

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3636867号

(P3636867)

(45) 発行日 平成17年4月6日(2005.4.6)

(24) 登録日 平成17年1月14日(2005.1.14)

(51) Int. Cl.⁷C07K 14/435
// C12N 9/02

F I

C07K 14/435
C12N 9/02

請求項の数 7 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平9-219375	(73) 特許権者	000004477
(22) 出願日	平成9年8月14日(1997.8.14)		キッコーマン株式会社
(65) 公開番号	特開平10-114794		千葉県野田市野田250番地
(43) 公開日	平成10年5月6日(1998.5.6)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成13年10月10日(2001.10.10)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	60/024, 671	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成8年8月22日(1996.8.22)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	梶山 直樹
			千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内
		審査官	鈴木 恵理子
		(56) 参考文献	Tetrahedron Letters, No.32(1974), p.2771-2774
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルシフェリンの再生に係わる蛋白質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発光能力を有する甲虫類からの抽出物をクロマトグラフ処理工程を含む精製工程により精製して得られる蛋白質であって、SDS-PAGEでの分子量が40,000、反応至適pHがpH7～9、反応至適温度が35～70℃である、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質。

【請求項 2】

発光能力を有する甲虫類由来であり、遺伝子組み換えの手法を用いて生産させた蛋白質であって、SDS-PAGEでの分子量が40,000、反応至適pHがpH7～9、反応至適温度が35～70℃である、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質。

【請求項 3】

発光能力を有する甲虫類が、ホタルであることを特徴とする請求項1または2に記載の蛋白質。

【請求項 4】

発光能力を有する甲虫類が、北米産ホタルであることを特徴とする請求項1または2に記載の蛋白質。

【請求項 5】

発光能力を有する甲虫類が、日本産ホタルであることを特徴とする請求項1または2に記載の蛋白質。

10

20

【請求項 6】

発光能力を有する甲虫類が、ゲンジボタルであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の蛋白質。

【請求項 7】

発光能力を有する甲虫類が、ヘイケボタルであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ルシフェリンの再生に係わる蛋白質に関する。

10

【0002】

【従来の技術】

生物発光は、酵素ルシフェラーゼが発光基質であるルシフェリンの酸化を触媒する反応であり、反応生成物としてオキシルシフェリンを生成する。

このオキシルシフェリンは、ルシフェラーゼの反応を阻害する物質として知られており、そのためルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は反応直後のフラッシュ発光の後、急激に発光が減少することが知られている。

【0003】

従来、オキシルシフェリンに作用し、発光基質であるルシフェリンを再生させる蛋白質は、単離、精製されてないのが実状である。

20

このような蛋白質を見出し、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系に添加すれば、発光持続性の向上が期待でき、また使用するルシフェラーゼ、ルシフェリンの使用量の軽減等につながる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、オキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者は、上記課題について鋭意検討した結果、甲虫類生体内にオキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質が存在することを見出し、該蛋白質を単離、精製することに成功した。

30

【0006】

すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

(1) オキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質。

(2) 発光能力を有する生体からの抽出物をクロマトグラフ処理工程を含む精製工程により精製して得られる、オキシルシフェリンと D-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質。

【0007】

40

(3) 発光能力を有する生体が、甲虫類であることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

(4) 発光能力を有する生体が、ホタルであることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

(5) 発光能力を有する生体が、北米産ホタルであることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

【0008】

(6) 発光能力を有する生体が、日本産ホタルであることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

(7) 発光能力を有する生体が、ゲンジボタルであることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

(8) 発光能力を有する生体が、ヘイケボタルであることを特徴とする請求項 2 記載の蛋白質。

50

白質。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本蛋白質を製造する方法としては、如何なる方法でもよく、例えば、以下の方法が挙げられる。

本蛋白質の製造のもととなるものは、本蛋白質を含有するものであれば如何なるものでも良く、例えば、ホタルをはじめとする甲虫類及び一般に市販されているホタルの粗酵素抽出液、さらには遺伝子組み換えの手法を用いて生産させた組み換え体等が挙げられる。

【0010】

10

次いで、本蛋白質を含有するものを、緩衝液中で粉碎、溶菌もしくは溶解させる。

緩衝液としては、本蛋白質を失活させるものでなければ、如何なるものでも良く、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、グリシルグリシン緩衝液等が挙げられる。

【0011】

粉碎方法としては、乳鉢及び乳棒を用いる方法、ホモゲナイザー、ワーニングブレンダー、フレンチプレス等を用いる方法、溶菌方法としては、リゾチーム処理を施す方法等が挙げられる。

【0012】

次いで、粉碎物、溶菌物及び溶解物等より、通常の遠心分離あるいは濾過処理により残さを除去して、粗酵素液を得るか、これに必要により硫酸沈澱法、アルコール沈澱法、アセトン沈澱法等を適宜選択して実施することにより粗酵素粉末を得る。

20

【0013】

上記粗酵素液もしくは粗酵素粉末よりさらに精製酵素標品を得るには、例えば、セファデックス、ウルトロゲルもしくはバイオゲル等を用いるゲル濾過法、イオン交換体を用いる吸着溶出法、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法、ヒドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法、蔗糖密度勾配遠心等の沈降法、等電点の違いによる分離法、アフィニティクロマト法、分子ふるい膜もしくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択して実施することにより、精製された蛋白質標品を得ることが出来る。

【0014】

【実施例】

30

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕

25mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸緩衝液に、100mM塩化ナトリウム、1mMジチオスレイトール及び1mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウムを添加し、さらにグリセロールを10%（W/V）となる如く添加して得た緩衝液A（pH7.0）200mlを用い、ホタル発光器抽出物（firefly lantern extract；SIGMA社製）4gを溶解させた。

【0015】

このようにして得た溶液を、常法により硫酸アンモニウムを用いて塩析し、40～60%飽和で生成した沈澱を20mlの緩衝液Aに溶解させた。

40

次いで、この溶液を、緩衝液Aで平衡化したウルトロゲル（Ultrogel）ACA34（IBF社製）カラム中に通過させてゲル濾過クロマトグラフィーを行い活性画分を得た。

【0016】

このようにして得られた画分を、5mMトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸緩衝液に1mMジチオスレイトール及び1mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウムを添加し、更に5%（W/V）グリセロール及び1mM塩化ナトリウムを添加した緩衝液B（pH6.5）で透析した。

【0017】

得られた溶液を、緩衝液Bで平衡化させたS-セファロース FF（S-Sepharose FF；ファルマシア バイオテック社製）カラムに吸着させ、1～100mMまで塩化ナトリウムに

50

よるリニアグラジエント溶出を行い、活性画分を得た。

【0018】

このようにして得られた活性画分を、緩衝液C（緩衝液Bと同じ組成のpH 8.0の溶液）で透析後、緩衝液Cで平衡化させたイオン交換HPLCカラム（東ソー社製、TSKgel SuperQ-5PW）に吸着させ、1～100mMまで塩化ナトリウムによるリニアグラジエント溶出を行い、活性画分を得た。

【0019】

このようにして得られた活性画分を、緩衝液Aで平衡化させたゲル濾過HPLCカラム（東ソー社製、TSKgel G3000SWXL）に通過させて、純化させることに成功した。

なお、ゲル濾過の通過画分を、Laemmli法（Laemmli, U.K.: Nature, 227, 680, (1970)）により、SDS-PAGEに供したところ、本純化蛋白質の分子量は、約40,000であった。

【0020】

さらに本蛋白質の反応至適pH、反応至適温度は、夫々pH 7～8及び温度35～50℃であった。また、本蛋白質は、50℃、30分の熱処理後においても、80%以上の残存活性を保持していた。

【0021】

〔実施例2〕

緩衝液A 15mlに、ゲンジボタル（西武百貨店より購入）の発光器 200 匹分を添加し、ヒスコトロン〔（株）日音医理科機器製作所製〕を用いて破碎したものを、12,000 r.p.m. で20分間遠心処理し、上清 14mlを得た。

このようにして得た粗酵素溶液を常法により硫酸アンモニウムを用いて塩析し、30～60%飽和で生成した沈澱を、12,000 r.p.m.で10分間遠心分離処理し、その沈澱を20mlの緩衝液Aに溶解させて溶液を得た。

【0022】

次いで、この溶液を、緩衝液Aで平衡化したウルトロゲル（Ultrogel）AcA 34（IBF社製）カラム中に通過させてゲル濾過クロマトグラフィーを行い活性画分を得た。このようにして得られた画分を、緩衝液B（pH 6.5）で透析後、緩衝液Bで平衡化させたS-セファロース FF（S-Sepharose FF；ファルマシア バイオテック社製）カラムに吸着させ、1～100mMまで塩化ナトリウムによるリニアグラジエント溶出を行い、活性画分を得た。

【0023】

このようにして得られた活性画分を、緩衝液C（緩衝液Bと同じ組成のpH 8.0の溶液）で透析後、緩衝液Cで平衡化させたイオン交換HPLCカラム（東ソー社製、TSKgel SuperQ-5PW）に吸着させ、1～100mMまで塩化ナトリウムによるリニアグラジエント溶出を行い、活性画分を得た。

【0024】

このようにして得られた活性画分を、緩衝液Aで平衡化させたゲル濾過HPLCカラム（東ソー社製、TSKgel G3000SWXL）に通過させて、純化させることに成功した。

なお、本蛋白質の反応至適pH、反応至適温度は、夫々pH 7～8及び温度35～50℃であった。また、本蛋白質は、50℃、30分の熱処理後においても、80%以上の残存活性を保持していた。

【0025】

〔実施例3〕

緩衝液A 15mlに、ヘイケボタル（西武百貨店より購入）の発光器 300匹分を添加し、ヒスコトロン〔（株）日音医理科機器製作所製〕を用いて破碎したものを、12,000 r.p.m. で20分間遠心処理し、上清 13mlを得た。

このようにして得られた粗酵素液は、実施例2と同様の操作により純化させることに成功した。

【0026】

なお、本蛋白質の反応至適 pH、反応至適温度は、夫々 pH 8～9 及び温度 50～70℃ であった。また、本蛋白質は、50℃、30分の熱処理後においても、80%以上の残存活性を、60℃、30分の熱処理後においても60%以上の残存活性を保持していた。

【0027】

〔実施例4〕

実施例1により精製した蛋白質のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に及ぼす影響を調べた。0.5μg/ml アメリカボタルルシフェラーゼ 10μl、1mM ルシフェリン 40μl、10mM D-システイン 40μl、活性測定用緩衝液〔25mMグリシルグリシン+5.4mM硫酸マグネシウム、(pH7.8)〕300μlを加えたものに、実施例1により精製した蛋白質10μlを添加した。この溶液中に、10mMATPを100μl注入し、発光量を10秒間隔で1分間測定した結果を表1に示した。なお、蛋白質の代わりに活性測定用緩衝液10μlを添加したものを、コントロールとし、比較した。その結果、本蛋白質を添加することにより、発光持続性が向上することが判明した。

【0028】

【表1】

秒	10	20	30	40	50	60
蛋白質添加(Kcount)	7.9	6.5	6.5	6.5	6.0	6.0
コントロール(Kcount)	5.1	3.7	3.2	3.0	3.0	2.8

【0029】

なお、実施例2及び3により精製した蛋白質においても、同様の効果が確認できた。

活性測定法

活性測定用緩衝液〔25mMグリシルグリシン+5.4mM硫酸マグネシウム、(pH7.8)〕8.5mlに、0.01mM D-システイン1ml及び1mMオキシルシフェリン0.5mlを添加し、基質混合液を作成した。

【0030】

上記混合液100μlに、測定サンプル10μlを加え、37℃で4時間反応させた。この反応液10μlを活性測定用緩衝液200μlに添加した後、ATP、ルシフェラーゼ混合液(10mMATP溶液に、ルシフェラーゼを0.5mg/mlとなるよう添加した溶液)を100μl注入し、発光量を5秒間積算した。

【0031】

【発明の効果】

本発明によれば、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有する蛋白質が提供され、該蛋白質をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系に添加すれば、発光を持続させることができ、また使用するルシフェラーゼ及びルシフェリンの使用量が軽減される。

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C07K 14/435

BIOSIS(DIALOG)