

高品質なタンパク質を作るための PURE Technology

上 田 卓 也

大腸菌の翻訳に関与する因子をすべて精製し、試験管内で再構築した。この PURE system と名付けた無細胞タンパク質合成系は高いタンパク質合成活性を有しており、翻訳反応以外の夾雑物を含まない点から発展性の高い無細胞タンパク質合成系と考えられる。PURE system にシャペロンや細胞膜へのターゲティングに関与する因子を共存させることで、活性の高いタンパク質や膜に組み込まれた膜タンパク質の合成に成功した。また、システム内の翻訳因子を操作することで部位特異的な非天然アミノ酸の高効率な導入が可能となった。タンパク質の分子認識能によって対応する mRNA を選抜するリボソームディスプレイ法を、PURE system を基盤として開発し、選抜の効率の高いシステムであることを見いだした。

1. はじめに

polymerase chain reaction (PCR) 法は、精製された好熱菌の DNA ポリメラーゼを用いることで、数時間という短時間の DNA 複製・クローニングを可能とした。部分配列が既知であるという制約はあるものの、数カ月を要していたクローニングの著しい短縮化である。また、T7 や SP6 などのファージ由来の RNA ポリメラーゼは、DNA から RNA の試験管内での合成を実現すると同時に、リボザイムなどの機能性 RNA の実験室内進化手法の開発の基盤となった。複製や転写というセントラルドグマのプロセスを、細胞を使用せずに酵素的に行うことにより、DNA や RNA の生産工程が飛躍的に簡便となった。

これらのシステムで留意すべきことは、純化された酵素を用いることにより、実験者の技量にはほとんど依存しない、高い再現性が保証されていることである。細胞抽出液

や粗精製された画分を用いて、これらの核酸を合成することは可能であるが、混在するヌクレアーゼによる分解により、信頼性は著しく低い。その点で、これらの酵素の精製標品は、こうした核酸の生産システムの高い再現性の一般化に必要不可欠であった。

複製と転写のプロセスを、純化された酵素によって行うことが可能となったが、セントラルドグマの残されたタンパク質への翻訳反応はどうであろうか。現在においても大腸菌、酵母、培養細胞などの細胞での発現系が主流である。その点で、DNA や RNA の生産システムの開発に比べ 10 年以上遅れていると言わざるを得ない。その主な理由は、翻訳系の基本反応に関与する分子の種類が、複製や転写に対して多種多彩なことである。アミノ酸の重合反応の場はリボソームであるが、真性細菌の場合、このタンパク質-RNA 複合体は三つの rRNA と 50 種類以上のリボソームタンパク質から構成される。また、リボソーム上での mRNA の解読プロセスは、開始因子、伸長因子、解離因子によって制御される。また、アミノアシル tRNA の生成には、原則として 20 種類のアミノ酸に対応して 20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素が必要である。このように、タンパク質合成の進行には、DNA や RNA の合成とは違い多くの因子を調製する必要があるため、そうした再構築の試みとしては、30 年前に Weisswach らの報告があるが、タンパク質の生産システムとしての観点からはほとんどな

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 (〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5 東京大学新領域生命棟 401)

PURE technology for protein production
Takuya Ueda (Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Bldg. FSB-401, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba Prefecture 277-8562, Japan)

されなかった¹⁾。しかし、このセントラルドグマの残されたプロセスを、精製された標品で組み立てることができれば、DNA, RNA, タンパク質という生命を支える生体高分子を、すべて、細胞を使用しない試験管での反応で再現性よく短時間で生産することが実現できるに違いない。

純化された標品から生命システムを構築するアプローチを、PURE technology と名付けているが、このテクノロジーの大きな利点は、細胞の制約によらずシステムを目的に合わせて自由にデザインすることができることである。PCR 法によって DNA に変異を導入するなど、さまざまな手法が生まれたように、PURE technology にもとづく無細胞タンパク質合成系は、タンパク質科学においても発展性の高い基盤技術となるであろう。

本稿では、筆者らの開発した完全再構築型タンパク質合成系 PURE system の開発の現状²⁻⁴⁾と、このシステムをより高品質なタンパク質の合成系へ進化させる試み、またタンパク質機能解析のための解析ツールへの発展性について詳解する。

2. PURE system の開発

真性細菌のタンパク質合成は多種類の分子による共同作業である (図 1a)。リボソーム上でのポリペプチドの合成開始反応には 3 種類の開始因子 (IF1, IF2, IF3) が、アミノ酸の重合反応には 3 種類の伸長因子 (EF-G, EF-Tu, EF-Ts) が、また終止コドンに対応したペプチド鎖の解離にはやはり 3 種類の解離因子 (RF1, RF2, RF3) が必要とされている。また、終結反応から開始反応への移行には、リボソームへのリサイクリングを司る因子 RRF が必

要である。また、アミノ酸が、アミノアシル tRNA へと活性化されるには、各々のアミノ酸に対応したアミノアシル tRNA 合成酵素が必須であり、また原核生物特有であるが翻訳開始の AUG に対応するメチオニル tRNA のメチオニンのアミノ基にホルミル基を転位するメチオニル tRNA ホルミル転位酵素が必要である。

筆者らは、大腸菌ゲノムからこれらの翻訳因子の遺伝子をすべて PCR クローニングし、大腸菌で大量発現した。PCR クローニングの段階で、N 末端または C 末端にヒスタグを導入しているために、発現した因子を Ni カラムによって精製することが可能である。31 種類の翻訳因子について、この手順で精製し、その純度と活性を検定し、電気泳動的に単一であることと、十分な活性を有していることを確認した²⁾。DNA からのタンパク質合成のために T7 RNA ポリメラーゼについてもヒスタグの付加された形で精製し、リボソームと tRNA 画分については従来法により調製した。これらの翻訳関連因子からタンパク質合成系の試験管内での構築を行ったところ、1ml の反応で、タンパク質の合成効率は 0.1mg 程度であった (図 1b)²⁾。由来する生物種による生産効率の違いはあまり認められず、高等動物のものも効率よく合成された。さらに、分子量が 10 万以上のポリペプチドも合成できることが示された。このシステムには、ヌクレアーゼやプロテアーゼなどの、ポリペプチドの生産に阻害的に働く夾雑因子もほとんど含まれていないことを確認した。このシステムは、タンパク質合成のエネルギー源である ATP や GTP などの、翻訳反応以外での分解もなく、エネルギー変換効率の高いシステムであった。

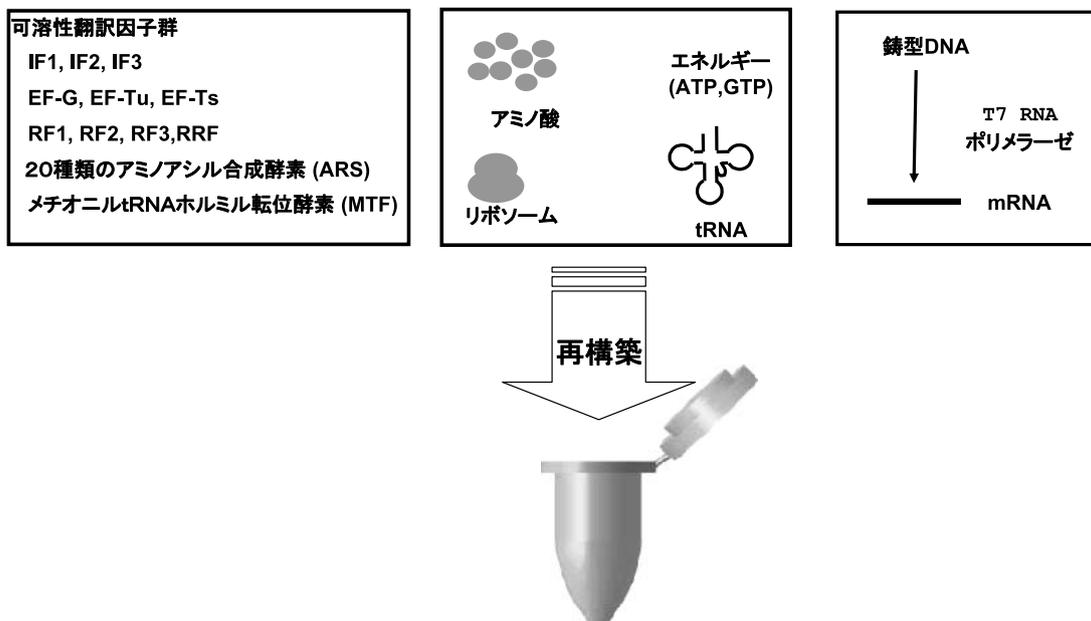


図 1a PURE system の構成要素

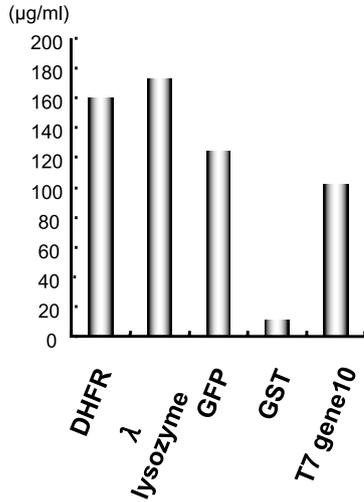


図 1b PURE system によるタンパク質の合成効率. 1ml で 1 時間反応させたもの.

以上のように、筆者らは精製された翻訳因子から試験管内でポリペプチドの合成が可能な分子工場を組み立てることに成功した。この無細胞タンパク質合成系を、PURE system (protein synthesis system using recombinant elements system) と名付けたが、PURE technology のコンセプトを、翻訳系で実現させたという思いが込められている。このシステムの開発によって、セントラルドグマのすべての反応を、純化された分子によって行うことが実現した。

しかし、翻訳系が転写や複製の系に比べて複雑であったのと同様に、産物であるタンパク質も、DNA や RNA とは違った一筋縄ではいかない特質を持っている。機能分子であるタンパク質は、個々の機能を正確に果たすためには、

適切な構造形成が必須である。構造形成には、ペプチド鎖の切断などのプロセッシング、フォールディング、翻訳後修飾などのプロセスを経る。また、細胞内の局所的な環境に対応しながら機能を発現しなくてはならない。特に、膜タンパク質は、脂質二重膜という疎水的環境で構造形成する必要があり、また分泌タンパク質では、疎水的環境を経由後、還元的な細胞内とは違った酸化的な環境で構造形成をする。リボソーム上でのポリペプチドの合成システムに、こうしたタンパク質の成熟に関与するプロセスを融合させることは、生理活性の高いタンパク質を生産するためにはたいへん重要である。PURE system は、こうした成熟プロセスを含まないシステムであり、一見不利のようにも思われるが、逆に目的タンパク質に合わせてこれらの成熟システムを連結できる、いわばオーダーメイドのタンパク質生産システムが可能となる。

3. フォールディングシステムの融合

タンパク質のフォールディングに関与するシャペロンは、凝集抑制活性やフォールディング活性を発揮するが、翻訳と共役して機能するものと翻訳終了後に働くものがあると考えられている^{5,6)}。原核生物では DnaK や trigger factor は前者に属し、GroEL は後者に属するものとされてきた (図 2a)。しかし、これらのシャペロンが、どのタンパク質を基質として認識するかについての知見は、ほとんど得られていない。従来の研究は、主に精製したタンパク質を試験管内で変性させた後、その折り畳みのプロセスを追うアプローチであったために、細胞内でのタンパク質の生合成過程での関与を反映しているとは言い難い。細胞内で

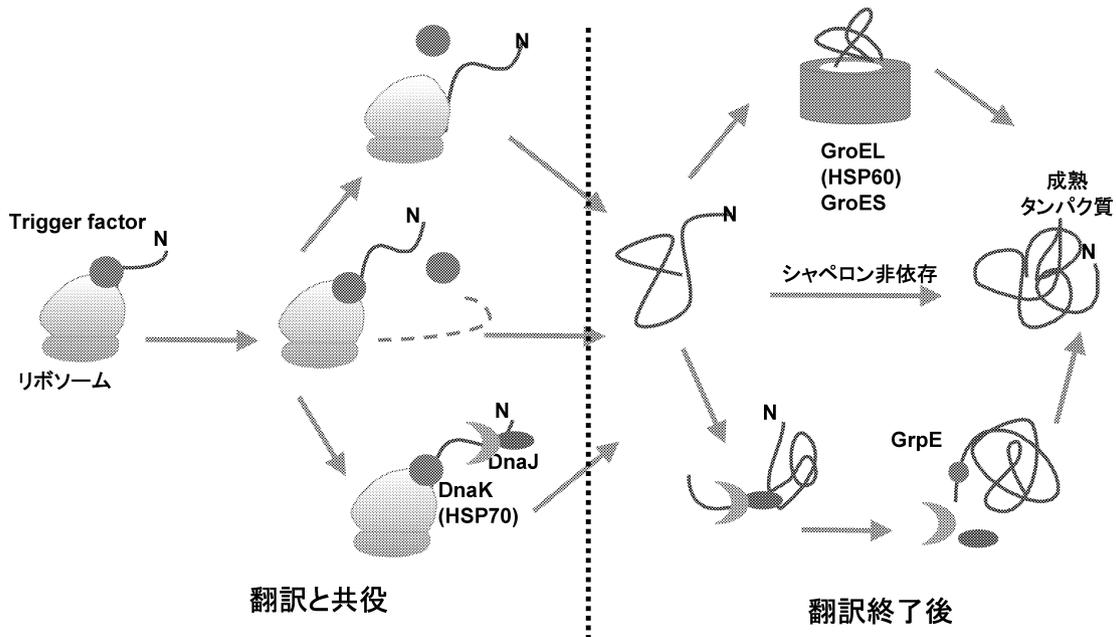


図 2a 大腸菌のシャペロンネットワーク。従来の説では、GroEL は翻訳終了後にのみ働くと考えられていた。

の過程を反映したシャペロン依存性の解析は、分子シャペロンの存在下と非存在下でタンパク質をPURE systemで合成し、その比活性や可溶性を評価することで、はじめて可能となる。現在、この実験系により大腸菌のすべてのタンパク質についてのシャペロン依存性の解析を進めているが、その過程で従来の説とは違い、GroELが翻訳と共役してフォールディングに関与することを見いだした^{7,8)}。

大腸菌 MetK 遺伝子は、同一のサブユニットからなるテトラマー酵素 adenosylmethionine synthetase をコードする。このタンパク質をシャペロンを添加したPURE systemで合成しその可溶性を測定したところ、DnaK システムとGroEL システムともに、その可溶化率の向上が観察された⁷⁾。しかし、活性の改善はGroEL 存在下で合成した場合のみ認められた (図2b)。つまり、MetK については、GroEL システムはフォールディングを促進し、DnaK シス

テムは凝集抑制の効果を持つことが示された。さらに驚くべきことに、翻訳途中のポリソームを、抗 GroEL 抗体で沈殿させると、MetK の mRNA が含まれていた⁷⁾。このことは、GroEL が翻訳途中の新生ペプチドに結合しフォールディングを誘導することを示唆するものである (図2c)。また、プロテアーゼに対する抵抗性から、ポリペプチド鎖が、GroEL のフォールディング促進の場である空洞内に取り込まれていることも明らかになった。GroEL はコシャペロンである GroES により、籠状の閉じた空間を形成することから、当然のように翻訳終了後のみ機能すると思われていたが、これは私たちの思いこみに過ぎなかったのである。

以上の報告は、PURE system によるシャペロンネットワークの解析の一例に過ぎない。最近、Hartl らのグループが、PURE system を用いて trigger factor のペプチド認識

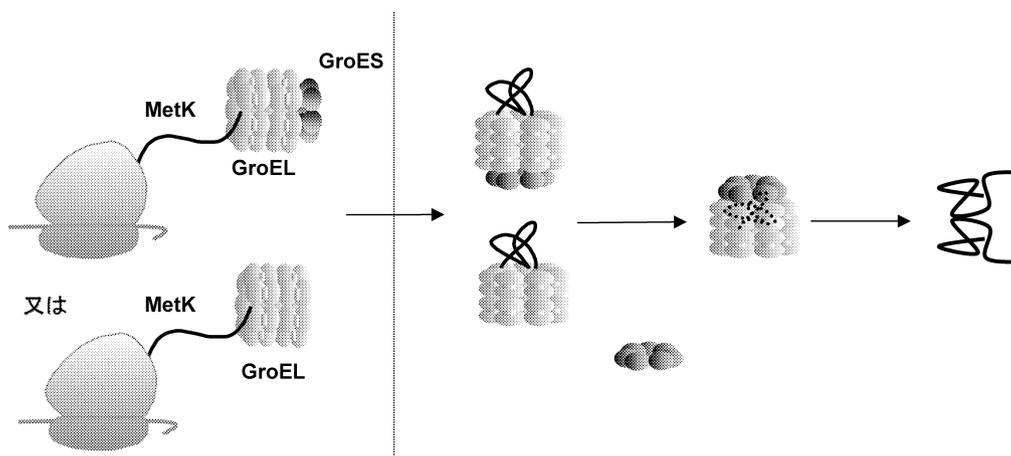
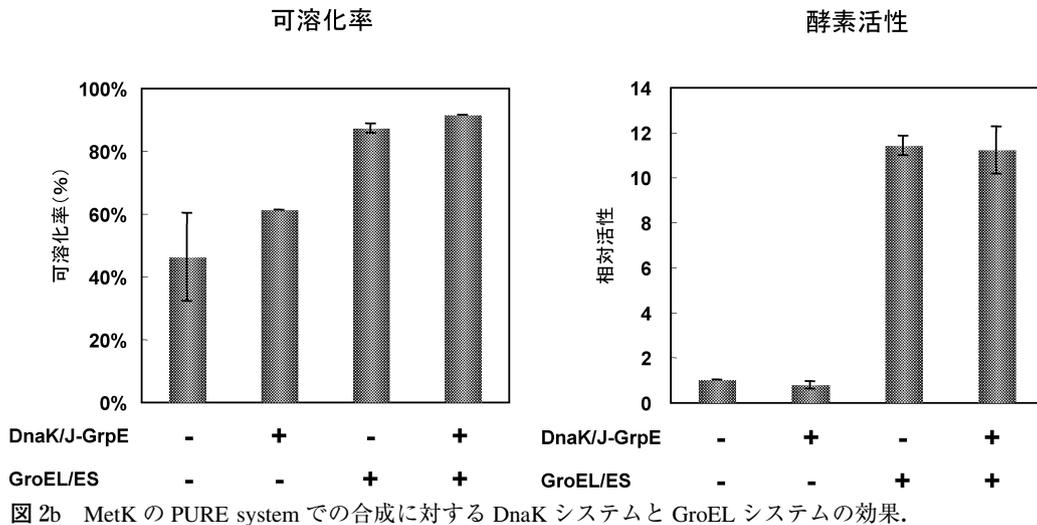


図2c GroEL は、翻訳途中の新生ペプチドに結合し、フォールディングを誘導する。

プロセスの解析を発表しているが⁹⁾、これらの実験は PURE system がシャペロンをまったく含まない系であるために、シャペロンの作用機序についての明快な結論を得ることができることを示している。目的とするタンパク質に対して同様の解析を行うことで、高活性のタンパク質を得るのに適したシャペロンを選択することができる。PURE system は原核生物由来であるが、真核生物のシャペロン群を共存させることで、真核生物のタンパク質の高品質化も可能であるかもしれない。

4. 膜タンパク質の合成

ゲノム上のタンパク質の約3割は膜タンパク質もしくは分泌タンパク質ではないかと推定されている。これらのタンパク質の機能や構造の解析は重要であり、特に G-protein coupled receptor などの膜受容体は、創薬ターゲットとして注目を浴びている。しかし、こうした膜タンパク質に関する研究は大きく立ち後れている。その理由は活性を有する形で合成する有効な方法がほとんどないためである。筆者らは、PURE system の構築と同様に、細胞での膜

タンパク質の合成プロセスを試験管内で再構築することで、この問題を解決できると考えた。

大腸菌では、膜タンパク質の膜への挿入は以下のようなプロセスで進行する。リボソームで合成途中のペプチド鎖はシグナル認識粒子 (SRP) で認識された後、SRP の受容体 (SR) により、細胞膜上の透過装置である SecYEG に輸送され、膜への挿入が進行する¹⁰⁻¹²⁾。SRP と SR を精製し、また大腸菌より内膜画分を反転させた形で調製した。この反転膜小胞については、弱く結合しているタンパク質を除去するために、6M 尿素で処理を行った。これらの膜へのターゲティングに関与する因子群を PURE system に添加し、大腸菌の膜タンパク質であり6回膜貫通ドメインを持つ MtlA をモデルタンパク質として、反転膜小胞への挿入をプロテアーゼ K (PK) に対する抵抗性により検討した (図 3a)。その結果、このタンパク質は効率よく膜へと挿入されること、また期待される膜貫通ドメインがプロテアーゼ抵抗性になることから、天然型と同様の配向性とコンフォメーションで挿入されているものと推定された (図 3b)¹³⁾。また、このシステムで、タンパク質合成を阻害する抗生物質で翻訳を停止させた後に反転膜小胞などを添加しても、膜挿入は起こらず、翻訳と共役させることが膜タンパク質の合成に重要であることが示された。現在、ATPase の Fo 部分や、動物細胞の受容体の合成を進めているが、膜への組み込み効率も高いため、今後の発展が期待できる。

分泌性のタンパク質は、可溶性の因子である SecB、SecA によって SecYEG へと輸送された後、膜を通過する。こうした分泌タンパク質の合成のために、SecA、SecB を精製し、反転膜小胞を含む PURE system に組み込んだ。大腸菌の外膜タンパク質 OmpA の前駆体である pOmpA をこのシステムで合成し、反転膜小胞内への分泌をプロテアーゼ抵抗性により検討した。その結果、シグナル配列が切断され、小胞内に OmpA タンパク質が輸送されていることが示された¹³⁾。細胞内は還元的であり、翻訳プロセスも還元的な反応条件で活性が高いが、分泌タンパク質は内

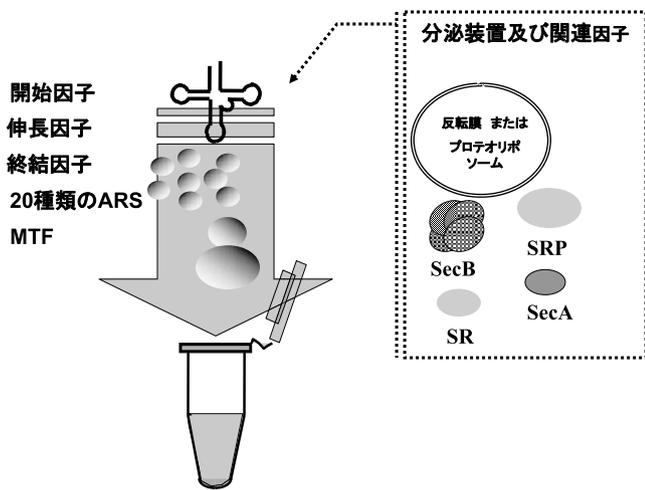


図 3a 膜へのターゲティングに関与する因子を添加した PURE system.

反転膜小胞	-		+		反転膜小胞		尿素処理した反転膜小胞								
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Ffh (SRP)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
FtsY (SR)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
PK	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

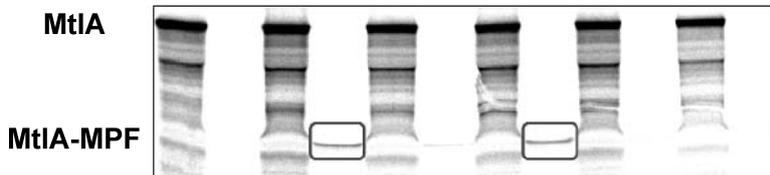


図 3b 膜タンパク質合成用の PURE system で MtlA を合成したもの。プロテアーゼ抵抗性から、膜に挿入されていると推定される。

膜を通過後は酸化環境でジスルフィド結合を形成しつつフォールディングする。筆者らの開発したシステムでは、タンパク質合成を小胞の外で還元的に行い、酸化環境の小胞内部へ分泌させることが可能である。また、ペリプラズムに存在するジスルフィド異性化シャペロンである Dsb 酵素群を小胞内に存在させることで、高品質な分泌タンパク質を生産させることも可能であろう。

5. PURE system による非天然アミノ酸の導入

PURE system は、夾雑物を含まないシステムであると同時に、構成成分である翻訳因子が個別に分離されているため、自由に成分の比率を変化させることが可能である。すでに、無細胞タンパク質合成系を用いた非天然アミノ酸の導入法が開発されている。もっとも広く使用されているのは、アンバーサプレッサー tRNA に化学的に非天然アミノ酸を結合させ、終止コドンの部位に導入する手法である¹⁴⁾。しかし、細胞の抽出液を用いた系では、内在性のアンバーコドンに対応する RF1 とサプレッサー tRNA との間の競合を避けることができず、またサプレッサー tRNA がリサイクルできないために、非天然アミノ酸の導入効率は高くない (図 4a)。RF1 を加えない PURE system でこの反応を行えば、こうした競合は回避できるはずである。実際に、ORF の 37 番目のアミノ酸をアンバーコドンに置換した DHFR の遺伝子を用いて、このシステムでサプレッサー効率を測定したところほぼ 100% であった (図 4b)²⁾。このことから PURE system は、非天然アミノ酸を導入するには、たいへん適したシステムであると言える。

非天然アミノ酸の導入法としては、芳坂らによってアンチコドンに 4 塩基にした tRNA を用いた導入法が開発されている¹⁵⁾。この手法は、読み枠をずらすことで、全長のタ

ンパク質のみに非天然アミノ酸を導入する方法である。この系において問題となるのは、内在性 tRNA と外来の 4 塩基コドンを認識する tRNA との競合である。PURE system では、タンパク質性の因子は精製しているが、tRNA については純化していない。tRNA も個々に純化することができれば、4 塩基コドンによる非天然アミノ酸の導入の効率も向上するはずである。また、tRNA 組成を自由に操作できれば、遺伝暗号表を改変することが可能となる。こうした改変が可能であれば、タンパク質は 20 種類のアミノ酸から構成されなくてはならないという制約がなくなり、タンパク質科学の新たな展開が期待される。

6. PURE system によるリボソームディスプレイ法

分子認識能はタンパク質の最も重要な機能である。タンパク質のこうした機能からその遺伝子が選抜できれば、タンパク質の機能解析の研究の大きな飛躍が期待できる。ポストゲノム時代における重要課題として細胞のタンパク質ネットワーク解析があるが、そのためにもタンパク質の相互作用解析のための手法の開発が必要である。広く使用されている分子認識能によるタンパク質の選抜方法としては、ファージディスプレイ法があるが、大きなライブラリーを扱えないこと、ファージの表面で構造をとらせながら提示するプロセスが、アミノ酸配列により影響を受けるなどの問題がある。それに対して、無細胞タンパク質合成系でポリペプチド鎖をリボソーム上に提示し、リガンドに結合した mRNA-リボソーム-ポリペプチド複合体から mRNA を回収するリボソームディスプレイ法が提案された (図 5a)^{16,17)}。しかし、ファージディスプレイ法に比べより理想に近いと考えられたにも関わらず、成功例はほとんどなかった。その理由は、主には無細胞タンパク質合成

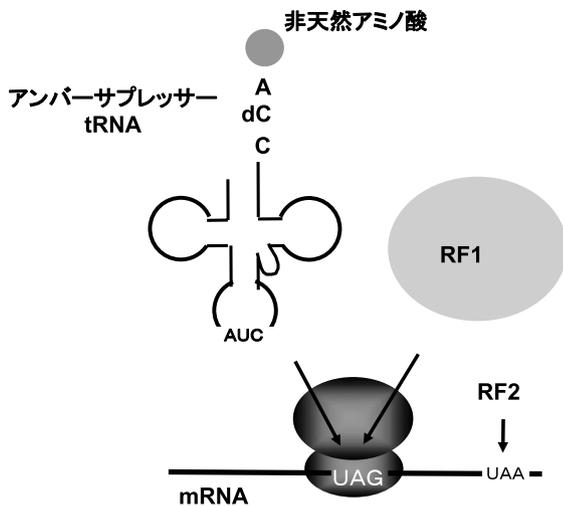


図 4a アンバーサプレッサー tRNA を用いた非天然アミノ酸の導入法。抽出液を用いた場合は、RF1 とサプレッサー tRNA の競合は避けられない。

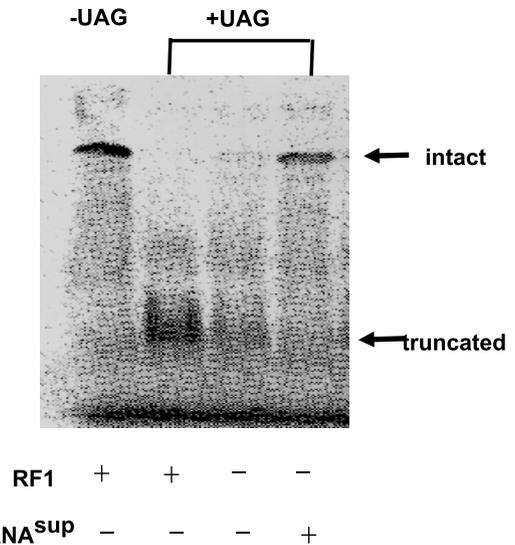


図 4b PURE system に RF1 を添加しないことで、ほぼ 100% のサプレッションを実現。

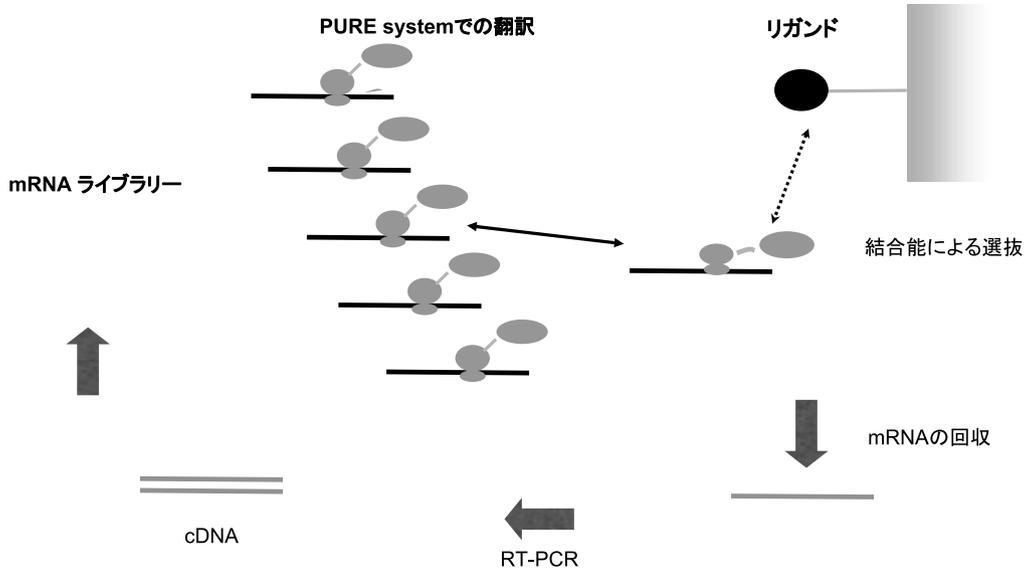


図5a リボソームディスプレイ法の原理.

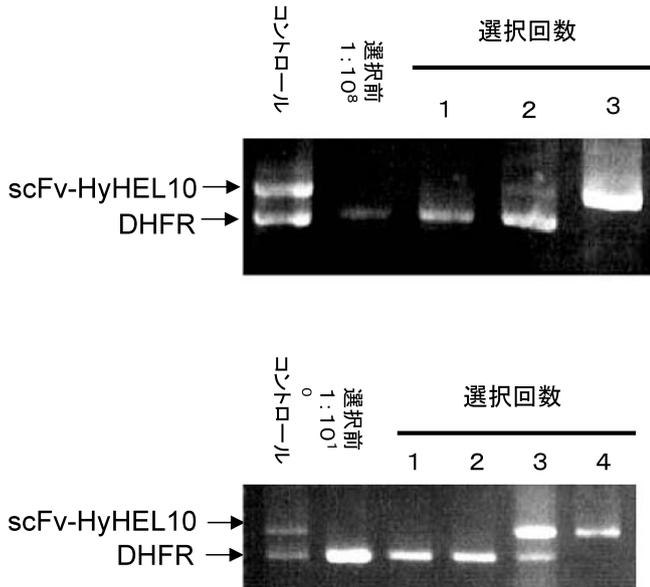


図5b PURE system を用いたリボソームディスプレイ法の例. 10⁸ や 10¹⁰ の競合 mRNA から選抜を繰り返すことで, 目的の scFv の mRNA を選抜した.

系に内在するヌクレアーゼによる mRNA の分解や, tmRNA などによる mRNA-リボソーム-ポリペプチド複合体の不安定化によるものと考えられていた. 繰り返すようであるが, PURE system では, こうした mRNA-リボソーム-ポリペプチド複合体を不安定化する因子は含まないため, 再現性の高いリボソームディスプレイ法が実現されるはずである.

この期待から, PURE system を用いたリボソームディスプレイ法の検討を行った. モデル分子として抗体の V_H と V_L をリンカーでつないだ一本鎖抗体 scFv を用いて抗原に対して選抜を行った. その結果, mRNA の回収率が飛躍

的に向上し, また 1 サイクルでの濃縮効率も 1 万倍以上であった. 競合する mRNA が 10⁸ から 10¹¹ 倍混在している場合でも, 目的とする scFv の mRNA を 3~5 回程度のサイクルで選抜することが可能であることが示された (図 5 b)¹⁸⁾. 他のグループも PURE system によるリボソームディスプレイ法の報告を始めている^{19,20)}. このように PURE system を用いることで, 確実性の高いリボソームディスプレイ法が実現しつつある. リボソームディスプレイ法は, フェージディスプレイ法や yeast two-hybrid 法に比べ, 大きなライブラリーを扱えるだけでなく, シンプルかつ迅速な手法である. また, タンパク質の機能とその遺伝型が直接的に連結しているために, 副次的な影響を考慮する必要もない. 今後このリボソームディスプレイ法の有効性をさまざまなタンパク質で検討し, 汎用性のある基盤技術として整備して行く予定である.

7. ま と め

20 世紀の生物学は, 生命現象を分析し, そのメカニズムを担う分子の機能と構造へ迫るといった還元的なアプローチで発展した. しかし, 今筆者らは, ゲノム解析の結果, タンパク質や RNA の一次配列の情報を手にしている. こうした個々の分子の設計図から生命現象の理解を深めるには, 還元的ではなく要素から統合的な理解へと進めることができる学問的技法を確立する必要がある. 情報生命科学では, 計算機科学に基づいて *in silico* でその道筋を作りつつある. 同様に, 実験生命科学の立場では, DNA, RNA, タンパク質の個別の分子を組み上げ, 生命システムを構築するという統合化の研究に重点をおくべきではなからうか. PURE system は, 既知の翻訳因子を混ぜ合わせ, タンパク質が合成されたという, 言ってみれば当たり前の結果

を示したに過ぎない。タンパク質の生産能力の点では、従来の細胞抽出液に比べて、現時点ではそれほど優位性があるわけではない。しかし、本稿では一部を紹介したにすぎないが、その発展性はたいへん高いものと思っている。また、細胞という観点から脱却し、分子から constructive または synthetic に生命現象を創出するという、無細胞生命科学の新たな学問領域の源流となることを切望している。

おわりに

まったく先の見えない研究テーマであるにもかかわらず、精力的かつ献身的に研究を推進した東京大学新領域創成科学研究科分子医科学分野の清水義宏博士を初めとする多くの同僚と、サポートしていただいた共同研究者の皆様にご感謝いたします。

文 献

- 1) Kung, H.F., Treadwell, B.V., Spears, C., Tai, P.C., & Weissbach, H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3217–3221.
- 2) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751–755.
- 3) Shimizu, Y., Kanamori, T., & Ueda, T. (2005) *Methods*, **36**, 299–304.
- 4) Shimizu, Y., Kuruma, Y., Ying, B.W., Umekage, S., & Ueda, T. (2006) *The FEBS Journal*, **273**, 4133–4140.
- 5) Bukau, B. & Horwich, A.L. (1998) *Cell*, **92**, 351–366.
- 6) Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., & Craig, E.A. (2000) *Cell*, **101**, 119–122.
- 7) Ying, B.W., Taguchi, H., Kondo, M., & Ueda, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12035–12040.
- 8) Ying, B.W., Taguchi, H., & Ueda, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21813–21819.
- 9) Kaiser, C.M., Chang, H.C., Agashe, V.R., Lakshminpathy, S.K., Etchells, S.A., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., & Barral, J.M. (2006) *Nature*, **444**, 455–460.
- 10) Koch, H.G., Moser, M., & Muller, M. (2003) *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **146**, 55–94.
- 11) Muller, M. & Blobel, G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81** (23), 7421–7425.
- 12) Muller, M., Koch, H.G., Beck, K., & Schafer, U. (2001) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **66**, 107–157.
- 13) Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Muller, M., & Ueda, T. (2005) *Biotechnol. Prog.*, **21**, 1243–1251.
- 14) Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., & Schultz, P. G. (1989) *Science*, **244**, 182–188.
- 15) Hohsaka, T. & Sisido, M. (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 809–815.
- 16) Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., & Pluckthun, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 75–80.
- 17) Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R., & Dower, W.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9022–9026.
- 18) Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B.W., & Ueda, T. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 270–276.
- 19) Matsuura, T., Yanagida, H., Ushioda, J., Urabe, I., & Yomo, T. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 372–377.
- 20) Villemagne, D., Jackson, R., & Douthwaite, J.A. (2006) *J. Immunol. Methods*, **313**, 140–148.