクレアーゼIVAおよびIVB、RecBCD（エキソヌクレアーゼV）、エキソヌクレアーゼVII、エキソヌクレアーゼVIII、RecJ、dRpase、エンドヌクレアーゼI、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼIV、エンドヌクレアーゼV、エンドヌクレアーゼVII、エンドヌクレアーゼVIII、fpg、uvrABC、mutH、vsrエンドヌクレアーゼ、ruvC、ecoK、ecoB、mcrBC、mcrA、mrr、ならびにトポイソメラーゼ（トポイソメラーゼI、トポイソメラーゼII、トポイソメラーゼIII、およびトポイソメラーゼIVなど）。このような除去、阻害等は、本発明の合成反応において使用される核酸鋳型の保存または保護を可能にする。例えば、細胞のDNAヌクレアーゼは変異、修飾、阻害などされて、DNA鋳型を維持または保存することができる。大腸菌または他の細胞に由来するこのようなDNaseは、当技術分野で公知である。

【００４６】

さらに、RNAヌクレアーゼは、変異、修飾、阻害などされて、RNA鋳型を保護または保存することができる。例えば、大腸菌リボヌクレアーゼ（例えば、エンドリボヌクレアーゼI、M、R、III、P、E、K、H、HII、IV、F、N、P2、0、PCおよびPIV）およびエキソヌクレアーゼ（例えば、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ、オリゴリボヌクレアーゼ、ならびにエキソリボヌクレアーゼII、D、BN、T、PH、およびR）は、変異または修飾または阻害されて、タンパク質合成のためにmRNAを保護することができる。抽出物のために使用され得る細胞によって、その細胞に天然に存在するそのその他のリボヌクレアーゼが変異、除去、修飾、または阻害などされて、タンパク質合成のための鋳型を維持または保護することができる。多くのヌクレアーゼおよびヌクレアーゼインヒビターが市販されている。例えば、Rnasin（登録商標）（Promega）は、哺乳動物系においてRNaseインヒビターとして十分に特徴付けされているが、原核生物RNaseの阻害には有効でない。

【００４７】

遺伝子を変異させる方法およびヌクレオチドをコードする変異遺伝子を選択する方法は、当技術分野において公知である。このような変異には、（例えば、部位特異的突然変異による）点変異、欠失変異、および挿入変異が含まれる。本発明はまた、変異、修飾、インヒビター、およびそのその他の方法を、単独で、または好ましくは組み合わせて含む、本発明の局面の使用を意図している。酵素活性の除去、調節、または減少に関するこれらの態様は、合成反応のためのエネルギー要求を補助する特徴をさらに含み得る。

【００４８】

他の酵素の除去、調節、または減少も同様に、それらが所望の生成物の産生を方向付けるかまたは強調する程度までは有用であり得る。例えば、核酸鋳型がRNAである場合、ポリメラーゼ活性は望ましくない可能性がある。従ってポリメラーゼ活性の不活性化または阻害は、所望のタンパク質生成物の収量および純度を改善し得る。

【００４９】

RNAポリメラーゼの調節もまた、DNA鋳型を使用してRNAを産生する系において役立ちうる。RNA合成が迅速である場合、リボソームによるRNAの保護が不十分である可能性がある。リボソームが適切な期間、新生RNAに結合してこれを保護することを可能にすることによって、変異または調節されたRNAポリメラーゼの使用は、RNAを有利に節約できる。

【００５０】

タンパク質および核酸の合成は、典型的にはエネルギー源を必要とする。従って、このような合成を補助するために十分なエネルギー源を供給することが本発明の特徴である。エネルギーは、mRNAを産生するための転写の開始に必要である（例えば、DNA鋳型が使用される場合、および翻訳の開始のために例えばGTPの形態で高エネルギーリン酸が使用される場合）。リボソームによる1コドン（3ヌクレオチド；1アミノ酸）の連続する段階それぞれは、さらなるGTPからGDPへの加水分解を必要とする。ATPもまた、典型的には必要とされる。タンパク質合成の間に重合化されるアミノ酸については、ATPが最初に活性化されなければならない。活性化には、2つの高エネルギーリン酸結合の加水分解が必要である。従って、アミノ酸単量体が、Mg^{2+}、tRNA、およびATPの存在下で反応して、アミノアシル-tRNA、AMPおよびPP_iを形成する。従って、高エネルギーリン酸結合からの有意な量のエネルギーが、タンパク質および/または核酸の合成の進行に必要とされる。

【００５１】

本発明者らは、合成に必要な化学的代謝物を供給し得る、一種を上回る、好ましくは二種またはそれ以上のエネルギー源を使用して、合成の改良が達成され得ることを見出した。高エネルギーリン酸結合を生成または再生するエネルギー源が好ましい。

【００５２】

好ましくは、本発明は、核酸および/またはタンパク質の合成の効率を改善するための上記の成分または方法の1つまたは複数を特徴とする。これらの改善の組み合わせもまた、本発明の態様である。例えば、本発明の組成物、系、方法、またはキットは、本明細書中に記載される、例えば以下の改善のいずれか1つまたは組み合わせを特徴としうる：少なくとも一種のエネルギー源ならびに少なくとも一種の酵素活性の除去および/または調節；少なくとも一種のエネルギー源および少なくとも一種のインヒビター；少なくとも一種の酵素活性の除去および/または調節ならびに一種のインヒビター；少なくとも一種のエネルギー源、少なくとも一種の酵素活性の除去および/または調節、ならびに1つのインヒビター；少なくとも二種のエネルギー源；少なくとも二種の酵素活性の除去および/または調節；ならびに少なくとも二種のインヒビター。より一般的には、本発明に従って、少なくとも一種の第1の改善が、少なくとも二種の別の改善と組み合わされ；三種またはそれ以上の任意の改善と、1つ、2つ、3つなどのそのその他の改善と組み合わされる。従って本発明は、その適用において頑強であり、かつ本発明の開示から当業者には明らかであるような多くの異なる態様を含む。

【００５３】

発明の詳細な説明

本発明は、タンパク質および核酸のインビトロ合成に関する。本発明は、本発明の特徴

の1つまたは複数を含有する合成系、方法、およびキットを含む。本発明の合成系は、核酸鋳型から核酸を合成するため、および核酸鋳型からタンパク質を合成するための必要成分を含む。本発明のインビトロ合成系は、細胞の境界の外側における効率的な合成を提供する。本発明の方法は、本発明の系または組成物を作製するため、および本発明の系を使用して関心対象の生成物分子を産生するために有用である。本発明のキットは、本発明のインビトロ合成系の実施を可能にするかまたは容易にする。

【００５４】

一般的な系は、所望の核酸（例えば、RNAまたはmRNA）および/またはタンパク質をコードする核酸鋳型を含む。核酸鋳型は任意の鋳型（例えば、DNA、RNA、特にmRNA）であり得、かつ任意の形態であり得る（例えば、線状、環状、スーパーコイル、一本鎖、二本鎖など）。このような鋳型は、所望のタンパク質または核酸分子の産生を導く能力について選択される。所望のタンパク質は、ポリペプチド分子を産生するために核酸鋳型によってコード可能なアミノ酸の、任意のポリマーであり得る。タンパク質は、合成と同時に、または合成後に、さらに処理され得る。望ましいならば、系は、コドンが、（検出可能に標識されたアミノ酸を含む）非通常または非天然のアミノ酸を含む通常とは異なるアミノ酸をコードするように、当技術分野で公知であるように改変され得る。

【００５５】

本明細書において、特記されない限り、用語は、遺伝コード材料からのタンパク質または核酸合成の分野の文脈における通常の意味を有する。例えば以下の通りである。

【００５６】

翻訳とは、mRNA鋳型からのポリペプチド（例えば、タンパク質）の合成である。

【００５７】

ヌクレアーゼとは、ポリヌクレオチドまたはポリ核酸の加水分解をもたらす酵素活性を有する化合物である。一般的に、DNAおよびRNA両方のホスホジエステル結合は加水分解に対して抵抗性である。これらの結合の加水分解を加速させる能力を有する多くのヌクレアーゼを産生することによって、生物学的な系は補償される。ヌクレアーゼを分類するための様々な方法が存在する。例えば、エンドヌクレアーゼは、ヌクレオチド配列における内部の部位でその核酸基質を切断するヌクレアーゼである。エキソヌクレアーゼは、その核酸基質の遊離末端から連続的にヌクレオチドを切断するヌクレアーゼである。いくつかのヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼを両方有する。

【００５８】

ヌクレアーゼは、それらの特異性に関連する種々の機能、例えば、DNA修復活性、3'から5'もしくは5'から3'の特異性、二本鎖DNAもしくは一本鎖DNA、またはRNA：DNAの特異性などを有する。ヌクレアーゼは、3'末端α,β-不飽和アルデヒドおよび5'末端リン酸（APリアーゼ）；3'-ヒドロキシルヌクレオチドおよび5'末端リン酸（II型エンドヌクレアーゼ）；または5'-ヒドロキシルおよび3'-リン酸（III型エンドヌクレアーゼ）を産生し得る。ヌクレアーゼは、優先的に、1つまたは複数の種のポリヌクレオチド、例えば、一本鎖DNA、二本鎖DNA、mRNA、オリゴRNA、リボソームRNAなどを処理し得る。制限ヌクレアーゼは、特定のヌクレオチド配列を有する部位で切断するヌクレアーゼである。

【００５９】

ヌクレアーゼのさらなる特性およびタイプは、ヌクレアーゼに関する入手可能な多くの刊行物に記載されているように、当技術分野において公知である。Nucleases、第2版、Linnら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993)は、具体的に参照され、その全体が参照として本明細書によって組み入れられる。本発明の1つの特徴は、ヌクレアーゼの機能のいずれか1つまたは複数を除去、妨害、または阻害することに関し、あるいは、1つもしくは複数のヌクレアーゼ活性または核酸鋳型もしくは他の基質に有害であるもしくは損害を与えるようなそのその他の活性を有する細胞からの細胞抽出物を使用することに関し、この基質は、このような活性をコードする1つまたは複数の遺伝子を例えば修飾するかまたは変異させることによって、減少されているか、実質的に減少されているか、または排除されている。

【００６０】
DNaseはDNAを切断する。DNAとは、遺伝の共通の分子的な基礎である核酸である。DNAの共通した形態は一本鎖および二本鎖である。二本鎖DNAは、デオキシリボースとリン酸の交互の連結を含む2本の鎖から内部へ突き出したプリン塩基とピリミジン塩基との間の水素結合によって結合している二重らせんから構成される。本発明は、任意の形態のDNA（cDNA、組換えDNA、単離されたDNA、および合成DNAを含む）を使用することを意図する。
【００６１】
RNaseはRNAを切断する。RNAとは、チミンの代わりにウラシルが構造成分として存在すること以外は、DNAにおいて見出された4つの主要な塩基すべておよびリボースを含む核酸である。RNAは、細胞の化学的活性の制御と関連している。メッセンジャーRNA（mRNA）は、タンパク質合成のための鋳型として作用するRNAである。関心対象のタンパク質をコードするRNAは、本発明の系に添加され得るか、または本発明の系に存在するかもしくは添加されたDNAから産生され得る。
【００６２】
「ヌクレオチド」とは、塩基-糖-リン酸の組み合わせを指す。ヌクレオチドは、核酸（例えば、DNAおよびRNA）の単量体単位である。ヌクレオチドは、ポリメラーゼによって核酸に組み込まれる。ヌクレオチドという用語には、例えば、リボヌクレオシド三リン酸（例えば、ATP、CTP、ITP、UTP、GTP、TTP、またはそれらの誘導体）、およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸（例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、またはそれらの誘導体）が含まれる。このような誘導体には、ポリ核酸分子、例えば、[αS]dATP、7-デアザ-dGTP、および7-デアザ-dATPに組み込まれ得る任意の単量体が含まれる。本明細書中で使用されるヌクレオチドという用語はまた、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ddNTP）およびそれらの誘導体に関する。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例示的な例には、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、およびddTTPが含まれるがこれらに限定されるわけではない。本発明によると、「ヌクレオチド」とは標識されていなくてもよく、周知の技術によって検出可能に標識されていてもよい。検出可能な標識には、例えば、放射性同位元素のような異なる同位元素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、および酵素標識が含まれる。
【００６３】
本発明の文脈において、インビトロという用語は、細胞または生物体の外部の系を指し、無細胞系を指すこともある。インビボ系とは、懸濁液中にあるか、または他の細胞もしくは固形物に付着もしくは接触しているかに関わらず、本質的に無傷の細胞を指す。インビトロ系は、操作可能性の面でより有利である。成分を細胞内部に送達することは重要ではなく、連続する細胞機能に不適合な操作もまた可能である。しかし、インビトロ系は、所望の機能を提供するために破壊された細胞または種々の成分の使用を含み、従って、細胞の空間的な関係は失われている。インビトロ系が調製された場合、所望の活性に決定的と考えられる成分は、廃棄された細胞細片とともに失われ得る。従って、インビトロ系はより操作可能であり、インビボ系とは異なって機能し得る。
【００６４】
核酸鋳型とは、別の核酸鋳型またはタンパク質の合成を行うために働くポリ核酸である。鋳型は、多数のヌクレオチドサブユニットからなる分子であるが、ヌクレオチドサブユニットの長さおよびタイプは変化し得る。DNAおよびRNA（例えばmRNA）は、タンパク質および核酸の合成のために鋳型として使用され得る種の核酸である。DNA鋳型は転写されて、全てまたは一部の鋳型に相補的なRNA鋳型を形成する。RNA鋳型は翻訳されて、全てまたは一部の鋳型にコードされるタンパク質またはペプチドを産生する。従って、合成反応における鋳型とは、所望のタンパク質を直接的または間接的にコードする一種または複数の核酸である。
【００６５】
タンパク質とは、ペプチド結合を介して互いに結合した重合化されたアミノ酸（またはその誘導体）の分子である。本発明の文脈において、ポリペプチドはタンパク質の一種で

ある。本発明に従って産生されたタンパク質は、当技術分野で公知の任意の方法によってアッセイされ得る。例えば、産生されたタンパク質に特異的なアッセイまたはより一般的なアッセイ（例えば、^{35}S-Metを使用する放射活性アッセイのようなアッセイ）が使用され得る。

【００６６】

エネルギー源とは、所望の化学反応を達成するためのエネルギーを供給するように酵素的に処理され得る、化学的基質である。ヌクレオシド三リン酸（例えばATP）において見出されるものなどの高エネルギーリン酸結合の切断によって合成のためのエネルギーの放出を可能にするエネルギー源が一般的に使用される。

【００６７】

他のエネルギー源（例えば、高エネルギーリン酸結合を形成し得るエネルギー源）もまた、合成プロセスに動力を供給し得る。インビトロ合成における使用のための例示的なエネルギー源は、グルコース、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、カルバモイルリン酸、アセチルリン酸、クレアチンリン酸、ホスホピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、ピルビン酸、およびグルコース-6-リン酸である。高エネルギーリン酸結合へと転換可能な任意のエネルギー源が、実質的に適している。

【００６８】

例えば、ピルビン酸キナーゼは、PEPおよびADPからピルビン酸およびATPを形成する反応を触媒する。ATPは、他のリボヌクレオシドの三リン酸に可逆的に転換され得る。従って、ATP、GTPなどは通常、タンパク質合成を補助するための等価なエネルギー源と考えられ得る。本発明のタンパク質合成系は、ATPを生成または再生し得る1つまたは複数のこのようなエネルギー源、好ましくは、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の異なるエネルギー源を含み得る。

【００６９】

抽出物とは、細胞溶解物または浸出液である。この細胞は、抽出物を調製するために増殖され得る任意の細胞であり得る。原核細胞および真核細胞の両方が、本発明によるタンパク質および/または核酸の合成のために使用され得る。原核生物系は、同時すなわち「共役型」の転写および翻訳からの恩典を有する。真核生物系もまた、一般に普及している。例えば、Pelhamら、European Journal of Biochemistry、67: 247(1976)を参照されたい。当業者は、本発明の異なる局面が、細胞または系のタイプ（例えば、真核生物系もしくは原核生物系、または特定の細胞もしくは細胞株）に依存して、多かれ少なかれ有利であることを理解すると考えられる。

【００７０】

好ましくは、抽出物は、細胞細片を除去するために処理される。遠心分離は、そのような固形物質を除去するための一般的な方法である。濾過、クロマトグラフィー、または任意のその他の分離もしくは精製の手順が、所望の抽出物を産生するために使用され得る。抽出物は、好ましくは、合成のために必要なすべての成分を含み、これらはさもなくばその系において供給されない。抽出物は、当技術分野の多くのツールの1つまたは複数を使用して濃縮され得る。合成反応用のエネルギーおよび他の成分を供給するために抽出物中に存在する、酵素および他の成分は、抽出した細胞起源であってもよく、または抽出物の産生の間に添加されてもよい。「細胞抽出物」とはまた、タンパク質合成または核酸合成のために必要であるかまたは所望される成分に関して、細胞溶解物または浸出物を模倣するために作り上げられた成分の混合物を含む。従って細胞抽出物は、タンパク質合成反応における細胞溶解物もしくは浸出物を模倣もしくは改良するための成分、および/または核酸鋳型からの合成のために使用される成分を供給するための成分の混合物であり得る。このような混合物は、当業者に認識されるように、部分的な抽出物もしくはその画分を得ることによって、および/または任意の数の個々の成分を混合することによって産生され得る。

【００７１】

遺伝子とは、遺伝の基本的な物理的かつ機能的な単位である。遺伝子は、特定の機能的

生成物（例えば、タンパク質またはRNA）をコードする。遺伝子は、コード領域および非コード領域を含む。遺伝子または、そのコード領域もしくは非コード領域のいずれかの位置の変更が、機能に影響を与え得る。遺伝子の機能的な効果は、遺伝子を改変することによって、または遺伝子の活性もしくは機能を制御する因子を改変することによって、修飾され得る。

【００７２】

1つの局面において、（例えば、点変異、欠失変異、挿入変異などによって）遺伝子は変異または修飾され、遺伝子のコード生成物またはタンパク質の活性が減少するか、実質的に減少するか、または除去される。別の局面において、修飾された遺伝子によってコードされる生成物またはタンパク質は産生されない可能性があり、または、産生される場合には、その活性が減少するか、実質的に減少するか、または除去されると考えられる。相対的な活性を決定するために、変異遺伝子（またはそれを含む細胞）の産物由来の活性は、修飾されていない遺伝子（またはそれを含む細胞）によってコードされる産物またはタンパク質の活性と比較され得る。変異遺伝子は、そのコードされた産物またはタンパク質の活性が細胞中でもはや検出可能でない程度にまで変異され得る。欠失遺伝子は、変異遺伝子の一種である。

【００７３】

ホスファターゼとは、有機リン酸エステルの加水分解を促進または加速する（例えば、ATPのADPへの加水分解を促進または加速する）酵素である。アルカリホスファターゼは、アルカリpHの溶媒中で活性である。酸性ホスファターゼは、酸性pHの溶媒中で活性である。多くのホスファターゼ酵素は、1つまたは複数のさらなる活性を有する。

【００７４】

インヒビターとは、別の化合物/タンパク質/分子/物質（例えば、酵素）の活性を減少させる、実質的に減少させる、または除去する物質である。核酸鋳型を維持するための本発明の文脈において、最も重要なインヒビターはヌクレアーゼインヒビターである。インヒビターとは、例えば、タンパク質、金属、または化合物などであり得るか、または阻害対象の酵素の活性を減少させる、実質的に減少させる、または除去する条件（例えば、pH、イオン強度、温度など）であり得る。ホスファターゼインヒビターおよびポリメラーゼインヒビターはまた、本発明のインビトロ合成において有利に使用され得る。

【００７５】

ポリメラーゼとは、既存の核酸鋳型を使用して核酸の合成を触媒する酵素である。鋳型がDNA鋳型である場合、RNA分子は、タンパク質が合成され得る前に転写されなければならない。本発明の方法における使用に適した核酸ポリメラーゼ活性を有する酵素には、タンパク質を合成するために選択された鋳型を有する選択された系で活性な任意のポリメラーゼが含まれる。細胞抽出物は通常、適切なポリメラーゼ（例えば、RNAポリメラーゼII、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼIII、および一般的にファージに由来するRNAポリメラーゼ）を含む。これらおよび他のポリメラーゼは当技術分野で公知であり、かつ1つまたは複数の公的なまたは個人的なデータベースを検索することによって、当業者によって容易に評価され得る。適切なポリメラーゼはまた、系において補充され得る。RNAがDNA鋳型から合成される場合、関心対象のDNA分子上で活性なポリメラーゼが使用されるべきである。本発明において有用なRNAポリメラーゼおよび転写因子は当技術分野で周知であり、当業者によって容易に理解される。

【００７６】

RecBCDとは、一本鎖および二本鎖の両方のエキソヌクレアーゼ活性、一本鎖のエンドヌクレアーゼ活性、ならびにヘリカーゼ活性を有する酵素である。この複合体（および単離したRecB）はATPase活性を示す。従って、RecBCDはヌクレアーゼであり、また機能的ホスファターゼでもある。

【００７７】

合成反応のためのエネルギーを供給するために、本発明の系は、好ましくは、ATP、GTPなどの高エネルギー三リン酸化合物を生成または再生し得る、添加されたエネルギー源（

例えば、グルコース、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸（PEP）、カルバモイルリン酸、アセチルリン酸、クレアチンリン酸、ホスホピルビン酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、およびグルコース-6-リン酸）を含む。本発明に従って、1つまたは複数（好ましくは、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上など）のこのようなエネルギー源が、任意の組み合わせで、または任意の順序で、添加され得る。

【００７８】

合成系において十分なエネルギー源が最初に存在しない場合には、添加的なエネルギー源が補充されることが好ましい。補充は、連続的に送達され得るか、または1つまたは複数の準備された補充物中で送達され得る。本発明の1つの特徴は、本発明の合成反応のためのエネルギーを供給するために少なくとも二種（または三種もしくはそれ以上、四種もしくはそれ以上、五種もしくはそれ以上、六種もしくはそれ以上など）のエネルギー源の添加を含む。エネルギー源（特に添加されたエネルギー源）は、それ自体が高エネルギーリン酸を含むことはないことが多い。好ましくは、それらは三リン酸化合物ではなく、より具体的にはヌクレオチド三リン酸ではない。

【００７９】

エネルギー源は所望の合成のために適切な任意の量で存在し得る。例えば、化学的エネルギー源は、10mM～100mMの濃度を達成するように添加され得る。約15mM、20mM、25mM、30mM、50mM、60mM、70mM、80mMまたは90mMもまた、目標の濃度であり得る。合成によりエネルギーが消費され、その後エネルギーがこれらのエネルギー源から補充されるにつれて、正確な濃度は変動すると考えられる。濃度は、種々の範囲内、例えば、約10mM～100mM、15mM～90mM、20mM～80mM、30mM～60mMなどで制御され得る。エネルギー源の所望の濃度範囲についてのおよその境界として、任意の目標濃度が使用され得る。エネルギー源はまた、インビトロ合成反応の間に添加または補充され得る。

【００８０】

2つまたはそれ以上のエネルギー源が使用される場合、各々のエネルギー源は、独立してこれらの目標濃度の1つとなるように方向付けされ得る。

【００８１】

複数のエネルギー源が系に含まれる場合、タンパク質生成物および/または核酸生成物が合成系によってより効率的に産生されるように、合成（特にタンパク質合成）が加速されてやがて延長されることが見出される。例えば、ホスホエノールピルビン酸（PEP）およびアセチルリン酸が追加的エネルギー源として使用される場合、合成されるタンパク質の量は、アセチルリン酸のみが添加された場合の2倍を上回りうる。従って本発明は、合成反応のために高エネルギーリン酸結合を供給する、少なくとも一種、好ましくは少なくとも二種またはそれ以上の異なるエネルギー源を含むインビトロ合成系を含む。

【００８２】

本発明の合成系は、一種または複数の細胞抽出物に基づいている。細胞は、タンパク質および/または核酸を合成するために必要な成分を保有している。従って細胞の抽出物は、合成成分の容易に入手可能な供給源である。細胞から処理される成分または他の供給源から処理もしくは合成された成分は、抽出物に含まれ得る。

【００８３】

鋳型の維持は、合成プロセスの持続時間を最大化するために必要である。従って、本発明の合成系は、鋳型を維持する成分を含み得る。鋳型は、鋳型の酵素的な分解、化学的な分解、または他の分解を妨害することによって維持され得る。

【００８４】

従って本発明の合成系は、生成物合成を改善するための抽出物への修飾を含み得る。抽出物が、タンパク質および/または核酸の産生を損なう活性を有する酵素を含む場合、これらの酵素の阻害は系によるより効率的な合成をもたらす。従って、少なくとも一種の酵素のインヒビターを含むインビトロ合成系は、本発明の態様である。ヌクレアーゼおよびホスファターゼのインヒビターは、タンパク質および/または核酸の合成の効率を増大するために有利に使用される。合成反応において使用される化合物を不必要に消費する酵素

の阻害もまた、合成効率を改善し得る。抽出物中に存在する特定の酵素によって、例えば、一種または複数の多くの公知のヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、またはホスファターゼのインヒビターが、合成効率を改善するために選択され得、かつ有利に使用され得る。

【００８５】

しかし、すべてのヌクレアーゼの活性を妨害または阻害することは望ましくないかもしれない。例えば、RNaseIおよびRNaseI*は、全長RNAと比較して短いRNAオリゴヌクレオチドを優先的に分解する。いくつかの状況において、この活性が役立つことが判明し得る。細胞はこの酵素を使って、もはや必要とされないRNAを分解する。例えば、RNase Iによって利用可能に作製されたモノヌクレオチドは、DNAを転写するための基質として利用可能である。あるいは、RNaseIをブロックすることそれ自体は、タンパク質合成プロセスの間の翻訳用のRNAを維持するためには不十分な可能性がある。例えば、他の酵素は、mRNAの最初の分解においてより活性であり得る。

【００８６】

鋳型を維持するため、抽出物を産生するために使用される細胞は、有害酵素の活性の減少、実質的減少、もしくは除去について、または修飾された活性を有する酵素について、選択され得る。従って、（例えば、1つまたは複数の遺伝子を修飾または変異させることによって）活性が改変された細胞の抽出物を含むインビトロ合成系は、本発明の態様である。修飾されたヌクレアーゼまたはホスファターゼの活性を有する（例えば、少なくとも1つの変異ホスファターゼもしくはヌクレアーゼの遺伝子、またはそれらの組み合わせを有する）細胞は、合成効率を増大させるために特に有利に使用される。

【００８７】

本発明はまた、一種または複数のポリメラーゼが修飾されている（またはポリメラーゼ活性が調節されている）インビトロ合成系を含有する。1つの局面において、ポリメラーゼ活性は、鋳型を維持するために（例えば、ポリメラーゼ遺伝子またはその調節エレメントを変異させることによって）減少または実質的に減少または阻害される。例えば、リボソームに結合したRNAは、RNase Eから保護されている。しかし、ポリメラーゼ活性があまりに強力な場合には、リボソームが結合し得る前に、RNase EはRNAを分解し得ることになる。従って鋳型は、RNAポリメラーゼを阻害することによって、またはポリメラーゼ活性の減少した細胞を使用することによって維持され得る。重合化の速度がリボソーム結合を改善するように調節されるように修飾されたRNAポリメラーゼ活性を有する細胞は、RNAがより効率的に利用されるタンパク質合成系を産生するように本発明に従って使用され得る。また、DNAポリメラーゼはいくつかの系（例えば、翻訳系）で必要とされない可能性がある。従って本発明は、例えば、このようなDNAポリメラーゼが反応成分を利用することを妨害する（例えば、エネルギーの不必要な消費を妨害する）ための、1つまたは複数のポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼ）の阻害、減少、実質的減少、または除去に関する。

【００８８】

あるいは、抽出物を産生するための細胞は、（例えば、関心対象のタンパク質の発現を減少させるために）生成物またはタンパク質または活性が減少または調節または除去されるような条件下で増殖され得る。このような増殖条件は、本発明による調節または阻害の一種と見なされる。得られる抽出物は、遺伝子が変異または修飾されている細胞から得られた抽出物と類似していると考えられる。

【００８９】

本発明はまた、インビトロ合成系におけるタンパク質分子および/または核酸分子の産生のための方法を含む。本発明の方法は、連続的に添加され得る、または1回もしくは複数回の慎重な添加によって順番に添加され得る、少なくとも一種、好ましくは少なくとも二種または三種またはそれ以上のエネルギー源を有するインビトロ系を用いてそのような生成物を産生する段階を含む。本発明の方法はまた、ヌクレオチド鋳型を維持するために修飾されたインビトロ系を用いて、タンパク質および/または核酸を産生する段階を含む。例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、もしくはポリメラーゼは、化学的または物理

的条件によって阻害され得；および/または一種もしくは複数の酵素（例えば、ヌクレアーゼ、ホスファターゼ、またはポリメラーゼ）が欠損しているかもしくは変異されているかもしくは調節されている細胞からの抽出物は、系のための基礎として使用され得る。

【００９０】

変異または修飾された細胞は、実施例において示されるように作製され得るか、および/または当技術分野で公知の方法に従って作製され得る。本発明の文脈において、修飾された細胞は、一種または複数の変異または修飾された遺伝子を有する細胞であるか、あるいは特定の活性または関心対象の活性を減少、実質的に減少、除去、阻害、または調節するような方法で修飾または調節された細胞である。変異された遺伝子は、野生型遺伝子と関連する完全に機能的な遺伝子産物に転写または翻訳されていない遺伝子を含む。変異は、野生型遺伝子産物の完全な機能を生じない任意の変異であり得る。例えば変異は、点変異、遺伝子の完全もしくは部分的欠失、遺伝子の完全もしくは部分的置換、および/または遺伝子中の1つもしくは複数の挿入であり得る。

【００９１】

抽出物は任意の適切な細胞から作製され得る。適切な細胞とは、選択された増殖条件下で任意に産生された、タンパク質および/もしくは核酸の合成のための成分を有する細胞か、または、インビトロ合成に有害な望ましくない特性を不活性化させる、もしくは減少させる、もしくは実質的に減少させる修飾および/もしくは変異を有する細胞である。本発明によって使用され得る宿主細胞には、細菌細胞、真菌細胞、および酵母細胞、植物細胞、ならびに動物細胞が含まれるが、これらに限定されるわけではない。好ましい細菌宿主細胞には、例えば、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌、特にエシェリキア（Escherichia）種の細胞（特に、大腸菌（E.coli）細胞および最も好ましくは、大腸菌株DH10B、Stbl2、DH5α、DB3、DB3.1（好ましくは、大腸菌LIBRARY EFFICIENCY（登録商標）DB3.1（商標）コンピテント細胞；Invitrogen Corp.、Life Technologies Division、Rockville、MD）、DB4およびDB5（2000年3月2日に出願された、米国特許出願第09/518,188号、および1999年3月2日に出願された米国特許仮出願第60/122,392号を参照されたい。これらの開示はその全体が本明細書中に参考として組み入れられる）、BL21、HB101、INV110、INVαF'、MC1061/P3、PIR1、PIR2、TOP10、TOP10F'、TOP10/P3など）、バチルス（Bacillus）種の細胞（特に、枯草菌（B.subtilis）細胞および巨大菌（B.megaterium）細胞）、アスペルギルス（Aspergillus）種の細胞、ストレプトミセス（Streptomyces）種の細胞、エルウィニア（Erwinia）種の細胞、クレブシエラ（Klebsiella）種の細胞、セラチア（Serratia）種の細胞（特に霊菌（S.marcessans）細胞）、シュードモナス（Pseudomonas）種の細胞（特に緑膿菌（P.aeruginosa）細胞）、およびサルモネラ（Salmonella）種の細胞（特にネズミチフス菌（S.typhimurium）細胞およびチフス菌（S.typhi）細胞）が含まれる。好ましい動物宿主細胞には、昆虫細胞（特にキイロショウジョウバエ（Drosophila melanogaster）細胞およびより特にS2細胞、スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）Sf9細胞およびSf21細胞ならびにトリコプルサ（Trichoplusa）High-Five細胞）、線虫細胞（特にC.エレガンス（elegans）細胞）、トリ細胞、両生類細胞（特にアフリカツメガエル（Xenopus laevis）細胞）、爬虫類細胞、ならびに哺乳動物細胞（最も特には、NIH3T3、CHO、COS、C127、VERO、BHK、HeLa、293、Per-C6、Bowesメラノーマ、ならびに、一般的に、ヒト、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、およびアレチネズミの細胞）が含まれる。好ましい酵母宿主細胞には、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）細胞およびピキア・パストリス（Pichia pastoris）細胞が含まれる。これらおよびその他の適切な宿主細胞は、例えば、Invitrogen Corp.、Life Technologies Division (Rockville、Maryland)、American Type Culture Collection (Manassas、Virginia) およびAgricultural Research Culture Collection (NRRL; Peoria、Illinois) から市販されており、各々のカタログは参照としてその全体が組み入れられる。植物細胞は、プロトプラスト、タバコ、ジャガイモ、および他の塊茎植物、トウモロコシ、ワタ、および他の繊維状（fibrous）植物を含む草本植物、一年生植物および多年生植物、単子葉植物および双子葉植物、ならびに、特に培養中に形質転換および/

または増殖され得る植物細胞によって例示される。

【００９２】

細胞抽出物は、抽出後、存在してないか、または十分な量では存在していない成分を供給するために補充され得る。

【００９３】

抽出物は、転写/翻訳系の完全性を維持する、当技術分野で使用される任意の方法によって調製され得る。または、プロセスが、転写/翻訳の任意の段階のために必要な1つまたは複数の成分を損傷させる場合には、損傷された成分は、抽出物の調製後、置換され得る。

【００９４】

抽出物は、上記に言及されたZubay（1973）の方法に従って調製された。当業者は、抽出プロセスに対する多くの改変が本発明の範囲内で可能であることを認識すると考えられる。

【００９５】

特記されない限り、インキュベーション反応物は、57mM Hepes/KOH pH8.2、230mM グルタミン酸カリウム、1.2mM ATP、それぞれ0.85mMのGTP、UTP、CTP、30mM PEP、1.7mM DTT、12mM $Mg(OAc)_2$、0.17mg/ml 大腸菌全RNA混合物、34μg/ml フォリン酸、66μg/ml T7 RNAポリメラーゼ、それぞれ1.25mMの各アミノ酸、14mg/ml 抽出物、3μl ^{35}S-Met（15μCi/μl）、および種々の量のDNA鋳型を含む。

【００９６】

当業者は、合成機能を維持し続ける一方で、インキュベーション培地の種々の成分の濃度が当技術分野で公知であるように調節され得ることを認識すると考えられる。例えばpHは、合成される生成物に依存して、約5.6～約8.8の範囲、またはより好ましくは約6.1～8.5の範囲、またはさらに約7.2～8.4の範囲であり得る。同様に、グルタミン酸カリウムの濃度は、約80mM～320mMまたはより好ましくは約120mM～280mMまたはさらに約180mM～250mMの間で容易に変動しうる。ATPの濃度は、約0.1mM～3.0mMまたはより好ましくは約0.3mM～2.0mMまたはさらに0.8mM～1.5mMの間で変動しうる。GTP、UTP、CTP、およびTTPの濃度は、約0mMもしくは0.1mM～2mM、またはより好ましくは約0.4mM～1.2mMまたはさらに約0.7mM～1.0mMの間で変動しうる。PEPは、約10mM～60mMまたはより好ましくは約20mM～50mMまたはさらに25mM～40mMの間で変動しうる。DTTは、約0.5mM～3.0mMまたはより好ましくは約1.0mM～2.5mMまたはさらに約1.5mM～2.0mMの間で変動しうる。マグネシウムは、約7.5mM～20mMまたはより好ましくは約10mM～15mMまたはさらに約11.5mM～14mMの間で変動しうる。全RNA混合物は、約0.1mg/ml～0.5mg/mlまたはより好ましくは約0.12mg/ml～0.3 mg/mlまたはさらに0.15mg/ml～0.2mg/mlの間で変動しうる。フォリン酸は、約15μg/ml～50μg/mlまたはより好ましくは約25μg/ml～40μg/mlまたはさらに約30μg/ml～35μg/mlの間で変動しうる。ポリメラーゼは、約0μg/mlまたは1.0μg/ml～300μg/mlまたはより好ましくは約20μg/ml～200μg/mlまたはさらに約30μg/ml～150μg/ml、約40μg/ml～120μg/ml、約50μg/ml～100μg/ml、もしくは約60μg/ml～75μg/mlの間で変動しうる。アミノ酸は、独立して、約0.4mM～5mMまたはより好ましくは約0.5mM～2.0mMまたはさらに0.8mM～1.5mMの間で変動しうる。抽出物は、約2mg～40mgタンパク質/mlまたはより好ましくは約5mg～25mgタンパク質/mlまたはさらに10mg～18mgタンパク質/mlの間で変動しうる。また、所望される場合、合成マーカー（以下に記載される実施例においては^{35}S-Met）は、望ましいように選択され得、かつ過度に合成を損なうことのない任意の検出可能な量で使用され得る。当業者は、成分の多くが、同じ濃度または定性的および/もしくは定量的に同様の効果を生み出す濃度のいずれかで使用され得る、公知の置換物または等価物を有することを容易に認識すると考えられる。

【００９７】

実施例1

変異体大腸菌を使用するインビトロ無細胞タンパク質合成

BL21の変異誘導体を、本発明のIVTT系における無細胞タンパク質合成のために使用した

。開始時のBL21株は、OmpTおよびlonプロテアーゼを欠いたものであった（Studier、Methods in Enzymology、185: 60-89 (1990)）。以下の遺伝子を、当技術分野で公知の技術によって変異させた：RNaseI、RNase Eのカルボキシル末端欠失体、およびエンドヌクレアーゼI。これらの変異により、DNA鋳型およびmRNAの安定化または維持、ならびに合成されたタンパク質の安定化がもたらされた。高濃度リン酸含有培地中での大腸菌細胞の増殖はアルカリホスファターゼの合成を抑制することが報告されている（MalamyおよびHorecker、Biochemistry、3: 1893-1897）。従って、ホスファターゼ活性の低い細胞を産生するために、高リン酸培地中での細胞の増殖が試みられた。他のヌクレアーゼまたは他の有害な遺伝子のさらなる変異もまた、さらなる増大のために作製された（例えば、以下の実施例6を参照されたい）。リン酸含有培地中で増殖させた大腸菌変異体から作製された抽出物は、タンパク質の産生を増大させた。

【００９８】

実施例2

λGamのクローニングおよび発現

RecBCDを変異させる代わりに、RecBCDヌクレアーゼを不活性化させる新規な方法が見出された。この新規な方法は、λリコンビナーゼタンパク質であるGamを無細胞抽出物中に組み込む段階を包含する。

【００９９】

Gamはインビボで大腸菌RecBCDを阻害することが示されており、かつ線状DNAを使用した相同組換えを補助する（Yuら、PNAS、97: 5978-5983(2003); DatsenkoおよびWarner、PNAS、97: 6640-6645(2000)）。両方の場合において、著者らは、λGamの存在下で線状DNAが保護され得、かつλExoおよびBetaが高度に効率的な相同組換えを促進することを実証した。本明細書において、Gamは大腸菌無細胞抽出物中で使用され、線状DNAの保護、ならびに従ってタンパク質および/または核酸合成の強力な増大が試みられた。

【０１００】

複数のGamアイソフォーム

文献においては、gam遺伝子産物のサイズに関する議論についてのいくつかの参考文献が存在する（Murphy、J. Bact.、173: 5808-21(1991)；FriedmanおよびHays、Gene、43: 255-63(1986)）。少なくとも1人の研究者により、Gamの2つの別々の形態（1つは見かけの分子量が17kD、もう1つは約12kD）がSDS-PAGE上で検出されたことが報告された。より小さい方のタンパク質は実際にgam遺伝子の産物であったが、以前に推定されていた上流の開始部位ではなく内部のメチオニンにおいて開始されることが提唱され、後に実証された。この内部の開始部位は、正確にShine-Dalgarno配列（AGGAGTTCAGCC）（配列番号：1）を有していたが、一方で、最初にマッピングされた開始部位は、検出可能な翻訳開始配列を有していなかった。

【０１０１】

さらに、ある報告（Murphy、1991）により、この短い形態のGam（GamSと呼ばれる）がインビボgam遺伝子産物のRecBCD阻害活性をすべて有していることが示唆された。これらの理由により、本発明者らは、短い形態のGamをクローニングしてタンパク質を発現させることを試みることを決定した。

【０１０２】

プライマーDE230（配列番号：2）

(5'-GGGAGGCCATGGATATTAATACTGAAACTGAG)

およびプライマーDE231（配列番号：3）

(5'-GGGAGGAGATCTTTATACCTCTGAATCAATATCAACC)

を用いて、pKD46からλgam遺伝子のPCR増幅を行った。PCR断片をNcoI部位およびBglII部位で消化し、同じ酵素で切断したpBAD-HisAに導入した。作製された構築物pLDE129は、操作された最適Shine-Dalgarno配列（AGGAGGAATTAACC）（配列番号：4）を使用するpBADプロモーターの制御下にあるGamを含んでいた。

【０１０３】

Gamについての上記のように、プライマーDE255（配列番号：5）
(5'-GGGAGGCCATGGGAAACGCTTATTACATTCAGGATCGTCTTG)
およびプライマーDE231（配列番号：3）
(5'-GGGAGGAGATCTTTATACCTCTGAATCAATATCAACC)
を使用して、GamSをクローニングした。最終構築物pLDE136を、DH10B（Life Technologies）に導入し、発現について試験した。これらの細胞は、見かけの分子量12kDのタンパク質を有意なレベルで発現させたが、これはGamSに関して予測されることと正確に同じであった。小規模抽出物は以前に記載したように作製されたが、GamSの場合には、すべてのタンパク質は可溶性画分中に見られた。

【０１０４】

pLDE129を大腸菌DH10Bに導入し、37℃でOD600が0.6になるまで増殖させ、0.2％アラビノースで誘導した。誘導から3時間後、ODが0.05の細胞を取り出し、ODが0.05の未誘導細胞と並べて、4％～12％NuPageゲル上でSDS-PAGE分析に供した。Gamを発現している細胞は、見かけの分子量17kDにおいて有意なタンパク質バンドを生じたが、これは、Gamの予測サイズ（16.3kD）にちょうど一致した。Gamの誘導培養物2mlを遠心分離し、細胞を-80℃で凍結し、融解し、0.4mlの抽出緩衝液（50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0、10％グリセロール）に再懸濁した。再懸濁した細胞を、30秒間50％出力で、かつ1/8インチプローブを使用して、30秒間の超音波処理に2回供し、NaClを最終濃度0.5Mになるように添加し、抽出物を遠心分離によって清澄化（clarify）した。清澄化した抽出物および不溶性ペレット画分を電気泳動し、全細胞抽出物と比較した。全細胞抽出物中には有意な量のGamが存在していたが、可溶性抽出物には検出可能なGamタンパク質が含まれなかった。実際、ほとんどすべてのタンパク質が不溶性ペレット画分中に存在した。

【０１０５】

実施例3

Gamを介したRecBCD阻害についての活性アッセイ

インビトロでGamをアッセイするために、本発明者らは放射性アッセイを開発した。手短に述べると、均一に標識された二本鎖の線状DNAを、精製RecBCDタンパク質（Plasmid-Safe EcoV、Epicentre）を利用するRecBCD活性に関する基質として使用する。Gamタンパク質をRecBCDおよびATPとともにプレインキュベートし、次いでDNAに加える。インキュベーション期間の後、混合物をGFBフィルターに結合させ、小さなDNA断片を除去するために洗浄して、フィルター上に残存する総数を測定する。Gamを用いてプレインキュベーションされていないRecBCDを使用したときの残存総数と比較することによって、阻害率が決定され得る。

【０１０６】

図1に示すように、0ユニット、1.5ユニット、または30ユニットのGamSを、1ユニットの精製RecBCD（Plasmid-Safe、Epicentre）とともに、100μlの1×Plasmid-Safe緩衝液および10mM ATP中で、37℃で10分間インキュベートした。50fmolの^{32}P内部標識エキソヌクレアーゼ基質を加え、37℃で30分間、60分間、90分間、または120分間反応を継続した。100μlのフィルター結合緩衝液（6Mグアニジン、100mM MES）を加えることによって反応を停止させ、すべての反応が完了するまで氷中に保持した。反応混合液（150μl）をMillipore GF/Bフィルター上にスポットし、200μlの80％エタノールで3回洗浄し、乾燥させ、4mlのScintisafe-F中に加え、1分間計数した。GamSは濃度依存的に基質の分解を阻害する。

【０１０７】

図2に示すように、0.5ユニットまたは5ユニットのGamSを、1μl（約40μg）の無細胞抽出物とともに、100μlの1×Plasmid-Safe緩衝液および10mM ATP中で、37℃で10分間インキュベートした。エキソヌクレアーゼアッセイを、図1の説明に記載したように実行した。残存するDNAの割合は、各アッセイで結合した総数を無細胞抽出物を欠く対照に結合した総数で除算することによって決定した。

【０１０８】

実施例4

GamSの精製

pLDE136の一晩培養物を、50mlフラスコ中の15mlのLB-Ampに希釈し、ODが0.6になるまで37℃で増殖させた。アラビノースを最終濃度0.2％になるように加え、細胞をさらに3時間増殖させてから回収した。ペレットを凍結し、融解し、500μlの抽出緩衝液（50mM Tris-Cl、pH 8.0、0.1mM EDTA、10％グリセロール、500mM NaCl）に再懸濁し、1/8インチプローブを使用して、50％出力で、30秒間超音波処理を2回行い、遠心分離によって清澄化した。試料をクロマトグラフィー前に100mM NaClに希釈させた。1mlのHitrap-MonoQカラム（Pharmacia）を10mlの緩衝液B（50mM Tris-Cl、pH 8.0、0.1mM EDTA、10％グリセロール、1M NaCl、1mM DTT）で平衡化し、次いで10mlの緩衝液A（50mM Tris-Cl、pH 8.0、0.1mM EDTA、10％グリセロール、1mM DTT）で平衡化し、その後10％緩衝液Bで大規模洗浄した。抽出物を、流速0.5ml/分の10％緩衝液Bでロードし、0.5ml/分、15CVの10％緩衝液Bで洗浄し、0.25ml/分の10％～70％緩衝液Bの20CVグラジエントで溶出した。画分を0.5mlごとに収集した。GamSは、塩濃度約400mMの3つの主要な画分中に溶出した。これらの画分をSDS-PAGEで分析し、単一のMonoQプールに集めた。クマシー染色によって、このプールは純度70％～80％であると見積もられた。

【０１０９】

実施例5

部分精製GamSのアッセイ

GamSのMonoQプールをGam抽出物と一緒にアッセイし、存在する活性の量を決定した。MonoQプールは25U/μl～30U/μlの活性を有しており、タンパク質濃度は194ng/μlであったが、実際のGamSタンパク質（純度75％～80％と仮定）の比活性値は160U/μl～200U/μlであった。抽出物の活性アッセイに基づくと、MonoQカラムからは活性がほとんど失われておらず、全ての損失は保存的プールに起因する可能性が高かった。全長Gam抽出物のアリコートは、少ないが検出可能なレベルの活性を示した。SDS-PAGEゲルをより慎重にチェックすると、少量の可溶性全長Gamの存在が見出される。この可溶性の量は、全長Gamについて観察されたいずれかの活性を示している可能性が高い。

【０１１０】

実施例6

Gamの存在下での精製RecBCDに対する大腸菌無細胞抽出物の線状DNAの安定性

放射性エキソヌクレアーゼアッセイを使用する大腸菌無細胞抽出物の分析により、抽出物中に有意なレベルのRecBCD様エキソヌクレアーゼ活性（約0.4ユニット/μl抽出物）が存在することが示された。抽出物への精製GamSの添加により、基質の大部分が分解から保護された。しかし、基質の20％は、GamSが最適レベルであってもなお、分解された。これにより、抽出物が、GamSの存在によって阻害されないその他のヌクレアーゼを少なくともいくつか含んでいることが示唆される。この結果は、より長いインキュベーション時間で実行された実験によってさらに確認された。本発明者らは、線状DNA（PCR断片）が、最大4時間のインキュベーション時間で、GamSの存在下で精製RecBCDに対して完全に保護され得ることを示した（図1）。しかし、GamSおよび粗抽出物を含む実験において、インキュベーション時間を長くすることは、添加されるGamSのレベルとは無関係に、より多くの基質の分解をもたらす。30分後、基質の80％が残存し、インキュベーション2時間後、基質の30％のみが保護されて残存していた（図2）。従って、他の大腸菌ヌクレアーゼ（例えば、ExoIII、ExoVIII、EndoIV、および二本鎖DNA特異的ヌクレアーゼ）もまた、線状DNAに作用して、全体の保護が達成されないという結果をもたらす可能性が高い。従って、これらの遺伝子のいずれかまたはすべての変異または阻害が、より長い期間で鋳型を保護するためには有用であることが予想される。

【０１１１】

実施例7

Gamの存在下、無細胞抽出物中での線状DNAを使用するタンパク質産生の増大

無細胞インビトロ転写翻訳反応物（50μl）を、スーパーコイルプラスミドDNA鋳型またはPCR産物鋳型（50ng）のいずれかを使用して上記のように調製した。各鋳型は、T7プロ

モーターの制御下のCAT遺伝子をコードする。PCR産物は、スーパーコイルプラスミドから直接作製した。GamSタンパク質（200ng）を大腸菌抽出物に加え、反応前に室温で2分間プレインキュベートした。反応を37℃で2時間実行した。反応を停止するために、RNase A（5μg）を加え、反応物を37℃で15分間インキュベートした。反応物をGFCフィルター上にスポットし（5μl）、10%トリクロロ酢酸で1回洗浄し、5%トリクロロ酢酸で2回洗浄し、メタノールで1回洗浄した。フィルターを乾燥させ、4mlのScintisafe-F中に入れ、1分間計数した。各試料について取り込まれたメチオニンの量（pmol）は、タンパク質合成の尺度である。

【０１１２】

次に、GamSタンパク質の存在下または非存在下で、無細胞タンパク質合成を行った。T7プロモーターの制御下のCAT遺伝子を含むスーパーコイルプラスミドDNAまたはPCR産物を、タンパク質合成のための基質として使用した。Gamタンパク質の非存在下では、PCR産物であるDNA鋳型からの収量は、スーパーコイルDNAプラスミド鋳型からの収量と比較して（1/2に）減少する。反応物にGamSタンパク質を加えることは、スーパーコイル鋳型からの合成には効果を有さない。しかし、GamSはPCR産物であるDNA鋳型からのタンパク質産生を、スーパーコイルDNA鋳型から観察されたレベルに匹敵するレベルまで回復した（図3）。

【０１１３】

実施例8

RNase欠失変異体におけるタンパク質合成の増大

上記のように、mRNAの安定性は、インビボまたはインビトロのいずれにおいても、より多くのタンパク質を産生する際の重要な因子である。従って、一種または複数のRNaseの不活性化は、mRNAの半減期を増大させ得り、これにより、タンパク質産生が増大され得る。大腸菌においては、転写および翻訳は協調しており、かつリボソームは、リボソーム結合部位が露出するとすぐに、新規に合成されたmRNAを結合する（Stent,G.S.、Proc. R. Soc.、164: 181-197(1966); Steitz, J.A.、Nature、224: 957-964(1969); Millerら、Science: 169: 392-395(1970)）。

【０１１４】

大腸菌において最も強力なプロモーターの1つであるT7プロモーターは、タンパク質を発現させるために広範に使用されてきた。しかし、T7プロモーターを用いると、mRNAは、天然のポリメラーゼを用いて作製されたmRNAよりも約8倍速く作製され、かつまたmRNAがリボソーム上で翻訳されるよりも8倍速く作製される。このことは、リボソームと結合しない部分をmRNAが有しかつ、従ってmRNAがRNase Eの標的となり得るという状況を引き起こす（Iostら、J. Bacteriol. 174: 619-622; Makarovaら、PNAS、92: 12250-12254(1995)）。この理由のために、上述の著者らは、T7プロモーターが使用された場合には転写物あたりのタンパク質の発現は低くなることを示唆した。本発明のインビトロタンパク質合成の1つの特徴とは、無細胞系において新生mRNAを保護または維持する、改変されたポリメラーゼを使用することである。変異型T7ポリメラーゼは当技術分野で周知である。例えば、Bonnerら、EMBO J.、11: 3767-3775(1992)を参照されたい。

【０１１５】

近年、Lopezら（Mol. Microbiol. 33: 188-199(1999)）により、RNase Eに変異を有する大腸菌株を発現のための宿主として使用する場合には、インビボにおける転写物あたりのタンパク質合成は増加し得ることが報告された。インビトロ転写翻訳系においては、天然の大腸菌プロモーターおよびポリメラーゼの代わりにT7プロモーターが使用されることが多い。従って、本発明者らは、大腸菌のRNase E変異体から作製された無細胞抽出物が、異なるプロモーター系を使用するタンパク質合成もまた増大し得るか否かを試験した。4つの異なるプラスミド鋳型（各々T7プロモーターを含む）からのタンパク質発現を、RNase E変異体株および野生株の両方から作製した無細胞抽出物を使用してアッセイした。以下に記載された本発明者らの結果により、RNase E変異型大腸菌の無細胞抽出物が、野生型大腸菌と比較して最大6倍のタンパク質合成を増大したことが示唆された（表1および図4）。従って、転写、翻訳、および酵素的分解を協調させることによりタンパク質合成効

率が改善され得ると考えられる。

【０１１６】

無細胞インビトロ転写翻訳反応を、3つの独立したスーパーコイルプラスミドDNA鋳型を使用して実行した。T7プロモーターの制御下において、これらの鋳型はそれぞれ、哺乳動物タンパク質であるGus、v-Raf、またはtTakをコードする。野生株（BL21-ERP）およびRNase E⁻株（BL21-Star、Invitrogen Corp.）の両方から作製した抽出物を使用して、タンパク質合成について各鋳型を試験した。各DNA鋳型の2通りの量（500ngおよび100ng）をアッセイした。組み込まれたメチオニンの量（pmol）を、タンパク質合成の尺度として各試料について示す。RNase E⁻株を使用した場合のタンパク質合成増加の倍数を右側に示す。

【０１１７】

（表１）RNase Eの欠失はIVTT反応におけるタンパク質合成を増加させる

鋳型	組み込まれた***Met***（pmol）*Rnase E +*	組み込まれた***Met***（pmol）**Rnase E -**	増加率（倍）
Gus			
500ng	455	1194	2.6
100ng	50	279	5.6
v-Raf			
500ng	1700	2318	1.4
100ng	810	1657	2.0
tTak			
500ng	505	449	1.0
100ng	25	144	5.7

【０１１８】

RNase E変異株からのタンパク質合成の増大が経時的に一定であるか否かを試験するために、時間経過実験を実行した。二種のタンパク質（B-GalおよびGus）の発現を、1時間後、2時間後、3時間後、および4時間後にアッセイした。無細胞インビトロ転写翻訳反応物（100μl）を、RNase E変異株BL21-Star（Invitrogen Corp.、Carlsbad、California）または野生株（BL21-ERP）のいずれかから作製した抽出物を使用して、上記のように調製した。反応物は、T7プロモーターの制御下でB-Gal遺伝子またはGus遺伝子のいずれかをコードするスーパーコイルプラスミドDNA鋳型（1μg）を含む。反応物を37℃でインキュベートし、各反応物からのアリコート（20μl）を、1時間後、2時間後、3時間後、および4時間後に取り出し、RNase Aを用いた処理によって反応を停止した。アリコートは、すべての反応が完了するまで氷上に置いた。試料を、上述の実施例7で記載したように処理した。各試料について組み込まれたメチオニンの量（pmol）はタンパク質合成の指標である。

【０１１９】

結果により、RNase E変異株を使用した場合、タンパク質の発現は野生株よりも高く、かつこの効果は経時的に一定であることが示された。さらに、それ以降の時点では発現の有意な増加が観察されなかったため、タンパク質発現はわずか1時間後には最大になると考えられる（図4）。

【０１２０】

RNase IおよびRNase Eは、RNAを分解する唯一のRNaseではない。多数のRNaseがRNAに作

用する（LinnおよびDeutscher：Nucleases、455-468頁、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1993)）。近年のデータにより、これらのRNaseのいずれかの変異または阻害もまた有益であり得ることが示された。

【０１２１】

実施例9

タンパク質合成の増大のためのデュアル（dual）エネルギー源

インビトロタンパク質合成系における生化学的エネルギー源は、三リン酸の加水分解に由来し、その濃度はエネルギー再生系によって維持される。一般的に使用される化合物は、真核生物系に対するクレアチンリン酸および細菌系に対するホスホエノールピルビン酸（PEP）である。アセチルリン酸が使用された場合もある（Ryabovaら、Anal. Biochem.、226、184-186(1995)）。アセチルリン酸系においては、PEP系においてよりも2倍長くATPのレベルが維持され得ることが示されている。タンパク質合成の観点から、アセチルリン酸の最適濃度は約25mM～30mMであることが見出された。より高い濃度の添加（例えば、40mM）は、阻害的であることが見出された。タンパク質合成に対する効果を決定するために、本発明者らは、PEPの存在下または非存在下のIVTT反応物にアセチルリン酸を滴定した。

【０１２２】

無細胞インビトロ転写翻訳反応を、T7プロモーターによって駆動されるCAT遺伝子をコードするスーパーコイルプラスミドDNA750ngを使用して実行した。アセチルリン酸を、30mM PEPの非存在下または存在下の反応物（0.1mM～60mM）に滴定した。全反応量は50μlであった。反応物を37℃で2時間インキュベートした。反応をRNase Aで停止させ、図3について上述したようにトリクロロ酢酸で沈殿させた。このプロトコールにおいては、驚くべきことに、少なくとも最大60mMのアセチルリン酸では、タンパク質合成の阻害が観察されなかった（図5）。

【０１２３】

アセチルリン酸の濃度が増加するに従って、タンパク質合成のほぼ直線的な増加が見られた。アセチルリン酸のみを添加すると、PEPのみを用いた場合に観察されるレベルに匹敵するレベルまでタンパク質合成が刺激された。さらに、PEPとともにアセチルリン酸を添加すると、タンパク質産生は2倍に増加した。従って、PEPおよびアセチルリン酸の両方をIVTT反応物に添加する場合には、タンパク質合成に特に有益な効果があると考えられる。

【０１２４】

タンパク質合成に対するアセチルリン酸の経時的効果を実証するために、時間経過実験を実行した。30mM PEPおよび/または60mM アセチルリン酸を含むIVTT反応物において、CATタンパク質を合成した。対照として、外因性エネルギー源を用いない反応もまた行った。750ngのT7-CATプラスミドを使用して、上記のように反応物を調製した。

【０１２５】

実施例7に記載のように試料を処理した。各試料に関して組み込まれた^{35}S-メチオニンの量（pmol）を、タンパク質合成を定量するために使用した。図6に見られるように、この結果により、PEPを含有する反応物に添加された場合に、アセチルリン酸の存在がタンパク質合成を増大させることが実証された。この効果は、全4時間の時間経過実験にわたって観察された。

【０１２６】

本発明の上記の記載、実施例および添付の図面に鑑みて、当業者は、これによって本明細書中に記載された本発明を実施することが可能であり、かつ本発明の範囲に影響を与えることなく、当技術分野に従って本発明を改変し、広範な変動条件の範囲内で本発明を実施することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【０１２７】

【図１】RecBCD活性の、GamSを介した阻害を示す。

【図２】細胞抽出物中のヌクレアーゼ活性の、GamSを介した阻害を示す。
【図３】GamSの存在下におけるIVTT反応がタンパク質合成の増加をもたらすことを示す。
【図４】RNase E変異株抽出物由来のタンパク質合成の増加の経時的な一貫性を示す。
【図５】アセチルリン酸存在下でのIVTT反応におけるタンパク質合成の増大を示す。
【図６】アセチルリン酸存在下および非存在下でのタンパク質合成の時間依存性を示す。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Invitrogen Corporation

<120> Improved In Vitro Synthesis System

<130> 0942.525PC01

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Shine-Dalgarno sequence

<400> 1
aggagttcag cc 12

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DE230 primer

<400> 2
gggaggccat ggatattaat actgaaactg ag 32

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DE231 primer

<400> 3
gggaggagat ctttatacct ctgaatcaat atcaacc 37

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Engineered optimal Shine-Dalgarno sequence

<400> 4
aggaggaatt aacc 14

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

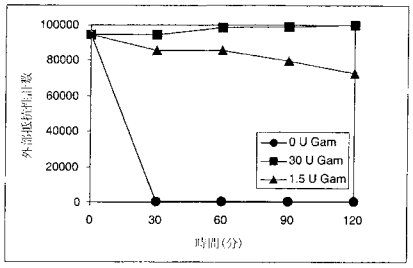
<213> Artificial Sequence

<220>

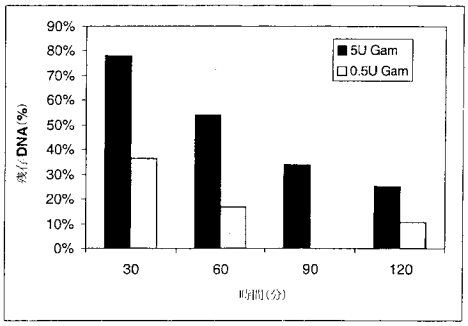
<223> DE255 primer

<400> 5
gggaggccat gggaaacgct tattacattc aggatcgtct tg 42

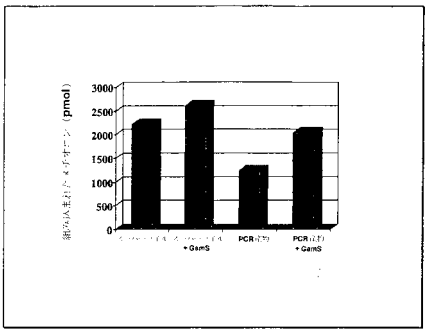
【図１】



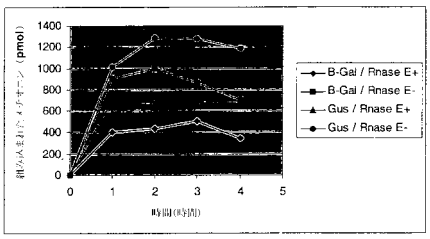
【図２】



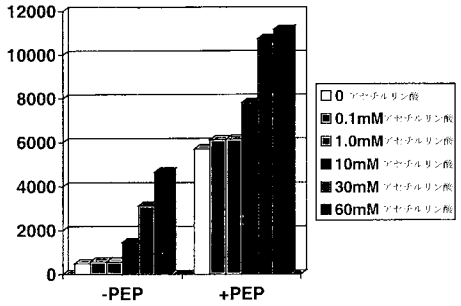
【図３】



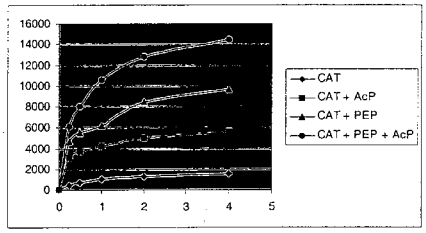
【図４】



【図５】



【図６】



フロントページの続き

審査官　柴原　直司

(56)参考文献　特開平０７－０００１９４（ＪＰ，Ａ）
J. Biotech., (1996), 48, [1-2], p.1-8
Ann. N. Y. Acad. Sci., (1996), 799, p.406-412
Anal. Biochem., (1995), 226, [1], p.184-186
Anal. Biochem., (1992), 206, [2], p.389-393
J. Bacteriol., (1988), 170, [3], p.1245-1253
J. Bacteriol., (1991), 173, [18], p.5808-5821

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/00
C12P 21/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed