明　細　書

発明の名称 ： 無細胞タンパク質合成用の植物胚芽

技術分野

[0001]　本発明は、無細胞タンパク質合成用の植物胚芽、それを用いて得られる無細胞タンパク質合成用抽出物及び反応液、並びにそれを用いる無細胞タンパク質合成方法及びタンパク質合成能の向上方法に関する。

背景技術

[0002]　タンパク質の人工的な合成は、学術的な用途にとどまらず、近年様々な場面でその必要性が増大している。タンパク質の人工的な合成においては、目的のタンパク質を安価、安定的かつ大量に得ることができ、特殊な機材や煩雑な工程を必要とせず簡便に実施できる方法が理想的である。

[0003]　タンパク質を人工的に合成する方法としては、哺乳類、昆虫、植物、大腸菌など様々な生物に由来する細胞に目的の遺伝子を導入して必要なタンパク質を合成する方法以外に、材料として小麦又はウサギ網状赤血球に由来する材料を使用する無細胞タンパク質合成系が知られている（特許文献１）。この方法は、遺伝情報をもつＤＮＡからその情報がｍＲＮＡに転写され、リボソームがｍＲＮＡの情報を翻訳して、タンパク質を合成するという工程を、試験管等の生体外で行う方法である。

無細胞タンパク質合成系は、翻訳の正確性等の利点がある一方で、合成効率、収量が劣るという欠点がある。そのような欠点を克服するため、様々な検討がなされてきた。例えば、小麦胚芽を使用した無細胞タンパク質合成系においては、細胞抽出物含有液を凍結乾燥化により製剤化した方法（特許文献２）、凍結保存下での安定化のために多価アルコールを添加する方法（特許文献３）、動物由来、及び微生物由来夾雑成分を除去する方法（特許文献４）、基質の初期濃度を維持させる方法（特許文献１）、タンパク質合成に使用する抽出液中のタンパク質濃度を濃縮して一定以上に保つ方法（特許文献５）などが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平１－５０３１１９号公報

特許文献2：特開２０００－３１６５９４号公報

特許文献3：ＵＳ２００３／０１９９０７６　Ａ１

特許文献4：特開２００７－９７４３８号公報

特許文献5：特開平６－２２５７８３号公報

発明の概要

[0005] 小麦を無細胞タンパク質合成系の材料として用いた場合、材料を安価に入手することができ、目的とするタンパク質を安価に大量に合成できるようになることが期待される。

しかしながら、無細胞タンパク質合成系に関する上述した従来方法は、期待しているほどに収量が改善しているとは言い難く、また、特別な装置が必要とする方法であったり、また、添加剤などの物質を使用する場合には、合成したタンパク質の用途が限定されるといった課題がある。

[0006] したがって、本発明は、無細胞タンパク質合成系において、煩雑な装置や工程を要することなく、安価に高い収率で、目的とするタンパク質を合成することが可能となる、無細胞タンパク質合成用植物胚芽等を提供することに関する。

[0007] 本発明者らは、鋭意検討した結果、小麦等の植物の胚芽に、植物ホルモンであるジベレリンを添加したものを用いることによって、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成能力を、煩雑な装置や工程を要することなく向上させることができることを見出し、かかる知見に基づき本発明を完成させた。

[0008] 本発明は、ジベレリンを添加した無細胞タンパク質合成用の植物胚芽を提供するものである。

また本発明は、前記植物胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用抽出物を提供するものである。

また本発明は、前記無細胞タンパク質合成用抽出物を含む、無細胞タンパク質合成用反応液を提供するものである。

また本発明は、前記無細胞タンパク質合成用抽出物又は無細胞タンパク質合成用反応液を使用する、無細胞タンパク質合成方法を提供するものである。

[0009] また本発明は、植物胚芽にジベレリンを添加し、低温条件で静置した後に抽出を行うことで、抽出により得られる胚芽抽出液の、無細胞タンパク質合成におけるタンパク質合成能を高める、タンパク質合成能の向上方法を提供するものである。

[0010] また本発明は、無細胞タンパク質合成においてタンパク質合成能力を高める方法であって、以下の工程（１）乃至（５）を含むことを特徴とする、タンパク質合成能の向上方法を提供するものである。

（１）植物胚芽に植物ホルモンを添加する工程

（２）低温条件下に静置する工程

（３）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程

（４）胚芽成分抽出用溶液を添加して植物胚芽を溶解する工程、及び

（５）溶解した植物胚芽を精製する工程

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、実施例及び比較例の評価結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明（無細胞タンパク質合成用の植物胚芽、無細胞タンパク質合成用抽出物、無細胞タンパク質合成用反応液、無細胞タンパク質合成方法、又はタンパク質合成能の向上方法）によれば、無細胞タンパク質合成系において、煩雑な装置や工程を要することなく、安価に高い収量で、目的とするタンパク質を合成することが可能となる。

本発明によれば、例えば研究用途としてのタンパク質合成だけでなく、医療用医薬品、診断用医薬、研究用試薬、動物用飼料又は人用の食品としての代替タンパク質といった、用途が多岐にわたる様々なタンパク質を、安価か

つ簡便に供給することができ、産業上の利用を促進することも可能となる。

[0013] 以下、本発明をその好ましい実施形態に基づき説明する。

本発明は、植物胚芽を用いた無細胞タンパク質合成系に関する。

本発明において、無細胞タンパク質合成系とは、ｍＲＮＡの情報を読み取ってタンパク質やポリペプチドを合成する無細胞翻訳系、及び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との両者を含む系のいずれをも意味するものとする。

植物胚芽は、植物由来の胚芽であり、小麦、大麦、イネ、コーン、ホウレンソウ等の各種植物の胚芽を用いることができる。タンパク質合成能の向上及び／又は入手の容易等の観点から、イネ科の植物の種子由来の胚芽が好ましく、特に小麦胚芽を用いることが好ましい。本発明において、無細胞タンパク質合成方法で製造するタンパク質には、一般的に無細胞タンパク質合成で合成可能なサイズの分子量のポリペプチド及びタンパク質が含まれ、例えば分子量が１０～２００ｋＤのポリペプチド又はタンパク質を合成の対象としてよい。また、以下の説明においては、小麦胚芽の場合を例にして説明する場合があるが、小麦胚芽以外の植物の胚芽にも同様に適用可能である。

[0014] 植物種子からリボソームを含有し無細胞タンパク質合成に用いることができる植物胚芽を調製する方法としては、一般的に知られている方法を用いることできる。

植物胚芽の調製方法としては、例えば、植物種子の粉砕、篩、重液選別、目視等による種皮、胚乳画分の除去、洗浄による胚乳成分の除去等を行うことによる、ジベレリンを添加する対象の植物胚芽の準備工程、及び準備した植物胚芽に対して、粉砕、抽出、精製する方法が挙げられる。本発明においては、準備工程の後の植物胚芽にジベレリンを添加することが好ましい。

[0015] ジベレリンを添加する対象の植物胚芽は、例えば、（Ａ１）植物種子の粉砕工程及び（Ａ２）胚芽の選別工程を経て得られたものが好ましく、以下の（Ａ３）水分量調節工程を経て得られるものがさらに好ましい。

[0016] （Ａ１）植物種子の粉砕工程

植物種子に含まれる胚芽の量は少ないため、胚芽を効率的に取得するためには、植物種子の破砕前に、胚芽以外の部分をできるだけ除去しておくことが好ましい。

破砕工程においては、通常、まず、植物種子に機械的な力を加えることにより、胚芽、胚乳破砕物、種皮破砕物を含む植物種子の粉砕物を得る。この粉砕工程は、公知の粉砕装置を用いて行うことができる。粉砕装置としては、ピンミル、ハンマーミル等の、被粉砕物に対して衝撃力を加えるタイプの粉砕装置を用いてよい。粉砕の程度は、使用する植物種子の胚芽の大きさに応じて適宜選択すればよいが、例えば小麦種子の場合は、好ましくは最大長さ４ｍｍ以下、より好ましくは最大長さ２ｍｍ以下の大きさに粉砕する。粉砕は、乾式で行ってもよいし、湿式で行ってもよい。

[0017] （Ａ２）胚芽の選別工程

胚芽の選別工程においては、粗胚芽画分の選別を行うことが好ましく、粗胚芽画分の選別後に、更に胚芽由来の部分の割合を高める純化処理を行うことが好ましい。

粗胚芽画分の選別においては、粉砕工程で得られた植物種子の粉砕物から、胚乳破砕物、種皮破砕物等を取り除いて粗胚芽画分を得る。粗胚芽画分は、胚芽を主成分とし、胚乳破砕物、種皮破砕物を含む。粗胚芽画分は、植物種子の粉砕物から、公知の分級装置、例えば篩を用いて取得する。例えば、小麦種子の場合、通常、メッシュサイズ０．５ｍｍ～２．０ｍｍ、好ましくは０．７ｍｍ～１．４ｍｍの粗胚芽画分を取得することができる。さらに、必要に応じて、得られた粗胚芽画分に含まれる種皮、胚乳、ゴミ等を風力、静電気力を利用して除去してもよい。

その後、又は前述の篩等による分級に代えて、胚芽と種皮、胚乳の比重の違いを利用する方法、例えば液体中に植物胚芽粉砕物を入れ、比重の違いを利用して種皮や胚乳画分を取り除き、粗胚芽画分を取得する重液選別により、粗胚芽画分を得ることもできる。この場合に用いる液体としては、通常、四塩化炭素とシクロヘキサンとの混合溶液が用いられるが、特に四塩化炭素

等の有機塩素系溶媒は、環境面及び健康面を考慮し、合成タンパク質の用途に応じて選択することができるので好ましい。より多くの胚芽を含有する粗胚芽画分を得るために、上記の方法を複数組み合わせてもよい。

[0018] このようにして得られた粗胚芽画分から、例えば目視や色彩選別機等を用いて胚芽を選別して胚芽画分を得てもよい。さらに、このようにして得られた胚芽にも、胚乳成分が付着している場合があるため、胚芽純化のために更に洗浄処理をすることも好ましい。

洗浄処理としては、例えば、通常１０℃以下、好ましくは４℃以下に冷却した水又は水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させ、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することが好ましい。また、通常１０℃以下、好ましくは４℃以下で、界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄するのがより好ましい。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましい。非イオン性界面活性剤としては、非イオン性のものを広く利用ができる。具体的には、例えば、好適なものとして、ポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ（Ｂｒｉｊ）、トリトン（Ｔｒｉｔｏｎ）、ノニデット（登録商標，Ｎｏｎｉｄｅｔ）Ｐ４０、ツイーン（Ｔｗｅｅｎ）等が例示される。なかでも、ノニデット（登録商標，Ｎｏｎｉｄｅｔ）Ｐ４０が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、例えば０．５％程度の濃度で使用することができる。

水又は水溶液による洗浄処理および界面活性剤による洗浄処理は、どちらか一方を実施してもよいし、両方を実施してもよい。また、これらの洗浄処理は、超音波処理との組み合わせで実施してもよい。

[0019]（Ａ３）水分量調節工程

本発明においては、上記の手法を用いて得られた胚芽を、無細胞タンパク質合成に使用する場合のタンパク質の収量を向上させるために、胚芽画分に含まれる水分量を調節してもよい。調節後の胚芽の水分量（質量％）は、３０％以下が好ましく、２８．６％以下がより好ましく、２４．８％以下がさらに好ましい。水分量（質量％）の下限は、特にないが、例えば１．６％以

上であり、１８．８％以下が好ましい。

胚芽中に含まれる水分量の調節は、例えば以下のようにして行うことができる。

水分量の調節の一例としては、小麦胚芽２０ｇに対して１．６～８．０ｍＬ加水し、４℃で１日冷蔵後に胚芽に含まれる水分量を測定する。

[0020] 植物胚芽の水分量の調節の方法は、最終的に水分含量を目的とする水分量（例えば３０％以下）となる方法であれば、特に限定されるものでなく、加水量、及び加水の工程（条件）ともに適宜選択して実施してよい。加水の方法としては、得られた植物胚芽を浸水させる方法、スプレー等による噴霧による方法など適宜選択して実施してよい。また、加水後に水分量均質化のために１日程度の冷蔵工程を実施してもよい。必要に応じて凍結乾燥の工程を実施してもよい。本発明の好ましい一実施形態においては、水分含量が多すぎても少なすぎてもタンパク質合成に影響を与えることから、加水量を調整して水分量を調整すること加えて、凍結乾燥を実施してその水分含量を適宜調整することも好ましい。凍結乾燥を用いる場合、凍結乾燥後の水分量を、そのまま胚芽の水分量としてもよく、凍結乾燥後の胚芽に対し、所望の水分量となるように所定量の水分を加えてもよい。

水分量調節後の胚芽の水分量は、下記式により求められる。

調節後の胚芽の水分量（質量％）＝〔（水分量調節後の質量－水分量調節前の乾物質量）／水分量調節後の質量〕×１００

乾物質量は、小麦胚芽を、耐熱容器に２ｇ秤量して入れ、１３５℃で1時間加熱した後に、再度秤量を実施し、減少した質量を、加熱前の小麦胚芽の質量から差し引いて算出した。秤量は、０．００１ｇの単位迄計測した。

[0021] 水分量の調節を、加水により行う場合に胚芽に添加する水は、純水、イオン交換水等の水に挙げられるが、これらに限られない。水分量の調節に、後述する植物ホルモン（ジベレリン等）を含む溶液等を単独で又は上述の他の水と組み合わせて用いてもよい。

加水前の乾物質量によって、使用する植物胚芽量を調整して、無細胞タン

パク質合成系に供することができる。

[0022]（ジベレリン処理）

本発明においては、植物胚芽を用いた無細胞タンパク質合成能力を向上させるために、植物ホルモンであるジベレリンを使用する。ジベレリンとしては、植物体に内生する、もしくは微生物が産生する化合物が知られており、炭素数２０のジベレリン（例えばＡ１２、Ａ１３、Ａ１４等）と、炭素数１９のジベレリン（例えばＡ１、Ａ３、Ａ４、Ａ７、Ａ９等）の２種類に大別されるが、いずれのジベレリン又はジベレリンの類縁物質を使用してもよく、当業者であれば、適切な物質を適宜選択して実施することが可能である。すなわち、本発明に用いるジベレリンには、ジベレリンの類縁物質も含まれる。

植物胚芽に対するジベレリンの添加量は、例えば、胚芽の乾物質量に対して０．５～５００ｐｐｍ（μｇ／ｍＬ:質量換算）とすることができる。

ジベレリンは、好ましくはジベレリン溶液として添加される。例えば、ジベレリンＡ３を純水で１００μｇ／ｍＬに調整し、ジベレリン溶液を作製して使用することができ、小麦胚芽の乾燥質量１ｇ当たりジベレリン溶液８０μＬ程度を添加する。

[0023] 小麦胚芽の水分量の調節とジベレリン処理は別々に実施してもよいし、同時に実施してもよい。別々に同時に行う方法の一例としては、例えば、後述するように濃度調整をしたジベレリン溶液（例えば１００μｇ／ｍＬ）を胚芽５ｇに対してジベレリン溶液４００μＬ添加して実施してよい。また、小麦胚芽に含まれる水分量調節とジベレリン添加を併せて実施する場合には、例えば水分として８００μＬ添加することとなった場合には、濃度調整をしたジベレリン溶液（例えば５０μｇ／ｍＬ）を胚芽５gに対して添加するなどして実施することができる。ジベレリン溶液の濃度や加水する水分量に応じて当業者であれば適宜調整して実施することができる。

[0024]（低温環境下での浸透処理）

ジベレリン添加後の植物胚芽に対して、低温環境下に所定時間放置する浸

透処理を行ってもよい。放置は静置が好ましい。この浸透処理により、植物胚芽にジベレリンが浸透して、無細胞タンパク質合成能が向上する。この浸透処理は、例えばジベレリン溶液の添加後、４℃で２４時間静置して行う。

[0025] このようにしてジベレリンを添加した植物胚芽は、本発明に係る無細胞タンパク質合成用の植物胚芽の好ましい一実施形態であり、無細胞タンパク質合成系によるタンパク質合成に用いることによって、ジベレリンを添加しない場合に比して、タンパク質合成能を向上させることができる。ジベレリン処理後の植物胚芽は、その植物胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用抽出物として、無細胞タンパク質合法によるタンパク質合成に供することも好ましい。例えば、ジベレリン添加後の植物胚芽は、ジベレリン処理を実施していない場合と同様にして抽出物を調製して無細胞タンパク質合成の用途に使用することができる。植物胚芽がジベレリンを添加したものであるか否かは、胚芽抽出液のＬＣ－ＭＳ等により判別可能である。

[0026] 以上のようにして得られたジベレリン処理後の植物胚芽から胚芽抽出物を得る。胚芽抽出物を得る方法は、従来公知の方法で行うことができる。例えば、液体窒素で凍結した胚芽を微粉砕し、抽出溶媒を加えて攪拌した後、胚芽抽出物含有液を遠心分離等により回収する。その後、必要に応じてゲルろ過等により精製してもよい。ジベレリン処理前又は後の植物胚芽は、微粉砕する工程に供して、微粉砕された胚芽を用いてもよい。

[0027] ジベレリン処理後の植物胚芽から、本発明の無細胞タンパク質合成用抽出物又は無細胞タンパク質合成用反応液を得る方法について、好ましい一例を示して説明する。

植物胚芽からの抽出物の取得方法は、（Ｂ１）粉砕工程と、及び（Ｂ２）抽出及び精製工程とを含むことが好ましい。

（Ｂ１）粉砕工程

粉砕工程は、粉砕時に攪拌されることによって、粉砕されたもの（破砕物）の均質化が達成される粉砕及び均質化工程であることが好ましい。

粉砕及び均質化工程においては、使用する植物胚芽をミル等の粉砕装置で

粉砕する。好ましくは、ジベレリン溶液添加後の植物胚芽を、液体窒素等で凍結させ、凍結させた胚芽を粉砕装置で粉砕する。攪拌を伴う粉砕方法により均質化も達成される。粉砕時に攪拌されて均質化されること又は粉砕後に別途攪拌することで均質化されることは、無細胞タンパク質合成方法において確実にタンパク質合成能を向上させる観点から好ましい。また、凍結させた状態で胚芽を粉砕することは、ジベレリンの分解抑制の点で好ましい。

ジベレリン処理後の植物胚芽を、抽出処理を行うまで保管する場合、その保管温度は、ジベレリンの分解抑制の点から２５℃以下が好ましく、より好ましくは１０℃以下である。植物胚芽を、後述する遠沈管に入れて凍結させた状態で保管することも好ましい。

（Ｂ２）抽出工程及び精製工程

抽出工程においては、例えば粉砕処理後の胚芽の適量を、秤量後に遠沈管、フラスコ等の容器に入れ、胚芽成分抽出用溶液を添加して振盪させる。振盪後には、遠沈管のまま又は遠沈管に移して遠心処理に供し、遠心後の上清を回収する。回収した上清は、好ましくは滅菌処理及び／又はゲルろ過を経て、目的の胚芽抽出液となる。

胚芽成分抽出用溶液としては、抽出用バッファーを用いることができる。抽出用バッファーとしては、後述する実施例に記載の抽出用バッファー１，２等が挙げられる。胚芽成分抽出用溶液は、少なくとも酢酸カリウム、酢酸マグネシウム及び還元剤（例えばジチオトレイトール）を含むことが好ましく、さらに塩化カルシウム等を含むことが好ましい。滅菌処理は、抽出した小麦胚芽抽出物に含まれる成分の変性防止の観点から、低温下で実施可能な処理であることが好ましい。ゲルろ過の目的は、胚芽成分抽出用溶液に溶解した植物胚芽の精製である。

[0028] このようにして植物胚芽から得られた胚芽抽出液には、通常、少なくともリボソーム及び翻訳因子が含まれる。翻訳因子としては、開始因子、伸長因子、翻訳終結因子などが含まれる。ジベレリンを添加した植物胚芽から得られる抽出液、又は該胚芽抽出液に凍結乾燥、スプレードライ、濃縮等をして

得られる液体又は固体は、本発明の無細胞タンパク質合成用抽出物の好ましい一実施形態であり、無細胞タンパク質合成系に好ましく使用される。

本発明の無細胞タンパク質合成用抽出物を用いた無細胞タンパク質合成系による、目的とするタンパク質の合成は、得られた胚芽抽出物を使用する以外は、公知の方法を採用して実施することができる。市販の合成用キットを使用して無細胞タンパク質合成系の反応に供してもよい。無細胞タンパク質合成反応は、公知の方法を使用することができる。市販されている合成反応用キットを使用してよい。

[0029] ｍＲＮＡの情報を読み取ってタンパク質やポリペプチドを合成する無細胞翻訳系の場合、例えば、ジベレリンを添加した植物胚芽から得られる抽出物であってリボソーム及び翻訳因子等を含む抽出物に、目的とするタンパク質の情報を含むｍＲＮＡを加えて反応させることで、目的とするタンパク質を効率良く生成させることができ、目的とするタンパク質の収量の向上も可能となる。

また無細胞タンパク質合成系が、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とを含む場合、例えば、合成反応用キットには、ＲＮＡポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、アミノ酸溶液、クレアチンキナーゼ等、無細胞翻訳系の各種成分の他、ＤＮＡポリメラーゼ、硫酸マグネシウム等、転写に関与する各種のタンパク質等の無細胞転写系の各種成分が含まれていることが好ましい。このような合成反応用キットに、ジベレリンを添加した植物胚芽から得られる抽出物であってリボソーム及び翻訳因子等を含む抽出物、及び目的とするタンパク質の情報を含むＤＮＡを加えて反応させることで、目的とするタンパク質を効率良く生成させることができ、目的とするタンパク質の収量の向上も可能となる。

[0030] 本発明に係る抽出物を使用した無細胞タンパク質合成方法によるタンパク質の合成効率は、例えば、以下のようにして判定することができる。このような判定の工程を、実施することで、目的とするタンパク質の合成を行う前にタンパク質の収量を見込むことができる。ここでいう「本発明に係る抽出

物」は、ジベレリンを添加した植物胚芽から前述した方法により得られる胚芽抽出液であることが好ましいが、ジベレリンを添加した植物胚芽から得られるものであれば、抽出方法、性状等に特に制限はない。

[0031] 無細胞タンパク質合成キットを用いて、目的とするタンパク質の性質に類似したタンパク質のＤＮＡ配列からｍＲＮＡ配列を合成する。合成効率の判定に用いるタンパク質としては、例えばＧＦＰなどの蛍光タンパク質を使用することができるが、これに限定されず、任意のタンパク質を合成効率の評価に用いることができる。ＧＦＰのような蛍光タンパク質の場合、特定の励起光を照射することによってその蛍光強度から容易にタンパク質量を反映した値が得られるため好ましい。合成効率の判定は、例えば合成したｍＲＮＡを鋳型としてタンパク質合成を行い、所定時間経過に、その収量を測定する。例えば翻訳開始から一定時間経過後に、プレートリーダーに入れた翻訳反応溶液に４８５ｎｍの励起光を照射し、その蛍光強度を測定する。

[0032] 本発明の無細胞タンパク質合成方法は、例えば、上述した無細胞タンパク質合成用植物胚芽若しくは無細胞タンパク質合成用抽出物、又はその無細胞タンパク質合成用抽出物を含む無細胞タンパク質合成用反応液を用いた無細胞タンパク質合成系でのタンパク質の合成方法を広く含み、合成するタンパク質の種類、使用する鋳型ＤＮＡの種類、製法等に特に制限はない。

本発明の無細胞タンパク質合成用反応液の具体例としては、ジベレリンを添加した植物胚芽から前述した方法により抽出して得られる胚芽抽出液であって、通常リボソーム及び翻訳因子等を含むものと、無細胞タンパク質合成に必要の他の成分である、アミノ酸溶液、クレアチンキナーゼ、上述の鋳型ＤＮＡの転写により得られるｍＲＮＡ溶液とを含む混合液等が挙げられる。

[0033] 本発明のタンパク質合成能の向上方法（第１方法）は、植物胚芽にジベレリンを添加し、低温条件で静置した後に抽出を行うことで、抽出により得られる胚芽抽出液の、無細胞タンパク質合成におけるタンパク質合成能を高める、タンパク質合成能の向上方法である。好ましい実施形態において、植物胚芽にジベレリンを添加する方法は、前述のジベレリン処理と同様であり、

低温条件で静置した後に抽出を行う方法は、前述の低温環境下での浸透処理を行う方法と同様である。本発明のタンパク質合成能の向上方法（第１方法）によれば、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成能を、煩雑な装置や工程を要することなく、容易に向上させることができる。

[0034] 本発明のタンパク質合成能の向上方法（第２方法）は、無細胞タンパク質合成においてタンパク質合成能力を高める方法であって、以下の工程（１）乃至（５）を含む。

（１）植物胚芽にジベレリンを添加する工程

（２）低温条件下に静置する工程

（３）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程

（４）胚芽成分抽出用溶液を添加して植物胚芽を溶解する工程、及び

（５）溶解した植物胚芽を精製する工程

[0035] 好ましい実施形態において、前記工程（１）は、前述のジベレリン処理を行う工程であり、前記工程（２）は、前述の低温環境下での浸透処理を行う工程であり、前記工程（３）は、前述した前記（Ｂ１）粉砕工程であり、前記工程（４）及び工程（５）は、前述した前記（Ｂ２）抽出工程及び精製工程であり、前述した各工程における各説明が適宜適用される。

前記工程（２）において、低温条件下に静置する静置時間は、例えば１時間以上が好ましく、より好ましくは６時間以上であり、上限は特になく、例えば３か月間でもよい。

なお、前記工程（４）において、植物胚芽の溶解とは、ｍＲＮＡからタンパク質を翻訳する際に必要となる、リボソーム及び翻訳因子等を、胚芽成分抽出用溶液に溶出させることを意味する。

前記工程（５）において、溶解した植物胚芽の精製とは、前記工程（３）において溶出した成分を精製、回収することを意味する。

本発明のタンパク質合成能の向上方法（第２方法）によれば、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成能を、煩雑な装置や工程を要することなく、容易に向上させることができる。

実施例

[0036] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

［比較例１］

日清製粉株式会社より入手した小麦胚芽から小麦胚芽抽出物の調製を行った。小麦胚芽抽出物の調製は、既報（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（１９８３），Ｖｏｌ．９６，　ｐ３８－５０）に記載の方法を一部改変して行い、以下の（１）～（８）の流れ（フロー）で実施した。

（１）小麦胚芽をミルサー（サイレントミルサー：岩谷産業株式会社製）を用いて粉砕、均質化した。

（２）下記方法にて測定した水分値から、小麦胚芽の乾物質量が３ｇとなるよう秤量し、５０ｍＬ遠沈管に入れ、下表１に記載の組成で作成した「抽出バッファー１」を１０ｍＬ添加した。

〔水分値の測定方法〕

小麦胚芽を、耐熱容器に２ｇ秤量して入れ、１３５℃で１時間加熱した後に、再度秤量を実施し、減少した質量を、加熱前の小麦胚芽の質量に対する質量比で算出し、水分値とした。秤量は、０．００１ｇの単位まで測定した。

（３）振盪器（Ｕｔｉｌｉｔｙ　Ｓｈａｋｅｒ　ＵＳ－Ｓ１００：アズワン株式会社製）を用いて、５分間振盪した（設定速度２００ｒｐｍ）。

（４）遠心分離機（Ａｖａｎｔｉ　ＪＸＮ－３０：ベックマン・コールター社製）を用いて、遠心分離を行った（遠心条件：２３０００Ｇ、１０分）。

（５）遠心後、上清の内水層を回収し、０．２２μｍフィルターで滅菌処理を行った。

（６）ＰＤ－１０カラム（Ｃｙｔｉｖａ社製）中の保存液を除去した後に、カラム内に下記表１に示す「抽出用バッファー１」を添加し、ゲルの均質化を行った。

（７）上記（５）で回収した夾雑物除去後の溶液２．５ｍＬを、ＰＤ－１０

カラムに添加し、ゲルを通過した溶液を廃棄した。

（８）下記表２に記載の組成で作成した「抽出用バッファー２」を３．５ｍＬカラムに添加し、回収した溶液を小麦胚芽抽出物として試験に供試した。

[0037] [表1]

抽出用バッファー１	
８００ｍＭ　HEPES-KOH　ｐＨ７．８	５　ｍＬ
１００ｍＭ　酢酸マグネシウム	１　ｍＬ
１Ｍ　酢酸カリウム	１０　ｍＬ
４０ｍＭ　塩化カルシウム	５　ｍＬ
２Ｍ　ＤＴＴ（ジチオトレイトール）	０．２　ｍＬ
純水	７８．８　ｍＬ
計	１００　ｍＬ

[0038] [表2]

抽出用バッファー２	
８００ｍＭ　HEPES-KOH　ｐＨ７．８	５　ｍＬ
１００ｍＭ　酢酸マグネシウム	５　ｍＬ
１Ｍ　酢酸カリウム	１０　ｍＬ
２Ｍ　ＤＴＴ（ジチオトレイトール）	０．２　ｍＬ
純水	７９．８　ｍＬ
計	１００　ｍＬ

[0039] ［実施例１］（無細胞タンパク質合成用の小麦胚芽の調製）

ジベレリンＡ３（東京化成工業株式会社製）を純水で１００μｇ／ｍＬに調整してジベレリン溶液を作製した。比較例１と同様の小麦胚芽５ｇに対し、作製したジベレリン溶液４００μＬを添加し、添加後４℃で２４時間静置した。

［実施例２］（無細胞タンパク質合成用抽出物の調製）

ジベレリン処理した小麦胚芽に対し、比較例１と同様の方法〔（１）～（８）〕を用いて、小麦胚芽抽出物を調製した。

［実施例３］（無細胞タンパク質合成方法）

無細胞タンパク質合成キット（ＮＵＰｒｏｔｅｉｎ株式会社製）を用いて、当該キットのプロトコルに準拠し、以下の表３に記載のＧＦＰ由来の塩基配列を有するプラスミドＤＮＡから、ｍＲＮＡを合成した。合成したｍＲＮＡおよび当該キットのＡｍｉｎｏ　Ａｃｉｄ　Ｍｉｘ、比較例１又は実施例

２で調製した小麦胚芽抽出物を用いて、当該キットプロトコルに準拠し、ＧＦＰタンパク質の翻訳を行った。翻訳開始から１６時間経過時点でプレートリーダー（ＡＲＶＯ－Ｘ４：パーキンエルマー社製）を使用して、翻訳反応溶液に４８５ｎｍの励起光を照射し、ＧＦＰの蛍光強度を測定した（測定波長：５３５ｎｍ）。結果を以下の図１に示す。

[0040] [表3]

ＧＦＰの塩基配列

ＡＴＧＡＧＴＡＡＡＧＧＡＧＡＡＧＡＡＣＴＴＴＴＣＡＣＴＧＧＡＧＴＴＧＴＣＣＣＡ
ＡＴＴＣＴＴＧＴＴＧＡＡＴＴＡＧＡＴＧＧＴＧＡＴＧＴＴＡＡＴＧＧＧＣＡＣＡＡＡ
ＴＴＴＴＣＴＧＴＣＡＧＴＧＧＡＧＡＧＧＧＴＧＡＡＧＧＴＧＡＴＧＣＡＡＣＡＴＡＣ
ＧＧＡＡＡＡＣＴＴＡＣＣＣＴＴＡＡＡＴＴＴＡＴＴＴＧＣＡＣＴＡＣＴＧＧＡＡＡＡ
ＣＴＡＣＣＴＧＴＴＣＣＡＴＧＧＣＣＡＡＣＡＣＴＴＧＴＣＡＣＴＡＣＴＴＴＣＴＣＴ
ＴＡＴＧＧＴＧＴＴＣＡＡＴＧＣＴＴＴＴＣＡＡＧＡＴＡＣＣＣＡＧＡＴＣＡＴＡＴＧ
ＡＡＡＣＧＧＣＡＴＧＡＣＴＴＴＴＴＣＡＡＧＡＧＴＧＣＣＡＴＧＣＣＣＧＡＡＧＧＴ
ＴＡＴＧＴＡＣＡＧＧＡＡＡＧＡＡＣＴＡＴＡＴＴＴＴＴＣＡＡＡＧＡＴＧＡＣＧＧＧ
ＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＣＡＣＧＴＧＣＴＧＡＡＧＴＣＡＡＧＴＴＴＧＡＡＧＧＴＧＡＴ
ＡＣＣＣＴＴＧＴＴＡＡＴＡＧＡＡＴＣＧＡＧＴＴＡＡＡＡＧＧＴＡＴＴＧＡＴＴＴＴ
ＡＡＡＧＡＡＧＡＴＧＧＡＡＡＣＡＴＴＣＴＴＧＧＡＣＡＣＡＡＡＴＴＧＧＡＡＴＡＣ
ＡＡＣＴＡＴＡＡＣＴＣＡＣＡＣＡＡＴＧＴＡＴＡＣＡＴＣＡＴＧＧＣＡＧＡＣＡＡＡ
ＣＡＡＡＡＧＡＡＴＧＧＡＡＴＣＡＡＡＧＴＴＡＡＣＴＴＣＡＡＡＡＴＴＡＧＡＣＡＣ
ＡＡＣＡＴＴＧＡＡＧＡＴＧＧＡＡＧＣＧＴＴＣＡＡＣＴＡＧＣＡＧＡＣＣＡＴＴＡＴ
ＣＡＡＣＡＡＡＡＴＡＣＴＣＣＡＡＴＴＧＧＣＧＡＴＧＧＣＣＣＴＧＴＣＣＴＴＴＴＡ
ＣＣＡＧＡＣＡＡＣＣＡＴＴＡＣＣＴＧＴＣＣＡＣＡＣＡＡＴＣＴＧＣＣＣＴＴＴＣＧ
ＡＡＡＧＡＴＣＣＣＡＡＣＧＡＡＡＡＧＡＧＡＧＡＣＣＡＣＡＴＧＧＴＣＣＴＴＣＴＴ
ＧＡＧＴＴＴＧＴＡＡＣＡＧＣＴＧＣＴＧＧＧＡＴＴＡＣＡＣＡＴＧＧＣＡＴＧＧＡＴ
ＧＡＡＣＴＡＴＡＣＡＡＡ

[0041] 図１に示すように、ジベレリン処理をした植物胚芽から得た小麦胚芽抽出物（実施例２）は、ジベレリン処理をしていない植物胚芽から得た小麦胚芽抽出物（比較例１）に対して、ＧＦＰの蛍光強度が有意に向上している。これにより、ジベレリン処理をした植物胚芽を用いることによって、複雑な装置及び工程を要することなく、無細胞タンパク質合成系におけるタンパク質合成能を向上させたり、タンパク質の収量を向上させたりすることができることが判る。

産業上の利用可能性

[0042] 本発明によれば、植物由来胚芽を使用した無細胞タンパク質合成に必要な材料を効率的に抽出し、不純物の少ない胚芽抽出液を得ることができるため

、安定で高い効率の無細胞タンパク質合成用胚芽抽出液および無細胞タンパク質合成用溶液を提供することができる。本発明のタンパク質合成用胚芽抽出液またはタンパク質合成用溶液を用いることにより、安定で高い効率の無細胞タンパク質合成が達成できるため、研究用途だけでなく医薬品、食品、工業製品等様々な分野におけるタンパク質の大量調製に貢献できる。

請求の範囲

[請求項1] ジベレリンを添加した無細胞タンパク質合成用の植物胚芽。

[請求項2] 請求項１に記載の植物胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用抽出物。

[請求項3] 請求項２に記載の無細胞タンパク質合成用抽出物を含む、無細胞タンパク質合成用反応液。

[請求項4] 請求項２に記載の無細胞タンパク質合成用抽出物又は請求項３に記載の無細胞タンパク質合成用反応液を使用する、無細胞タンパク質合成方法。

[請求項5] 植物胚芽にジベレリンを添加し、低温条件で静置した後に抽出を行うことで、抽出により得られる胚芽抽出液の、無細胞タンパク質合成におけるタンパク質合成能を高める、タンパク質合成能の向上方法。

[請求項6] 無細胞タンパク質合成においてタンパク質合成能力を高める方法であって、以下の工程（１）乃至（５）を含むことを特徴とする、タンパク質合成能の向上方法。

（１）植物胚芽にジベレリンを添加する工程

（２）低温条件下に静置する工程

（３）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程

（４）胚芽成分抽出用溶液を添加して植物胚芽を溶解する工程、及び

（５）溶解した植物胚芽を精製する工程