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、無細胞タンパク質合成用抽出物を得る方法、無細胞タンパク質合成方法、植物胚芽の品質管理方法に関する。

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。また適用可能な無細胞タンパク質合成系が限られ、汎用性が高い方法ではなかった。

[0006] 従って、本発明は、植物由来胚芽を使用した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可能とする技術に関する。

[0007] 本発明者らは、鋭意検討した結果、小麦胚芽を使用した無細胞タンパク質合成系において、小麦胚芽から内容物を抽出する前の胚芽の状態において、胚芽に含まれる水分量が無細胞タンパク質合成活性に多大な影響を及ぼすことを見出し、斯かる知見に基づき、更に研究を重ねて、本発明を完成させた。

[0008] 本発明は、水分量が３０％以下である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。植物胚芽は、植物種子から調製された植物胚芽を常温以下の温度に保管したものであることが好ましい。

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。

[0009] また本発明は、前記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用いる植物胚芽由来抽出物を得る方法であって、以下の工程（１）乃至（４）を実施することを特徴とする、胚芽由来抽出物の取得方法を提供するものである。

（１）乾燥した植物胚芽に加水し、静置する工程、

（２）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程、

（３）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

（４）溶解した植物胚芽を精製する工程

[0011] また本発明は、前記の胚芽由来抽出物を使用することを特徴とする、無細胞タンパク質合成方法を提供するものである。

[0012] また本発明は、植物胚芽の水分量を測定し、測定した水分量が３０％以下であるかどうかを指標として、無細胞タンパク質合成用途に使用できるかどうかを判定する、植物胚芽の品質管理方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0013] [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。

[図2]図２は、保管期間のタンパク質合成活性への影響を示すグラフである。

[図3]図３は、保管温度のタンパク質合成活性への影響を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 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、胚芽由来抽出物の取得方法、無細胞タンパク質合成方法、又は植物胚芽の品質管理方法）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。

[0015] 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。

[0016] 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、胚乳除去後の粉砕、抽出、精製等を行う方法が挙げられる。

[0017] 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い。

[0018] （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。また、粉砕は、乾式で行ってもよいし、湿式で行ってもよいが、後述する水分量調節工程で、加水量の増減によって水分量を調整することが可能又は容易となる等の点から、乾式で行うことが好ましい。

[0019] （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。

[0020] 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、洗浄処理としては、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。

[0021] 上記工程を経て調製し選別された植物胚芽は、常温未満の温度条件で保管することが好ましい。常温以下の温度は、通常２５℃以下、好ましくは４℃以下、より好ましくは－２０℃以下、最も好ましくは－８０℃以下である。これらの温度において植物胚芽を保管することによって、この後に実施する無細胞タンパク質の合成効率が向上するため、好ましい。小麦胚芽を調製する工程は４℃の温度条件で実施するため、すみやかに常温未満の温度に置くことが重要である。

破砕工程後の植物胚芽は、細胞液抽出までの間の保管、又は保管及び処理

を、上記の常温以下の温度条件で行うことが、同様の観点から好ましい。

[0022]（水分量調節工程）

本発明に係る無細胞タンパク質合成用の植物胚芽及び無細胞タンパク質合成用抽出物等を、無細胞タンパク質合成に使用する場合のタンパク質合成活性を向上させたり、タンパク質の収量を向上させたりするために、植物胚芽からタンパク質の合成に関与する要素を抽出する抽出工程の前に、植物胚芽の水分量の調節を行うことが好ましい。水分量の調整は、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た後の胚芽画分に対して行う。

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。

[0023] 植物胚芽の水分量の調節の方法は、最終的な水分量を、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。本発明の好ましい一実施形態においては、水分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。

[0024] 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が挙げられるが、これらに限られない。

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。

[0025]（低温環境下での浸透処理）

加水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、植物胚芽の集合体の内部に水分が浸透して、無細胞タンパク質合成能が向上する。この浸透処理は、例えば加水後、４℃に２４時間静置して行う。

[0026] 上述した低温環境下での浸透処理を行う場合、その処理も水分量調節の処理の一部としてもよい。

水分量調節後の植物胚芽は、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法によるタンパク質合成に用いることによって、水分量が３０%超である場合に比して、タンパク質合成能を向上させることができる。また水分量調節を行うことによって、水分量調節を行わない場合に比して、タンパク質合成能を安定して確実に向上させることができる。

水分量を３０%以下に水分量調節後の植物胚芽は、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。

[0027] 以上のようにして得られた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。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。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。

[0028] 水分量調節後の植物胚芽から、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、（Ｂ２）抽出工程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、水分量調節後の植物胚芽を、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、胚芽から抽出されるタンパク質合成に関与する成分の分解又は変性抑制の点で好ましい。

水分量調節後の植物胚芽を、抽出処理を行うまで保管する場合、その保管温度は、タンパク質合成に関与する成分の分解又は変性抑制の点から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。

[0029] （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質防止の観点から、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。

[0030] 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。水分量を３０％以下に調整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。

[0031] 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、植物胚芽から得られる抽出物であってリボソーム、及び翻訳因子等のタンパク質の合成に必要な因子を含む抽出物に、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法が、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、植物胚芽から得られる抽出物であってリボソーム、及び翻訳因子等のタンパク質の合成に必要な因子を含む抽出物、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。

[0032] 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おけ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、水分量を３０％以下に調整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、水分量が３０％以下の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。

[0033] 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。

[0034] 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、水分量を３０％以下に調節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溶液等とを含む混合液等が挙げられる。

[0035] 本発明の胚芽由来抽出物の取得方法は、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（４）を実施することを特徴とし、好ましくは、工程（１）乃至（４）をこの記載順に実施する。

（１）乾燥した植物胚芽に加水し、静置する工程、

（２）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程、

（３）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

（４）溶解した植物胚芽を精製する工程

[0036] 好ましい実施形態において、前記工程（１）は、前述の水分量調節工程であり、前述の低温環境下での浸透処理が、静置する工程の一例である。乾燥した植物胚芽とは、小麦原料から製粉工程で採取した小麦胚芽を意味し、凍結乾燥により乾燥させたものも含まれる。加水後の浸透処理時間又は静置時間は、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。前記工程（２）は、前述した前記（Ｂ１）粉砕工程における粉砕及び均一化工程であり、前記工程（３）及び工程（４）は、前述した前記（Ｂ２）抽出工程及び精製工程である。

なお、前記工程（３）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（４）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。

本発明の胚芽由来抽出物の取得方法によれば、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、胚芽由来抽出物が効率よく得られる。

[0037]　無細胞タンパク質合成において、反応効率、すなわち目的とするタンパク質の収量を上げるためには、無細胞タンパク質合成に使用する反応液中の水分量を低くして用いる方がよいことが一般的に知られている。これは、安定的に反応を持続させて収率を向上することを目的としている。しかしながら、無細胞タンパク質合成時においては、胚芽抽出物に多量の水性媒体（水分）を添加して使用するにも関わらず、抽出前の胚芽に含まれる水分量がタンパク質合成反応の効率に影響を与え、そのため、胚芽状態の水分調節により合成効率が向上するということは当業者にとっても意外な効果であった。

[0038]　本発明を使用した別の実施態様として、植物胚芽状態における水分量を測定することによって、その植物胚芽を無細胞タンパク質合成用途に使用できるかどうかを判定する品質管理法として使用することができる。

品質管理法の手順としては、例えば、まず、植物胚芽一定量秤量し加熱した後に、再度秤量を実施する。次に、減少した質量を元の植物胚芽質量に対する質量比で算出する。算出した水分値が、事前に設定した基準値を上回る、又は下回る場合に、その植物胚芽を無細胞タンパク質合成用途に使用できるか否かを判定する。事前に設定する基準値は、一定の幅をもった水分値の範囲であってよい。

この基準値から外れた植物胚芽については、再度水分量を調整する工程を実施して基準値内に入るようにすることで、無細胞タンパク質合成用途に使用することができる。このような基準値を設けて無細胞タンパク質合成を実

施すると、一度のタンパク質合成反応において得られる収量に変動が少なく効率的な合成を行える点で好ましい。

実施例

[0039] 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。

[0040] ［比較例１］

日清製粉株式会社より冷蔵状態で入手した、北米産硬質小麦由来の小麦胚芽（以下、小麦胚芽Ａともいう）２０ｇに対し、純水を加水した。加水後、２４時間４℃にて静置し、水分量の異なる胚芽1，２を作成した。胚芽１，２の加水量は下記の通りである。

胚芽１： 胚芽２０ｇに対し、純水６．４ｍＬ

胚芽２： 胚芽２０ｇに対し、純水８．０ｍＬ

[0041] ［実施例１］

比較例１で用いたものと同じ小麦胚芽Ａに対して、凍結乾燥機（ＦＤＵ－１２００：東京理化器械株式会社製）を用いて凍結乾燥を行い、水分量の異なる胚芽３，４を作成した。胚芽３，４について、凍結乾燥を行った時間は下記の通りである。

胚芽３： 胚芽２０ｇに対し、１６時間凍結乾燥

胚芽４： 胚芽２０ｇに対し、６時間凍結乾燥

［実施例２］

比較例１で用いたものと同じ小麦胚芽Ａに対して、無処理の胚芽５を用意した。また同じ小麦胚芽Ａの２０ｇに対して純水を加水し、加水後２４時間４℃にて静置した水分量の異なる胚芽６～９を作成した。胚芽６～１０の加水量は下記の通りである。

胚芽５： 無処理

胚芽６： 胚芽２０ｇに対し、純水０．８mL

胚芽７： 胚芽２０ｇに対し、純水１．６mL

胚芽８： 胚芽２０ｇに対し、純水３．２mL

胚芽９：　胚芽２０ｇに対し、純水４．８mL

[0042]［実施例３］（水分量の測定）

比較例１、実施例１～２にて調整した小麦胚芽に対し、水分量の測定を実施した。小麦胚芽を耐熱容器に２ｇ秤量し、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、加熱前の質量２ｇに対する質量比で算出して、水分量（％）とした。水分量の測定結果を表１に示す。秤量は、０．００１ｇの単位まで測定した。

[0043][表1]

各小麦胚芽の水分値

	比較例１		実施例１		実施例２				
	胚芽１	胚芽２	胚芽３	胚芽４	胚芽５	胚芽６	胚芽７	胚芽８	胚芽９
水分量（%）	31.2	33	1.6	5.9	14.7	18.8	20.9	24.8	28.6

[0044]　本発明において、水分量が３０％以下の植物胚芽は、水分量が３０％以下となるように水分量を調節した植物胚芽であることが好ましい。

実施例２の胚芽５で用いた植物胚芽は、植物種子から調製された植物胚芽を一貫して常温以下の温度に保管したものであり、その点において非公知の植物胚芽と言える。

実施例２の胚芽５は、測定した水分量が３０％以下であるかどうかを指標として、無細胞タンパク質合成用途に使用できるかどうかを判定する植物胚芽の品質管理方法においては、使用できると判定される。

[0045]［実施例４］（小麦胚芽抽出物の調製）

比較例１、実施例１～２にて調整した小麦胚芽を用いて、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）実施例３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。

（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。

[0046] [表2]

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

[0047] [表3]

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

[0048] ［実施例５］（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４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）。結果を図１に示す。

[0049] [表4]

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

[0050] 図１に示すように、水分量を３０％以下に調整した小麦胚芽から得た小麦胚芽抽出物は、水分量が３０％超の植物胚芽から得た小麦胚芽抽出物に対して、ＧＦＰの蛍光強度が有意に向上している。これにより、水分量を３０％以下に調整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。

[0051] ［参考例１］

図２に、小麦胚芽として、北米産硬質小麦由来の胚芽を、その調製後０日～４週間２５℃に保管したものから抽出した胚芽抽出液を用いて、実施例５と同様の方法でタンパク質合成活性を測定した結果を示す。

図２に示すように、常温以下での保管は、保管期間が長期にわたっても、タンパク質合成活性の低下がある程度の範囲に抑えられる。そのため、植物胚芽は、常温未満の温度で保管したものを用いることが好ましいことが判る。

[0052] ［参考例２］

小麦胚芽として、北米産硬質小麦由来の胚芽を、その調製後１週間、－８０℃、－２０℃、４℃、２５℃又は４０℃の温度にて保管し、そのそれぞれについて、実施例４と同様の方法で胚芽抽出液を調製し、その胚芽抽出液を用いて実施例５と同様の方法でタンパク質合成活性を測定した。その結果を図３に示す。なお、－８０℃、－２０℃、４℃、２５℃及び４０℃の温度で保管した胚芽は、保管の前後のいずれにおいても水分量の値が３０％以下であった。より具体的には、保管前の水分量が１５．３％であった。また密封容器に入れて保管し、保管後の水分量も同程度に維持されるようにした。

図３に示すように、常温以上の４０℃で保管した胚芽は、常温以下で保管した胚芽に比して、タンパク質合成活性が有意に優れる。そのため、植物胚芽は、常温未満の温度で保管したものを用いることが好ましいことが判る。

産業上の利用可能性

[0053] 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] 水分量が３０％以下である無細胞タンパク質合成用の植物胚芽。

[請求項2] 植物種子から調製された植物胚芽を常温以下の温度に保管したものである、請求項１に記載の植物胚芽。

[請求項3] 請求項１又は２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4] 請求項３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5] 無細胞タンパク質合成に用いる植物胚芽由来抽出物を得る方法であって、以下の工程（１）乃至（４）を実施することを特徴とする、胚芽由来抽出物の取得方法。

（１）乾燥した植物胚芽に加水し、静置する工程、

（２）静置後、植物胚芽を粉砕、均質化する工程、

（３）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

（４）溶解した植物胚芽を精製する工程

[請求項6] 前記工程（１）及び工程（２）は、前記工程（３）において胚芽成分抽出用溶液を添加する段階の植物胚芽の水分量が３０％以下となるように行う、請求項５に記載の胚芽由来抽出物の取得方法。

[請求項7] 請求項５又は６に記載の方法により得られた胚芽由来抽出物を使用することを特徴とする、無細胞タンパク質合成方法。

[請求項8] 植物胚芽の水分量を測定し、測定した水分量が３０％以下であるかどうかを指標として、無細胞タンパク質合成用途に使用できるかどうかを判定する、植物胚芽の品質管理方法。