

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5467320号  
(P5467320)

(45) 発行日 平成26年4月9日(2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年2月7日(2014.2.7)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b> <b>Z N A A</b>
<b>C 4 O B</b>	<b>40/06</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 4 O B</b>	<b>40/06</b>
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b> <b>A</b>

請求項の数 20 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2011-76727 (P2011-76727)	(73) 特許権者	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(22) 出願日	平成23年3月30日(2011.3.30)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公開番号	特開2012-210170 (P2012-210170A)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(43) 公開日	平成24年11月1日(2012.11.1)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
審査請求日	平成24年2月6日(2012.2.6)	(72) 発明者	四方 哲也 大阪府吹田市山田丘1-5 国立大学法人 大阪大学内
		(72) 発明者	市橋 伯一 大阪府吹田市山田丘1-5 国立大学法人 大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】一枚膜リポソームを用いた酵素進化法の開発

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソームであって、以下：

- (a) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むDNA；
  - (b) RNAポリメラーゼ；
  - (c) リボヌクレオチド；ならびに、
  - (d) 無細胞蛋白質合成系、
- を含む、一枚膜リポソーム。

【請求項2】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、請求項1に記載の一枚膜リポソーム。

【請求項3】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項1に記載の一枚膜リポソーム。

【請求項4】

核酸分解酵素によって処理された複数の一枚膜リポソームを含むライブラリーであって、該複数の一枚膜リポソームの各々は、以下：

- (a) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むDNA；
- (b) RNAポリメラーゼ；

10

20

(c) リボヌクレオチド；ならびに、  
 (d) 無細胞蛋白質合成系、  
 を含む、ライブラリー。

【請求項 5】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、請求項 4 に記載のライブラリー。

【請求項 6】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、請求項 4 に記載のライブラリー。

【請求項 7】

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソームであって、以下：

10

(a) 翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む RNA；ならびに、  
 (d) 無細胞蛋白質合成系、  
 を含む、一枚膜リボソーム。

【請求項 8】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、請求項 7 に記載の一枚膜リボソーム。

【請求項 9】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、請求項 7 に記載の一枚膜リボソーム。

【請求項 10】

核酸分解酵素によって処理された複数の一枚膜リボソームを含むライブラリーであって、  
 該複数の一枚膜リボソームの各々は、以下：

20

(a) 翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む RNA；ならびに、  
 (d) 無細胞蛋白質合成系、  
 を含む、ライブラリー。

【請求項 11】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、請求項 10 に記載のライブラリー。

【請求項 12】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、請求項 10 に記載のライブラリー。

【請求項 13】

30

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソームの製造方法であって、以下：

(1) 以下：

(a) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む DNA；

(b) RNA ポリメラーゼ；

(c) リボヌクレオチド；ならびに、

(d) 無細胞蛋白質合成系、

を封入した一枚膜リボソームを調製する工程；ならびに、

(2) 工程 (1) で調製された一枚膜リボソームを、核酸分解酵素によって処理する工程、

40

を包含する、方法。

【請求項 14】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソームの製造方法であって、以下：

(1) 以下：

(a) 翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む RNA；ならびに、

50

(d) 無細胞蛋白質合成系、  
を封入した一枚膜リポソームを調製する工程；ならびに、  
(2) 工程(1)で調製された一枚膜リポソームを、核酸分解酵素によって処理する工程、  
を包含する、方法。

【請求項17】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項16に記載の方法。

10

【請求項19】

一枚膜リポソームのライブラリーを用いたスクリーニング方法であって、以下：

- (i) 請求項4に記載のライブラリーを提供する工程；
  - (ii) 該ライブラリーから、所望の特徴を有する一枚膜リポソームを選択する工程；
  - (iii) 該一枚膜リポソームに含まれるDNAを増幅する工程；および、
  - (iv) 該増幅したDNAを単離する工程、
- を包含する方法。

【請求項20】

一枚膜リポソームのライブラリーを用いたスクリーニング方法であって、以下：

- (i) 請求項10に記載のライブラリーを提供する工程；
  - (ii) 該ライブラリーから、所望の特徴を有する一枚膜リポソームを選択する工程；
  - (iii) 該一枚膜リポソームに含まれるRNAに逆転写酵素を作用させて、DNAを生成する工程；
  - (iv) 該生成したDNAを増幅する工程；および、
  - (v) 該増幅したDNAを単離する工程、
- を包含する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子進化工学に利用するための、新規の一枚膜リポソームの分野に関連する。また、本発明は、一枚膜リポソームを用いた、新規の分子進化工学、特に、酵素進化工学に関連する。

30

【背景技術】

【0002】

酵素を進化工学的に改良する方法として、遺伝子ライブラリーと無細胞蛋白質合成系を封入したりポソームとセルソータを用いた方法が利用されている。この方法では、酵素遺伝子にランダム変異を導入した遺伝子ライブラリーと無細胞蛋白質合成系をリポソームに封入し、内部で酵素を発現させる。そして、セルソータにより、より高機能の酵素を含むリポソームを選択することにより、より高機能の酵素をコードする遺伝子を選択することができる。この選択を繰り返すことによって、酵素をコードする遺伝子を進化させることができる(非特許文献1)。

40

【0003】

スクリーニング効率を向上させることによって、より少ない作業量で、より高い機能を有する酵素をコードする遺伝子が可能になると予測される。それゆえ、酵素進化法におけるスクリーニング効率の向上が求められている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Sunami, T., Sato, K., Matsuura, T., Tsukada, K., Urabe, I., and Yomo, T. (2006) Anal

50

ytical biochemistry 357, 128-136

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

分子進化学（例えば、酵素進化法）におけるスクリーニングの効率を向上させることを、本発明の課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題は、以下を提供することによって解決された。

（項目1）

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソームであって、以下：

（a）プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むDNA

；

（b）RNAポリメラーゼ；

（c）リボヌクレオチド；ならびに、

（d）無細胞蛋白質合成系、

を含む、一枚膜リボソーム。

（項目2）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、項目1に記載の一枚膜リボソーム。

（項目3）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、項目1に記載の一枚膜リボソーム。

（項目4）

核酸分解酵素によって処理された複数の一枚膜リボソームを含むライブラリーであって、該複数の一枚膜リボソームの各々は、以下：

（a）プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むDNA

；

（b）RNAポリメラーゼ；

（c）リボヌクレオチド；ならびに、

（d）無細胞蛋白質合成系、

を含む、ライブラリー。

（項目5）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、項目4に記載のライブラリー。

（項目6）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、項目4に記載のライブラリー。

（項目7）

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソームであって、以下：

（a）翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むRNA；ならびに、

（d）無細胞蛋白質合成系、

を含む、一枚膜リボソーム。

（項目8）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、項目7に記載の一枚膜リボソーム。

（項目9）

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、項目7に記載の一枚膜リボソーム。

（項目10）

核酸分解酵素によって処理された複数の一枚膜リボソームを含むライブラリーであって、該複数の一枚膜リボソームの各々は、以下：

（a）翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含むRNA；ならびに、

10

20

30

40

50

(d) 無細胞蛋白質合成系、  
を含む、ライブラリー。

(項目 11)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、項目 10 に記載のライブラリー。

(項目 12)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、項目 10 に記載のライブラリー。

(項目 13)

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソームの製造方法であって、以下：

(1) 以下：

(a) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む DNA ;

(b) RNA ポリメラーゼ；

(c) リボヌクレオチド；ならびに、

(d) 無細胞蛋白質合成系、

を封入した一枚膜リポソームを調製する工程；ならびに、

(2) 工程(1)で調製された一枚膜リポソームを、核酸分解酵素によって処理する工程

、  
を包含する、方法。

(項目 14)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソームの製造方法であって、以下：

(1) 以下：

(a) 翻訳開始配列、および、ポリペプチドコード配列を含む RNA ; ならびに、

(d) 無細胞蛋白質合成系、

を封入した一枚膜リポソームを調製する工程；ならびに、

(2) 工程(1)で調製された一枚膜リポソームを、核酸分解酵素によって処理する工程

、  
を包含する、方法。

(項目 17)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素、および、DNA 分解酵素からなる群から選択される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、項目 16 に記載の方法。

(項目 19)

一枚膜リポソームのライブラリーを用いたスクリーニング方法であって、以下：

(i) 項目 4 に記載のライブラリーを提供する工程；

(ii) 該ライブラリーから、所望の特徴を有する一枚膜リポソームを選択する工程；

(iii) 該一枚膜リポソームに含まれる DNA を増幅する工程；および、

(iv) 該増幅した DNA を単離する工程、

を包含する方法。

(項目 20)

一枚膜リポソームのライブラリーを用いたスクリーニング方法であって、以下：

(i) 項目 10 に記載のライブラリーを提供する工程；

(ii) 該ライブラリーから、所望の特徴を有する一枚膜リポソームを選択する工程；

(iii) 該一枚膜リポソームに含まれる RNA に逆転写酵素を作用させて、DNA を生

10

20

30

40

50

成する工程；

( i v ) 該生成したDNAを増幅する工程；および、

( v ) 該増幅したDNAを単離する工程、

を包含する方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明の核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソームを用いることによって、スクリーニング効率が向上した。理論に拘束されることは望まないが、本発明が優れた効果を奏する理由としては、以下が挙げられる。

【0008】

従来用いられていたリポソームは、凍結乾燥法により調製された多重膜リポソームであり、内部に多重構造をもつため、反応容器の体積を制御することができなかった。リポソームの体積は内部の酵素反応速度に影響をあたえるため、効率よく酵素を改良するためには、多重構造をもたない一枚膜リポソームを使うことが望ましい。しかし、これまでの方法では、遠心沈降法でつくった一枚膜リポソームを反応容器として用いた場合、セルソーターでより反応したリポソームを選択しても、高い機能をもつ酵素をコードした遺伝子を選択して回収することができなかった。

【0009】

これに対して、本発明では、一枚膜リポソームを核酸分解酵素で処理したところ、従来法において使用されていた多重膜リポソームや、酵素処理をしていない一枚膜リポソームと比較して、より高効率のスクリーニングが可能となり、高機能の酵素をコードした遺伝子を選択して回収することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】左から順番に、従来法の多重膜リポソーム、核酸分解酵素で処理していない一枚膜リポソーム、RNA分解酵素で処理した一枚膜リポソーム、および、DNA分解酵素で処理した一枚膜リポソームを用いて、より高い活性を有する（すなわち、より強い蛍光を発する）リポソームをスクリーニングした際の選択効率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明を説明する。本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。

【0012】

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列举する。

【0013】

(定義)

本明細書において使用する場合、用語「微小区画」とは、脂質層、および、その内部の水層から構成される閉じられた微小な空間をいう。「微小区画」としては、例えば、リポソームが挙げられるがこれに限定されない。

【0014】

本明細書で使用される場合、用語「リポソーム」とは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。代表的に使用されるリン脂質のほか、コレステロール、糖脂質などを組み込ませることも可能である。本発明において、リポソームは、修飾基を付するために、エステル結合を付与する官能基を有する構成単位（例えば、糖脂質、ガングリオシド、ホスファチジルグリセロールなど）またはペプチド結合を付与する官能基を有する構成単位（例えば、ホスファチジルエタノールアミン）を有してもよい。本発明において使用するリポソームは、脂質二重層からなる膜が一枚のみからなる「一枚膜リポソーム」である。一枚膜リポソームの調製法としては、種々の周知の方法が利用可能である。

【0015】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する場合、用語「プロモーター配列」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子の上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。プロモーターは、誘導性であっても、構成的であっても、部位特異的であっても、時期特異的であってもよい。プロモーターとしては、例えば、哺乳動物細胞、大腸菌、酵母などの宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。代表的なプロモーター配列としては、T7プロモーター配列、T5プロモーター配列、Sp6プロモーター配列、および、T3プロモーター配列が挙げられるがこれらに限定されない。

【0016】

10

本明細書において使用する「RNAポリメラーゼ」は、使用するプロモーター配列に適合する、すなわち、その使用するプロモーターからの転写を行なうRNAポリメラーゼであれば、いかなるRNAポリメラーゼを用いてもよい。好ましくは、プロモーター配列とRNAポリメラーゼとが、同じ、あるいは、近接する生物種に由来する。例えば、原核生物由来のプロモーター配列を使用する場合、使用するRNAポリメラーゼもまた、原核生物由来であることが好ましい。あるいは、バクテリオファージ由来のプロモーター配列を使用する場合、使用するRNAポリメラーゼもまた、同一または類似のバクテリオファージ由来であることが好ましい。

【0017】

本明細書において使用する場合、用語「翻訳開始配列」とは、機能的なりボソーム進入部位を提供できる任意の配列を意味する。バクテリアのシステムにおいては、この領域は、シャイン-ダルガルノ(Shine-Dalgarno)配列ともいわれる。

20

【0018】

本明細書において使用される用語「無細胞蛋白質合成系」とは、細胞を処理することによって自律複製能を失った細胞由来の成分であって、蛋白質の合成が可能な成分をいう。無細胞蛋白質合成系としては、例えば、市販のPURESYSTEM(登録商標)(バイオコウマ株式会社 東京都文京区)を利用することも可能である。あるいは、無細胞蛋白質合成系に必要なとされる成分を精製および/または組換え発現して、作製することも可能である。

【0019】

30

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0020】

(一枚膜リボソームの製造)

本発明において使用する一枚膜リボソームは、実施例に記載する遠心沈降法を用いて調製することができるが、調製法は、これに限定されない。例えば、遠心沈降法の他にも、静置水和法(P. Mueller and T. F. Chien, Biophys. J., 1983, 44, 375-381)、および、エレクトロフォーメーション法(Miglena I. Angelove and Dimiter S. Dimitrov, Faraday Discuss. Chem. Soc., 1986, 81, 303-311)を利用することが可能である。

40

【0021】

静置水和法は、代表的には、以下の工程を包含する方法である:(1)脂質を溶媒に溶かしフラスコ中で自然乾燥することにより、フラスコ表面に脂質膜を形成させる工程;および、(2)水溶液を添加し、脂質膜を膨潤させる工程。この第2工程によって、脂質膜が水溶液を取り込んだリボソームが浮き上がってくる。

【0022】

50

エレクトロフォーメーション法は、代表的には、以下の工程を包含する方法である：（１）導電性電極上に脂質溶液を塗布し、乾燥させて脂質フィルムを形成させる工程；（２）絶縁性スペーサーを介した反対側にも導電性電極を設置し、その間を水溶液で満たす工程；および、（３）二つの電極間に電界を印加することにより、脂質膜を電極から剥がして巨大薄膜リポソームを作製する工程。

【 0 0 2 3 】

（核酸分解酵素）

本発明において使用する核酸分解酵素としては、例えば、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素が挙げられるがこれらに限定されない。使用する核酸分解酵素の供給源は、特に限定されることはない。核酸分解酵素としてDNaseを使用する場合、使用する酵素活性は、100μLのリポソーム溶液あたり、1U～20U、より好ましくは、5U～15U、もっとも好ましくは、約12.5Uである。核酸分解酵素としてRNaseを使用する場合、使用する酵素活性は、100μLのリポソーム溶液あたり、1μg～20μg、より好ましくは、5μg～15μg、もっとも好ましくは、約10μgである。当業者は、使用する酵素量を容易に決定することができる。

10

【 0 0 2 4 】

（使用するDNAまたはRNA）

例えば、リポソームに含ませる遺伝情報がDNAである場合、そのDNAに、タンパク質のコード配列、ならびに、このコード配列に作動可能に連結された翻訳調節配列、および、このコード配列に作動可能に連結された転写翻訳調節配列を含ませる。

20

【 0 0 2 5 】

翻訳調節配列としては、例えば、翻訳開始配列が挙げられるがこれらに限定されない。必要に応じて、翻訳終止コドンを含ませてもよい。連結される翻訳調節配列は、使用する無細胞蛋白質合成系と適合することが好ましい。例えば、E.coli由来の無細胞蛋白質合成系を利用する場合、連結される翻訳調節配列は、好ましくは、E.coliの翻訳開始配列である。使用する翻訳調節配列と無細胞蛋白質合成系とは、必ずしも同一種由来である必要はなく、両者が適合可能、すなわち、無細胞蛋白質合成系が翻訳調節配列からの翻訳を開始できる限り、いかなる種由来であってもよい。

【 0 0 2 6 】

転写翻訳調節配列としては、例えば、プロモーター配列が挙げられるがこれに限定されない。必要に応じて、エンハンサー配列、サブレッサー配列、オペレーター配列、および、転写終結部位を含んでもよい。連結される転写翻訳調節配列は、使用するRNAポリメラーゼと適合することが好ましい。例えば、E.coli由来のRNAポリメラーゼを利用する場合、連結される転写翻訳調節配列は、好ましくは、E.coliの転写翻訳調節配列である。使用する転写翻訳調節配列とRNAポリメラーゼとは、必ずしも同一種由来である必要はなく、両者が適合可能、すなわち、RNAポリメラーゼが転写翻訳調節配列からの転写を開始（あるいは、制御）できる限り、いかなる種由来であってもよい。

30

【 0 0 2 7 】

例えば、リポソームに含ませる遺伝情報がRNAである場合、そのRNAに、タンパク質のコード配列、および、このコード配列に作動可能に連結された翻訳調節配列を含ませる。翻訳調節配列としては、例えば、翻訳開始配列が挙げられるがこれらに限定されない。必要に応じて、翻訳終止コドンを含ませてもよい。連結される翻訳調節配列は、使用する無細胞蛋白質合成系と適合することが好ましい。例えば、E.coli由来の無細胞蛋白質合成系を利用する場合、連結される翻訳調節配列は、好ましくは、E.coliの翻訳開始配列である。使用する翻訳調節配列と無細胞蛋白質合成系とは、必ずしも同一種由来である必要はなく、両者が適合可能、すなわち、無細胞蛋白質合成系が翻訳調節配列からの翻訳を開始できる限り、いかなる種由来であってもよい。

40

【 0 0 2 8 】

（本発明のリポソームの分子進化学への応用）

本発明のリポソームを分子進化学に利用することができる。

50



## 【 0 0 2 9 】

例えば、核酸分解酵素処理をした一枚膜リポソームを、その内部のDNAまたはRNAがタンパク質産物を生成する条件下にインキュベートし、生成されたタンパク質の活性を測定し、この活性を指標として、高機能性の遺伝情報を含む一枚膜リポソームを選択（スクリーニング）する。利用する活性は、代表的には、一枚膜リポソーム内のDNAまたはRNAがコードするタンパク質の活性である。例えば、一枚膜リポソーム内のDNAまたはRNAが - ガラクトシダーゼをコードする場合、利用する活性は、5 - クロロメチルフルオレセイン ジ - - D - ガラクロピラノシド（CMFDG）の分解によって生じる蛍光である。例えば、一枚膜リポソーム内のDNAまたはRNAがGFPをコードする場合、利用する活性は、GFPによる発光である。

10

## 【 0 0 3 0 】

タンパク質のリン酸化や他の他のタンパク質との結合を検出するためには、例えば、以下の方法を用いる：ターゲットとなるタンパク質の端をFRETを起こすような蛍光色素でラベルする工程；リン酸化や他のタンパク質との結合によってコンフォメーションが変化し、FRETの程度が変化した場合、その蛍光変化を指標として選択する工程。あるいは、GFP遺伝子を例えばT3RNAポリメラーゼプロモーターの下流に配置し、同時にT3RNAポリメラーゼRNAを用いることにより、よりRNA合成活性の高いT3RNAポリメラーゼを得ることも可能である。

## 【 0 0 3 1 】

また、タンパク質のコード配列以外の配列（例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、リポソーム結合配列、翻訳開始部位などの遺伝子発現の制御に関連する配列）に変異を導入し、選択することにより、高い活性（例えば、高いプロモーター活性、エンハンサー活性、翻訳活性など）を有するように配列を進化させることができる。

20

## 【 0 0 3 2 】

スクリーニングの結果得られた一枚膜リポソームは、その中にDNAないしRNAとして含まれる遺伝情報を単離するために使用される。遺伝情報がDNAである場合、DNAを特異的に増幅するプライマーを用いて、PCRによって遺伝情報を増幅して、単離することができる。あるいは、DNAが、宿主細胞内で自律複製するために必要な配列を含む場合、DNAを適切な宿主細胞に導入して増幅後に単離してもよい。

## 【 0 0 3 3 】

遺伝情報がRNAである場合、（1）逆転写酵素を用いて、RNAをDNAに変換し、その後、耐熱性DNAポリメラーゼ酵素を用いてPCRによってDNAを増幅するか、あるいは、（2）耐熱性逆転写酵素を用いて、一段階で、RNAの遺伝情報を増幅してもよい。RNAが宿主細胞内で自律複製するために必要な配列を含む場合、RNAを適切な宿主細胞に導入して増幅後に単離してもよい。

30

## 【 0 0 3 4 】

第1ラウンドのスクリーニング後に、必ずしも、遺伝情報を単離（純化）する必要はない。例えば、第1ラウンドのスクリーニングによって、単クローンのDNAないしRNAを得るのではなく、DNAないしRNAの集団を取得し、その集団を出発材料として、第2ラウンドのスクリーニングを行ってもよい。第2ラウンドのスクリーニングまたはそれ以降のラウンドのスクリーニングによって得られたDNAないしRNAの集団を、次のラウンドのスクリーニングの出発材料としてもよい。

40

## 【 0 0 3 5 】

あるいは、スクリーニング後に得られたクローン（純化されたクローン）について、変異誘発を行い、異なる複数のクローンを含む集団を作製し、次のラウンドのスクリーニングの出発材料としてもよい。

## 【実施例】

## 【 0 0 3 6 】

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

50

## 【 0 0 3 7 】

( 実施例 1 : 一枚膜リポソームの調製 )

以下に記載の遠心沈降法により、一枚膜リポソームを調製した。

- ・ 1 0 m g の脂質 ( ホスファチジルコリン : コレステロール = 9 : 1 ) を 1 0 0 μ l クロロホルムに溶解し、 2 m l の流動パラフィンと混合した。
- ・ 8 0 ° C で 3 0 分インキュベーションした。
- ・ リポソーム外液 ( 3 3 3 m M グルコース、無細胞蛋白質合成系から翻訳タンパク質群と t R N A を除いたもの )、内液 ( 3 3 0 m M スクロース、 1 μ M T r a n s f e r r i n A l e x a 6 4 7、無細胞蛋白質合成系、 4 0 U / μ l R N a s e インヒビター ( P r o m e g a )、 0 . 4 μ M リポソーム S 1 サブユニット、 5 0 μ M 5 - クロロメチルフルオレセイン ジ - D - ガラクロピラノシド ( C M F D G )、 5 0 p M 鋳型 DNA ( p U C M D V ( + ) ( - N H ) - ( + ) G a l ( - ) と p U C M D V ( + ) ( - N H ) - d S - ( + ) G a l ( - ) の 1 : 1 混合物 ) を調製した。
- ・ 脂質を溶解した流動パラフィン 4 0 0 μ l にリポソーム内液 2 0 μ l を入れ、氷上に 1 分置いた。
- ・ ボルテックスミキサーの最大強度で 4 0 秒攪拌しエマルションを調整後、氷上で 1 0 分置いた。
- ・ 新しいチューブにリポソーム外液 1 5 0 μ l を入れ、その上に調製したエマルションを積層し、氷上で 1 0 分置いた。
- ・ 1 4 k x g、 4 ° C で 3 0 分遠心した。
- ・ チューブの底に穴を開け、底に溜まったリポソーム懸濁液 8 0 μ l を回収した。
- ・ リポソーム懸濁液に 2 μ l の 5 U / μ l D N a s e、または、 4 m g / m l R N a s e を添加した。
- ・ リポソーム懸濁液を 3 7 ° C で 3 時間インキュベーションした。
- ・ 希釈液 ( 5 0 m M H e p e s - K O H ( p H 7 . 6 )、 1 3 m M 酢酸マグネシウム、 1 0 0 m M グルタミン酸カリウム ) で 2 0 倍に希釈し、セルソーター ( F A C S A r i a ) にかけた。
- ・ セルソーターにより、より強い蛍光を持つリポソームを選択した。
- ・ 選択されたリポソームから反応中に生じた RNA を R N e a s y ( Q I G E N ) により精製した。
- ・ 得られた RNA を 0 . 2 μ M プライマー 1 ( 配列番号 1 : G C A A G T G A C T C A G G A T T C G T A C A T A A T A T C G T C T C C G T A A A C A G T G )、各 1 m M d N T P と混合し、 6 5 ° C で 5 分熱処理後直ちに氷冷した。
- ・ 1 0 U / μ l P r i m e S c r i p t R e v e r s e T r a n s c r i p t a s e ( T A K A R A )、 P r i m e S c r i p t b u f f e r、 1 U / μ l R N a s e インヒビター ( P r o m e g a ) を加え、 5 0 ° C で 6 0 分、 7 0 ° C で 1 5 分インキュベーションした。
- ・ 反応液を水で 5 倍希釈した。
- ・ p U C M D V ( + ) ( - N H ) - ( + ) G a l ( - ) を測定する場合には 0 . 4 μ M のプライマー 2 ( 配列番号 2 : G G T A G T G T T G T T A C C T A C G A G A A G ) およびプライマー 3 ( 配列番号 3 : G C A A G T G A C T C A G G A T T C G T A C ) を用いた。 p U C M D V ( + ) ( - N H ) - d S - ( + ) G a l ( - ) を測定する場合には 0 . 4 μ M のプライマー 3 ( 配列番号 3 : G C A A G T G A C T C A G G A T T C G T A C ) とプライマー 4 ( 配列番号 4 : C C C T C T G T G A G C T C G A G T C ) を加え、 S Y B R P r e m i s E x T a q I I と混合した。・ S Y B R 蛍光を指標に定量 P C R を行ない、回収された RNA 量を測定した。 P C R のサイクルは以下のとおり。 9 5 1 0 秒の後、 ( 9 5 5 秒、 6 3 1 0 秒、 7 2 1 5 秒 ) を 5 0 サイクル。

## 【 0 0 3 8 】

10

20

30

40

50

使用した無細胞蛋白質合成系の組成は、以下のとおりである。

各 0.3 mM アミノ酸 (アラニン、グリシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、セリン、スレオニン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、リシン、アルギニン、ヒスチジン、メチオニン、システイン、チロシン)、3.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  tRNA、2 mM ATP、2 mM GTP、1 mM CTP、1 mM UTP、14 mM 酢酸マグネシウム、50 mM Hepes-KOH (pH 7.8)、100 mM グルタミン酸カリウム、2 mM スペルミジン、20 mM クレアチンリン酸、2 mM ジチオスレイトール、10 ng/ $\mu\text{l}$  10-ホルミル-5.6.7.8.-テトラヒドロ葉酸、翻訳タンパク質群 (2500 nM IF1、411 nM IF2、728 nM IF3、247 nM RF1、484 nM RF2、168 nM RF3、485 nM RRF、727 nM AlaRS、99 nM ArgRS、420 nM AsnRS、121 nM AspRS、100 nM CysRS、101 nM GlnRS、232 nM GluRS、86 nM GlyRS、85 nM HisRS、365 nM IleRS、99 nM LeuRS、115 nM LysRS、109 nM MetRS、134 nM PheRS、166 nM ProRS、99 nM SerRS、84 nM ThrRS、102 nM TrpRS、101 nM TyrRS、100 nM ValRS、588 nM MTF、926 nM MK、465 nM CK、1307 nM NDK、621 nM Ppiase2、1290 nM EF-G、2315 nM EF-Tu、3300 nM EF-Ts、529 nM Tig、22 nM HrpA、1440 nM TrxC)。

【0039】

(実施例2：ライブラリーの作製およびスクリーニングの結果)

活性のある野生型のガラクトシダーゼ遺伝子と活性のない変異型のガラクトシダーゼ遺伝子とを1:1で混合し、実施例1に記載の方法で作製したリボソームに封入した。蛍光を発したリボソームを回収し、リボソーム内のDNAの種類(野生型か変異型か)を決定した。その結果を、図1に示す。

【0040】

野生型のガラクトシダーゼ遺伝子を封入したリボソームは蛍光を発するが、変異型のガラクトシダーゼ遺伝子を封入したリボソームは蛍光を生じない。そのため、蛍光を指標として回収されたりリボソーム中、変異型遺伝子を含むリボソームは、スクリーニングにおけるノイズである。変異型遺伝子を含むリボソームが多いということは、「選択効率」が低いことを示す。そこで、図1の縦軸を、回収された野生型遺伝子の数を、回収された変異型遺伝子の数で割った商とした(「より活性の高い酵素の選択効率」として表す)。

【0041】

図1の結果は、核酸分解酵素で処理しない一枚膜リボソームを用いた場合、多重膜リボソームを用いた場合よりも選択効率が低かったことを示す。これに対して、核酸分解酵素処理をした一枚膜リボソームを用いた場合は、多重膜リボソームを用いた場合よりも選択効率が高かった。特にRNA分解酵素を用いた場合に、選択効率が高かった。

【産業上の利用可能性】

【0042】

核酸分解酵素処理をした一枚膜リボソームを用いることによって、より高効率のスクリーニングが可能となり、高機能の酵素をコードした遺伝子を選択して回収することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0043】

配列番号1：プライマー1(逆転写酵素反応用プライマー)

配列番号2：プライマー2(PCR用プライマー)

配列番号3：プライマー3(PCR用プライマー)

配列番号4：プライマー4(PCR用プライマー)

10

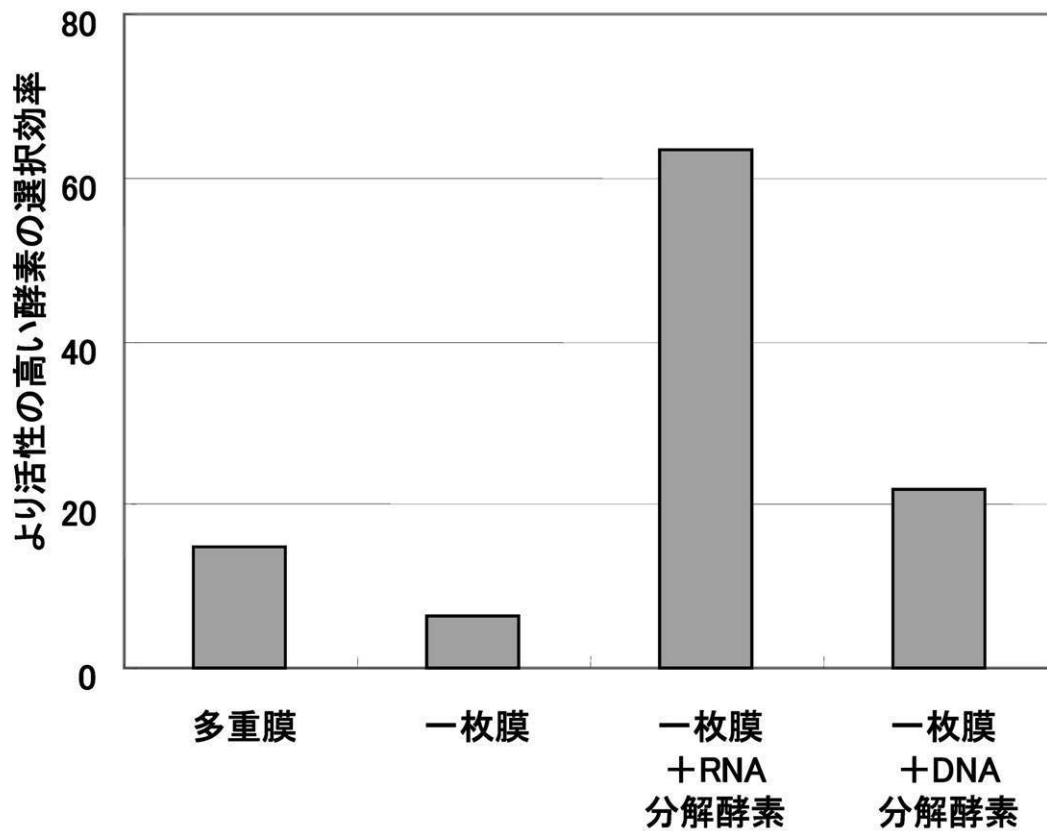
20

30

40

50

【図1】



【配列表】

0005467320000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 角南 武志  
大阪府吹田市山田丘1-5 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 西川 雄大  
大阪府吹田市山田丘1-5 国立大学法人大阪大学内

審査官 櫛引 明佳

- (56)参考文献 国際公開第2009/066758(WO, A1)  
OHTSUKA T et al., Synthesis and in situ insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-sized liposomes, Anal. Biochem., 2011年, Vol.418, No.1, pp.97-101  
NOIREAUX V et al., A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly, PNAS, 2004年, Vol.101, No.51, pp.17669-17674  
HOVIJITRA NT et al., Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes, Biotechnol. Bioeng., 2009年, Vol.104, No.1, pp.40-49  
KURUMA Y et al., Question 7: biosynthesis of phosphatidic acid in liposome compartments - toward the self-reproduction of Minimal Cells, Orig. Life Evol. Biosph., 2007年, Vol.37, No.4-5, pp.409-413  
Dimitriadis, FEBS LETTERS, Vol.86, No.2, p.289-293, 1978

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12Q 1/68

C40B 40/06

CAPLUS/REGISTRY/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed