

大腸菌を宿主とした異種タンパク質高発現のイロハ

東端 啓貴

タンパク質は、リボソームで合成されたポリペプチドが折りたたまれ、その機能を発揮する。タンパク質の折りたたみには、DnaK系やGroEL系といった分子シャペロンの“介添え”を必要とするものもある。また、これらの分子シャペロンが変性途中のタンパク質を捕捉し元の折りたたみ構造へ戻すことでその凝集や不完全な構造によるプロテアーゼ消化を防いでいる。発現させるタンパク質によっては、その特性・宿主への毒性などから宿主細胞内で封入体を形成したり、あるいはまったく発現しなかったり、細胞が溶菌してしまうなどの問題が起こることがある。発現させるタンパク質の用途により封入体でもよい場合があるが、本稿では、酵素活性などの機能を保持した状態で発現させることを目的とし、大腸菌を宿主として異種タンパク質を発現させた場合に、しばしば経験する問題とそれを克服するヒントを紹介したい。

pETシステムの基本原理

タンパク質の高発現のためによく用いられるのは、T7 RNAポリメラーゼとT7プロモーターを用いたpETシステムであろう。このシステムでは、L8-UV5 *lac*プロモーターの支配下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれたバクテリオファージλDE3の溶原菌を宿主として用いる必要がある。pETシステムが使用可能な菌名には、たとえばBL21 (DE3) のように、λDE3溶原菌を意味する(DE3)の表記が必ずある。したがって、BL21とBL21 (DE3)の遺伝子型は同一ではない¹⁾。

誘導剤であるIPTGの添加によりLacリプレッサーがL8-UV5 *lac*プロモーター下流の*lac*オペレーターから解離し、大腸菌由来RNAポリメラーゼによるT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の転写が開始される。L8-UV5 *lac*プロモーターとは、*lac*プロモーターへL8とUV5の変異が導入されたものである。L8は培地中のグルコース量減少への応答(転写の活性化)が著しく低下した変異であり、誘導時の*lac*プロモーター活性はきわめて低い²⁾。UV5は、L8変異のサプレッサーとして単離された変異であり、-10領域がコンセンサス配列(5'-TATAAT-3')となっているため、誘導時のプロモーター活性が回復する。すなわち、このL8UV5変異によりIPTG添加時の*lac*プロモーターからの転写が強く促進され、T7 RNA

ポリメラーゼが生成する。大腸菌内で生成したT7 RNAポリメラーゼの特異性は非常に高くT7プロモーターのみにしか作用しない。したがって、pETプラスミド上にあるT7プロモーター支配下の異種遺伝子のみを集中的に転写することが可能となり、異種タンパク質を大量に発現・取得することができる³⁾(図1)。このpETシステムを使用したときにしばしば遭遇する問題点を中心に話を進めたい。

トラブルその1

異種タンパク質が大腸菌に対して毒性を保持していることなどの理由により、形質転換体が得られない、誘導前に菌が溶菌する、十分な菌密度を得られない場合がある。このような時には、誘導剤を添加しない状態の異種タンパク質の基底レベルの発現を抑えることでこの問題を克服できる可能性がある。そのためには、T7プロモーターからの異種遺伝子の転写を抑制する方法と、T7 RNAポリメラーゼの基底レベルの発現を減らす、あるいはその活性を阻害するなどの方法がある。

プロモーター転写量制御 pETプラスミドにあるT7プロモーターの下流に*lac*オペレーターを配し(T7*lac*プロモーター)、さらに*lac*リプレッサー遺伝子(*lacI*)を載せたpETプラスミドを使用することで、異種遺伝子の転写を抑制する方法がある。この方法では、*lacI*遺伝子から発現されたLacリプレッサーはT7*lac*プロモーター下流に結合するだけでなく、宿主染色体にあるL8-UV5 *lac*プロモーター下流の*lac*オペレーターへも結合しT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の転写も抑制する。その他にも、T7 RNAポリメラーゼに結合しその活性を阻害するリゾチーム遺伝子を、発現用プラスミドと和合性のあるプラスミドに別途保持させたもの(pLysSまたはpLysE)を使用する方法(図1網掛け部分)、あるいは、培地に終濃度0.5~1%のグルコースを加えてL8-UV5 *lac*プロモーターからのT7 RNAポリメラーゼの発現を抑え込む方法が挙げられる。培地中のグルコースに対するL8-UV5 *lac*プロモーターの感度はきわめて低いが、グルコースによるカタボライト抑制を起こさせることは可能である⁴⁾。

pETシステムではIPTGを誘導剤として用いるが、よ

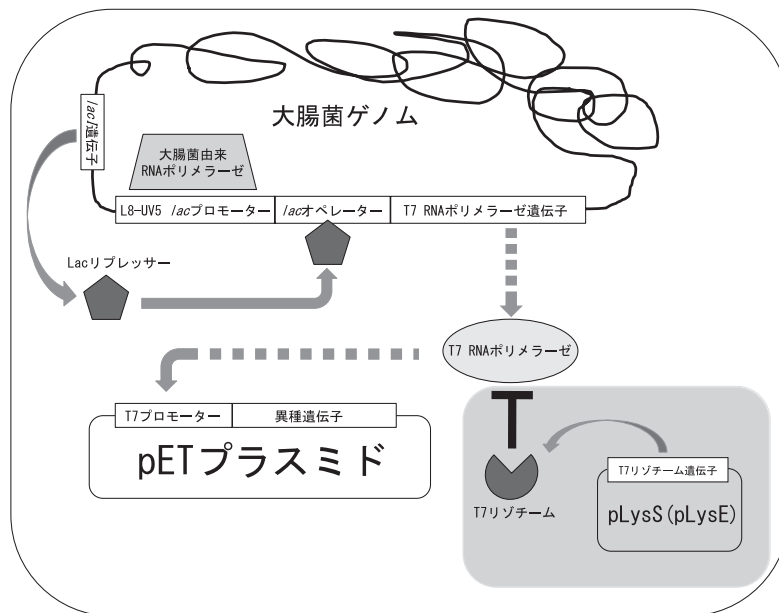


図1. pETシステムの基本原理. 網掛けの部分は、pLysSあるいはpLysEを保持する大腸菌で起こる抑制を示している。

り厳密に制御するためL-アラビノースで誘導可能なプロモーター (*araBAD* プロモーター) の支配下に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を配したシステム (BL21-AI) がある⁵⁾。誘導剤を加えない場合、*araBAD* プロモーターからの T7 RNA ポリメラーゼの基底レベルの発現は低く保たれ、グルコースの添加によりさらに抑制される。

プラスミドのコピー数を制御 上述のプロモーターからの転写量を制御する他にプラスミドのコピー数を減らすことでこの問題に対処する方法もある。コピー数をコントロールできる pETcoco 発現ベクターには 2 種の複製起点 (*oriV* と *oriS*) と複製を開始するために必要な遺伝子が組み込まれている⁶⁾。アラビノースを添加した場合には、*oriV* からの複製を開始するタンパク質が誘導され、pETcoco 発現ベクターを大腸菌 1 細胞当たり 20~50 コピーに保持させることができる。一方、アラビノースを添加しない場合には、*oriS* からの複製により 1 細胞当たり 1 コピーに保つことができるため、目的とする異種タンパク質の発現量を低下させることができる。

トラブルその2

タンパク質の過剰発現によく用いられる BL21 株とその誘導体は、*lon* プロテアーゼと *ompT* プロテアーゼを欠損しているため、誘導されたタンパク質は分解されにくい。しかし、pET システムにおいて、その強力な転写活性にもかかわらず、タンパク質の発現量がそれほど多くない場合がある。このような原因として、mRNA の不安定性による異種タンパク質の転写・翻訳効率の悪さ

や、生成した異種タンパク質の分解などが挙げられる。

mRNA の安定化 大腸菌のほとんどの mRNA は不安定であり、その半減期は数分である。RNA 分解酵素 RNaseE 遺伝子に変異を与えた大腸菌を使うことで、この問題を解決できる可能性がある。RNaseE は、9S rRNA (5S rRNA 前駆体) のプロセッシング、tRNA の 3' 末端プロセッシング、tmRNA (後述) のプロセッシングなどに機能する他にも、デグラドソームを形成し mRNA を分解する。RNaseE の C 末端ドメインを欠いた変異 *rne131* によって mRNA の安定性が向上することが報告されており⁷⁾、*rne131* 変異が導入された大腸菌は、BL21 Star (DE3) としてインビトロジェンから市販されている。

レアコドンの補充 異種タンパク質を発現させる際に、宿主のコドンの使用頻度を考慮に入れなければならない場合がある。使用頻度が極端に低いレアコドンが mRNA に散見される場合は、アミノ酸の取り込みの誤り、翻訳フレームのずれやリボソームの停滞・停止などの原因となる。アミノ酸の取り込みの誤り、翻訳フレームのずれは、酵素活性の測定や機能解析には致命的である。リボソームの停滞・停止は、目的タンパク質の発現量の低下や、tmRNA によるトランス-トランスレーションの機構による分解をうけることが予想される⁸⁾。tmRNA は tRNA と mRNA のハイブリッドであり、mRNA に相当する領域にはタンパク質分解酵素の標的となるタグがコードされている。停滞したりリボソームに tmRNA が入ることにより合成途中のペプチドにタグが

付加され、停滞していたリボソームが再び機能できるようになる。

大腸菌では、アルギニン、イソロイシン、グリシン、ロイシン、プロリンに対応するコドンに使用頻度の低いものがみられるため、これらのコドン (tRNA) を補充すれば、リボソームの停滞などの問題を解決することができる。このようなレアコドン補充株は、Rosetta シリーズ (Novagen 社)、BL21-CodonPlus シリーズ (アジレント・テクノロジー社) として市販されている。

異種タンパク質の安定化 SDS-PAGE で異種タンパク質の発現を確認した際、異種タンパク質の分解産物に由来するバンドが多く見られることがある。この場合、異種タンパク質の安定性を向上させることでこの問題を解決できる可能性がある。開始メチオニンの次のアミノ酸が、タンパク質の安定性を決定している。これを N エンドルールという。タンパク質の N 末端はホルミルメチオニンであるが、デホルミラーゼによりホルミル基が除去され、次いでメチオニンアミノペプチダーゼ (MAP) により開始メチオニンが除かれる。MAP 活性は、開始メチオニンの次のアミノ酸に依存しており His, Gln, Glu, Phe, Met, Lys, Tyr, Trp, Arg の場合は、分解をほとんど受けないことが報告されている⁹⁾。MAP の働きにより露出した 2 番目のアミノ酸がロイシンの場合、タンパク質の半減期がわずか 2 分と著しく短いことが報告されており¹⁰⁾、N 末端が ML……のタンパク質を大腸菌内で発現させるときは注意が必要である。

トラブルその 3

目的とする異種タンパク質が大腸菌内で封入体を形成してしまい可溶性画分への発現がきわめて低いかまったく発現しない場合には以下の方法が有効な場合が多い。

低温での発現 発現時の培養温度を低温にシフトすることで、タンパク質の折りたたみを緩やかに進行させ¹¹⁾、さらには、低温誘導されるシャペロンの働きにより、可溶性画分への発現の向上が期待できる。また、低温で培養することにより宿主細胞内の夾雑タンパク質の発現が抑えられ、その後のタンパク質の精製効率が向上する。内在性プロテアーゼ活性も低く抑えることができるので、目的タンパク質の残存率も高い。

添加剤によるストレス応答の利用 低温での発現以外に、添加剤を用いる対処法が考えられる。エタノールを培養液に 3% (v/v) となるように添加することで、熱ショック応答 (DnaK 系や GroEL 系といった分子シャペロンの発現) を誘導することができ、異種タンパク質の可溶性画分への発現を増加させることができる¹²⁻¹⁴⁾。また、タンパク質合成を阻害する抗生物質のなかには、

熱ショックやコールドショック応答を起こさせるものがある。カナマイシン、ピューロマイシン、ストレプトマイシンはエタノールの場合と同様に熱ショック応答を誘導し、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、スピラマイシン、テトラサイクリン、フシジン酸はコールドショック応答を誘導することが報告されている^{15,16)}。これらの薬剤を添加 (終濃度 1 μg/ml 程度) することによって低温あるいは高温環境に暴露させた状態に細胞内環境を似せることができ、誘導された熱ショックやコールドショック応答により異種タンパク質の可溶性画分への発現を増加させることができる。

分子シャペロンとの共発現 異種タンパク質と分子シャペロンを共発現させることで、可溶性画分への発現の向上が期待できる。熱ショック応答などにより誘導されるシャペロン遺伝子を、pET プラスミドと和合性のある別のプラスミドに載せたシステムが市販されている。たとえば、*groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ* などのシャペロン遺伝子を挿入したプラスミドとの共存により、タンパク質の可溶性画分への発現を向上させるシステムがある (タカラバイオ社)¹⁷⁾。

大腸菌の生育下限温度は約 7.5°C であるが¹⁸⁾、好冷菌 *Oleispira antarctica* 由来のシャペロニン Cpn60 と Cpn10 を発現させた大腸菌は 0°C 付近でも増殖が可能となる¹⁹⁾。これらのシャペロニンは、*in vitro* において 4~12°C で高いリフォールディング活性を示す。低温環境下でこれらのシャペロニンを共発現させ、タンパク質の溶解性を改善させるシステム ArcticExpress (アジレント・テクノロジー社) が市販されている²⁰⁾。

タグの付加 目的とする異種タンパク質が前述の方法でも可溶化しない場合、溶解性の高いタグを付加することによって、タンパク質全体の溶解性を高める戦略を用いるとよい場合がある。SET (solubility enhancement tags) と呼ばれるグルタミン酸残基に由来する負の電荷を持ったタグをタンパク質の N 末端または C 末端側に付加することによって、タンパク質の溶解性を向上させ凝集を抑えることができる (VariFlex protein expression system)^{21,22)}。他のこのようなタグとして、GST (glutathione-S-transferase) タグ²³⁾、MBP (maltose-binding protein) タグ^{24,25)}、Trx (thioredoxin) タグ²⁶⁾、Nus (NusA) タグ²⁷⁾、SUMO (small ubiquitin-like modifier) タグ²⁸⁾などを挙げることができる。

一方、ヒスチジンタグ (6 × His) は、固定化金属イオンカラムによる簡便なアフィニティー精製を行うため頻繁に用いられるが、この強い塩基性を示すタグが付加されたことにより、目的とする異種タンパク質が封入体を形成してしまう場合がある。HAT (histidine affinity

tag) タグは、ニワトリの乳酸デヒドロゲナーゼ由来であり19残基のアミノ酸からなる²⁹⁾。HATタグは、ヒスチジンタグ(6×His)と同様、固定化金属イオンカラムによるアフィニティー精製に使用できるが、ヒスチジンタグ(6×His)より長い場合高分子量タンパク質に付加した場合に構造内部に潜り込む可能性を低く抑えることができる。また、タグを通して均一に電荷が分布しているため溶解性が高く、ヒスチジンタグ(6×His)よりも封入体を形成しにくいという長所がある。

異種の膜タンパク質の高発現を試みた場合、膜中に正しく発現させることの難しさに加え、宿主にとって重要な膜タンパク質の発現を競争的に排除してしまい毒性を示すなどの問題が生じる。このために、低コピープラスミドで、弱い発現用プロモーターを使用することによってタンパク質の発現レベルを低く保ち、大量に培養することが要求される。その一方、目的とする異種タンパク質を細胞膜に高レベルに発現・提示できるタグが発見された。MISTIC (membrane integrating sequences for translation of integral membrane protein constructs) は、*Bacillus subtilis*由来の110アミノ酸からなる高い親水性を示す膜結合タンパク質である³⁰⁾。このタンパク質を付加して大腸菌内で発現させると、シグナル配列を必要とせずに細胞膜に強固に結合する。大腸菌で発現させることが困難な膜タンパク質でも、このMISTICタンパク質をタグとして付加することで、細胞膜内に効率よく高発現させることができる。MISTICタグを付加して細胞膜へ提示させたタンパク質のフォールドは野生型と同じといわれている。しかし、MISTICタンパク質に関する報告例はいまだ少なく、どういう機構で細胞膜内へ標的タンパク質を提示しているのか不明である。

ジスルフィド結合の制御 大腸菌の細胞内環境は、チオレドキシシンおよびグルタチオン/グルタレドキシシンに依存したレドックス制御機構により比較的高い還元状態が保たれている。そのため、目的とする異種タンパク質へ安定なジスルフィド結合が導入されず分解されるか封入体を形成してしまうことがある。チオレドキシシン、グルタチオンの再活性化に関与するチオレドキシシン還元酵素遺伝子 *trxB* やグルタチオン還元酵素遺伝子 *gor* を破壊し、細胞内をより酸化状態にすることで、ジスルフィド結合の適切な形成・タンパク質の正常な折りたたみを促し、タンパク質の生産を高めることができる³¹⁾。ジスルフィド結合の掛け違いを修正する酵素(DsbC)は本来ペリプラズムに局在している。DsbCを細胞質へ発現させた大腸菌は、複数のジスルフィド結合を有する可溶性タンパク質の発現にも効果的であるが、DsbCはシャペロン活性も持つのでジスルフィド結合を持たない異種

タンパク質の発現にも有効である³¹⁾。ペリプラズムは、ジスルフィド結合の形成やタンパク質の折りたたみに適した環境にあるので、ペリプラズムへの発現も有効だと思われる。その際に、ペリプラズムで発現・機能しているDsbCなどと融合させることで、溶解性の増大、タンパク質の折りたたみの促進が期待できる³⁾。

大腸菌を宿主とするその他の発現系

大腸菌を宿主として用いた異種タンパク質の発現にはpETシステムを用いるのが現在の主流である。pETシステムが開発されるまでは、*lac*、*tac*、*trc*プロモーターなどを利用した高コピープラスミド(pUC系)による異種タンパク質発現が一般的であった。*tac*プロモーターは、*trp*プロモーターの-35領域とL8-UV5 *lac*プロモーターの-10領域を連結したハイブリッドプロモーターであり、L8-UV5 *lac*プロモーターや*trp*プロモーターよりも強力に転写を促す³²⁾。*trc*プロモーターは、*tac*プロモーターの-35領域と-10領域の間にシトシンを1塩基挿入することによって制限酵素*HpaII*認識サイトをデザインしたもので、大腸菌内での転写活性は、*tac*プロモーターの9割程度である³³⁾。*lac*、*tac*および*trc*プロモーターからの転写は大腸菌由来RNAポリメラーゼを必要とするため、大腸菌ゲノム中のさまざまなプロモーターと競合関係にある。しかし、プラスミドの圧倒的なコピー数により、それらのプロモーターからの転写量は多くなる。その結果、これらのプロモーターの支配下にある異種遺伝子を効率よく発現させることができる。

これらの発現プラスミドを使用して異種遺伝子を発現させた場合にも、IPTGを添加しない基底レベルの発現が問題となるケースがある。すなわち、宿主細胞にとって悪影響を示すタンパク質を発現させる場合、形質転換体を得られないことがある。上記のプロモーターの下流には*lac*オペレーターが配されているので、Lacリプレッサーが結合できる。そこで、Lacリプレッサーを過剰に発現するよう変異を施した*lacI^q*遺伝子(qはquantityの意味)を載せた発現用プラスミドを使用したり、*lacI^q*遺伝子を載せたF'プラスミド保持株を宿主に用いることで、高コピーの発現用プラスミドであろうとも*lac*、*tac*および*trc*プロモーターからの転写を抑制することができる。*lac*プロモーターに関しては、前述したようにグルコースを培地に添加することで、このプロモーターからの転写を抑制することができる。*tac*および*trc*プロモーターからの転写はグルコース濃度に左右されない。

プロモーターからの異種タンパク質の基底レベルの発現を抑える他にもプラスミドのコピー数を減らすことで対処できる。大腸菌C株誘導体であるABLE C、ABLE

Kは、ColE1系プラスミドのコピー数をそれぞれ1/4, 1/10にできる³⁴⁾。大腸菌の染色体DNAを複製するのはPolIIIでありこの遺伝子は必須である。ColE1系のプラスミドはPolIIにより複製されるが、PolIIをコードする遺伝子*polA*は宿主大腸菌にとっては必須でない。ABLE CおよびABLE K株の染色体DNAには、*polA*の機能を相補する、K-12株とは異なる大腸菌由来のDNA断片が組み込まれている³⁵⁾。これらの株を宿主とすれば、異種タンパク質の基底レベルの発現量を低下させることができるため、プラスミドの安定性や細胞生存率の向上が期待できる。また、pUC系のプラスミドをタンパク質発現に用いる場合、培養温度を下げることでそのコピー数を減少させることができる。pUC系発現用プラスミドをpACYC系プラスミド（細胞当たり18～22コピー）、あるいはpSC101系プラスミド（細胞当たり～5コピー）に変更する方法も考えられるが、上記の宿主を変える方法を利用すればpUC系プラスミドのままコピー数を減少させることが可能である。本誌89巻10号で橋本義輝先生が執筆の“pUCプラスミドにまつわるエトセトラ”にて詳解されているので参照されたい³⁶⁾。

大腸菌由来コールドショック遺伝子*cspA*のプロモーターを利用したコールドショック発現システムがpColdベクターシリーズ（タカラバイオ社）として市販されている³⁷⁾。このプロモーターは大腸菌由来であるため、ほとんどの大腸菌内で機能する。培養温度を15°Cの低温にシフトすることで、*cspA*プロモーター支配下の異種遺伝子の発現を誘導させることができる。*cspA*プロモーターの下流に*lac*オペレーターを配しているため、異種タンパク質の発現には、低温への温度シフトとIPTGの添加が必要である。「低温での発現」で述べたように、宿主細胞内の夾雑タンパク質の発現や内在性プロテアーゼ活性を低く抑えることができる。

おわりに

異種タンパク質の高発現を実現させるさまざまな「イロハ」を簡単に紹介した。本稿で触れた内容はほんの一端であり、他にも「イロハ」を駆使し高発現に成功した報告を見つけることができるだろう。また、本稿で紹介した方法を単独で用いるのではなくて適宜組み合わせることで問題を克服できるかもしれない。これらを駆使しても発現に成功しない場合には、大腸菌以外の宿主の利用や、*in vitro*翻訳系を用いることも選択肢の一つと思われる。本稿を執筆するにあたりいろいろ調べてみて、「これは、使えるかも」と思えるものが多々あった。本稿が、研究進展の一助となれば幸いである。

文 献

- 1) Studier, F. W. and Moffatt, B. A.: *J. Mol. Biol.*, **189**, 113 (1986).
- 2) Novy, R. and Morris, B.: *inNovations*, **13**, 8 (2001).
- 3) Novagen: *pET System Manual* タンパク質発現システム第11版日本語版, MERCK社 (2009).
- 4) Pan, S. and Malcolm, B. A.: *BioTechniques*, **29**, 1234 (2000).
- 5) http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/oneshot_bl21ai_man.pdf
- 6) https://www.merckmillipore.com/japan/life-science-research/petcoco-1-system/EMD_BIO-71131/japanese/p_ikub.sIOCB0AAAEj8Bt9.zLX
- 7) Lopez, P. J. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **33**, 188 (1999).
- 8) Roche, E. D. and Sauer, R. T.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 28509 (2001).
- 9) Hirel, P.-H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8247 (1989).
- 10) Tobias, J. W. *et al.*: *Science*, **254**, 1374 (1991).
- 11) Song, J. M. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **82**, 297 (2012).
- 12) Sahu, S. K. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1745 (2009).
- 13) Thomas, J. G. and Baneyx, F.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 11141 (1996).
- 14) Thomas, J. G. and Baneyx, F.: *Protein Expr. Purif.*, **11**, 289 (1997).
- 15) VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 5589 (1990).
- 16) Kusano, K. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **367**, 129 (1999).
- 17) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100004131
- 18) Shaw, M. K. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **105**, 683 (1971).
- 19) Ferrer, M. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **21**, 1266 (2003).
- 20) <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300796>
- 21) <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300639>
- 22) Zhang, Y.-B. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **36**, 207 (2004).
- 23) Smith, D. B. and Johnson, K. S.: *Gene*, **67**, 31 (1988).
- 24) di Guan, C. *et al.*: *Gene*, **67**, 21 (1988).
- 25) Maria, C. V. *et al.*: *Gene*, **74**, 365–373 (1988).
- 26) LaVallie, E. R. *et al.*: *Biotechnology (NY)*, **11**, 187 (1993).
- 27) Davis, G. D. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 382 (1999).
- 28) Marblestone, J. G. *et al.*: *Protein Sci.*, **15**, 182 (2006).
- 29) http://catalog.takara-bio.co.jp/clontech/product/basic_info.asp?unitid=U100004411
- 30) Tarmo, P. R. *et al.*: *Science*, **307**, 1317 (2005).
- 31) Qiu, J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4891 (1998).
- 32) Boer, H. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50**, 21 (1983).
- 33) Brosius, J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **260**, 3539 (1985).
- 34) <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300297>
- 35) Greener, A.: *Strategies*, **6**, 7 (1993).
- 36) 橋本義輝：生物工学, **89**, 609 (2011).
- 37) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100004327