

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6016011号  
(P6016011)

(45) 発行日 平成28年10月26日 (2016.10.26)

(24) 登録日 平成28年10月7日 (2016.10.7)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 4 O B	40/08	(2006.01)	C 4 O B	40/08	
C 4 O B	30/00	(2006.01)	C 4 O B	30/00	

請求項の数 24 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2012-145795 (P2012-145795)  
 (22) 出願日 平成24年6月28日 (2012.6.28)  
 (65) 公開番号 特開2014-7983 (P2014-7983A)  
 (43) 公開日 平成26年1月20日 (2014.1.20)  
 審査請求日 平成27年6月10日 (2015.6.10)

(出願人による申告) 平成21年度、独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究事業「四方動的微小反応場」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 503360115  
 国立研究開発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  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (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 松浦 友亮  
 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】 インビトロ膜タンパク質進化分子工学的手法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

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、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含むDNA；

(b) RNAポリメラーゼ；

(c) リボヌクレオチド；、(d) 無細胞蛋白質合成系；ならびに、(e) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、を含む、一枚膜リポソーム。

【請求項2】

請求項1に記載の一枚膜リポソームであって、核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソーム。

【請求項3】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素、および、DNA分解酵素からなる群から選択される、請求項2に記載の一枚膜リポソーム。

【請求項4】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項3に記載の一枚膜リポソーム。

【請求項5】

複数の一枚膜リポソームを含むライブラリーであって、該一枚膜リポソームは、以下：

10

20

( a ) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む DNA ;  
 ( b ) RNAポリメラーゼ ;  
 ( c ) リボヌクレオチド ;  
 ( d ) 無細胞蛋白質合成系 ; ならびに、  
 ( e ) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む、ライブラリー。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のライブラリーであって、前記一枚膜リボソームが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る、ライブラリー。

10

【請求項 7】

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 6 に記載のライブラリー。

【請求項 8】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項 7 に記載のライブラリー。

【請求項 9】

一枚膜リボソームであって、以下 :

( a ) 翻訳開始配列、および、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む RNA ; ( d ) 無細胞蛋白質合成系 ; ならびに、( e ) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む、一枚膜リボソーム。

20

【請求項 10】

請求項 9 に記載の一枚膜リボソームであって、核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボソーム。

【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 に記載の一枚膜リボソーム。

【請求項 12】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項 11 に記載の一枚膜リボソーム。

【請求項 13】

複数の一枚膜リボソームを含むライブラリーであって、該一枚膜リボソームは、以下 :

( a ) 翻訳開始配列、および、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む RNA ; ( d ) 無細胞蛋白質合成系 ; ならびに、( e ) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む、ライブラリー。

30

【請求項 14】

請求項 13 に記載のライブラリーであって、前記一枚膜リボソームが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る、ライブラリー。

【請求項 15】

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 14 に記載のライブラリー。

40

【請求項 16】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項 15 に記載のライブラリー。

【請求項 17】

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、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む DNA ;  
 ( b ) RNAポリメラーゼ ;  
 ( c ) リボヌクレオチド ;

50

(d) 無細胞蛋白質合成系；ならびに、  
 (e) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 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18】

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17に記載の方法。

【請求項19】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

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、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含むRNA；

(d) 無細胞蛋白質合成系；ならびに、

(e) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 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21】

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20に記載の方法。

【請求項22】

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

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5~8のいずれか一項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24】

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13~16のいずれか一項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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インピトロにおける膜タンパク質の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、膜タンパク質を対象とする、新規の分子進化工学、特に、酵素進化工学に関連する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 2 】

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リ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）。この従来法では、専ら、可溶性タンパク質が対象であった。

## 【 0 0 0 3 】

膜タンパク質が細胞の機能において多くの重要な役割を担うことは周知である。そのため、膜タンパク質を対象とする、新規の分子進化工学、特に、酵素進化工学が求められている。

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【 0 0 0 4 】

【非特許文献1】Sunami, T., Sato, K., Matsuura, T., Tsukada, K., Urabe, I., and Yomo, T. (2006) Analytical biochemistry 357, 128 - 136

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

20

## 【 0 0 0 5 】

膜タンパク質を対象とする、新規の分子進化工学的手法、特に、酵素進化工学的手法を提供することを、本発明の課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 6 】

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)

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、膜タンパク質をコードする配列を含むDNA；

30

(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。

## (項目2)

前記膜タンパク質がトランスポーターであり、前記一枚膜リポソームがさらに、

(e) 前記膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、を含む、項目1に記載の一枚膜リポソーム。

## (項目3)

項目1または2に記載の一枚膜リポソームであって、核酸分解酵素によって処理された一枚膜リポソーム。

40

## (項目4)

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3に記載の一枚膜リポソーム。

## (項目5)

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、項目4に記載の一枚膜リポソーム。

## (項目6)

複数の一枚膜リポソームを含むライブラリーであって、該一枚膜リポソームは、以下：

(a) プロモーター配列、翻訳開始配列、および、膜タンパク質をコードする配列を含むDNA；

50

- ( b ) R N A 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 7 )  
 前記膜タンパク質がトランスポーターであり、前記一枚膜リポソームがさらに、  
 ( e ) 前記膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む項目 6 に記載のライブラリー。  
 ( 項目 8 )  
 項目 6 または 7 に記載のライブラリーであって、前記一枚膜リポソームが核酸分解酵素に  
 10  
 よって処理された一枚膜リポソームである、ライブラリー。  
 ( 項目 9 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素、および、D N A 分解酵素からなる群から選択され  
 る、項目 8 に記載のライブラリー。  
 ( 項目 1 0 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素である、項目 9 に記載のライブラリー。  
 ( 項目 1 1 )  
 一枚膜リポソームであって、以下：  
 ( a ) 翻訳開始配列、および、膜タンパク質をコードする配列を含む R N A ; ならびに、  
 ( d ) 無細胞蛋白質合成系、  
 20  
 を含む、一枚膜リポソーム。  
 ( 項目 1 2 )  
 前記膜タンパク質がトランスポーターであり、前記一枚膜リポソームがさらに、  
 ( e ) 前記膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む項目 1 1 に記載の一枚膜リポソーム。  
 ( 項目 1 3 )  
 項目 1 1 または 1 2 に記載の一枚膜リポソームであって、核酸分解酵素によって処理され  
 た一枚膜リポソーム。  
 ( 項目 1 4 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素、および、D N A 分解酵素からなる群から選択され  
 30  
 る、項目 1 3 に記載の一枚膜リポソーム。  
 ( 項目 1 5 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素である、項目 1 4 に記載の一枚膜リポソーム。  
 ( 項目 1 6 )  
 複数の一枚膜リポソームを含むライブラリーであって、該一枚膜リポソームは、以下：  
 ( a ) 翻訳開始配列、および、膜タンパク質をコードする配列を含む R N A ; 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 1 7 )  
 前記膜タンパク質がトランスポーターであり、前記一枚膜リポソームがさらに、  
 40  
 ( e ) 前記膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、  
 を含む項目 1 6 に記載のライブラリー。  
 ( 項目 1 8 )  
 項目 1 6 または 1 7 に記載のライブラリーであって、前記一枚膜リポソームが核酸分解酵  
 素によって処理された一枚膜リポソームである、ライブラリー。  
 ( 項目 1 9 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素、および、D N A 分解酵素からなる群から選択され  
 る、項目 1 8 に記載のライブラリー。  
 ( 項目 2 0 )  
 前記核酸分解酵素が、R N A 分解酵素である、項目 1 9 に記載のライブラリー。  
 50

## (項目 2 1)

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、膜タンパク質をコードする配列を含む 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 10

を包含する、方法。

## (項目 2 2)

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、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む DNA；

(b) RNA ポリメラーゼ；

(c) リボヌクレオチド；

(d) 無細胞蛋白質合成系；ならびに、 20

(e) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、

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 2 3)

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 2 1 または 2 2 に記載の方法。

## (項目 2 4)

前記核酸分解酵素が、RNA 分解酵素である、項目 2 3 に記載の方法。 30

## (項目 2 5)

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、膜タンパク質をコードする配列を含む 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。 40

## (項目 2 6)

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、トランスポーターである膜タンパク質をコードする配列を含む RNA；

(d) 無細胞蛋白質合成系；ならびに、

(e) 該膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子、

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。 50

を包含する、方法。

(項目27)

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25または26に記載の方法。

(項目28)

前記核酸分解酵素が、RNA分解酵素である、項目27に記載の方法。

(項目29)

一枚膜リボ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6～10のいずれか一項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ボソームを選択する工程；

(iii) 該一枚膜リボソームに含まれる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30)

一枚膜リボ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16～20のいずれか一項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ボソームを選択する工程；

(iii) 該一枚膜リボソームに含まれる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。

【発明の効果】

【0007】

本発明によって、リボソームを利用する、膜タンパク質を対象としたインビトロでの分子進化工学的手法が可能になった。また、本発明によって、所望の機能を有する膜タンパク質をコードする遺伝子の大規模スクリーニング/選択もまた可能である。

【0008】

膜タンパク質がトランスポーターである場合、その膜タンパク質が輸送するリガンドに結合する因子をリボソーム内に封入してリボソーム内に輸送されたりガンドを捕獲することにより、スクリーニング/選択の感度が向上する。

【0009】

さらに、本発明に従い核酸分解酵素によって処理された一枚膜リボ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する。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。従来用いられていたリボソームは、凍結乾燥法により調製された多重膜リボソームであり、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つた。リボ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ボ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ボ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ボ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つた。これに対して、本発明では、一枚膜リボ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ボソームや、酵素処理をしていない一枚膜リボソームと比較して、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。

【0010】

また、本発明の開示に従い、リボソームを構成する脂質の組成/比率、および、リボソームを調製する際のマグネシウム濃度を最適化することによって、スクリーニング/選択の感度がさらに向上する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

## 【0011】

【図1】図1は、EmrE - myc - his配列（配列番号1）を含むDNA、または、GUS配列（配列番号3）を含むDNAを用い、タンパク質発現前と発現後のリポソームに対して、標識化抗Mycタグ抗体を添加し、セルソータにて分析した結果である。縦軸はリポソーム内部体積を、横軸はAlexa488の蛍光強度を示す。AおよびBは、GUS配列を用いた結果を示し、CおよびDは、EmrE - myc - his配列を用いた結果を示す。AおよびCは、37でのインキュベーションにてタンパク質を発現する前のリポソームの結果であり、BおよびDは、37で1時間インキュベーションしてタンパク質を発現したリポソームの結果である。

【図2】図2は、EmrE - myc - his配列（配列番号1：図2A）を含むDNA、または、GUS配列（配列番号3：図2B）を含むDNAを含むリポソームにおいて、タンパク質を発現させ、異なるpHにおいて、EtBrの輸送活性を測定した結果である。

【図3】図3は、種々の脂質組成を用いた場合の、機能を有する膜タンパク質発現の割合を示す結果である。ヘモリシンが活性発揮した場合、八口タグAlexa Fluor 488リガンドを高輝度に取り込むので、縦軸は、それらの割合（%）を示す。すなわち、縦軸は、リポソームの中の膜タンパク質活性を発揮する割合を示す。左から順番に、POPC : Chol = 9 : 1の混合物、POPC : Chol = 7 : 3の混合物、POPC : Chol = 5 : 5の混合物、および、POPC : Chol = 3 : 7の混合物を用いた結果である。なお、POPCは1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリンの略称であり、Cholはコレステロールの略称である。

【図4】図4の縦軸は、各種脂質を用いた場合の全リポソームの中の八口タグAlexa Fluor 488リガンドを高輝度に取り込んだリポソームの割合（%）を示す。すなわち、図4のグラフは、チャンネルの相対活性を示すグラフである。用いた脂質は、以下のとおりである：EggPCは鶏卵から精製したホスファチジルコリンの略称であり、POPCは1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン、PSは1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォセリン、PEは1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォエタノールアミン、Cholはコレステロールの略称である。PC mixは、1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン : 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイルホスファチジルコリン : 1 - ステアロイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン : 1 - ステアロイル - 2 - リノレオイルホスファチジルコリン = 129 : 67 : 48 : 24（質量比）で混ぜたものの略称であり、EggPC / PS / PEはそれぞれを順に3 : 1 : 1（質量比）、EggPC / PS / PE / Cholはそれぞれを順に2 : 1 : 1 : 1（質量比）、PC mix / PS / PEはそれぞれを順に3 : 1 : 1（質量比）、PC mix / PS / PE / Cholはそれぞれを順に2 : 1 : 1 : 1（質量比）、POPC / PS / PEはそれぞれを順に3 : 1 : 1（質量比）、POPC / POPE / POPPS / Cholはそれぞれを順に2 : 1 : 1 : 1（質量比）で混ぜたものの略称である。

【図5】図5は、進化実験の結果を示すグラフである。縦軸は、高輝度リポソームの割合（赤点の割合）を示す。サイクルを重ねるにつれて、活性の高い集団の割合が増加した。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0012】

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。

## 【0013】

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挙する。

## 【0014】

（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。

## 【0015】

10

20

30

40

50



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。本発明においては、リポソームの成分としてコレステロールを含ませることが好ましい。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。

10

## 【0016】

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。

20

## 【0017】

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。

## 【0018】

本明細書において使用する場合、用語「翻訳開始配列」とは、機能的なりポ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。

30

## 【0019】

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PURE SYSTEM(登録商標)(パ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。

40

## 【0020】

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。

## 【0021】

本明細書において使用される用語「膜タンパク質」とは、脂質二重膜に付着するタンパク質をいう。膜タンパク質は、膜貫通領域を含むタンパク質であっても、膜貫通領域を含まないタンパク質であってもよい。

50

## 【 0 0 2 2 】

(膜タンパク質)

本発明は、あらゆる膜タンパク質に適用可能である。代表的な膜タンパク質としては、例えば、トランスポーター、レセプターなどが挙げられるがこれらに限定されない。必要に応じて、本発明の膜タンパク質をコードする配列は、タンパク質を膜に挿入するためのリーダー配列を含んでもよい。

## 【 0 0 2 3 】

(トランスポーター)

本発明の膜タンパク質は、トランスポーターであっても、そうでなくてもよい。本発明のトランスポーターとしては、細胞において物質輸送に関するタンパク質(例えば、Emr Eタンパク質)、脂質二重膜を透過しない物質を透過させるタンパク質(例えば、ヘモリン)が挙げられるがこれらに限定されない。

10

## 【 0 0 2 4 】

(一枚膜リポソームの製造)

本発明において使用する一枚膜リポソームは、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。

20

## 【 0 0 2 5 】

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ポソームが浮き上がってくる。

## 【 0 0 2 6 】

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。

30

## 【 0 0 2 7 】

(一枚膜リポソームの製造において使用される脂質の成分/組成)

一枚膜リポソームの製造において使用される脂質の成分/組成は、特に限定されることはないが、リン脂質およびコレステロールを含むことが好ましい。脂質としては、例えば、L-アルファ-ホスファチジルコリン、コレステロール、L-アルファ-ジラウロイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、L-アルファ-ジラウロイルホスファチジルグリセロールナトリウム、L-アルファ-モノミリストイルホスファチジコリン、L-アルファ-ジミリストイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、L-アルファ-ジミリストイルホスファチジルグリセロールアンモニウム、L-アルファ-ジミリストイルホスファチジルグリセロールナトリウム、L-アルファ-ジミリストイルホスファチジン酸ナトリウム、L-アルファ-ジオレイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、L-アルファ-ジオレオイルホスファチジルセリンナトリウム、L-アルファ-モノパルミトイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジパルミトイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、L-アルファ-ジパルミトイルホスファチジルグリセロールアンモニウム、L-アルファ-ジパルミトイルホスファチジルグリセロールナトリウム、L-アルファ-ジパルミトイルホスファチジン酸ナトリウム、L-アルファ-ステアロイルホスフ

40

50

ァチジルコリン、L-アルファ-ジステアロイルホスファチジルコリン、L-アルファ-ジステアロイルホスファチジエタノールアミン、L-アルファ-ジステアロイルホスファチジルグリセロールナトリウム、L-アルファ-ジステアロイルホスファチジルグリセロールアンモニウム、L-アルファ-ジステアロイルホスファチジン酸ナトリウム、L-アルファ-ジエルコイルホスファチジルコリン、1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン、ベータ-オレイル-ガンマ-パルミトイル-L-アルファ-ホスファチジエタノールアミン、ベータ-オレイル-ガンマ-パルミトイル-L-アルファ-ホスファチジルグリセロールナトリウム、スフィンゴミエリン、ステアリルアミンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0028】

コレステロールの割合は、好ましくは10%以上、より好ましくは30%以上、さらにより好ましくは50%以上、最も好ましくは70%以上である。

【0029】

(一枚膜リポソームの製造に適切なマグネシウム濃度)

マグネシウムの濃度は、好ましくは15 mM ~ 50 mM、より好ましくは18.88 mM ~ 42.48 mM、さらにより好ましくは28.32 mM ~ 37.76 mM、最も好ましくは33.04 mMである。

【0030】

(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、100 μLのリポソーム溶液あたり、1 U ~ 20 U、より好ましくは、5 U ~ 15 U、もっとも好ましくは、約12.5 U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、100 μLのリポソーム溶液あたり、1 μg ~ 20 μg、より好ましくは、5 μg ~ 15 μg、もっとも好ましくは、約10 μg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。

【0031】

(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。

【0032】

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。

【0033】

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、サプレッサー配列、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。

【0034】

10

20

30

40

50

例えば、リボ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。

【0035】

(本発明のリボソームの分子進化学への応用)

本発明のリボソームを分子進化学に利用することができる。

【0036】

例えば、核酸分解酵素処理をした一枚膜リボソームを、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、(1)リボソーム表面の発現したタンパク質の存在を指標として、あるいは、(2)生成された膜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ボソームを選択(スクリーニング)する。利用する活性は、代表的には、一枚膜リボソーム内の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、一枚膜リボソーム内のDNAまたはRNAがトランスポーターをコードする場合、利用する活性は、代表的には、その輸送活性である。トランスポーターの輸送活性を指標とする場合、例えば、そのトランスポーターによってリボソーム内に輸送される物質を標識し(例えば、蛍光標識)、セルソータ(FACS: 蛍光標式細胞分取器)を用いて標識物質が蓄積したリボソームを選択する。例えば、リボソーム内にトランスポーターが輸送するリガンドに結合する因子を封入し、リボソーム内に輸送されたリガンドを捕獲することにより、スクリーニング/選択の感度を向上することができる。

【0037】

あるいは、膜タンパク質が有する酵素活性を指標としてもよい。

【0038】

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膜タンパク質の活性の指標として検出するためには、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。

【0039】

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、リボソーム結合配列、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。

【0040】

スクリーニングの結果得られた一枚膜リボソームは、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。

【0041】

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

10

20

30

40

50

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。

【0042】

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、単一クローンの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なってもよい。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。

10

【0043】

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】

【0044】

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。

【0045】

(実施例1:一枚膜リポソームの調製)

20

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。

・10mgの脂質(ホスファチジルコリン:コレステロール=9:1)を100 $\mu$ lクロロホルムに溶解し、2mlの流動パラフィンと混合した。

・80 $^{\circ}$ Cで30分インキュベーションした。

・リポソーム外液(333mM 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tRNAを除いたもの)、内液(330mM スクロース、1 $\mu$ M Transferin Alexa 647、無細胞蛋白質合成系、40U/ $\mu$ l RNaseインヒビター(Promega)、0.4 $\mu$ M リポソームS1サブユニット、50pM DNAを調製した。DNAとして、EmrE-myc-his配列(配列番号1:EmrE遺伝子のC末端にmycタグおよびhisタグを含む配列)を含むDNA、または、GUS配列(配列番号3:GUS配列およびmyc配列を含むネガティブコントロール)を含むDNAを用いた。この条件は、各リポソームに1分子のDNAが封入される条件である。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:

30

各0.3mM 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、グルタミン酸、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 $\mu$ g/ $\mu$ l tRNA、2mM ATP、2mM GTP、1mM CTP、1mM UTP、14mM 酢酸マグネシウム、50mM Hepes-KOH (pH7.8)、100mM グルタミン酸カリウム、2mM スペルミジン、20mM クレアチンリン酸、2mM ジチオスレイトール、10ng/ $\mu$ 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(2500nM IF1、411nM IF2、728nM IF3、247nM RF1、484nM RF2、168nM RF3、485nM RRF、727nM AlaRS、99nM ArgRS、420nM AsnRS、121nM AspRS、100nM CysRS、101nM GlnRS、232nM GluRS、86nM GlyRS、85nM HisRS、365nM IleRS、99nM LeuRS、115nM LysRS、109nM MetRS、134nM PheRS、166nM ProRS、99nM SerRS、84nM ThrRS、102nM TrpRS、101nM TyrRS、100nM ValRS、588nM MTF、926nM MK、465nM CK、1307nM NDK、621nM Ppiase2、1290nM E

40

50

F - G、2315 nM EF - Tu、3300 nM EF - Ts、529 nM Tig、22 nM HrpA、1440 nM TrxC)。

・脂質を溶解した流動パラフィン400  $\mu$ lにリポソーム内液20  $\mu$ 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40秒攪拌しエマルジョンを調整後、氷上で10分置いた。

・新しいチューブにリポソーム外液150  $\mu$ lをいれ、その上に調製したエマルジョンを積層し、氷上で10分置いた。

・14kxg、4で30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80  $\mu$ lを回収した。

・リポソーム懸濁液に2  $\mu$ lの5U/ $\mu$ l DNase、または、4mg/ml RNaseを添加した。

・リポソーム懸濁液を37で3時間インキュベーションし、タンパク質合成を行った。

・PBS + 1% BSA溶液で抗体(Alexa Fluor 488で標識した、抗Mycタグ抗体(マウスIgG1))を希釈し終濃度5  $\mu$ g/mlになるようにリポソーム懸濁液に加えた。(リポソーム溶液9  $\mu$ lに50g/mlの抗体を1  $\mu$ l加えた。)

・室温30分放置後、抗体を顕微鏡観察で観察した(Ex: 470~490 Em: 510~550)。

#### 【0046】

その結果、EmrE遺伝子のC末端にmycタグおよびhisタグを含む配列からなるポリペプチドに結合した抗体に起因するAlexa 488蛍光のリポソーム膜への局在が確認された。すなわち、上記方法によって、リポソーム内で膜タンパク質をインビトロ合成し、膜タンパク質がリポソーム膜に組み込まれたことが確認された。

#### 【0047】

次に、EmrE - myc - his配列(配列番号1: EmrE遺伝子のC末端にmycタグおよびhisタグを含む配列)を含むDNA、または、GUS配列(配列番号3: GUS配列およびmyc配列を含むネガティブコントロール)を含むDNAを用い、タンパク質発現前と発現後のリポソームに対して、PBS + 1% BSA溶液で希釈した抗体(Alexa Fluor 488で標識した、抗Mycタグ抗体(マウスIgG1)終濃度5  $\mu$ g/ml)を添加し(リポソーム溶液9  $\mu$ lに50g/mlの抗体を1  $\mu$ l添加)、室温で30分放置し、セルソータにて分析した。その結果を図1に示す。縦軸はリポソーム内部体積を、横軸はAlexa 488の蛍光強度を示す。AおよびBは、GUS配列を用いた結果を示し、CおよびDは、EmrE - myc - his配列を用いた結果を示す。AおよびCは、37でのインキュベーションにてタンパク質を発現する前のリポソームの結果であり、BおよびDは、37で1時間インキュベーションしてタンパク質を発現したリポソームの結果である。図1から明らかなように、各リポソームに1分子のDNAを封入する条件でリポソームを調製し、膜タンパク質を発現し、抗体で検出できることが確認された。

#### 【0048】

(実施例2: 一枚膜リポソームにて発現した膜タンパク質の機能の確認)

リポソームに、EmrE - myc - his配列(配列番号1: EmrE遺伝子のC末端にmycタグおよびhisタグを含む配列)を含むDNA、または、GUS配列(配列番号3: GUS配列およびmyc配列を含むネガティブコントロール)を含むDNAそれぞれ5 nM、および、PURE systemを内封し、37 2時間インキュベートしEmrE - myc - hisとGUS - mycを発現させた。リポソーム調製後、外液1から、EtBr 5  $\mu$ g/mlを含む外液2に交換した。一分間ごとに蛍光を測定し、EtBrの取り込みを観測した。その後、同じサンプルを蛍光顕微鏡で観察した(Ex: 520~550 Em: 580~)。

#### 【0049】

外液1の組成(すなわち、リポソーム合成時の外液)は、以下のとおりである: HEP

10

20

30

40

50

ES - KOH (pH 7.6) 100 mM、K - Glu 200 mM、スペルミジン 4 mM、酢酸マグネシウム 25 mM、CP 40 mM、DTT 2 mM、FD 20  $\mu$ g/ml、20種類のアミノ酸各 0.4 mM、ATP 8 mM、GTP 8 mM、UTP 4 mM、CTP 4 mM。

【0050】

外液2の組成(すなわち、プロトン勾配を作るための外液)は、以下のとおりである: Tris - HCl (pH 9.0または7.6) 100 mM、K - Glu 200 mM、スペルミジン 4 mM、酢酸マグネシウム 25 mM、CP 40 mM、DTT 2 mM、FD 20  $\mu$ g/ml、20種類のアミノ酸 各 0.4 mM、ATP 8 mM、GTP 8 mM、UTP 4 mM、CTP 4 mM。

10

【0051】

その結果を図2に示す。図2Aは、EmrE - myc - his配列(配列番号1)を含むDNAを用いた結果を、図2Bは、GUS配列(配列番号3)を含むDNAを用いた結果を示す。EmrE - myc - his配列から膜タンパク質を発現したリポソームでは、pH依存性の蛍光強度が観察された。この結果は、リポソームにて発現した膜タンパク質が輸送能を発揮したことを実証する結果である。

【0052】

(実施例3: Mg濃度の検討)

リポソームに、ヘモリシン配列を含むDNA 5 nM、ハロタグタンパク質および、PURE systemを内封した。この際、リポソーム内液及び外液のMg濃度を18.8、23.6、28.32、33.04、37.76、42.28、47.2、51.92、56.64 mMの9条件でリポソーム調整を行った。リポソーム調製後、37、16時間インキュベートし、ヘモリシンを発現させた。発現したアルファヘモリシンの機能を測定するためにリポソーム外液にハロタグAlexa Fluor 488リガンド1  $\mu$ Mを加え、3時間後にリポソーム内部に蓄積されたハロタグAlexa Fluor 488リガンドの蛍光量を測定した。その結果、33.04 mMのMg濃度値で調製したリポソームで最も多くのハロタグAlexa Fluor 488リガンドの蓄積がみられた。したがって、ヘモリシンの活性検出には、好ましくは18.88 mM ~ 23.6 mM、より好ましくは23.6 mM ~ 28.32 mM、最も好ましくは28.32 ~ 42.48 mMの条件を用いる事が良い、と判明した。

20

30

【0053】

(実施例4: 脂質成分/組成の検討 - 1)

実施例1で用いたEmrE - myc - his配列のかわりにヘモリシンをコードする配列(配列番号5)をトランスポーターを発現するために用いた。さらに、ヘモリシンが輸送するリガンドであるハロタグAlexa Fluor 488リガンドに結合する因子として、ハロタグタンパク質(配列番号7)を用いた。ヘモリシンは、膜にポアを作る膜タンパク質であり、3 kDaよりも小さい物質を透過させる。そのため、ヘモリシンが発現すると、リポソームにポアが生じ、その結果、脂質膜を透過できないハロタグAlexa Fluor 488リガンドを透過させる。ポアを介して透過したハロタグAlexa Fluor 488リガンドは、ハロタグタンパク質と結合し、その結果、リポソーム内に移動したハロタグAlexa Fluor 488リガンドはリポソーム内に蓄積する。

40

【0054】

リポソームを形成する脂質として、POPC: Chol = 9:1の混合物、POPC: Chol = 7:3の混合物、POPC: Chol = 5:5の混合物、および、POPC: Chol = 3:7の混合物を用いた。なお、POPCは1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリンの略称であり、Cholはコレステロールの略称である。その結果、図3に示されるように、コレステロールの比率が高くなるにつれて、DNAを含むリポソームの中の膜タンパク質活性を発揮する割合が上昇した。

【0055】

50

(実施例 5 : 脂質成分 / 組成の検討 - 2 )

次に、実施例 4 と同様の手法で、種々の脂質を用いてリボソームを合成し、発現した膜タンパク質の活性を比較した。結果を図 4 に示す。

【 0 0 5 6 】

図 4 の縦軸は、各種脂質を用いた場合の全リボソームの中のハロタグ Alexa Fluor 488 リガンドを高輝度に取り込んだリボソームの割合 (%) を示す。用いた脂質は、以下のとおりである：EggPC は鶏卵から精製したホスファチジルコリンの略称であり、POPC は 1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン、PS は 1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォセリン、PE は 1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォエタノールアミン、Chol はコレステロールの略称である。PC mix は、1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン : 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイルホスファチジルコリン : 1 - ステアロイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン : 1 - ステアロイル - 2 - リノレオイルホスファチジルコリン = 129 : 67 : 48 : 24 (質量比) で混ぜたものの略称であり、EggPC / PS / PE はそれぞれを順に 3 : 1 : 1 (質量比)、EggPC / PS / PE / Chol はそれぞれを順に 2 : 1 : 1 : 1 (質量比)、PC mix / PS / PE はそれぞれを順に 3 : 1 : 1 (質量比)、PC mix / PS / PE / Chol はそれぞれを順に 2 : 1 : 1 : 1 (質量比)、POPC / PS / PE はそれぞれを順に 3 : 1 : 1 (質量比)、POPC / POPE / POPC / Chol はそれぞれを順に 2 : 1 : 1 : 1 (質量比) で混ぜたものの略称である。

10

20

【 0 0 5 7 】

これらの結果からホスファチジルコリンの種類を変える事や複数種類を混和する事、1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォセリン、1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスフォエタノールアミンを混和する事がヘモリシンの活性発揮に有意に影響を与えない事が判明した。

【 0 0 5 8 】

(実施例 6 : 所望の核酸の濃縮)

野生型ヘモリシン (配列番号 5) と致死変異型ヘモリシン (配列番号 8) を用い、実施例 4 と同様の手法を用いて、実験を行った。野生型と致死変異型との比率は、1 : 12 として、10 倍以上多くの致死変異型を用いた。37 で 160 分間培養し、膜タンパク質を発現させ、その後、セルソーターで輸送活性を示したりリボソームを選択し、リボソームに含まれる野生型遺伝子と変異型遺伝子との割合を決定したところ、野生型 : 変異型 = 8 : 1 であった。この結果は、本発明のスクリーニング / 選択によって 100 倍の濃縮がされたことを実証するものである。

30

【 0 0 5 9 】

例えば、所望の性質を示すリボソームを選択し、含まれる DNA (または RNA) に変異誘導 (例えば、ランダム変異) し、その変異誘導した集団を出発材料としてセルソータでの選択を行うこともできる。この手順を繰り返すことによって、所望の特性を有する変異型遺伝子を濃縮することが可能である。

【 0 0 6 0 】

(実施例 7 : 進化実験)

以下の手順を用いて、進化実験を行った。

【 0 0 6 1 】

1) 遠心沈降法によりでリボソームを作成した。

脂質組成は POPC : Chol = 1 : 1 (wt / wt) を用いた。内液組成には、実施例 1 に記載の無細胞蛋白質合成系と同様の組成 (ただし、酢酸マグネシウム濃度を 33 . 04 mM に変更) を用いた。さらに、100 nM T7 RNA ポリメラーゼ、200 mM スクロース、5 mM - グルクロニダーゼ結合体化ハロペプチド、1 mM トランスフェリン結合体化 alexa fluor 647、5 pM DNA (T7 プロモーター制御下にヘモリシンの ORF を配置) を用いた。外液組成には、実施例 1 に記載の無細

40

50



胞蛋白質合成系と同様の組成（ただし、酢酸マグネシウム濃度を33.04 mMに変更）の小分子のみに加え、200 mM グルコースを含む溶液を用いた。

【0062】

2) 外液交換をして外液に混入したリポソーム内液を除去した。6000 G 5分間遠心し、上清を捨てた後に沈殿を300 mlの新しいリポソーム外液で再懸濁した。

【0063】

3) ヘモリシタンパク質をリポソーム内部で合成し、脂質膜に呈示させた。37 で16時間インキュベートした。

【0064】

4) DNaseを加えてリポソーム外液に残るDNAを分解した。4 µlのDNase (TAKARA組換えDnase1)をリポソーム液に加えた。

10

【0065】

5) 外環境に蛍光基質を加えた。リポソーム液に新たな外液を900 ml加え、最終体積を1.2 mlにした。最終濃度2 nMになるようにし、ハロタグAlexa Fluor 488リガンドを外液に加えた。継時的にフローサイトメータでリポソームの蛍光強度を測定した。

【0066】

6) 蛍光基質取り込みを無蛍光の脂質二重膜透過性の拮抗阻害基質で停止した。適当な蛍光強度が得られた時に、最終濃度200 nM ハロタグビオチンリガンドを外液に加えた。

20

【0067】

7) リポソーム溶液の濃縮。6000 G 5分間遠心し、上清を捨てて沈殿を新しい外液300 mlで再懸濁した。

【0068】

8) セルソーター (BD, FACS Aria 2) で高輝度リポソームを最高輝度値から1万個分取した。

【0069】

9) 遺伝情報を増幅した。分取したリポソーム液は簡易型のDNA精製カラム (QIAGEN MinElute PCR Purification Kit) を用いて精製した。その後、PCRを40サイクル行った (DNAポリメラーゼはTOYOBO KOD FX Neoを使用)。PCRは再度DNA精製カラムを用いて精製した。その後、アガロース電気泳動により、ゲルバンドを精製した (Life technologies, E-Gel CloneWell SYBR Safe Gelを使用)。再度DNA精製カラムを用いて精製した後、再度PCRを20サイクル行った。PCR産物は再度DNA精製カラムで精製し、次のサイクルのDNAストックとした。

30

【0070】

結果を図5に示す。図5は、蛍光強度が260以上である高輝度リポソームの集団の割合を示したグラフである。ハロタグAlexa Fluor 488リガンドがヘモリシン活性がないネガティブコントロールのリポソームに対して吸着する蛍光値が上限で260であることから、この数値以上の蛍光値を示したサンプルは、ヘモリシンによる特異的なハロタグAlexa Fluor 488リガンド取り込みを示したサンプルである。

40

【0071】

スクリーニング/選択のサイクルを繰り返すことによって、より活性の高い遺伝子の割合が増加したことが示された。なお、DNAを単離した後に変異導入をしてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0072】

核酸分解酵素処理をした一枚膜リポ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、所望の機能を有する膜タンパク質をコードする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】

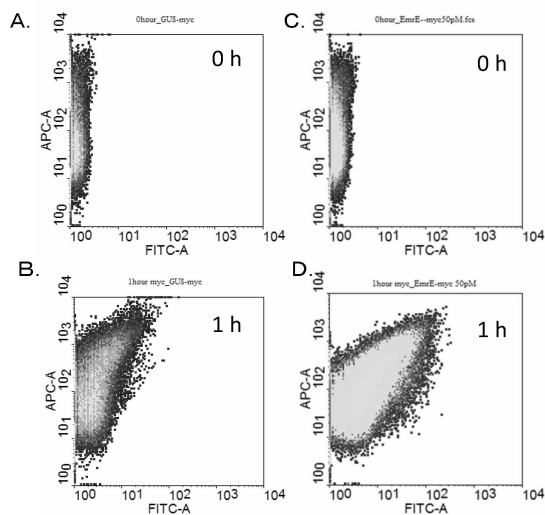
50

【 0 0 7 3 】

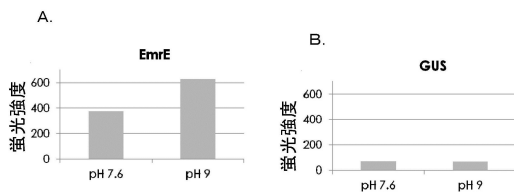
- 配列番号 1 : EmrE - myc - his のヌクレオチド配列
- 配列番号 2 : EmrE - myc - his のアミノ酸配列
- 配列番号 3 : Escherichia coli 由来の GUS のヌクレオチド配列
- 配列番号 4 : Escherichia coli 由来の GUS のアミノ酸配列
- 配列番号 5 : Staphylococcus aureus 由来のヘモリシンをコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 6 : Staphylococcus aureus 由来のヘモリシンのアミノ酸配列
- 配列番号 7 : ハロタグタンパク質のアミノ酸配列
- 配列番号 8 : Staphylococcus aureus 由来の致死変異型ヘモリシンをコードするヌクレオチド配列
- 配列番号 9 : Staphylococcus aureus 由来の致死変異型ヘモリシンのアミノ酸配列

10

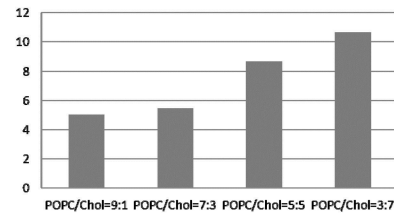
【 図 1 】



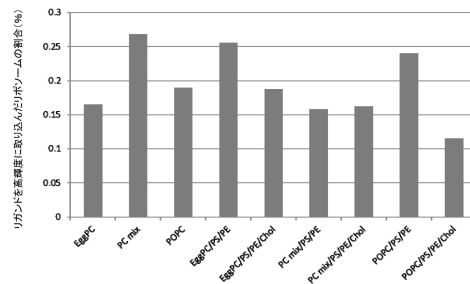
【 図 2 】



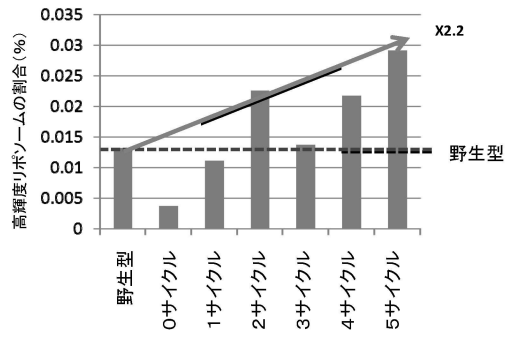
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0006016011000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 曾我 遥  
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 渡邊 肇  
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 藤井 聡志  
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 西村 亜希子

- (56)参考文献 特開2007-060995(JP,A)  
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, Orig. Life Evol. Biosph., 2007年, Vol.37, No.4-5, pp.409-413  
OHTSUKA T et al., Synthesis and in situ insertion of a site-specific fluorescently labeled membrane protein into cell-, Anal. Biochem., 2011年, Vol.418, No.1, pp.97-101  
西川雄大ほか, 単層膜リボソームを反応場とする遺伝子スクリーニングシステムの定量的評価, 高分子討論会予稿集, 2011年 9月13日, Vol.60, No.2, Disk1, Page.ROMBUNNO.2U05  
NISHIKAWA T et al., Construction of a gene screening system using giant unilamellar liposomes and a fluorescence-activated, Anal. Chem., 2012年 6月 5日, Vol.84, No.11, pp.5017-5024  
西川雄大ほか, リボソームを反応場とする遺伝子スクリーニングによる活性型グルクロニダーゼの探索, 高分子学会年次大会予稿集, 2012年 5月15日, Vol.61 No.1, Page.ROMBUNNO.2G26  
SHIMIZU Y et al., Protein synthesis by pure translation systems, Methods, 2005年, Vol.36, pp.299-304  
LOS GV et al., HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis, ACS CHEMICAL BIOLOGY, 2008年, Vol.3, No.6, pp.373-382

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09  
C12P 21/02  
C12Q 1/68  
C40B 30/00  
C40B 40/08  
JSTPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)