

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4475826号  
(P4475826)

(45) 発行日 平成22年6月9日(2010.6.9)

(24) 登録日 平成22年3月19日(2010.3.19)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	14/195	(2006.01)	C O 7 K 14/195
C 1 2 R	1/01	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
			C 1 2 R 1:01

請求項の数 4 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2001-11379 (P2001-11379)  
 (22) 出願日 平成13年1月19日(2001.1.19)  
 (65) 公開番号 特開2002-209588 (P2002-209588A)  
 (43) 公開日 平成14年7月30日(2002.7.30)  
 審査請求日 平成19年11月30日(2007.11.30)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成12年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(73) 特許権者 000002174  
 積水化学工業株式会社  
 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (72) 発明者 吉田 尊雄  
 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所 釜石研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の安定化方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

古細菌由来の シャペロニンホモオリゴマー及びAMP-PNPを用いて、該 シャペロニンホモオリゴマーの空洞内部に天然型タンパク質分子を継続して保持させることを特徴とするタンパク質の安定化方法。

【請求項2】

古細菌由来の シャペロニンホモオリゴマーが、好熱性古細菌又は超好熱性古細菌由来のシャペロニンホモオリゴマーである請求項1に記載のタンパク質の安定化方法。

【請求項3】

タンパク質の安定化が、タンパク質の熱変性に対する安定化である請求項1又は2に記載のタンパク質の安定化方法。

【請求項4】

タンパク質の安定化が、タンパク質の酵素的分解に対する安定化である請求項1又は2に記載のタンパク質の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、天然型タンパク質を熱などの環境ストレスによる変性から防ぎ、安定な状態に保持する方法に関する。

【0002】

10

20

## 【従来の技術】

タンパク質は複数のアミノ酸がペプチド結合により連なったポリペプチドである。タンパク質がその特性を発現するためには分子内または分子間の相互作用により形成される特有の三次構造（立体構造）が重要である。一般に天然型タンパク質は熱などの環境的ストレスを加えると、その立体構造が変化し、その特性が不可逆的に消失してしまう場合が多い（変性型タンパク質）。従って、このような環境変化に対し、天然型タンパク質をいかに安定な状態に保つか、タンパク質を扱う上で常に課題として挙げられている。

## 【0003】

上記問題点の解決策としてこれまで精力的に研究がなされ、さまざまな改善案が提案されている。近年、タンパク質の立体構造形成及び構造変化に関与する因子として分子シャペロンに関心が高まっている。分子シャペロンの一つであるシャペロニン、熱ショックタンパク質の一群であり、細胞が温度変化など様々な環境ストレスにさらされた際に菌体内に蓄積される。これらは真正細菌、古細菌、真核生物を問わず広く存在しており、タンパク質の種類を選ばず、非特異的にタンパク質の立体構造形成に関与することが明らかにされている。特に真正細菌から生産されるシャペロニンとしてGroELが良く知られている。例えば大腸菌のGroELは7個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計14サブユニットからなる特徴的な構造を有している。GroELは、ドーナツ構造の空洞部に変性タンパク質を捕捉し、ATPなどのヌクレオチドの加水分解と、補助因子であるGroESの結合に伴って、効率的に正しい立体構造のタンパク質へと折り畳むことが知られている。このシャペロニンをタンパク質の安定化に応用する試みがいくつかなされている。例えば特開平7-67641号公報には「酵素含有溶液にシャペロニンタンパク質及びATPなどのヌクレオチドを含有せしめ、溶液中の酵素を安定化する方法」が提案されている。また特開平7-48398号公報には、「化学的に変性された不活性タンパク質、遺伝子操作等で使用された形質転換体の中に蓄積された不活性なタンパク質などを活性タンパク質に再生させることを目的として、サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) より精製したシャペロニンを用いる方法」が提案されている。

## 【0004】

これらはいずれもシャペロニンが有するタンパク質の立体構造形成作用を利用したものであり、熱や変性剤によって立体構造が変形した際、タンパク質のポリペプチド鎖を本来の立体構造に巻き戻す（折り畳む）作用により、目的を達成するものである。

## 【0005】

しかしながら、シャペロニンは一般的にATP（アデノシン-5' 三リン酸）、CTP（シチジン-5' 三リン酸）、GTP（グアノシン-5' 三リン酸）、UTP（ウリジン-5' 三リン酸）といったヌクレオチドの加水分解反応を伴って折り畳み反応が進むため、タンパク質の安定化のためには高価なヌクレオチドを随時供給する必要があった。また、これらのヌクレオチドは熱や、加水分解反応に伴うpH変化によって自己分解しやすく経済性に欠けた。さらに、これらの方法では、シャペロニンによっていったん折り畳まれた天然型タンパク質はシャペロニン空洞から放出されるため、再度変性する危険があった。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題に鑑み、ヌクレオチドを随時供給することなく、シャペロニンを使って有用なタンパク質を安定化させ、その特性を効果的に利用する方法を提供することを目的とする。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

通常、変性したタンパク質がヌクレオチドの加水分解と共役してシャペロニン内部で折り畳まれた後には、天然型として空洞部から放出され、再度、タンパク質は変性の危険にさらされることになる。しかし、本発明者が随意検討した結果、折り畳み反応において、ヌクレオチドの代わりにヌクレオチドアナログを用いたところ、ヌクレオチドアナログがシャペロニンのヌクレオチド反応部位に結合することによって、変性タンパク質がシャペロ

10

20

30

40

50

ニン空洞部で折り畳まれ、天然型に変換された後も、シャペロニン内部に継続して捕捉されることを見だし、本発明を完成させた。

即ち、本発明は、グループ2型シャペロニン分子の空洞内部に天然型タンパク質分子を継続して保持することを特徴とするタンパク質の安定化方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

シャペロニンは真正細菌に由来するグループ1型と、古細菌または真核生物に由来するグループ2型の2種類に分類される(Kim et al. Trends Biochem. Sci. 543-548, 1994)

。本発明ではグループ2型に属するシャペロニンをを用いる。グループ1型に分類されるシャペロニンは、大腸菌由来GroELに代表されるように、その折り畳み反応には補助因子として10kDaサブユニット6量体であるGroESの結合を必要とする。熱などによって変性したタンパク質がシャペロニンによって折り畳まれる際、シャペロニンのドーナツ構造の空洞部に変性タンパク質を捕捉するが、グループ1型シャペロニンの場合、GroESがシャペロニン空洞部を閉蓋するため、例えば酵素をシャペロニン内部に捕捉した場合、該酵素と基質分子が反応することはできない。それに対し、グループ2型シャペロニンはTF55に代表されるように、55-60kDaのサブユニットのみでオリゴマーを形成し、GroESの様な補助因子なしで折り畳み活性を示す。そのため、グループ2型シャペロニンの場合、シャペロニン空洞部と外部の間で低分子化合物の行き来が可能であるため、シャペロニン空洞部で、例えば酵素反応における物質変換のような、タンパク質本来の特性を発揮することが可能となる。通常、グループ2型シャペロニンが変性タンパク質を捕捉し、反応液に共存するヌクレオチドの加水分解がなされると、シャペロニンの4次構造が変化し、巻き戻されたタンパク質は分子空洞部から放出されてしまう。天然型タンパク質をシャペロニン空洞部に継続して捕捉しておくことは、従来用いられるATPやGTP,UTP,CTPなどのヌクレオチドの代わりに、それらのホモログを用いることで達成される。ヌクレオチドホモログは一度シャペロニン分子のヌクレオチド反応部位に結合すると、加水分解することが無いので、シャペロニンの構造変化が伴わず、折り畳まれたタンパク質はシャペロニン空洞部にとどまったままとなる。具体的には、変性したタンパク質を溶液中でシャペロニンに捕捉させておき、ヌクレオチドホモログを添加することで、シャペロニン内部で折り畳み反応が行われる。ヌクレオチドホモログはシャペロニンには結合するが、加水分解することはないので、折り畳まれた天然型タンパク質は天然型のままシャペロニン空洞部にとどまり、外部に放出されることはない。

【0009】

本発明で用いられるヌクレオチドアナログは、シャペロニンのヌクレオチド反応部位に結合し、解離しないものが用いられる。一例として、AMP-PNP(5'-adenylylimido-diphosphate)、GMP-PNP(5'-guanylylimido-diphosphate)、CNP-PNP(5'-cytidylylimido-diphosphate)、UMP-PNP(5'-uridylylimido-diphosphate)などが好適に用いられる。特に望ましいのはAMP-PNPであるがこれに限定されるものではない。

【0010】

シャペロニンには、真核生物、真正細菌及び古細菌由来のものが考えられるが、本発明で用いられるシャペロニンは、古細菌または真核生物に由来するグループ2型のシャペロニンであれば、どのシャペロニンも用いることが可能である。古細菌由来のシャペロニンは構成するシャペロニンモノマーの種類が1-3種類と少ないので、シャペロニンを大腸菌などを使った遺伝子組み換え技術で大量に生産する場合、利便性に優れる。特に好熱性または超好熱性古細菌由来のシャペロニンは、シャペロニン分子自身の耐熱性に優れるため、シャペロニンに捕捉されたタンパク質も熱ストレスから効果的に保護されるので、好適に用いることができる。本発明で言う、好熱性菌とは至適生育温度が45 - 80 である微生物を指し、超好熱性菌とは80 以上で生育するものである。

【0011】

本発明で用いられる古細菌は、アシディアヌス(Acidianus)属、メタロスファエラ(Metall

10

20

30

40

50

osphaera) 属、スティジオロバス(*Stygiolobus*) 属、スルフォロバス(*Sulfolobus*) 属、スルフロコッカス(*Sulfurococcus*) 属及びスルフルリスファエラ(*Sulfurisphaera*) 属などのスルフォロバレス(*Sulfolobales*) 目、アエロパイラム(*Aeropyrum*) 属、デスルフロコッカス(*Desulfurococcus*) 属、ステッテリア(*Stetteria*) 属、スタフィロサーマス(*Staphylothermus*) 属、サーモディスクス(*Thermodiscus*) 属、イグネオコッカス(*Igneococcus*) 属、サーモスファエラ(*Thermosphaera*) 属及びスルフォフォボコッカス(*Sulfophobococcus*) 属、ハイパーサーマス(*Hyperthermus*) 属、パイロディクティウム(*Pyrodictium*) 属及びパイロロバス(*Pyrolobus*) 属などのイグネオコッカレス(*Igneococcales*) 目、パイロバキュラム(*Pyrobaculum*) 属、サーモプロテウス(*Thermoproteus*) 属、サーモフィラム(*Thermofilum*) 属及びカルドコッカス(*Caldococcus*) 属などのサーモプロテアレス(*Thermoproteales*) 目、アーキオグロブス(*Archaeoglobus*) 属及びフェログロブス(*Ferroglobus*) 属などのアーキオグロバレス(*Archaeoglobales*) 目、メタノサーマス(*Methanothermus*) 属、メタノバクテリウム(*Methanobacterium*) 属、メタノサーモバクター(*Methanothermobacter*) 属及びメタノスファエラ(*Methanosphaera*) 属などのメタノバクテリアレス(*Methanobacteriales*) 目、メタノコッカス(*Methanococcus*) 属、メタノサーモコッカス(*Methanothermococcus*) 属、メタノカルドコッカス(*Methanocaldococcus*) 属及びメタノイグニス(*Methanoignis*) 属などのメタノコッカレス(*Methanococcales*) 目、メタノマイクロバイアレス(*Methanomicrobiales*) 目、メタノザルチナ(*Methanosarcina*) 属などのメタノザルチナレス(*Methanosarcinales*) 目、メタノピラレス(*Methanopyrales*) 目、パイロコッカス(*Pyrococcus*) 属及びサーモコッカス(*Thermococcus*) 属などのサーモコッカレス(*Thermococcales*) 目、サーモプラズマ(*Thermoplasma*) 属及びピクロフィラス(*Picrophilus*) 属などのサーモプラスマレス(*Thermoplasmatales*) 目などが挙げられる。本発明に用いられるシャペロニンはいずれの古細菌由来のものも利用可能であり、これに限定されるものではないが、このうち好熱性または超好熱性古細菌由来のものが好適である。

#### 【0012】

本発明で安定化できるタンパク質は、シャペロニン分子の空洞部に捕捉される必要があるため、その分子量が約60 kDa以下であることが望ましい。

本発明で用いられるシャペロニンを得るためには、好熱性古細菌または超好熱性古細菌を培養し、得られた菌体をSDSなどの菌可溶化剤を用いて溶菌後、フェノール抽出及びエタノール沈殿法などの手法により、ゲノムDNAを抽出する。本ゲノムDNAを適当な制限酵素で切断後、適当なベクターに連結し、ゲノムDNAライブラリーを作製する。ベクターにはファージ由来の各種ベクター例えば gt10や ZAPなどのファージミドDNA、あるいはpUC18やpBR322等のプラスミドベクターを用いることができる。一方、別の生物種由来のシャペロニン遺伝子間でホモロジーの高い領域のアミノ酸配列をもとに、それに相当するDNAを合成しPCRに用いるプライマーとする。本プライマーを用いて上記ゲノムDNAを鋳型とするPCRを行えば、目的の遺伝子の部分断片を得ることができる。上記部分断片は<sup>32</sup>Pなどの放射性元素や、ジコキシゲニンなどの非放射性化合物で標識することにより、遺伝子スクリーニングのプロープとして用いることができる。

#### 【0013】

目的の遺伝子の全塩基配列を得るためには上記ゲノムDNAライブラリーを、大腸菌などの宿主に導入しておき、ラベル化した上記プロープと強く結合するクローンを選択すればよい。塩基配列の決定はサンガー法やマクサム-ギルバート法といった一般的な方法によって決定することができる。以上の手順により、翻訳開始コドンから終止コドンを含むシャペロニンをコードする全DNA塩基配列を単離することができる。上記操作により、単離したシャペロニンをコードするDNAは適宜pETシステムなどの発現ベクターに挿入し、微生物や培養細胞に導入して発現させることにより、目的のシャペロニンを大量調製することが可能である。

#### 【0014】

変性したタンパク質をシャペロニンに捕捉するためには、変性タンパク質1に対し、シャペロニンオリゴマーを0.1-10の混合比率で溶液中に混ぜておけばよい。好ましくは変性タ

10

20

30

40

50

ンパク質1に対し、シャペロニンオリゴマー0.5-2の混合比率が良い。反応溶液の組成はいずれの緩衝液でも用いることが可能であるが、望ましくはカリウムイオン、マグネシウムイオンを加えておくことが望ましい。カリウムイオンの濃度範囲は10-1000 mM、マグネシウムイオンは10-500mMが好適である。

【0015】

変性タンパク質をシャペロニンで捕捉した後、ヌクレオチドアナログを加えることでシャペロニン空洞部に捕捉されたタンパク質が天然型に折り畳まれるが、ヌクレオチドを加えた場合のように、シャペロニン外部に放出されることはない。ヌクレオチドアナログの添加量は0.1-10 mMが望ましい。

【0016】

グループ2型シャペロニン空洞部に捕捉された天然型タンパク質は、グループ1型シャペロニンで捕捉された場合のように外部と隔離されておらず、空洞部と外部の物質移動が可能な環境となっているため、通常のタンパク質と同様の使い方ができる。好熱性古細菌及び超好熱性古細菌から得られたシャペロニンは耐熱性に優れるため、内部に捕捉された天然型タンパク質も耐熱性が付与される。従って、高温などのストレス環境下での反応が可能となるだけでなく、運搬、保存などの際有利である。

【0017】

【実施例】

以下、実施例により、本発明を説明するが、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

〔実施例1〕 超好熱性古細菌のシャペロニンの調製

超好熱古細菌サーモコッカスsp.KS-1株由来の シャペロニンホモオリゴマーを特開平10-327869号公報記載の方法に従い調製した。

【0018】

サーモコッカスsp.KS-1株の菌体0.6gを10mlのTNE緩衝液(20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM NaCl, 20mM EDTA)に懸濁した。10% SDS溶液と1%トリトンX-100 溶液を各々1mlずつ添加し、4 で一晩放置した。ついで温度を50 にしてプロテイナーゼK溶液(20mg/ml)を0.05ml添加し4時間振盪した。フェノール処理、クロロホルム処理後、RNase A溶液(0.5mg/ml)を0.05 ml添加し、37 で1時間放置した。再び10% SDS溶液を1 ml、プロテイナーゼK溶液(20mg/ml)を0.05ml添加し50 で70分放置した。フェノール処理、クロロホルム処理後(溶液量10ml)、1mlの3Mの酢酸ナトリウム溶液(pH 5.2)、25mlのエタノールを添加し、-20 で2時間放置した。その後高速遠心機で遠心しDNAを沈殿させ、70%エタノール溶液 3mlで沈殿を洗浄、遠心エバポレーターで乾固させて、TE緩衝液 0.5mlに溶解した。この操作により約 2mgのゲノムDNAが得られた。

【0019】

古細菌のシャペロニンのアミノ酸相同領域から以下のDNAプライマーを合成した。

**Forward: 5'-CCAAGCTTACNAT(A/T/C)ACNAA(T/C)GA(T/C)GGNGCNACNAT-3'**

**Reverse: 5'-ATCTGCAGGA(C/T)TT(C/T)TTNACNC(G/T)NC(G/T)NACNGC -3'**

【0020】

サーモコッカスsp. KS-1 株のDNAを鋳型としてPCR amplification kit (宝酒造)を用いたPCRを行った。条件は、初期変性94 3分、ついで変性(94 1分)、アニーリング(55 1分)、伸長(72 1分)のサイクルを30回行った。約800bpの増幅DNA断片をpUC18に連結し、コンピテントセルE. coli DH5 を用いて形質転換した。陽性クローンを選択し、挿入断片のあることを確認後、2xYT培地(0.05mg/mlのアンピシリンを含む)に植菌し、一晩37 で振盪培養した。培養液を遠心分離して集菌後、プラスミドDNAを調製した。1サンプルあたり200ngのDNAを鋳型としてシークエンス反応を行い、DNAシークエンサー(ALF DNA sequencer II, ファルマシア)により塩基配列を決定した。その結果、サブユニット遺伝子と相同性の高い断片が得られた。この断片をECL random prime labelling and detection system(アマシャム)を用いてランダムプライマーによりラベルし、プ

10

20

30

40

50

ローブとした。一方、HindIIIで切断したゲノムDNAを用いてサザンブロッティングを行った。

#### 【0021】

上記断片と反応した8kbpのバンドの位置のDNAをゲルから抽出し、pUC18に連結し、このDNAの塩基配列を決定した。

決定した塩基配列からシャペロニン サブユニット遺伝子の開始コドン及び終止コドンの位置を特定した。開始コドンを含む領域をNdeI認識部位に、終止コドンを含む領域をBamHI認識部位にPCRを用いて改変した後、ORFを含む領域を市販の発現ベクターpET21a（東洋紡）に組み込み、発現プラスミドpK1E を作製した。

#### 【0022】

上記発現用プラスミドをそれぞれ宿主大腸菌*E. coli* BL21(DE3)に導入し、2 × YT（アンピシリンまたはカナマイシンを含む）で37 °Cで培養した。菌体を遠心分離によって回収し、緩衝液（50 mM Tris-HCl pH7.5, 25 mM 塩化マグネシウム）に懸濁し、超音波破碎を行った。debrisを除いたのち、70 °C 30分保温し、変性した大腸菌由来のタンパク質を沈殿除去した。その上澄に硫酸アンモニウムを30%飽和になるよう添加後、Ether-toyopearlカラム（東ソー）に吸着させ、30%~0%の直線濃度勾配により溶出した。シャペロニンタンパク質を含む画分を集め、透析後 Resource-Qカラム（ファルマシア）にかけ、0~0.5 MのNaClの直線濃度勾配により溶出した。シャペロニンタンパク質を含む画分を集め、Cetiprep 30（アミコン）で濃縮し、ゲル濾過（Shodex PROTEIN KW803、昭和電工）を行い、精製シャペロニン サブユニットを得た。

#### 【0023】

〔実施例2〕 AMP-PNP依存の シャペロニンホモオリゴマーによる緑色蛍光蛋白質の安定化

AMP-PNP依存の シャペロニンホモオリゴマーによる緑色蛍光蛋白質（Green fluorescent Protein; 以下、「GFP」と略す）の熱安定化の結果を図1に示した（図1, ○）。GFPは、分子量約2万7千の単量体で緑色の蛍光を発するクラゲ由来の蛋白質である。GFPを変性させ、シャペロニンを含む溶液に希釈し、60 °Cでの安定化実験を行った。GFPの変性は、GFP溶液に塩酸を0.0125mM、DTTを5mMとなるように添加し、GFP濃度は、10 μMとなるように調製し変性させた。変性させたGFPは、あらかじめ60 °Cに加熱保温しておいた シャペロニンホモオリゴマーをGFPと等量もしくはそれ以上含む再生バッファ（50 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5 mM DTT）に300倍希釈した。GFPの折り畳みは、蛍光光度計を用いて、励起光396nmをあて、蛍光510nmを径時的に追跡した。変性GFPを、シャペロニンホモオリゴマーを含む溶液に希釈した場合、GFPの蛍光は全く回復されていない。これは、 シャペロニンホモオリゴマーにより変性GFPが捕捉された結果、GFPが正常な立体構造を形成できなくなったためと考えられる。 シャペロニンホモオリゴマーが変性GFPを捕捉している状態に、AMP-PNPを添加すると、GFPの蛍光は急速に回復し、その後一定に保たれた。これは、 シャペロニンホモオリゴマーとAMP-PNPにより捕捉されたGFPがシャペロニン空洞内部で折り畳まれ、正常な立体構造を形成していることを示している。また、蛍光が一定であることから、シャペロニン空洞内部にGFPが折り畳まれ、そのまま保護されているため、GFPは、熱などによる変性が防がれ、安定化されていることを示している。

#### 【0024】

##### 〔比較例1〕

AMP-PNPと シャペロニンホモオリゴマーを添加しなかったこと以外は実施例2と同様にした。その結果を図1に示した（図1, ×）。 シャペロニンホモオリゴマーとAMP-PNPを含まない再生バッファに希釈した場合、急速に蛍光が生じる。しかし、 シャペロニンホモオリゴマー及びAMP-PNPを含まないため安定化されず、GFPの熱変性が生じその蛍光が少しずつ減少する。

#### 【0025】

〔実施例3〕 ゲル濾過によるAMP-PNP依存の シャペロニンホモオリゴマーによる緑色

10

20

30

40

50

### 蛍光蛋白質の安定化の解析

実施例 2 と同様に反応させた再生溶液を100  $\mu$ l 分取し、ゲル濾過分析にかけた。その結果を図 2 に示した。ゲル濾過バッファは、50 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> とし、流速0.5ml/minで流した。ゲル濾過カラムはG3000SWxL (東ソー) を用い60 に加熱保温しながら解析を行った。蛋白質の検出には、紫外光280nmの吸収 (黒線) とGFP蛍光 (励起光398nm蛍光510nm) (灰色線) をリアルタイムで測定した。その結果、シャペロニンホモオリゴマーに相当する紫外吸収のピークとGFPの蛍光ピークが一致する挙動を示した。これは、シャペロニンホモオリゴマーとAMP-PNPにより、捕捉されたGFPがシャペロニン空洞内部に保持されていること示している。

【0026】

〔比較例 2〕

AMP-PNPの代わりにATPを用いたこと以外は実施例 2 と同様である。結果を図 3 に示した。AMP-PNPの代わりにATPを用いた場合には、シャペロニンホモオリゴマーに相当する紫外吸収のピークとGFPの蛍光ピークが一致する結果は得られない。これは、GFPがシャペロニンホモオリゴマーの空洞内部に保持されず、溶液中に放出されることを示している。

【0027】

〔実施例 4〕 プロテアーゼによるAMP-PNP依存の シャペロニンホモオリゴマーによる緑色蛍光蛋白質の安定化の解析

実施例 2 と同様に反応させた再生溶液にプロテアーゼを添加し、プロテアーゼ耐性を分析した。その結果を図 4 に示した。プロテアーゼは、サーモリシン (和光純薬) を1ng/ $\mu$ l 濃度とリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬) を10ng/ $\mu$ l 濃度になるように再生溶液添加し、60 で10分間反応させた。反応後、ただちにSDS-PAGEバッファを等量加え、95 5分間インキュベートし、20  $\mu$ l 分を15% SDS-PAGEにかけた。電気泳動後、分離された蛋白質はPVDF膜に転写し、GFPはウエスタンブロッティングにより検出した。まず、PVDF膜をブロックエース (大日本製薬) に浸し、1時間室温で放置した。次にPVDF膜を抗GFPウサギ抗体 (ノバジェン) に浸し、1時間、室温に放置した。放置後、PBSバッファ (8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) にて10分間3回洗浄した。次にホースラディッシュペルオキシダーゼラベルされた抗ウサギIgG抗体 (パイオラッド) にPVDF膜を浸し、1時間室温に放置した。放置後、PBSバッファにて10分間3回洗浄した。抗体は発色液 (0.2 mg/ml of diaminobenzidine, 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に浸して染色した。

【0028】

シャペロニンホモオリゴマーのみ及び シャペロニンホモオリゴマーとATPを用いた場合には (図 4、レーン 1、2、5、6)、プロテアーゼ処理するとGFPのバンドは薄くなり、プロテアーゼにより分解されてしまう (図 4、レーン 2 及びレーン 6)。一方、シャペロニンホモオリゴマーとAMP-PNPを含む場合には (図 4、レーン 3、4)、プロテアーゼ処理後もGFPのバンドは残り、プロテアーゼによる分解がされていない (図 4、レーン 4)。これは、シャペロニンホモオリゴマーとAMP-PNPにより、捕捉されたGFPがシャペロニン空洞内部に保持され、プロテアーゼによる分解を受けず、安定に存在していることを示している。

【0029】

【発明の効果】

本発明により、熱などによるタンパク質の変性を抑制し、長期間タンパク質を安定に機能させることができる。また、熱に対して不安定なタンパク質の耐熱性を向上させることが可能となる。本発明を応用することで、変性タンパク質の再生、タンパク質試薬の安定化、高温での酵素反応などが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 GFPの蛍光強度の経時的変化を示す図である。

【図 2】 GFP、シャペロニンオリゴマー、及びAMP-PNPを含む溶液のゲル濾過分析の結果を示す図である。

10

20

30

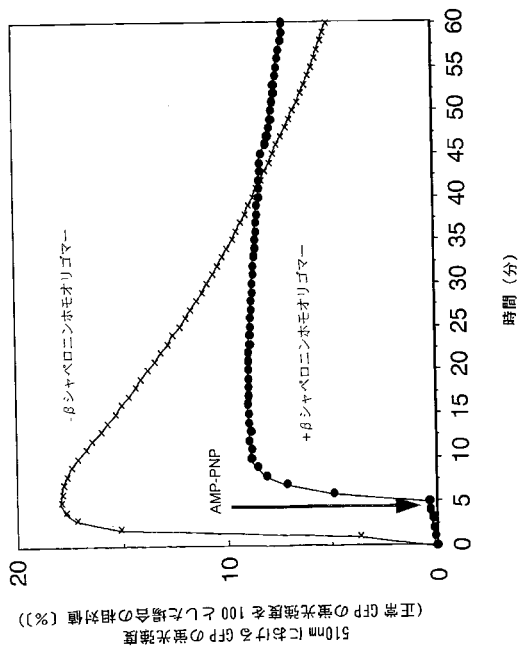
40

50

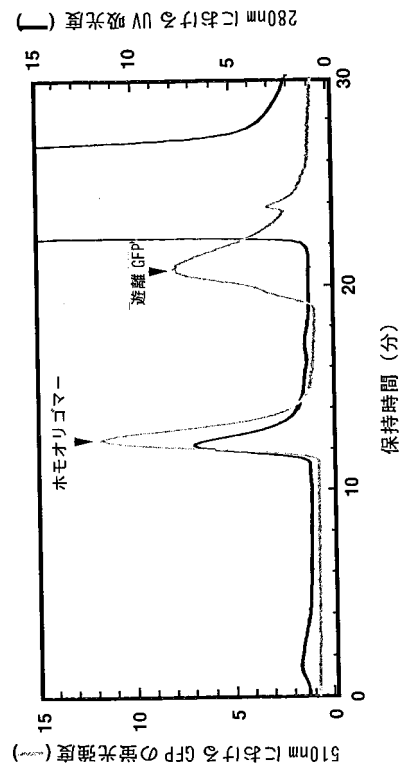
【図3】 GFP、 シャペロニンオリゴマー、及びATPを含む溶液のゲル濾過分析の結果を示す図である。

【図4】 シャペロニンオリゴマー等の存在する条件下で、GFPにプロテアーゼを作用させた場合の電気泳動の結果を示す図である。

【図1】

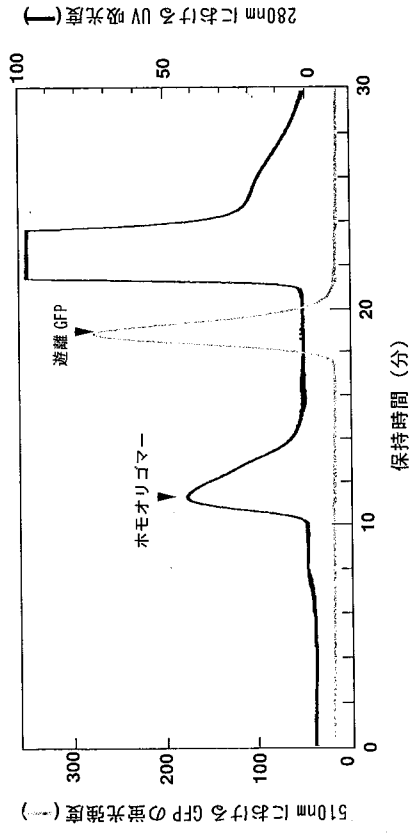


【図2】

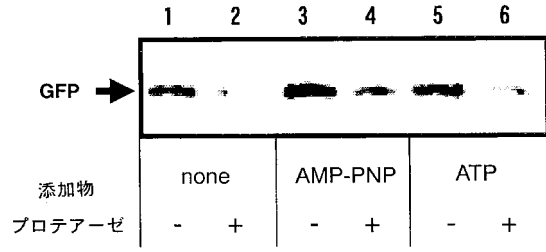




【図3】



【図4】



---

フロントページの続き

(72)発明者 川口 利華

岩手県気仙郡三陸町越喜来字烏頭160番4号 北里大学 水産学部内

(72)発明者 井手野 晃

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所 釜石研究所内

(72)発明者 丸山 正

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所 釜石研究所内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特開2000-083673(JP,A)

特開平11-302297(JP,A)

Journal of Molecular Biology, 2000年, Vol.299, p.1399-1400

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N1/00-15/90

C07K1/00-19/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

Pubmed