

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008 年 8 月 14 日 (14.08.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/096846 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 21/02 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/493 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

山 順 (YOKOYAMA, Jun) [JP/JP]; 〒1428558 東京都品川区小山一丁目 3 番 2 6 号 太陽日酸株式会社内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/052116

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町 MT ビル 1 9 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日:

2008 年 2 月 8 日 (08.02.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2007-030650 2007 年 2 月 9 日 (09.02.2007) 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). 太陽日酸株式会社 (TAIYO NIPPON SAN SO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1428558 東京都品川区小山一丁目 3 番 2 6 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(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 2 2 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 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 横

(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: COMPOSITION FOR SYNTHESIS OF PROTEIN LABELED WITH STABLE ISOTOPE AND METHOD FOR PRODUCTION OF PROTEIN LABELED WITH STABLE ISOTOPE

(54) 発明の名称: 安定同位体標識タンパク質合成用組成物及び安定同位体標識タンパク質の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a means for synthesizing a protein labeled with a stable isotope (which is useful in the fields of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry) at low cost. Specifically disclosed is a composition for use in the synthesis of a protein labeled with a stable isotope, which comprises (A) an amino acid mixture comprising 16 kinds of amino acids consisting of L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tyrosine and L-valine, (B) an indole, (C) hydrogen sulfide or sodium sulfide and (D) an ammonium salt, wherein at least one of the amino acids in the amino acid mixture and/or any one or all of the indole, hydrogen sulfide or the sulfide salt and the ammonium salt is labeled with a stable isotope. Also specifically disclosed is a method for the synthesis of a protein labeled with a stable isotope using the composition.

(57) 要約: 本発明は、核磁気共鳴分光 (NMR) 法ならびに質量分析分野において有用な安定同位体標識タンパク質を安価に合成する手段を提供することを課題とする。本発明によれば、(A) L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリンの16種類のアミノ酸からなるアミノ酸混合物、(B) インドール、(C) 硫化水素または硫化ナトリウム、および(D) アンモニウム塩を含み、かつ前記アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種、および/または、硫化水素または硫化物塩、アンモニウム塩のいずれかまたは全部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組成物、ならびに該組成物を用いる安定同位体標識タンパク質の合成方法が提供される。

WO 2008/096846 A1

明 細 書

安定同位体標識タンパク質合成用組成物及び安定同位体標識タンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、核磁気共鳴分光(NMR)分析や質量分析分野において有用な安定同位体標識タンパク質を合成するための組成物、および当該組成物を用いて安定同位体標識タンパク質を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] タンパク質の構造や機能解析に用いるタンパク質試料には安定同位体標識化が行われる。例えば、核磁気共鳴分光(NMR)分析法においてタンパク質の立体構造解析を行う際には、対象タンパク質に ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{17}O 等の安定同位体を導入することで、測定感度を向上させ、解析を容易にする効果が得られる。また、質量分析においてタンパク質を定量又は定性分析する際には、内部標準として安定同位体(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{18}O 等)標識タンパク質が用いられる。

[0003] タンパク質への安定同位体導入方法は、古くから検討されており、いくつかの方法が上述の分析分野で実施されている。最も一般的な方法としては、組換え大腸菌を安定同位体で標識した炭素源(例えばグルコース- ^{13}C)又は窒素源(例えば塩化アンモニウム- ^{15}N)を含む無機培地で培養し、既知の手法で組換えタンパク質を細胞内に大量発現させ、回収した大腸菌を適切な方法により破碎、抽出し、本抽出液より所望の安定同位体標識タンパク質を精製する方法が挙げられる。また、宿主として大腸菌に代えて酵母、動物細胞、昆虫細胞等の生細胞を用いる安定同位体標識タンパク質合成法も広く実用化されている。

[0004] さらに近年では、生細胞を用いず、破碎した細胞抽出液より、タンパク質を合成する機能成分を分離し、試験管内で効率的に安定同位体標識タンパク質を合成する無細胞タンパク質合成技術が確立されている(非特許文献1および特許文献1)。無細胞タンパク質合成系による方法は、安定同位体標識アミノ酸から効率良く安定同位体標識タンパク質を合成することが可能であり、生細胞に見られる重水素の同位

体効果による生育阻害等の問題がなく、多種類のタンパク質の生産に向くなどの利点がある。

[0005] このような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合成に際しては、基質アミノ酸として、20種類の安定同位体標識アミノ酸を用いる必要がある。安定同位体標識アミノ酸を製造する方法としては、安定同位体の種類によって幾つかの方法が知られているが、例えば、炭素・窒素安定同位体の場合は、安定同位体標識された栄養源(グルコース、炭酸ガス、酢酸、メタノール、硝酸塩、アンモニウム塩等)を含む培地中、重水素安定同位体の場合は重水中、酸素安定同位体は酸素同位体標識水中にてそれぞれ培養した微生物からタンパク質を抽出、精製し、酸加水分解、あるいはプロテアーゼやエキソ(エンド)ペプチダーゼ等による酵素分解により、アミノ酸まで分解し、陽イオン交換カラムなどを用いて分離、精製する方法が一般的である。しかしながら、タンパク質を上記酵素で分解する方法では、完全にアミノ酸単位まで分解することは難しく、アミノ酸の二量体、三量体が不純物となり、細胞増殖や無細胞タンパク質合成反応を阻害するなどの不具合が生じやすい(非特許文献2)。また、上記酵素は、自己分解を起こし、アミノ酸の同位体標識率を下げる問題もある。一方、酸加水分解で製造する方法では、比較的効率よくアミノ酸にまで分解でき、同位体希釈も生じないが、L-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミンの4種類のアミノ酸は酸に極めて不安定であるために酸加水分解過程で分解され消失してしまう。そのため、酸加水分解法で生産される安定同位体標識アミノ酸は、上記の4種類のアミノ酸を除く16種類のアミノ酸のみである。よって、L-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミンの4種類のアミノ酸の安定同位体標識体については、発酵、化学合成、酵素合成等他の方法で別途合成する必要があるため非常にコストがかかり、高価である。

[0006] 特に、近年注目される固体NMR分野においてその効果が期待される酸素同位体(^{17}O)標識アミノ酸は、アミノ酸を酸素同位体(^{17}O)で標識する際に、酸素同位体(^{17}O)標識水を塩化水素ガスで飽和した強酸条件下で反応を行うため、酸に極めて不安定な上記の4種類のアミノ酸は分解されてしまうという問題があった。従って、酸素同位体(^{17}O)標識アミノ酸はその製造方法が確立しているものの、いまだ経済的に実用

レベルの製品は市販されていない。これを解決する手段として、例えば、カルボキシル基がエステル化合物で誘導体化されたFmoc-（またはtBoc-）アミノ酸を、酸素同位体(^{17}O)標識水を含む溶媒中で加水分解することによって、カルボキシル基中の1つの酸素原子を酸素同位体(^{17}O)で標識するという手法が提案されている(特許文献2)。これにより、上述の酸に不安定な4種類のアミノ酸についても酸素同位体標識することが可能となった。更に上記のカルボキシル基のエステル化と酸素標識水存在下での加水分解を繰り返すことにより、カルボキシル基の2つの酸素原子を全て酸素同位体標識することが可能である。本アミノ酸は、Fmoc-（またはtBoc-）化されており、そのままペプチド合成機を用いて化学的に重合させ、酸素同位体標識タンパク質を合成することができる点で大変優れている。しかしながら、上記の手法を実施し、カルボキシル基の酸素原子を全て酸素同位体標識するためには、複数回カルボキシル基のエステル化反応及び加水分解を繰り返す必要があり、多大な労力を必要とする上、精製によるロスが生じる。また、より高分子量で複雑な高次構造をとるタンパク質を合成するためには、Fmoc-（またはtBoc-）誘導体の除去後、精製してアミノ酸を調製する工程が必要である点で煩雑である。

[0007] このように、無細胞タンパク質合成技術を用いた安定同位体標識タンパク質合成法は、安定同位体標識アミノ酸を効率的に利用することができ、経済的観点からも一定の成果を上げているものの、上記の酸素同位体標識アミノ酸を含む一部の安定同位体標識アミノ酸が高価であるため、未だ経済的に実用レベルとは言い難い。

特許文献1:特開2000-175695号

特許文献2:特開2006-8666号

非特許文献1:Kigawa T. et al., Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins, FEBS Lett., 442(1), 15-9, 1999

非特許文献2:Andrew P. Hansen, et al., A practical method for uniform isotopic labeling of recombinant proteins in mammalian cells, Biochemistry, 31(51), 12713-12718, 1992

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 従って、本発明の目的は、安定同位体標識タンパク質を安価に合成する手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 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、16種類のアミノ酸(L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン)を含む反応系内に、4種類のアミノ酸(L-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミン)の前駆体物質を添加することによって、これまで製造が困難で、高価であった上記の4種類のアミノ酸の安定同位体標識体を添加せずとも、20種類のアミノ酸を添加した場合と同等レベル量の安定同位体標識タンパク質を安価にかつ効率的に合成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[0011] (1) (A) L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリンの16種類のアミノ酸からなるアミノ酸混合物、(B) インドール、(C) 硫化水素または硫化物塩、および(D) アンモニウム塩を含み、かつ前記アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種、および/または、インドール、硫化水素または硫化物塩、アンモニウム塩の少なくとも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組成物。

[0012] (2) 前記安定同位体が、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び ^2H からなる群から選ばれる1種または2種以上の組み合わせである、(1)に記載の安定同位体標識タンパク質合成用組成物。

[0013] (3) (1)または(2)に記載の組成物を含む、安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット。

[0014] (4) (1)または(2)に記載の組成物を用いて安定同位体標識タンパク質を合成すること、を特徴とする、安定同位体標識タンパク質の製造方法。

[0015] (5) 安定同位体標識タンパク質の合成が、無細胞タンパク質合成系内で行われる、(4)に記載の製造方法。

[0016] (6) 安定同位体標識タンパク質の合成が、生細胞内で行われる、(4)に記載の製造方法。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、従来から製造コストのかかっていたL-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミンの4種類のアミノ酸の安定同位体標識体について、これらのアミノ酸を使用することなく、タンパク質合成反応系内で他のアミノ酸から転換、系内合成によって製造することが可能となった。従って、本発明は、安価かつ効率的な安定同位体標識タンパク質を合成する技術として非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]19種類のアミノ酸(L-トリプトファン無添加)混合物とインドールを用いる無細胞タンパク質合成系によるCATタンパク質の合成を示す。

[図2]19種類のアミノ酸(L-システイン無添加)混合物と硫化ナトリウムを用いる無細胞タンパク質合成系によるCATタンパク質の合成を示す。

[図3]18種類のアミノ酸(L-システイン及びL-トリプトファン無添加)混合物または16種類のアミノ酸(L-アスパラギン、L-グルタミン、L-システイン及びL-トリプトファン無添加)混合物と、硫化ナトリウムとインドールを用いる無細胞タンパク質合成系によるCATタンパク質の合成を示す。

[図4]Rasタンパク質の¹⁵N-HSQCスペクトルを示す(上:20種類のアミノ酸混合物による合成、下:16種類のアミノ酸混合物+非標識インドール、硫化ナトリウム、酢酸ナトリウム-¹⁵Nによる合成)

[図5]¹⁸O標識タンパク質(UBAタンパク質)のTOF-MS測定を示す(A:非標識16種類のアミノ酸混合物+インドール、硫化ナトリウム、B:¹⁸O標識16種類のアミノ酸混合物+非標識アスパラギン、グルタミン、トリプトファン、システイン、C:¹⁸O標識16種類のアミノ酸混合物+インドール、硫化ナトリウム)。

[0019] 本願は、2007年2月9日に出願された日本国特許出願2007-030650号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0021] 1. 安定同位体標識タンパク質合成用組成物

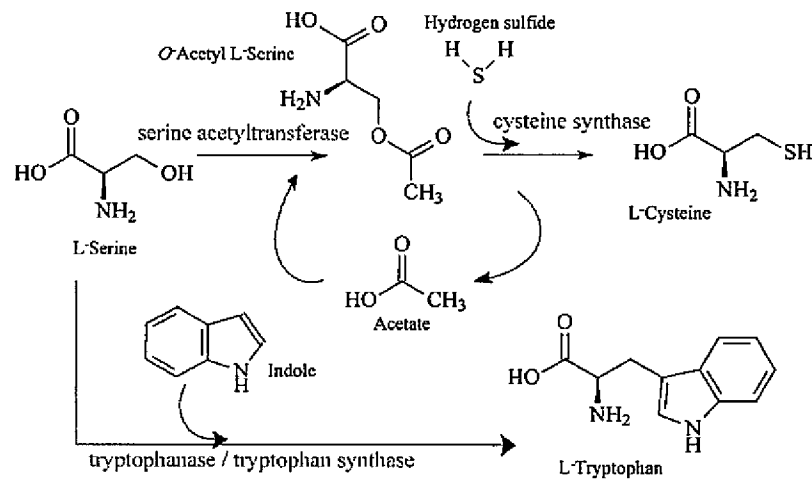
本発明によれば、安定同位体標識タンパク質合成用組成物が提供される。本安定同位体標識タンパク質合成用組成物は、16種類のアミノ酸からなるアミノ酸混合物と4種類のアミノ酸の前駆体であるインドール、硫化水素または硫化物塩、およびアンモニウム塩とを含み、かつ前記アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種、および/または、インドール、硫化水素または硫化物塩、アンモニウム塩の少なくとも1種が安定同位体で標識されていることを特徴とする。

[0022] 上記の「アミノ酸混合物」の16種類のアミノ酸とは、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリンをいう。本アミノ酸混合物は、16種類のアミノ酸単品をそれぞれ混合したものでもよく、或いは市販のアミノ酸混合物を用いてもよい。

[0023] また、上記の「4種類のアミノ酸」とは、L-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミンをいう。必須アミノ酸を必要としない多くの微生物では、タンパク質を構成する全てのアミノ酸を細胞内で合成するためのアミノ酸生合成系を保有している。

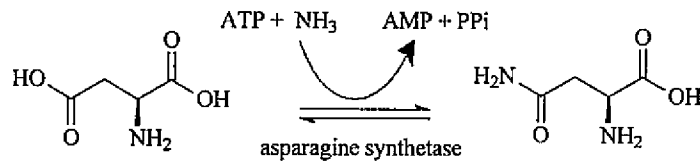
[0024] 下記に示すように、L-トリプトファンは、その前駆物質であるピルビン酸、アンモニウムイオン、及びインドールから、またはL-セリンとインドールからトリプトファンシンターゼ(E.C.4.2.1.20)またはトリプトファンナーゼ(E.C.4.1.99.1)の作用により合成される。また、L-システインは、L-セリンがセリンO-アセチルトランスフェラーゼ(E.C.2.3.1.30)の作用でO-アセチル化され、O-アセチルL-セリンとなり、システインシンターゼ(E.C.4.2.99.8)の作用により硫化水素と反応してL-システインを生成する。

[0025] L-セリンから L-システイン、L-セリンから L-トリプトファンの反応(大腸菌)

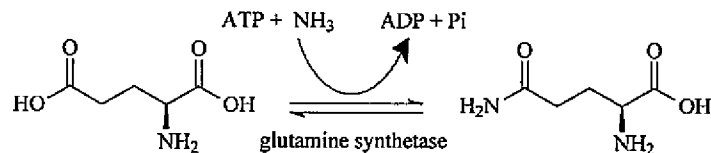


また、下記に示すように、L-アスパラギン、L-グルタミンは、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸の側鎖の水酸基が、アスパラギンシンセターゼ(E.C.6.3.1.1)及びグルタミンシンセターゼ(E.C.6.3.1.2)の作用によりアミノ基に置換されることで生成される。

[0026] L-アスパラギン酸から L-アスパラギンの反応(大腸菌)



L-グルタミン酸から L-グルタミンの反応(大腸菌)



従って、上記の「4種類のアミノ酸の前駆物質」とは、具体的には、L-トリプトファンの前駆物質であるインドール、L-システインの前駆物質である硫化水素または硫化物塩、L-アスパラギン、L-グルタミンの前駆物質であるアンモニウム塩をいう。

[0027] ここで、アンモニウム塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸からアスパラギン、グルタミンへの代謝系においてアミノ基のドナーとなり、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、

硫酸アンモニウム、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、好ましくは5～100mM、より好ましくは10～50mMである。

[0028] 上記アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種、および/または、インドール、硫化水素または硫化物塩、アンモニウム塩の少なくとも1種が安定同位体で標識されている。安定同位体とは、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び ^2H からなる群から選ばれる1種または2種以上の組み合わせをいう。タンパク質の構造解析においては、多種類の標識タンパク質が必要となる場合が多い。このような場合には、数種類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、上記のアミノ酸混合物に含まれるアミノ酸、アミノ酸前駆体物質は少なくとも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。

[0029] 2. 安定同位体標識タンパク質の製造方法

本発明によれば、上記1. の安定同位体標識タンパク質合成用組成物を用いて、安定同位体標識タンパク質を製造する方法が提供される。

[0030] 安定同位体標識タンパク質の合成は、上記組成物からL-トリプトファン、L-システイン、L-アスパラギン、L-グルタミンの4種類のアミノ酸を合成するために必要なアミノ酸生合成酵素群が存在する限り、無細胞タンパク質合成系内または生細胞内のいずれの系で行ってもよい。

[0031] 上記のアミノ酸生合成酵素群は、L-トリプトファン合成に関わるトリプトファンシンターゼ(E.C.4.2.1.20)またはトリプトファンナーゼ(E.C.4.1.99.1)、L-システイン合成に関わるセリンO-アセチルトランスフェラーゼ(E.C.2.3.1.30)、システインシンターゼ(E.C.4.2.99.8)、L-アスパラギン合成に関わるアスパラギンシンセターゼ(E.C.6.3.1.1)、L-グルタミンに関わるグルタミンシンセターゼ(E.C.6.3.1.2)等が挙げられるが、同様の反応を触媒する酵素群が当該細胞に存在していればよい。

[0032] 2-1. 無細胞タンパク質合成系

本発明における「無細胞タンパク質合成系」とは、DNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系と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

細胞翻訳系とを含む無細胞転写翻訳系、ならびに無細胞翻訳系の両者を包含する。

[0033] 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。

[0034] 本発明の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は、アミノ酸基質として上記1. の組成物を用いる以外は、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反応は、特開2000-175695号公報、特開2005-102513号公報、Zubayの文献(Geoffrey Zubay, Annual Review of Genetics, 1973 Vol.7:267-287)を参考にしてもよいし、ロッシュダイアグノスティックス社、プロメガ社等から市販されているキットを適宜使用してもよい。

[0035] 「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ー細胞、エールリツヒ腹水癌細胞、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。

[0036] 本発明において好適に用いることのできる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) BL21株 codon plus等から既知の方法(Geoffrey Zubay, Annual Review of Genetics, 1973 Vol.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。

[0037] また、上記アミノ酸生合成酵素群を持たない生物由来(例えば、トリプトファン合成

酵素を持たないヒト由来)の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いる場合であっても、反応液内に上記アミノ酸生合成酵素群を添加することによっても本発明は達成できる。

[0038] 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。

[0039] 「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、DNAのいずれをも含む。

[0040] 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、最終濃度で0.5～10 μ g/mL程度が例示される。

[0041] 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、クレアチンホスフェート、ホスホエノールピルビ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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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(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。

[0045] 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。

[0046] 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、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組成物、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T7RNA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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] また、透析法を用いて連続的に目的の安定同位体標識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、ピルビン酸キナーゼあるいはクレアチンキナーゼ等を除いたものを使用できる。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またはクレアチンホスフェート、抗菌剤などを含んでいけばよい。

- [0050] 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、新しい外液と交換、または、新たな核酸を定期的に反応液に補給してもよい。
- [0051] 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。
- [0052] 合成した安定同位体標識タンパク質の精製法としては、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で行うことができる。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、ヒスチジンタグ、GSTタグ及びマルトース結合性タグ等が一般的である。
- [0053] 以上のようにして合成・精製された安定同位体標識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。

[0054] 2-2. 生細胞内合成系

安定同位体標識タンパクを生細胞内で行う方法としては、生細胞を培養する培養液に上記安定同位体標識タンパク質合成用組成物を直接添加する方法であってもよく、あるいは、あらかじめ培養した生細胞を回収、洗浄後、上記安定同位体標識タンパク質合成用組成物を添加した緩衝液と反応させる方法(T.Yamasaki J.Am.Chem.Soc.1997,199 p872-880参照)のいずれの方法であってもよい。

[0055] 生細胞を用いる場合においても同様に、上記のアミノ酸生合成酵素群を持つ生物由来の細胞であればよく、例えば、大腸菌、酵母などが挙げられる。

[0056] ただし、添加するインドールや硫化ナトリウムから発生する硫化水素が、細胞毒性を示さない程度に低濃度に保つため、それら濃度をモニターしながら間欠的に添加することが望ましい。

[0057] 生細胞内で安定同位体標識タンパク質を製造する場合、まず目的タンパク質をコードする核酸または該核酸を組み込んだ適当なプラスミドを生細胞に導入し、組換え細胞を得る。次に、得られた組換え細胞を、上記組成物を含有する培養液で培養するか、あるいは、得られた組換え細胞を通常の培養液で培養した培養細胞を回収、洗浄後、上記組成物を含有する緩衝液に添加して培養する。

[0058] 目的とする安定同位体標識タンパク質は、その培養物から採取することにより得ることができる。ここで、「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。

[0059] 組換え細胞を培養する場合、その細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。細胞が大腸菌や酵母菌等の微生物であれば、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、当該細胞の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が挙げられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプ

トン、肉エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で行う。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0060] 培養した組換え細胞を、既知の方法で回収し、上記組成物を含む緩衝液に添加する場合、緩衝液としては、例えば、無機最小培地、Hepes緩衝液、Tris緩衝液、リン酸緩衝液等を用いることができる。

[0061] 目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、超音波処理、凍結融解の繰り返し、ホモジナイザー処理などを施して菌体又は細胞を破砕することにより目的タンパク質を採取する。また、目的タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換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等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

[0062] 3. 安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット

前記1.の「安定同位体標識タンパク質合成用組成物」は、無細胞タンパク合成系または生細胞内合成系によるタンパク製造にそれぞれ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。

[0063] 例えば、安定同位体標識タンパク質合成を無細胞タンパク合成系で行う場合は、本発明の安定同位体標識タンパク質合成用キットは、前記の安定同位体標識タンパク質合成用組成物と無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を少なくとも含んでいればよい。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。

実施例

[0064] 以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発

明を限定するものでない。

[0065] (実施例1) 19種類のアミノ酸(L-トリプトファン無添加) 混合物とインドールによる無細胞タンパク質合成

L-トリプトファンを除く19種類のアミノ酸混合物とインドールによる無細胞タンパク質合成を透析法にて行った。アミノ酸とアミノ酸の前駆体以外の反応液(内液)および透析外液の組成をそれぞれ下記表1および表2に示す。

[表1]

反応液(内液) 組成

組成	濃度
HEPES-KOH pH7. 5	58. 0mM
ジチオスレイトール (DTT)	1. 8mM
ATP	1. 2mM
CTP, GTP, UTP	各0. 8mM
クレアチンリン酸	80. 0mM
クレアチンキナーゼ	0. 25mg/mL
ポリエチレングリコール8000	4. 0%
3', 5'-cAMP	0. 64mM
L(-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8,-テトラ-ヒドロ葉酸	68μM
大腸菌トータル tRNA	175μg/mL
D-グルタミン酸カリウム	250mM
酢酸アンモニウム	27mM
酢酸マグネシウム	10. 7mM
アジ化ナトリウム	0. 05%
T7RNAポリメラーゼ	66. 6μg/mL
大腸菌S30抽出液	反応液の30容量%
鋳型DNA (発現プラスミド)	1μg/mL

[表2]

透析外液組成

組成	濃度
HEPES-KOH pH7. 5	58. 0mM
ジチオスレイトール (DTT)	1. 8mM
ATP	1. 2mM
CTP, GTP, UTP	各0. 8mM
クレアチンリン酸	80. 0mM
クレアチンキナーゼ	0. 25mg/mL
ポリエチレングリコール8000	4. 0%
3', 5'-cAMP	0. 64mM
L(-)-5-フォルミル-5, 6, 7, 8,-テトラ-ヒドロ葉酸	68μM
D-グルタミン酸カリウム	250mM
酢酸アンモニウム	27mM
酢酸マグネシウム	10. 7mM
アジ化ナトリウム	0. 05%
トリス酢酸 (pH8. 2)	3mM
酢酸カリウム	18mM

[0066] 反応は、表1に示した組成の反応液(内液)を、表2に示した組成の透析外液に対して30℃にて一晩透析することにより行った。反応スケールは反応液(内液)30 μ l、透析外液300 μ lとした。大腸菌S30抽出液はズベイ(Zubay)ら(Annu.Rev.Geneti.,7,267-287,1973)の方法に従って、大腸菌BL21codon plus株から調製した。タンパク質合成量を定量的に示すため、比活性から容易にタンパク質の定量が可能なクロラムフェニコールアミノトランスフェラーゼ(CAT)を採用した。CAT発現ベクターとしてはpK7-CAT(Kim et al.,Eur. J. Biochem. 239, 881-886, 1996参照)を用いた。合成されたCATタンパク質の定量はShawらの方法(Methods Enzymol. 735-755, 1975参照)に従った。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(DNTB)を用いて発色定量した。37℃、412nmにおける吸光度の単位時間当たりの増加量より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。

[0067] 反応液(表1)に対し、L-トリプトファン以外のアミノ酸として、藍藻由来のタンパク質を塩酸加水分解して得られた16種類のアミノ酸混合物(L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン)(大陽日酸株式会社より購入)を最終濃度で5mg/ml、L-アスパラギンを最終濃度で2mM、L-グルタミンとL-システインをそれぞれ最終濃度で1mMになるように添加した。また、同反応液に対し、トリプトファンの前駆体(基質)となるインドールを最終濃度で0.5 mMまたは1.0mMになるように添加した。また、コントロールとして、インドールを添加しない場合と、L-トリプトファンを最終濃度で1mMになるように添加した条件でもCAT合成を同時に行った。

[0068] その結果、図1に示すように、L-トリプトファン、インドールを添加しない反応系(図1中、19種類アミノ酸、バックラウンド)、ほとんどCATは合成されなかったが、インドールを添加することによりCATが合成された。また、トリプトファン合成酵素の補酵素であるピリドキサル5'-リン酸(PLP)を最終濃度で0.5mM添加することで、20種類のアミノ酸を添加した場合と同等量のCATを合成できた。

[0069] (実施例2) 19種類のアミノ酸(L-システイン無添加)混合物と硫化ナトリウムによる無細胞タンパク質合成

L-システインを除く19種類のアミノ酸混合物と硫化ナトリウムによる無細胞タンパク質合成を実施例1と同様にして透析法にて行った。アミノ酸とアミノ酸の前駆体以外の反応液(内液)組成および透析外液組成、ならびに反応条件(スケール・温度・時間)は実施例1と同じである。前記反応液(表1)に対し、L-システイン以外のアミノ酸として、藍藻由来のタンパク質を塩酸加水分解して得られた16種類のアミノ酸混合物(L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン)(大陽日酸株式会社より購入)を最終濃度で5mg/ml、L-アスパラギンを最終濃度で2mM、L-グルタミンとL-トリプトファンをそれぞれ最終濃度で1mMになるように添加した。また、同反応液に対し、L-システインの前駆体(基質)となる硫化ナトリウム(Na_2S)を最終濃度で0.5 mMまたは1.0mMになるように添加した。また、コントロールとして、硫化ナトリウムを添加しない場合と、L-システインを最終濃度で1.0mMになるように添加した条件でもCAT合成を同時に行った。

[0070] その結果、図2に示すように、L-システイン、硫化ナトリウムを添加しない反応系(図2中、19種類アミノ酸、バックラウンド)においては、ほとんどCATは合成されなかったが、硫化ナトリウムを添加することによりCATが合成された。また、実施例1と同様、システイン合成酵素の補酵素であるPLPを最終濃度で0.5mM添加することでさらに合成量が増加した。硫化ナトリウムを最終濃度で1mM、PLPを最終濃度で0.5mM添加した場合、20種類のアミノ酸を添加した場合の8割以上のCATタンパク質を合成できた。

[0071] (実施例3) 18種類のアミノ酸(L-システイン及びL-トリプトファン無添加)混合物または16種類のアミノ酸(L-アスパラギン、L-グルタミン、L-システイン及びL-トリプトファン無添加)混合物と、硫化ナトリウムとインドールによる無細胞タンパク質合成

(i) L-システイン及びL-トリプトファンを除く18種類のアミノ酸混合物、硫化ナトリウム、及びインドールによる無細胞タンパク質合成、(ii) L-アスパラギン、L-グルタミン、L-システイン及びL-トリプトファンを除く16種類のアミノ酸混合物、硫化ナトリウム、及び

インドールによる無細胞タンパク質合成を実施例1と同様にして透析法にて行った。アミノ酸とアミノ酸の前駆体以外の反応液(内液)組成および透析外液組成、ならびに反応条件(スケール・温度・時間)は実施例1と同じである。

[0072] 前記反応液(表1)に対し、L-システイン及びL-トリプトファン以外のアミノ酸として、藍藻由来のタンパク質を塩酸加水分解して得られた16種類のアミノ酸混合物(L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン)(大陽日酸株式会社より購入)を最終濃度で5mg/ml、(i)の合成の場合は、L-アスパラギンを最終濃度で2mM、L-グルタミンを最終濃度で1mMになるように反応液に添加した。また、同反応液に対し、L-システインの前駆体(基質)となる硫化ナトリウム(Na_2S)を最終濃度で0.5 mM、およびL-トリプトファンの前駆体(基質)となるインドールを最終濃度で0、0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、1.5mMになるよう添加した。さらに、実施例1、2でCAT合成量向上に効果が見られたPLPを最終濃度で0.5mM添加した。また、コントロールとして、L-システイン及びL-トリプトファンをそれぞれ最終濃度で1mMになるように添加した条件でもCAT合成を同時に行った。

[0073] その結果、図3に示すように、インドールを添加しない反応系は、ほとんどCATは合成されなかったが、インドールを添加することによりCATが合成された。インドールの最終濃度が0.2mMの条件が最も合成量が多かった。16種類のアミノ酸の場合では、18種類のアミノ酸の場合に比べ、合成量が6割程度に留まったもののCATが合成されることが確認された。反応系内のアンモニウムイオンを最適化することにより、合成量はさらに改善すると考えられる。

[0074] (実施例4)窒素同位体(^{15}N)標識タンパク質の合成

(1)無細胞タンパク質合成による窒素同位体(^{15}N)標識タンパク質合成

16種類の ^{15}N 標識アミノ酸混合物(L-アラニン- ^{15}N 、L-アルギニン- ^{15}N 、L-アスパラギン酸- ^{15}N 、L-グルタミン酸- ^{15}N 、グリシン- ^{15}N 、L-ヒスチジン- ^{15}N 、L-イソロイシン- ^{15}N 、L-ロイシン- ^{15}N 、L-リジン- ^{15}N 、L-メチオニン- ^{15}N 、L-フェニルアラニン- ^{15}N 、L-プロリン- ^{15}N 、L-セリン- ^{15}N 、L-スレオニン- ^{15}N 、L-チロシン- ^{15}N 、L-バリン- ^{15}N)、硫化ナト

リウム(Na_2S)、およびインドールをアミノ酸基質として用い、前記表1に示す鋳型DNA(発現プラスミド)としてCAT発現ベクターに代えてRasタンパク質(Yamasaki J Biomol NMR. 1992 Jan;2(1):71-82)をコードする環状プラスミドDNA(最終濃度 $2\mu\text{g/ml}$)、酢酸アンモニウムに代えて酢酸アンモニウム- ^{15}N を用いる以外は、実施例1と同様にして無細胞タンパク質合成を透析法にて行った。アミノ酸とアミノ酸の前駆体以外の反応液(内液)組成および透析外液組成、反応条件(温度・時間)は実施例1と同じである。なお、反応液(内液)は3ml、透析外液は30mlとした。

[0075] 前記反応液(表1)に対し、窒素同位体(^{15}N)アミノ酸混合物を最終濃度で5mg/ml、インドールを最終濃度で0.2mM、硫化ナトリウムを最終濃度で0.5mMになるように添加した。また、補酵素であるPLPを最終濃度で0.5mMになるように添加した。また、コントロールとして、20種類の ^{15}N 標識アミノ酸を基質とした無細胞タンパク質合成も同時に実施した。合成が終了した後、透析膜内の反応液を遠沈管に回収した。

[0076] (2) 窒素同位体(^{15}N)標識タンパク質の精製

上記手法で合成、回収したRasタンパク質の精製は、ヒスチジンとコバルトイオンとの親和性を利用した精製方法にて行った。操作は4°Cで実施した。無細胞タンパク質合成反応液3mlを、緩衝液(20mMトリス塩酸塩(pH8.0)/1M塩化ナトリウム)2.6mlで希釈し、遠心分離(2,000回転、5分間)して沈殿を除去した。得られた上清に3.2mlのTALON樹脂(BD Biosciences clontech社)を加えて混和し、タンパク質を吸着させた。ミニカラムに、上記タンパク質溶液と樹脂の混合液を静かに充填し、ろ過することで樹脂と液を分離した。カラムボリュームの約5倍量の洗浄緩衝液でカラムを洗浄した後、溶出用液緩衝液(20mMトリス塩酸塩(pH8.0)/30mM塩化ナトリウム/500mMイミダゾール)4mlを樹脂に加えることによりTALON樹脂に吸着したRasタンパク質を溶出させた。溶出したRasタンパク質のN末端にある不要なヒスチジントグを切断するために、限外ろ過装置(ビバスピク2; ザルトリウス社)を用いて約500 μl に濃縮し、8 $\mu\text{g/ml}$ のTEVプロテアーゼを加えて4°Cで一晩切断反応を行った。反応終了後の液を再度限外ろ過装置に入れ、緩衝液(20mMトリス塩酸塩(pH8.0)/1M塩化ナトリウム)を2ml加えて200 μl にまで濃縮した。これを数回繰り返す、緩衝液の交換を行った。溶媒を洗浄緩衝液に交換したRasタンパク質溶液にさらに洗浄緩衝液を加えて3.5mlとし、そこに

1.6mlのTALON樹脂を加えて切断したヒスチジンタグを樹脂に吸着させた。ミニカラムに樹脂を含む溶液を充填し、素通りした画分を回収し、精製Rasタンパク質を得た。収量は、16種類のアミノ酸で合成した場合で約3.1mg、20種類のアミノ酸の場合で3.8mgであり、本発明方法による16種類のアミノ酸で合成したRasタンパク質収量は20種類のアミノ酸で合成した場合と比較して若干収量は低下するものの、NMR測定に十分量のRasタンパク質を合成することができた。

[0077] (3) NMR測定試料の調製

精製した ^{15}N 標識Rasタンパク質をNMR測定に適した溶媒(20mM リン酸ナトリウム(pH6.5)/100mM NaCl/5mM MgCl_2 /5mM d-DTT/0.01% NaN_3)に置換するため、再度限外ろ過装置で溶媒交換を実施した。溶媒置換したタンパク質溶液に対して、10%になるよう重水を加え、NMR測定用試料とした。

[0078] (4) NMR測定

NMR測定用溶媒に置換した ^{15}N 標識Rasタンパク質溶液を対称型マイクロNMR試料管(シゲミ社、 ϕ 5mm)に入れ、700MHzのNMR装置(DRX;ブルカー社)で、温度25°Cにて ^1H - ^{15}N -2次元HSQC(以降 ^{15}N -HSQCと略記)測定を実施した。NMR測定(^{15}N -HSQCスペクトル)の結果を図4に示す。

[0079] 16種類のアミノ酸とその他のアミノ酸前駆体をアミノ酸源として合成したRasタンパク質では、トリプトファンの前駆体として非標識インドールを用いたため、トリプトワンの側鎖(インドール環)が標識されていないことが分かる(図4: 下図)。それ以外のN-Hのシグナルは、20種類のアミノ酸で合成したRasタンパク質と同等であることが確認された。

[0080] (実施例5)酸素同位体(^{18}O)標識タンパク質の合成

(1)アミノ酸(16種類)の酸素同位体(^{18}O)標識

アミノ酸のカルボキシル基の酸素を酸素同位体で標識する方法として、Murphy RC, Clay KL., 1979, Synthesis and back exchange of ^{18}O -labeled amino acids for use as internal standards with mass spectrometry. Biomed Mass Spectrom 6:309-314に記載の方法を用いた。

[0081] 市販の16種類のアミノ酸(L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタ

ミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリン)を、下記表3に示す藍藻のアミノ酸混合物の組成比と同一の組成比になるよう混合し、16種類の非標識アミノ酸混合物を作成した。

[表3]

アミノ酸混合物組成

アミノ酸	モル (%)
L-アラニン	13.75
L-アルギニン	2.68
L-アスパラギン酸	10.20
L-グルタミン酸	10.03
グリシン	10.91
L-ヒスチジン	1.23
L-イソロイシン	7.29
L-ロイシン	9.98
L-リジン	4.12
L-メチオニン	1.85
L-フェニルアラニン	3.54
L-プロリン	4.56
L-セリン	4.87
L-スレオニン	5.54
L-チロシン	2.04
L-バリン	7.40

[0082] 上記アミノ酸混合物を0.257g(A)と0.259g(B)秤量し、それぞれを10ml容ナスフラスコに移した。Aに濃塩酸で調製した0.3N 塩酸¹⁸O標識水(¹⁸O濃縮度: 95atom%)を4.25g、Bに0.3N 塩酸水溶液(非標識水)を4.02gそれぞれ加えて完全に溶解させた。各々に蓋をしてオイルバスに入れ、窒素気流下100℃にて16時間還流加熱した。反応終了後、室温に冷まし、ロータリーエバポレーターを用いて完全に乾固させ、水分及び塩酸を除去した。乾固物に蒸留水を加え、5M 水酸化カリウムでpH7.5に調整し、それぞれ蒸留水を添加して5mlにし、酸素同位体(¹⁸O)標識アミノ酸混合物(16種類)を調製した。

[0083] (2)無細胞タンパク質合成法による酸素同位体(¹⁸O)標識タンパク質合成

アミノ酸基質として(1)で作成した酸素同位体(¹⁸O)標識アミノ酸混合物を用い、前記表1に示す鋳型DNA(発現プラスミド)としてCAT発現ベクターに代えて配列番号1に示したヒト由来イソペプチダーゼ5(E.C.3.1.2.15)のユビキチン結合ドメイン(UBA)塩基

配列を含む発現プラスミドDNAを用いた以外は、実施例1と同様にして無細胞タンパク質合成を透析法にて行った。アミノ酸とアミノ酸の前駆体以外の反応液(内液)組成および透析外液組成、ならびに反応条件(スケール・温度・時間)は実施例1と同じである。

[0084] 前記反応液(表1)に対し、酸素同位体(^{18}O)標識アミノ酸混合物および非標識アミノ酸混合物を最終濃度で5mg/mlになるように添加した。また、インドール、硫化ナトリウムは、それぞれ最終濃度で1mMになるように添加した。また、コントロールとして、非標識L-アスパラギンを最終濃度で2mM、非標識L-グルタミン、非標識L-トリプトファン、及び非標識L-システインをそれぞれ最終濃度で1mMになるように添加した条件でもUBAタンパク質合成を実施した。

[0085] (3) 酸素同位体(^{18}O)標識タンパク質の精製

上記のようにして合成されたUBAタンパク質の精製は、ヒスチジンとコバルトイオンとの親和性を利用した精製方法にて行った。無細胞タンパク質合成反応液30 μl を0.6 ml容遠心チューブにて回収し、緩衝液(20mMトリス塩酸塩(pH8.0)/1M 塩化ナトリウム)30 μl で希釈し、遠心分離(4,000回転、5分間)して沈殿を除去した。得られた上清40 μl にTALON樹脂(BD Biosciences clontech社)を加えて混和し、タンパク質を吸着させた。フィルタープレートを用いて遠心分離により上清を除去した後、得られた樹脂に上記緩衝液を150 μl 加えて更に遠心分離し、樹脂の洗浄を行った。樹脂から合成UBAタンパク質を溶出させるため、溶出用緩衝液(20mMトリス塩酸塩(pH8.0)/300mM 塩化ナトリウム/500mMイミダゾール)100 μl を樹脂に加えて混和し、遠心分離により精製UBAタンパク質を含む溶出液を得た。

[0086] (4) 酸素同位体(^{18}O)標識タンパク質の脱塩と質量分析

精製された酸素同位体(^{18}O)標識UBAタンパク質の酸素同位体標識による質量の増加の有無を確認するため、質量分析を行った。質量分析の前処理として、精製タンパク質をZip tip C18(Waters社)により脱塩処理した。質量分析精度向上のため、試料中にミオグロビンを内部標準として添加して脱塩精製UBAタンパク質試料とし、MALDI-TOF MS(Voyager; アプライドバイオシステムズ社)により酸素同位体(^{18}O)標識タンパク質の質量を測定した。合成したUBAタンパク質の非標識の平均分子量は

、10390.9Daであった。TOF-MSによる質量測定結果を図5に示す。その結果、¹⁸O標識したアミノ酸混合物を使用したUBAタンパク質で酸素同位体標識によると思われる平均質量の増加が確認された。

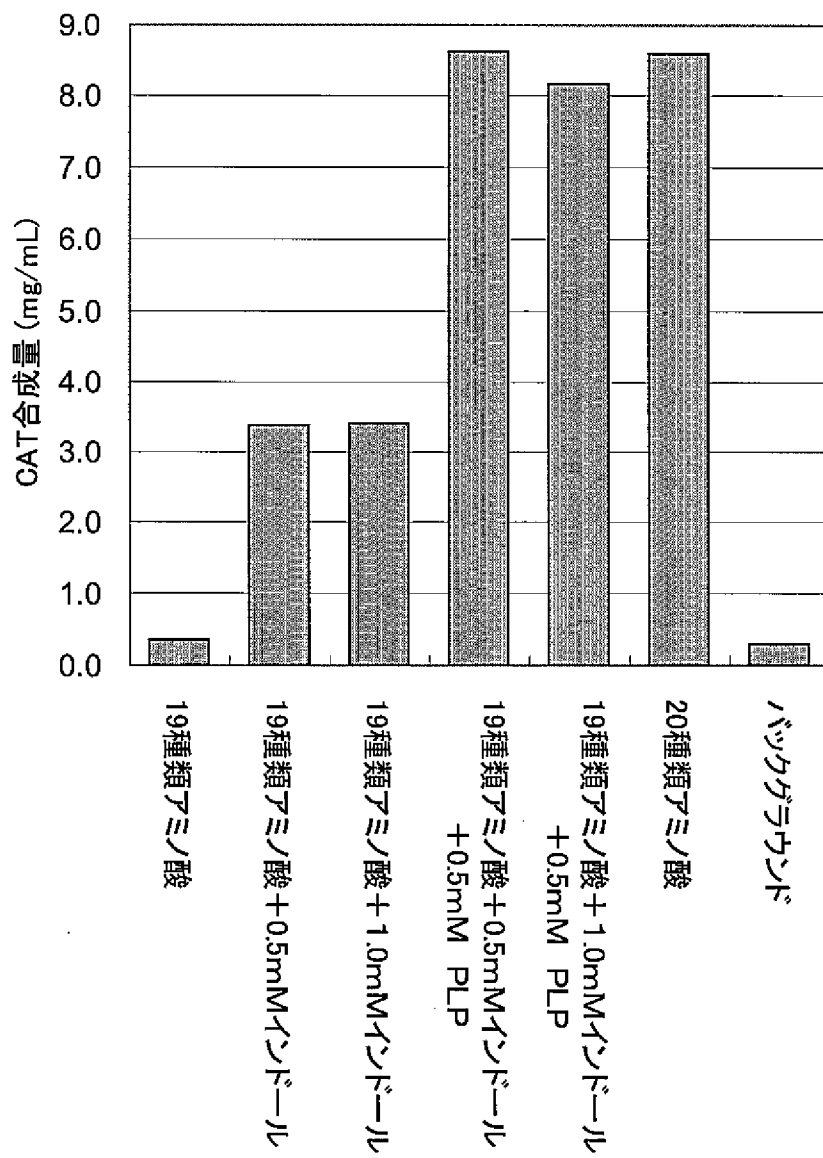
産業上の利用可能性

- [0087] 本発明によれば、安定同位体標識タンパク質を安価に製造することが可能となり、タンパク質立体構造解析などの技術分野において貢献できる。
- [0088] 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。

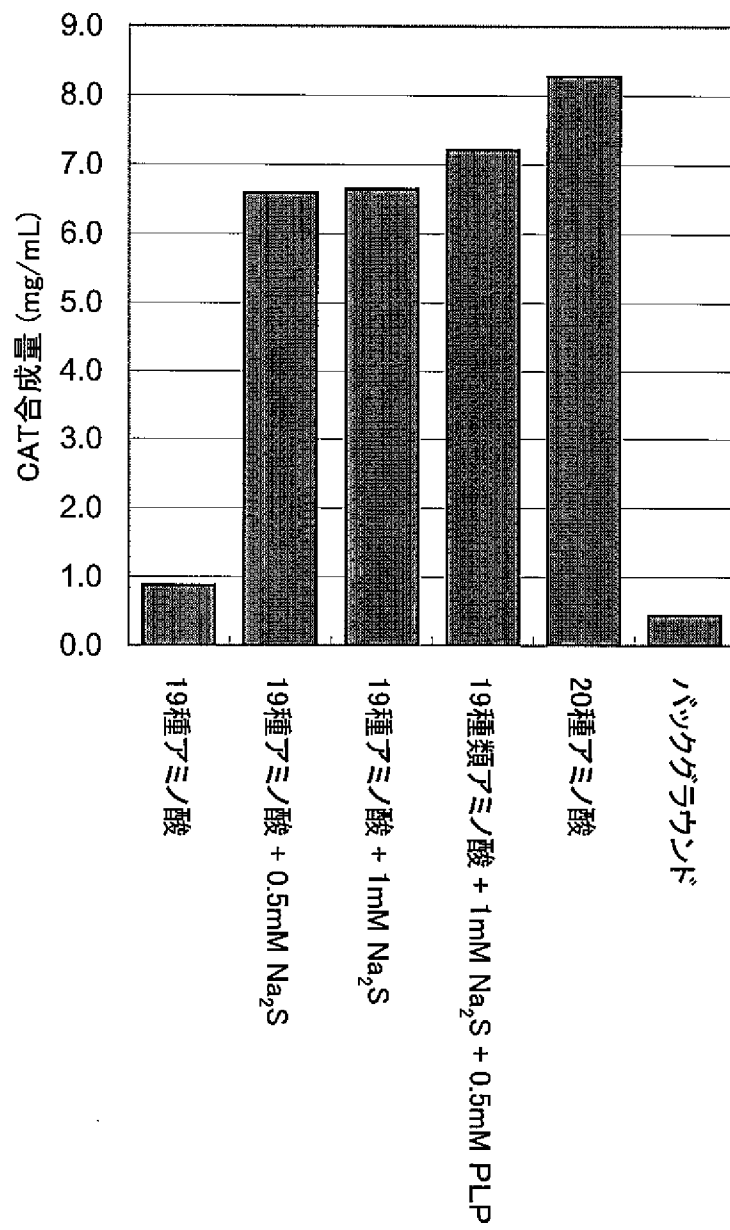
請求の範囲

- [1] (A) L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-バリンの16種類のアミノ酸からなるアミノ酸混合物、(B) インドール、(C) 硫化水素または硫化物塩、および(D) アンモニウム塩を含み、かつ前記アミノ酸混合物中のアミノ酸の少なくとも1種、および/または、インドール、硫化水素または硫化物塩、アンモニウム塩の少なくとも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組成物。
- [2] 前記安定同位体が、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び ^2H からなる群から選ばれる1種または2種以上の組み合わせである、請求項1に記載の安定同位体標識タンパク質合成用組成物。
- [3] 請求項1または2に記載の組成物を含む、安定同位体標識タンパク質合成用試薬キット。
- [4] 請求項1または2に記載の組成物を用いて安定同位体標識タンパク質を合成することを特徴とする、安定同位体標識タンパク質の製造方法。
- [5] 安定同位体標識タンパク質の合成が、無細胞タンパク質合成系内で行われる、請求項4に記載の製造方法。
- [6] 安定同位体標識タンパク質の合成が、生細胞内で行われる、請求項4に記載の製造方法。

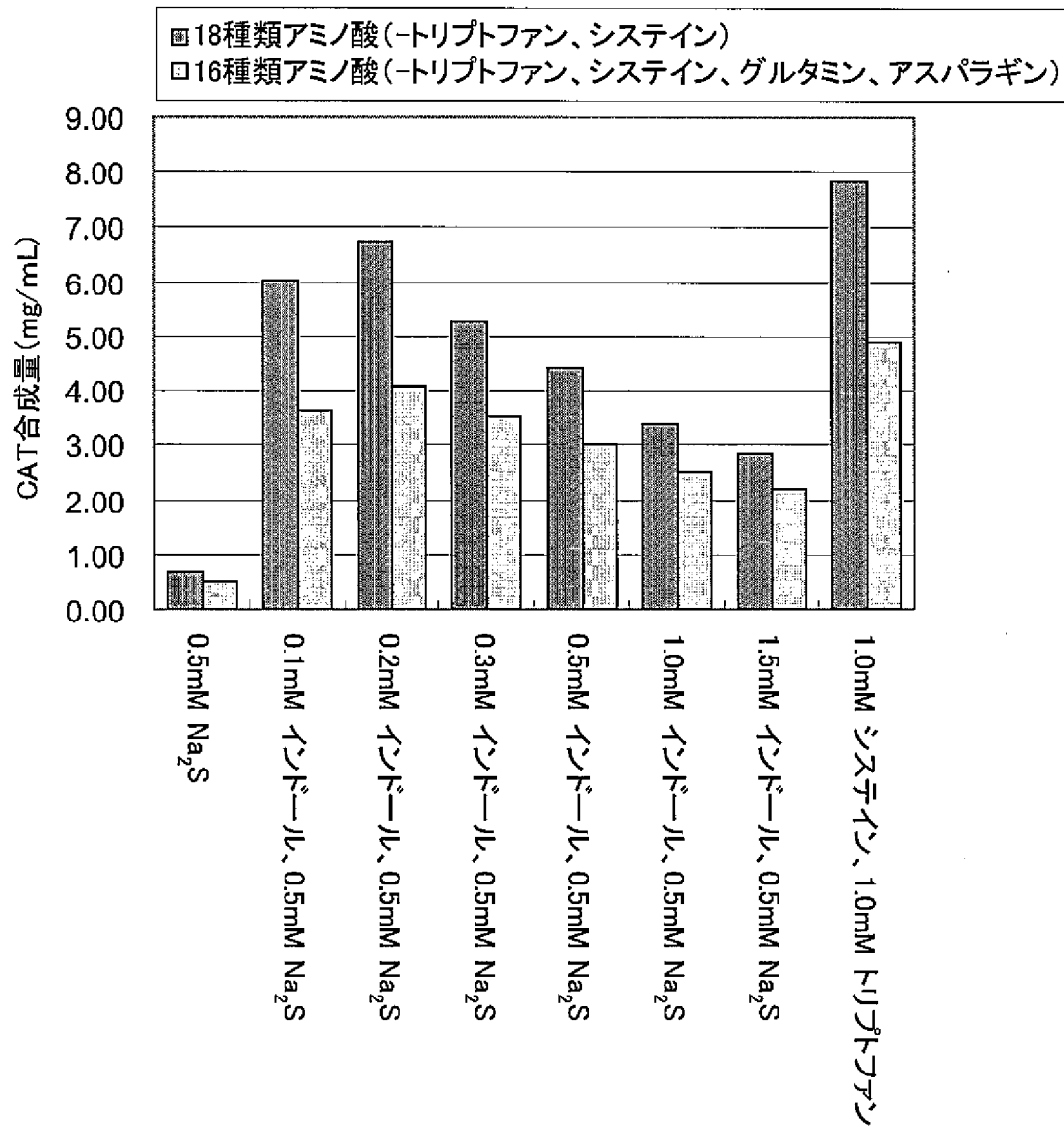
[図1]



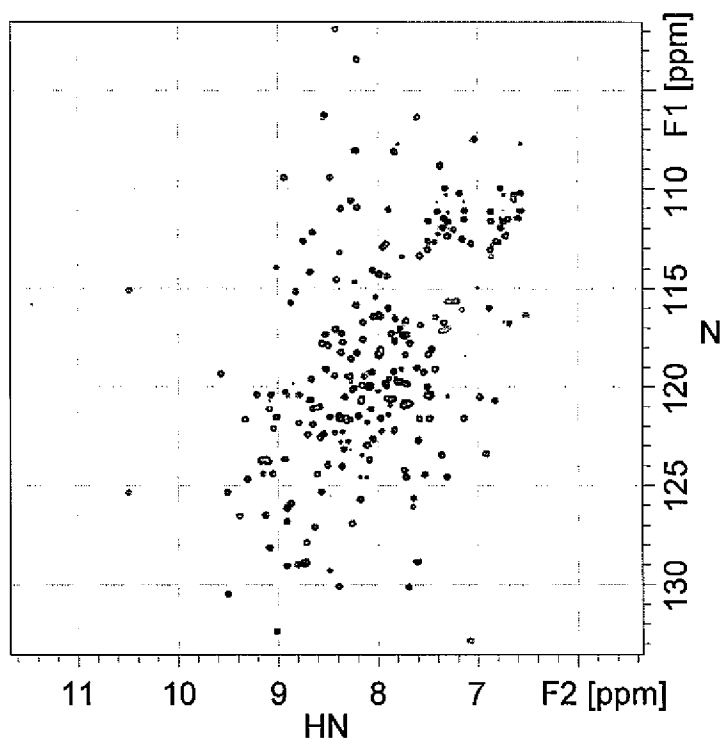
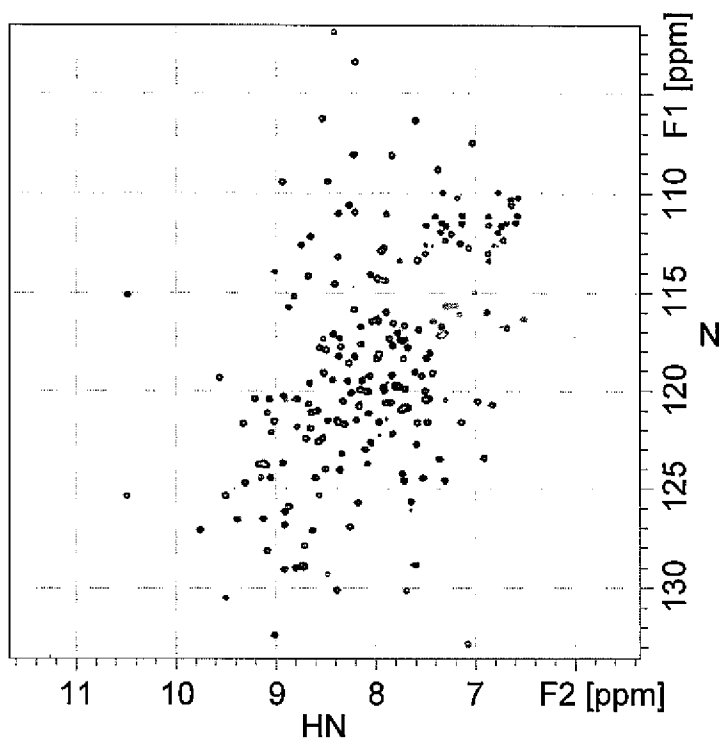
[図2]



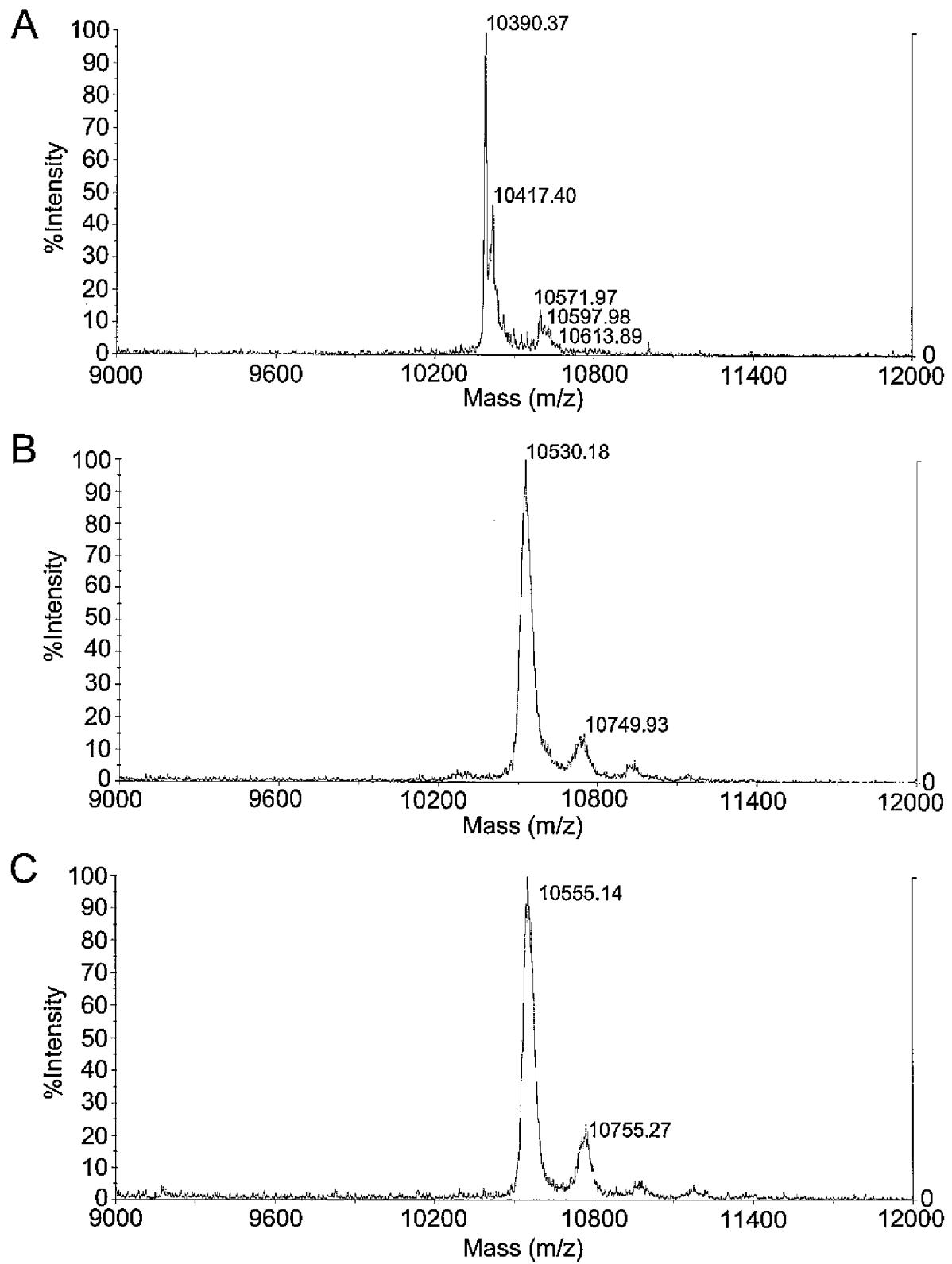
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/052116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P21/02(2006.01)i, G01N33/493(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C12P21/02, G01N33/493, G01N33/58, G01N33/68, 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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/104210 A1 (RIKEN), 02 December, 2004 (02.12.04), & EP 1655376 A1	1-6
Y	JP 8-103283 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 April, 1996 (23.04.96), (Family: none)	1-6
Y	JP 1-101892 A (Keishitsu Ryubun Shin Yoto Kaihatsu Gijutsu Kenkyu Kumiai), 19 April, 1989 (19.04.89), (Family: none)	1-6
Y	JP 2-222692 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 05 September, 1990 (05.09.90), (Family: none)	1-6

☐ 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
10 April, 2008 (10.04.08)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2008 (22.04.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12P21/02(2006.01)i, G01N33/493(2006.01)i, G01N33/58(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n			
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（I P C）） Int.Cl. C12P21/02, G01N33/493, G01N33/58, G01N33/68, 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） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus(JDreamII)			
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	WO 2004/104210 A1 (RIKEN) 2004.12.02 & EP 1655376 A1	1 - 6	
Y	JP 8-103283 A (三菱化学株式会社) 1996.04.23 (ファミリーなし)	1 - 6	
Y	JP 1-101892 A (軽質留分新用途開発技術研究組合) 1989.04.19 (ファミリーなし)	1 - 6	
☒ 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 1 0 . 0 4 . 2 0 0 8		国際調査報告の発送日 2 2 . 0 4 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 池上 文緒 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 7 6 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	JP 2-222692 A (協和発酵工業株式会社) 1990.09.05 (ファミリーなし)	1 - 6