

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4268556号
(P4268556)

(45) 発行日 平成21年5月27日 (2009. 5. 27)

(24) 登録日 平成21年2月27日 (2009. 2. 27)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/447 (2006. 01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 F

GO 1 N 33/483 (2006. 01)

GO 1 N 27/26 3 1 5 H

GO 1 N 33/68 (2006. 01)

GO 1 N 33/483 Z N A F

CO 7 K 14/245 (2006. 01)

GO 1 N 33/68

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

CO 7 K 14/245

請求項の数 11 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-108476 (P2004-108476)
 (22) 出願日 平成16年3月31日 (2004. 3. 31)
 (65) 公開番号 特開2005-84048 (P2005-84048A)
 (43) 公開日 平成17年3月31日 (2005. 3. 31)
 審査請求日 平成16年4月2日 (2004. 4. 2)
 (31) 優先権主張番号 2003-062756
 (32) 優先日 平成15年9月8日 (2003. 9. 8)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 502318478
 コリア アドバンスド インスティテュー
 ト オブ サイエンス アンド テクノロ
 ジィ
 大韓民国、タエジョン、ユソング、クソン
 ドン 3 7 3 - 1
 (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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 s H S P s を含むタンパク質分解防止用組成物およびこれを用いた2次元ゲル電気泳動法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のIbpA；アラビドプシス・サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のsHSPs；ブラジルビゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) 由来のHspB、HspH、HspC、HspF；ブルセラ・スイス (*Brucellaisuis*) 由来のIbpA；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) 由来のsHSPs；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) APS株由来のIbpA；シトラス・トリステザウイルス (*Citrus tristeza virus*) 由来のsHSPs；大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のIbpA、IbpB；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 由来のIbpB；ヒト由来のHsp27、 β -クリスタリン；メタノコッカス・ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) 由来のHSP16.5；メタノピラス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*) 由来のIbpA；マウス由来のHsp25；マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*) 由来のsHSPs；結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のHsp16.3；ピレルラ (*Pirellula*) 種由来のIbpB；ピサム・サチバム (*Pisum sativum*) 由来のHsp18.1；熱帯マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 由来のsHSPs；緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のIbpA；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 由来のIbpA；サッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHsp26；サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 由来のIbpA、IbpB；サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来のIbpA、IbpB；シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) 由来のIbpA；フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 由来のIbpA、IbpB；シノリゾミウム

10

20

・メリロチ (*Sinorhizobium meliloti*) 由来のIbpA；ストレプトコッカス・ヨゲネ (*Streptococcus pyogenes*) 由来のIbpA；ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来のsHSPs；スルホロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来のsHSPs；シネココッカス・バルカナス (*Synechococcus vulcanus*) 由来のHsp16；サーモアナエロバクター・テンコンジェンシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由来のIbpA；サーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*) 由来のIbpA；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のsHSPs、IbpA、IbpB；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のIbpA、IbpBでなる群から選択されたいずれか一つ以上である微小熱ショックタンパク質 (sHSPs) を含有する、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) によるタンパク質分解を防止するための組成物。

10

【請求項2】

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のIbpA；アラビドプシス・サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のsHSPs；ブラジルビゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) 由来のHspB、HspH、HspC、HspF；ブルセラ・スイス (*Brucellais*) 由来のIbpA；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) 由来のsHSPs；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) APS株由来のIbpA；シトラス・トリステザウイルス (*Citrus tristeza virus*) 由来のsHSPs；大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のIbpA、IbpB；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 由来のIbpB；ヒト由来のHsp27、 β -クリスタリン；メタノコッカス・ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) 由来のHSP16.5；メタノピラス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*) 由来のIbpA；マウス由来のHsp25；マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*) 由来のsHSPs；結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のHsp16.3；ピレルラ (*Pirellula*) 種由来のIbpB；ピサム・サチバム (*Pisum sativum*) 由来のHsp18.1；熱帯マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 由来のsHSPs；緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のIbpA；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 由来のIbpA；サッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHsp26；サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 由来のIbpA、IbpB；サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来のIbpA、IbpB；シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) 由来のIbpA；フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 由来のIbpA、IbpB；シノリゾミウム・メリロチ (*Sinorhizobium meliloti*) 由来のIbpA；ストレプトコッカス・ヨゲネ (*Streptococcus pyogenes*) 由来のIbpA；ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来のsHSPs；スルホロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来のsHSPs；シネココッカス・バルカナス (*Synechococcus vulcanus*) 由来のHsp16；サーモアナエロバクター・テンコンジェンシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由来のIbpA；サーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*) 由来のIbpA；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のsHSPs、IbpA、IbpB；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のIbpA、IbpBでなる群から選択されたいずれか一つ以上である微小熱ショックタンパク質 (sHSPs) を含有する、タンパク質分解を防止するための2次元ゲル電気泳動用組成物。

20

30

【請求項3】

タンパク質の混合物に対する2次元ゲル電気泳動法において、タンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) によるタンパク質の分解を防止して、より多くのスポットを有するゲルを得るために、該タンパク質の混合物に、

40

アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のIbpA；アラビドプシス・サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のsHSPs；ブラジルビゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) 由来のHspB、HspH、HspC、HspF；ブルセラ・スイス (*Brucellais*) 由来のIbpA；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) 由来のsHSPs；ブルキネラ・アフィディコラ (*Bruchnera aphidicola*) APS株由来のIbpA；シトラス・トリステザウイルス (*Citrus tristeza virus*) 由来のsHSPs；大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のIbpA、IbpB；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter*

50

pylori) 由来のIbpB; ヒト由来のHsp27、 β -クリスタリン; メタノコッカス・ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) 由来のHSP16.5; メタノピラス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*) 由来のIbpA; マウス由来のHsp25; マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*) 由来のsHSPs; 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のHsp16.3; ピレルラ (*Pirellula*) 種由来のIbpB; ピサム・サチバム (*Pisum sativum*) 由来のHsp18.1; 熱帯マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 由来のsHSPs; 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のIbpA; シュードモナス・ブチダ (*Pseudomonas putida*) 由来のIbpA; サッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHsp26; サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 由来のIbpA、IbpB; サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来のIbpA、IbpB; シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) 由来のIbpA; フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 由来のIbpA、IbpB; シノリゾミウム・メリロチ (*Sinorhizobium meliloti*) 由来のIbpA; ストレプトコッカス・ヨゲネ (*Streptococcus pyogenes*) 由来のIbpA; ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来のsHSPs; スルホロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来のsHSPs; シネココッカス・バルカナス (*Synechococcus vulcanus*) 由来のHsp16; サーマネロバクター・テンコンジェンシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由来のIbpA; サーマプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*) 由来のIbpA; エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のsHSPs、IbpA、IbpB; エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のIbpA、IbpBでなる群から選択されたいずれか一つ以上である微小熱ショックタンパク質 (sHSPs) を加えた後、電気泳動を行うことを特徴とする、2次元ゲル電気泳動法。

10

20

【請求項4】

sHSPsは、大腸菌由来のIbpA、IbpB及びIbpABとシュードモナス由来のIbpA、およびサッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHSP26でなる群から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、請求項3に記載の2次元ゲル電気泳動法。

【請求項5】

sHSPsの量は、タンパク質の混合物100重量部に対し、0.1ないし50重量部であることを特徴とする、請求項3または4に記載の2次元ゲル電気泳動法。

【請求項6】

sHSPsの量は、タンパク質の混合物100重量部に対し、0.5ないし20重量部であることを特徴とする、請求項5に記載の2次元ゲル電気泳動法。

30

【請求項7】

タンパク質の混合物は特定の細胞の全タンパク質であることを特徴とする、請求項3または4に記載の2次元ゲル電気泳動法。

【請求項8】

特定の細胞は、原核細胞または真核細胞であることを特徴とする、請求項7に記載の2次元ゲル電気泳動法。

【請求項9】

特定の細胞は、原核細胞は大腸菌またはシュードモナス属の微生物で真核細胞はヒト由来の細胞であることを特徴とする、請求項8に記載の2次元ゲル電気泳動法。

40

【請求項10】

2次元ゲル電気泳動によるプロテオームの分析方法において、請求項1または2に記載の組成物を用いることを特徴とする方法。

【請求項11】

アグロバクテリウム・ツメファシエンシス (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のIbpA; アラビドプシス・サリアナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のsHSPs; ブラジルビゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) 由来のHspB、HspH、HspC、HspF; ブルセラ・スイス (*Brucella suis*) 由来のIbpA; ブルキネラ・アフディコラ (*Bruchnera aphidicola*) 由来のsHSPs; ブルキネラ・アフディコラ (*Bruchnera aphidicola*) APS株由来

50

のIbpA；シトラス・トリステザウイルス (*Citrus tristeza virus*) 由来のsHSPs；大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のIbpA、IbpB；ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 由来のIbpB；ヒト由来のHsp27、 β -クリスタリン；メタノコッカス・ジャナシ (*Methanococcus jannaschii*) 由来のHSP16.5；メタノピラス・カンドレリ (*Methanopyrus kandleri*) 由来のIbpA；マウス由来のHsp25；マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*) 由来のsHSPs；結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 由来のHsp16.3；ピレルラ (*Pirellula*) 種由来のIbpB；ピサム・サチバム (*Pisum sativum*) 由来のHsp18.1；熱帯マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 由来のsHSPs；緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のIbpA；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 由来のIbpA；サッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHsp26；サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 由来のIbpA、IbpB；サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) 由来のIbpA、IbpB；シェワネラ・オネイデンシス (*Shewanella oneidensis*) 由来のIbpA；フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 由来のIbpA、IbpB；シノリゾミウム・メリロチ (*Sinorhizobium meliloti*) 由来のIbpA；ストレプトコッカス・ヨゲネ (*Streptococcus pyogenes*) 由来のIbpA；ストレプトマイセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) 由来のsHSPs；スルホロバス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来のsHSPs；シネココッカス・バルカナス (*Synechococcus vulcanus*) 由来のHsp16；サーモアナエロバクター・テンコンジェンシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由来のIbpA；サーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*) 由来のIbpA；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のsHSPs、IbpA、IbpB；エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*) 由来のIbpA、IbpBでなる群から選択されたいずれか一つ以上である微小熱ショックタンパク質 (sHSPs) をタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) によるタンパク質分解の阻害剤として用いる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、sHSPs (small heat shock proteins；微小熱ショックタンパク質) を含むタンパク質分解防止用組成物、および2次元ゲル電気泳動用組成物に関する。また、本発明は、sHSPsを用いることを特徴とする改善された2次元ゲル電気泳動 (two-dimensional gel electrophoresis) 法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト遺伝子に対する塩基配列が決定され、数多くの微生物、下等動物、植物の遺伝子情報が毎日増えつつある中で、次世代における研究の中心に浮び上がっているのが、プロテオミクス (proteomics) である。

【0003】

このプロテオミクスは、プロテオーム (proteome) を体系的に研究する学問の領域であって、ゲノム (genome) を研究するゲノミクス (genomics) と区別される。プロテオームとは、特定の条件下でゲノムから発現されるタンパク質の種類および量に関する総体的な情報をいう。つまり、プロテオミクスとは、生命現象に係る細胞や組織内の様々なタンパク質を一遍に分析して同定することである。このようなプロテオーム分析は、ゲノム・プロジェクトやDNAの研究では発見できない結果を提供するので、癌、糖尿病、痴呆、心臓および循環系疾患などのような生活習慣病や精神疾患などの診断用試薬や治療剤の開発に対する研究と共に、臓器移植のような分野に応用しようとする研究が進まれている。

【0004】

現在まで行われているプロテオミクスの研究において、最も広く利用されている核心技术は、2次元ゲル電気泳動法である。該2次元ゲル電気泳動法は、細胞や組織内の総体的なタンパク質を分離し、定量化することのできる最適な方法である。

【0005】

該2次元ゲル電気泳動法は、タンパク質混合物を各タンパク質の等電点 (isoelectric

point ; p I) に従って一次的に展開し、該展開された試料のそれぞれを、垂直方向に、分子量に従って更に一回分離し、該分離された各タンパク質が平面上に 2 次的に分布されるようにする方法である。すなわち、I E F (isoelectric-focusing) 法と、S D S - P A G E (sodiumdodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) 法とを順次に用いるものである。

【0006】

現在、I E F を用いた 2 次元ゲル (2-dimensional gel : 2 D - g e l) が開発されており、常用化された機器が続々と出現して従来の 2 次元ゲルの問題点であった再現性を大幅に向上させた (US6,554,991、US 2002157954、US 2002133300、US 6,416,644、US 6,398,932、WO 02/25259、US2001032786、US 2001023826、US 2001015320、US 6,245,206、US 6,136,173、US 6,123,821、US5,993,627、WO 98/59092、WO 02/90966)。また、2 次元ゲルで個々のタンパク質を染色し、タンパク質分解酵素で切断するというそれぞれの段階が、自動化機器およびコンピュータを用いることによって多くの試料を簡易に処理できるようになった。

10

【0007】

しかし、最初の段階である 2 次元ゲル電気泳動の自動化は未だに実現されていない。また、2 次元ゲル電気泳動の全過程においてタンパク質の損失 (loss) があるので、細胞や組織内の複雑なプロテオームの全てを分析することは不可能であるのが現状である。第一の段階で細胞を溶解 (lysis) すれば、細胞内のプロテアーゼ (protease) が放出すると同時にタンパク質が分解 (degradation) され、全体のタンパク質数が減少してしまう。

20

【0008】

そのため、タンパク質の分離過程において、プロテアーゼの攻撃を抑制するための様々な方法が考案されている：(1) 試料に、強い変性剤 (denaturant) を即時に添加する方法；(2) 低温やアルカリ性 (p H 9 以上) の条件下で試料を用意；および (3) プロテアーゼ阻害剤 (inhibitor) を使用。前記プロテアーゼ阻害剤として、P M S F (phenylmethylethyl-sulphonylfluoride)、A E B S F (aminoethyl benzylsufonyl fluoride or Pefabloc™ SC)、E D T A (ethylenediaminetetraaceticacid)、B e n z a m i d i n e、T L C K (tosyl lysine chloromethyl ketone)、T P C K (tosylphenylalanine chloromethyl ketone) などが用いられている。しかし、このような方法は、タンパク質の分解 (proteolysis) を完全には抑制できず、しかも、タンパク質試料の形態や起源が様々であるので、各々の試料に応じて最適に用意する過程を経験的に決定しなければならない。

30

【0009】

一方、s H S P s は、小さい分子量 (15 ~ 30 k D a) を有する H S P s (heat shock proteins) による熱ショック (heat shock) や、特定タンパク質の過剰産生のようなストレスによって誘導され、タンパク質の変性を防止する役目をする。該 s H S P s は、真核生物 (eukaryote) から原核生物 (prokaryote) に至るまでのすべての生物に、一つ以上存在する。現在まで明らかになっている s H S P s を表 1 に示す。

【0010】

【表 1】

現在まで明らかになっている s H S P s

起源(Origin)	s H S P s
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 (U. Washington)	I b p A
<i>Arabidopsis thaliana</i>	s H S P s
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	H s p B、H s p H、H s p C、 H s p F
<i>Brucella suis</i> 1330	I b p A
<i>Buchnera aphidicola</i> plasmid pBPS1	s H S P s
<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	I b p A
<i>Citrus tristeza</i> virus	s H S P s
<i>Escherichia coli</i> CFT073	I b p A、I b p B
<i>Escherichia coli</i> K12	I b p A、I b p B
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 EDL933	I b p A、I b p B
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	I b p A、I b p B
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	I b p B
Human	H s p 27、 α -クリスタリン、 β -クリスタリン
<i>Methanococcus jannaschii</i>	H S P 16. 5
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	I b p A
Murine	H S P 25
<i>Mycobacterium leprae</i> strain TN	s H S P s
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H S P 16. 3
<i>Pirellula</i> sp.	I b p B
<i>Pisum sativum</i> (pea)	H S P 18. 1
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	s H S P s
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	I b p A
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	I b p A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H S P 26
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	I b p A、I b p B
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	I b p A、I b p B

10

20

30

40

<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	I b p A
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T	I b p A、I b p B
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	I b p A、I b p B
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	I b p A
<i>Sinorhizobium meliloti</i> plasmid pSymA	I b p A
<i>Streptococcus pyogenes</i>	I b p A
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	s H S P s
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	s H S P s
<i>Synechococcus vulcanus</i>	H s p 1 6
<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> strain MB4T	I b p A
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	I b p A
<i>Yersinia pestis</i> KIM	s H S P s、I b p A、I b p B
<i>Yersinia pestis</i> strain C092	I b p A、I b p B

10

該 s H S P s は、進化の過程において保存された区域 (conserved region) を有するので、互いにはほぼ類似した機能を有する。A T P 非依存性 s H S P s は、熱ショックにより変性されたタンパク質と結合して非可逆的にタンパク質の凝集を防ぐ機能をしながら A T P 依存性熱ショックタンパク質と共に変性されたタンパク質を正確にリフォールディングさせて、タンパク質を元の状態に戻す。

20

【0011】

例えば、大腸菌由来の I b p A と I b p B は、熱あるいは酸化剤によるクエン酸シンターゼの凝集を防いで不活性されないように保護すると報告されている (Kitagawa et al., Eur. J. Biochem., 269:2907-17, 2002)。豆由来の H S P 1 8 . 1 は、熱ストレスの時リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (malatedehydrogenase ; MDH) , グリセラルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase ; GAPDH) 等のようなタンパク質の凝集を防ぐ役割をすると報告されている (Lee et al., EMBO J., 16:659-671, 1997)。ブラデルビゾビウム ジャポニクム (*Bradyrhizobium japonicum*) 由来の s H S P s は、熱によるクエン酸シンターゼの凝集を防ぐと報告された (Studerand Narberhaus, J. Biol. Chem., 275:37212-37218, 2000)。人間由来の α -クリスタリンは熱ストレスによって変性された目的タンパク質が透析過程で凝集することを防止して目的タンパク質の正確なリフォールディングを手伝うと報告されている (Horwitz, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10449-10453, 1992)。一方、熱に安定な有機体から精製した P f u - s H S P は熱ストレスの時細胞のタンパク質を保護するため、P C R を行う場合、高温で T a q ポリメラーゼ (Taq polymerase) 及び他の酵素を安定化されると報告された (WO 01/79250 A1)。また、マウス由来の s H S P s 2 5 は診断分析において不安定なタンパク質やペプチドなどを安定化されると報告された (Ehrnsperger et al., Anal. Biochem., 259:218-225, 1998)。しかし、該 s H S P s がタンパク質の分解を防止するということはまだ明らかになっていない。

30

40

【0012】

ここで、本発明者らは、2次元ゲル電気泳動の際にタンパク質が分解されることを防止する方法を開発するために鋭意努力した結果、s H S P s が、タンパク質の分解を防止する効果を有することを最初に確認すると共に、該 s H S P s を用いて2次元ゲル電気泳動を行うとき、格段に多いタンパク質スポットを有するゲルが得られることを確認し、本発明を完成した。

【特許文献1】米国特許第6, 554, 991

【特許文献2】米国特許出願公開番号2002157954

50

- 【特許文献3】米国特許出願公開番号2002133300
- 【特許文献4】米国特許第6,416,644
- 【特許文献5】米国特許第6,398,932
- 【特許文献6】PCT公開番号WO02/25259
- 【特許文献7】米国特許出願公開番号2001032786
- 【特許文献8】米国特許出願公開番号2001023826
- 【特許文献9】米国特許出願公開番号2001015320
- 【特許文献10】米国特許第6,245,206
- 【特許文献11】米国特許第6,136,173
- 【特許文献12】米国特許第6,123,821 10
- 【特許文献13】米国特許第5,993,627
- 【特許文献14】PCT公開番号WO98/59092
- 【特許文献15】PCT公開番号WO02/90966
- 【特許文献16】PCT公開番号WO01/79250
- 【非特許文献1】Kitagawa et al.,Eur.J.Biochem.,269:297-2907-17,2002
- 【非特許文献2】Lee et al.,EMBO J.,16:659-671,1997
- 【非特許文献3】Studer and Narberhaus,J.Biol.Chem.,275:37212-18,2000
- 【非特許文献4】Horwitz et al.Proc.Natl.Acad.Sci. USA,89:10449-53,1992
- 【非特許文献5】Ehrnsperger et al.,Anal.Biochem.,259:218-225,1998
- 【非特許文献6】Sambrook et al.,Molecular Cloning,2nd ed.,Cold Spring Harbor Lab 20
oratoryPress, NY, 1989
- 【非特許文献7】Hochstrasser et al.,Anal. Biochem.,173:424-35,1998;Han et al.,J.B
acteriol.,183:301-8,2001
- 【非特許文献8】Bradford,M.M.,Anal. Biochem.72,248-54,1976
- 【発明の開示】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0013】
- 結局、本発明の主な目的は、タンパク質分解防止用組成物を提供することである。
- 【0014】
- 本発明の他の目的は、タンパク質の分解を防止し、より多くのスポットを有するゲルを 30
得るための、2次元ゲル電気泳動用組成物を提供することである。
- 【0015】
- 本発明の更に他の目的は、タンパク質の分解を防止し、より多くのスポットを有するゲ
ルを得る、2次元ゲル電気泳動法を提供することである。
- 【課題を解決するための手段】
- 【0016】
- 上記目的を達成するために、本発明は、有効量のsHSPsを含むことを特徴とする、
タンパク質分解防止用組成物を提供する。
- 【0017】
- 本発明は、また、有効量のsHSPsを含むことを特徴とする、2次元ゲル電気泳動用 40
組成物を提供する。
- 【0018】
- 本発明は、また、タンパク質の混合物に対する2次元ゲル電気泳動法において、前記タ
ンパク質の混合物に、タンパク質の分解を防止してより多くのスポットを有するゲルを得
るためにsHSPsを加えた後、電気泳動を行うことを特徴とする、2次元ゲル電気泳動
法を提供する。
- 【0019】
- 本発明は、また、前記組成物を用いることを特徴とする、2次元ゲル電気泳動によるプ
ロテオームの分析方法を提供する。
- 【0020】 50

本発明は、また、プロテアーゼによる目的タンパク質の分解を阻害する阻害剤として s H S P s を用いる方法を提供する。

【0021】

本発明において、前記 s H S P s は、表 1 に記載されたタンパク質から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とすることができ、より好ましくは、I b p A (inclusion body-associated protein A)、I b p B、I b p A B および H S P 2 6 でなる群から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とすることができる。

【0022】

本発明において、2次元ゲル電気泳動法に用いられるタンパク質の混合物は、特定の細胞の全体のタンパク質であることを特徴とすることができ、前記特定の細胞は、原核細胞 (prokaryotes) または真核細胞 (eukaryotes) であることを特徴とすることができ、前記原核細胞は大腸菌またはシュドモナス (Pseudomonas) 属の微生物であることを、前記真核細胞はヒト由来の細胞であることを特徴とすることができる。

10

【0023】

本発明において、タンパク質の分解は生体内 (in vivo) または試験管内 (in vitro) でプロテアーゼ等によってタンパク質のペプチド結合が加水分解されアミノ酸或いはペプチド混合物を生成する化学反応をいう。

【0024】

本発明において、タンパク質分解防止用として加えられる s H S P s の量は、電気泳動の試料の全体のタンパク質 1 0 0 重量部に対し、好ましくは 0 . 1 ないし 5 0 重量部であり、より好ましくは 0 . 5 ないし 2 0 重量部である。0 . 1 以下の重量部である場合、タンパク質分解防止用にしては絶対量が不足であり、2 0 重量部以上の場合には過量の s H S P s によって分離しようとする特定細胞のタンパク質の分離を妨げてしまったり、s H S P s の精製コストの側面から考えると逆効果をもたらしてしまう。

20

【0025】

従って、本発明は、以下を提供する：

(項目 1) 有効量の s H S P s を含むことを特徴とする、タンパク質分解防止用組成物。

【0026】

(項目 2) 前記 s H S P s は、表 1 に記載されたタンパク質から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 1 に記載のタンパク質分解防止用組成物。

30

【0027】

(項目 3) 前記 s H S P s は、I b p A、I b p B、I b p A B および H S P 2 6 でなる群から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 2 に記載のタンパク質分解防止用組成物。

【0028】

(項目 4) 有効量の s H S P s を含むことを特徴とする、2次元ゲル電気泳動用組成物。

【0029】

(項目 5) 前記 s H S P s は、表 1 に記載されたタンパク質から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 4 に記載の 2次元ゲル電気泳動用組成物。

40

【0030】

(項目 6) 前記 s H S P s は、I b p A、I b p B、I b p A B および H S P 2 6 でなる群から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 5 に記載の 2次元ゲル電気泳動用組成物。

【0031】

(項目 7) タンパク質の混合物に対する 2次元ゲル電気泳動法において、前記タンパク質の混合物に、タンパク質の分解を防止してより多くのスポットを有するゲルを得るために s H S P s を加えた後、電気泳動を行うことを特徴とする、2次元ゲル電気泳動法。

【0032】

50

(項目 8) 前記 s H S P s は、表 1 に記載されたタンパク質から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 7 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0033】

(項目 9) 前記 s H S P s は、大腸菌由来の I b p A、I b p B 及び I b p A B とシュードモナス由来の I b p A、およびサッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の H S P 26 でなる群から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、項目 8 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0034】

(項目 10) 前記 s H S P s の量は、タンパク質の混合物 100 重量部に対し、0.1 ないし 50 重量部であることを特徴とする、項目 7 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

10

【0035】

(項目 11) 前記 s H S P s の量は、タンパク質の混合物 100 重量部に対し、0.5 ないし 20 重量部であることを特徴とする、項目 10 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0036】

(項目 12) 前記タンパク質の混合物は特定の細胞の全体タンパク質であることを特徴とする、項目 7 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0037】

(項目 13) 前記特定の細胞は、原核細胞または真核細胞であることを特徴とする、項目 12 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0038】

20

(項目 14) 前記特定の細胞は、大腸菌またはシュードモナス (*Pseudomonas*) 属の微生物で真核細胞はヒト由来の細胞であることを特徴とする、項目 13 に記載の 2 次元ゲル電気泳動法。

【0039】

(項目 15) 2 次元ゲル電気泳動によるプロテオームの分析方法において、項目 1～6 のいずれかに記載の組成物を用いることを特徴とする方法。

【0040】

(項目 16) プロテアーゼによる目的タンパク質の分解を阻害する阻害剤として s H S P s を用いる方法。

【0041】

30

(項目 17) 項目 16 に記載の方法であって、前記 s H S P s は、表 1 に記載されたタンパク質から選択されたいずれか一つ以上であることを特徴とする、方法。

【発明の効果】

【0042】

本発明は、s H S P s を含むタンパク質分解防止用組成物、および 2 次元ゲル電気泳動用組成物を提供するという効果がある。また、I b p A、I b p B、I b p A B、および H S P 26 のような s H S P s を用いた 2 次元ゲル電気泳動法によれば、電気泳動の際にタンパク質スポットが減少することを防止でき、格段に多いタンパク質スポットを含む 2 次元電気泳動ゲルを得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0043】

以下、実施例を通じて本発明をより詳しく説明する。これらの実施例は専ら本発明をより具体的に説明するためのもので、本発明の要旨により、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないことは当業者にとっては自明なことであろう。

【0044】

特に、下記の実施例では、s H S P s として、大腸菌由来の I b p A または I b p B、シュードモナス由来の I b p A、およびサッカロマイセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の H S P 26 を例示したが、表 1 に記載された s H S P s などにも制限なしに適用される。

【実施例】

50

【0045】

(実施例1：I b p A、I b p BまたはH S P 2 6 遺伝子を含む組換えプラスミドの製造)

大腸菌W 3 1 1 0 (A T C C 3 9 9 3 6)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) K T 2 4 4 0 (A T C C 4 7 0 5 4)、およびサッカロマイセス・セレヴィシエの染色体DNAを、S a m b r o o kらの方法により分離精製した (Sambrook et al. *Molecular Cloning*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989)。

【0046】

大腸菌W 3 1 1 0、シュードモナス・プチダK T 2 4 4 0、およびサッカロマイセス・セレヴィシエのそれぞれを500 mLのLB培地 (L u r i a - B e r t a n i m e d i u m) で24時間培養した。それぞれの菌株が初期の指数関数的増殖期であるとき、遠心分離によって菌体を回収した後、10 mg/mLリゾチーム (S i g m a C o ., U S A) の含まれているTE溶液 (10 mM T r i s, 1 mM E D T A ; p H 7.6) 50 mLに懸濁させた。前記菌株の懸濁液を24時間にかけて徐々に攪拌しながら常温で培養した。

10

【0047】

菌株の破碎およびタンパク質除去のために、前記培養液に、10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液16 mLと、20 mg/mLプロテイナーゼK (S i g m a C o ., U S A) 570 μ Lとを加え、37°Cで1時間反応させた。

【0048】

次いで、5 M塩化ナトリウム溶液14 mLと、0.7 M塩化ナトリウム溶液に溶解されている10% CTAB (cetyltrimethylammoniumbromide) (S i g m a C o ., U S A) 10.66 mLとを加えた後、65°Cで10分間反応させた。その後、前記反応液と同じ体積のクロロホルム：イソアミルアルコール=24：1の混合液を加え、常温で2時間にかけて注意しながら混合した。前記混合液を6000 rpmで10分間遠心分離し、上清液をビーカに移し、2倍量の冷却エタノールをゆっくり加えて染色体DNAを沈澱させた後、ガラス棒でDNAを巻き上げた。前記ガラス棒を自然乾燥させてエタノールを取り除いた後、1 mLのTE溶液にDNAを溶解させた。

20

【0049】

前記DNA溶液に、RNase (S i g m a C o ., U S A) を最終濃度が50 μ g/mLになるように加えた後、37°Cで1時間反応させた。反応の完了後、再び前記反応液と同じ体積のクロロホルム：イソアミルアルコール=24：1の混合液を加え、常温で2時間にかけて注意しながら混合した。

30

【0050】

前記混合液を6000 rpmで10分間遠心分離し、上清液をビーカに移し、2倍量の冷却エタノールをゆっくり加えて染色体DNAを沈澱させた後、ガラス棒でDNAを巻き上げた。前記ガラス棒を自然乾燥させてエタノールを取り除いた後、最終的に、1 mLのTE溶液に、精製された大腸菌W 3 1 1 0、シュードモナス・プチダK T 2 4 4 0、およびサッカロマイセス・セレヴィシエの染色体DNAを溶解させた。

【0051】

I b p A、I b p BまたはH S P 2 6 タンパク質の発現および精製を容易にするために、組換えプラスミドである、p T a c 9 9 I b p A H、p T a c 9 9 I b p B H、p T a c 9 9 P P I b p A H、およびp T a c 9 9 H S P 2 6 Hを作製した。

40

【0052】

大腸菌W 3 1 1 0の染色体DNAを鋳型とし、それぞれ配列番号1と2、および配列番号3と4のプライマーを用いてPCRを行い、大腸菌由来のI b p A - 6 h i sおよびI b p B - 6 h i s 遺伝子を得た。

【0053】

また、シュードモナス・プチダK T 2 4 4 0の染色体DNAを鋳型とし、配列番号5と6のプライマーを用いてPCRを行い、シュードモナス由来の p p I b p A - 6 h i s 遺

50

伝子を得た。シュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 のゲノムでは、I b p B 遺伝子に対してまだ明らかになっていない。

【0054】

サッカロマイセス・セレヴィシエの染色体 DNA を鋳型とし、配列番号 7 と 8 のプライマーを用いて P C R を行い、サッカロマイセス・セレヴィシエ由来の H S P 2 6 - 6 h i s 遺伝子を得た。

【0055】

P C R において、第 1 番目の変性 (denaturation) は 9 5 °C で 5 分間 1 回行い、以降の第 2 番目の変性は 9 5 °C で 5 0 秒間、アニーリング (annealing) は 5 5 °C で 1 分間、伸長 (extension) は 7 2 °C で 1 分 3 0 秒間行った。これを 3 0 回繰り返した後、7 2 °C で 5 分間、最後の伸長を 1 回行った。

【0056】

得られた I b p A - 6 h i s、I b p B - 6 h i s、_{p p} I b p A - 6 h i s および H S P 2 6 - 6 h i s 遺伝子をそれぞれ、E c o R I および H i n d I I I によって切断された組換えプラスミドである p T a c 9 9 A に挿入し、プラスミド p T a c 9 9 I b p A H、p T a c 9 9 I b p B H、p T a c 9 9 _{p p} I b p A H および p T a c 9 9 H S P 2 6 H をそれぞれ作製した (図 1、図 2、図 3、および図 4)。

【0057】

前記組換えプラスミドである p T a c 9 9 A は、p T r c 9 9 A (Pharmacia Biotech., UPPsala, Sweden) の t r c プロモータが p K K 2 2 3 - 3 (Pharmacia Biotech., UPPsala, Sweden) の t a c プロモータに置き換えられたプラスミドであって、p K K 2 2 3 - 3 の t a c プロモータを制限酵素 P v u I I および E c o R I で処理して得た後、t a c プロモータ遺伝子の切片を同じ制限酵素によって切断された p T r c 9 9 A に挿入することにより作製した。

【0058】

配列番号 1 : 5' -ggaattcatgcgtaactttgatttatccccg-3'
 配列番号 2 : 5' -cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggttgatttcgatacggcgcg-3'
 配列番号 3 : 5' -ggaattcatgcgtaacttcgatttatccccactg-3'
 配列番号 4 : 5' -cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggctatttaacgcgggacgttcgct-3'
 配列番号 5 : 5' -ggaattcatgacctgactactgctttc-3'
 配列番号 6 : 5' -cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggttcagcgctggttttt-3'
 配列番号 7 : 5' -ggaattcatgtcatttaacagtcatttt-3'
 配列番号 8 : 5' -cccaagcttttaatggtgatgatggtgatggttacccacgattcttgaga-3'。

【0059】

(実施例 2 : I b p A、I b p B、および H S P 2 6 タンパク質の精製)

前記実施例 1 によって製作された I b p A、I b p B、または H S P 2 6 タンパク質をコードする遺伝子を含む組換えプラスミドである、p T a c 9 9 I b p A H、p T a c 9 9 I b p B H、p T a c 9 9 _{p p} I b p A H または p T a c 9 9 H S P 2 6 H によって形質転換された組換え大腸菌 X L 1 - B l u e (S t r a t a g e n e, U S A) を、抗生剤であるアンピシリン (5 0 m g / L) の添加された L B 培地 (酵母抽出物 5 g / L, トリプトファン 1 0 g / L, 塩化ナトリウム 1 0 g / L) で培養した。

【0060】

I b p A、I b p B、および H S P 2 6 タンパク質の発現は、培養液を分光光度計 (波長 : 6 0 0 n m) で測定して光学密度 (O. D.) が 0. 7 であるとき、培養液に 1 m M の I P T G (isopropyl-β-thiogalactoside) を加えることにより誘導した。誘導発現の後、4 時間経過してから培養液を 1 m L ずつとり、4 °C、6 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿物を 0. 5 m L の T E 溶液 (T r i s - H C l 1 0 m M, E D T A 1 m M, p H 8. 0) で 1 回洗浄した後、再び 4 °C、6 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、沈殿物を得た。前記得られた沈殿物を 0. 2 m L の平衡溶液 (尿素 8 M, N a H ₂ P O ₄ 1 0 0 m M, T r i s 1 0 m M, p H 8. 0) に懸濁させ、超音波で破碎して分画した。

【0061】

前記懸濁溶液を、4℃、10000rpmで10分間遠心分離し、上清液をとり、あらかじめ平衡溶液によって平衡化されたNi-NTA spin column (Qiagen, USA) に通過させた後、2000rpmで2分間遠心分離した。600μlの洗浄溶液（尿素 8M、NaH₂PO₄ 100mM、Tris 10mM, pH 6.3）をカラムに2回通過させ、200μlの溶離溶液（尿素 8M、NaH₂PO₄ 100mM、Tris 10mM, pH 4.5）をカラムに注入し、IbpA、IbpB、およびHSP26タンパク質を精製した。

【0062】

以上で精製されたIbpA、IbpB、およびHSP26タンパク質を含有した溶液を200μlずつとり、SDS-PAGEサンプル溶液（25%グリセロール、2% SDS、14.4mMの2-メルカプトエタノール、0.1%ブロモフェノールブルー、60mM Tris-HCl）50μlと混合し、10分間沸騰させた後、これを12%の分離用ゲル（separatinggel）でSDS-PAGEを行った。次いで、ゲルを染色溶液（メタノール40%、酢酸10%、0.25g/L クーマシーブリリアントブルーR）に2時間以上浸漬して染色させ、再び脱色溶液（40%メタノール、7%酢酸）に2時間以上、2回にかけて浸漬して脱色させた（図5）。

【0063】

図5は、それぞれの組換えプラスミドである、pTac99IbpAH、pTac99IbpBH、pTac99_{pp}IbpAHまたはpTac99HSP26Hによって形質転換された組換え大腸菌XL1-Blueから発現されたIbpA、IbpBおよびHSP26タンパク質を精製した後の電気泳動写真である。（A）において、レーンMはタンパク質の標準分子量を示し、レーン1および2は精製されたIbpAを、レーン3および4は精製されたIbpBを、レーン5は精製された_{pp}IbpAを示す。（B）において、レーンMはタンパク質の標準分子量を示し、レーン1ないし3は精製されたHSP26を示す。図5に示すように、精製されたIbpA、IbpB、およびHSP26タンパク質の純度は、ほぼ100%であることが分かった。

【0064】

（実施例3：目的タンパク質を分離・精製する際のsHSPsの効果）

目的タンパク質は細胞の溶解溶液（lysis solution）の中でプロテアーゼに攻撃されやすいから損失が多かった。本発明では同量の目的タンパク質のヒト血清アルブミンを溶解溶液に希釈した後2時間常温で多様な濃度のトリプシンと共に反応させた。プロテアーゼの濃度は基質（目的タンパク質）に対して0、1/10、1/20、1/30または1/50で変化させた。sHSPsは大腸菌由来のIbpAおよびIbpB、サッカロマイセス・セレビシエ由来のHSP26を使用した（図6）。

【0065】

図6は同じ濃度のヒト血清アルブミンが添加された溶液でsHSPsのプロテアーゼ阻害効果を示す電気泳動写真であって、（A）はsHSPsが添加されていない対照群溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.05μg/μlのトリプシンが添加された溶液、レーン3は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.125μg/μlのトリプシンが添加された溶液、レーン4は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.017μg/μlのトリプシンが添加された溶液、レーン5は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.01μg/μlのトリプシンが添加された溶液を示す。（B）はIbpAが添加された溶液を示し、（C）はIbpBが添加された溶液を示し、（D）はHSP26が添加された溶液を示す。レーンMはタンパク質標準分子量を示す。（B）、（C）および（D）において、レーン1は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.005μg/μl sHSPだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5μg/μlのヒト血清アルブミンに0.05μg/μlのトリプシンと0.005μg/μlのsHSPが添加された溶液、レーン3は0.5μg/μlのヒト

10

20

30

40

50

血清アルブミンに0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のsHSPが添加された溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.017 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のsHSPが添加された溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のsHSPが添加された溶液を示して、(E)は種々のプロテアーゼ阻害剤が添加された溶解溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加されている溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加されている溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのPMSFが添加されている溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのPMSFが添加されている溶液、レーン6は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと4mMのペファブロクSC (PefablocSC)が添加されている溶液、レーン7は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと4mMのペファブロクSC (Pefabloc SC)が添加されている溶液、レーン8は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンとカクテル阻害剤(7ml/tablet)が添加されている溶液、レーン9は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンとカクテル阻害剤(7ml/tablet)が添加されている溶液、レーン10は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのEDTAが添加されている溶液、レーン11は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのEDTAが添加されている溶液を示す。矢印はヒト血清アルブミンを示す。

【0066】

図6に示すように、sHSPが添加された溶液では目的タンパク質であるヒト血清アルブミンの殆んどが分解されなかった反面、対照群ではプロテアーゼの攻撃によってヒト血清アルブミンの殆んどが分解された。図6の(A)、(B)、(C)および(D)のレーン2を比較するとヒト血清アルブミンが分解されやすいことを観察できる。しかし、少量のsHSPsを添加すればヒト血清アルブミンはほぼ分解されなかった。また、図6(B)から(D)までのレーン2およびレーン3と図6(E)のレーン4ないしレーン11を比較すると、一般的に使用されるプロテアーゼ阻害剤よりsHSPsのほうがずっと効果的にプロテアーゼによる目的タンパク質の分解を防止した。

【0067】

本発明では他のプロテアーゼであるプロテイナーゼKで上記と同じ実験を行った。同じ濃度の目的タンパク質であるヒト血清アルブミンを溶解溶液に希釈した後2時間の間常温で多様な濃度のプロテイナーゼKと共に反応させた。プロテアーゼの濃度は基質(目的タンパク質)に対して0, 1/300, 1/1000, 1/3000または1/10000で変化させた。sHSPsは大腸菌由来のIbpAおよびIbpB、サッカロマイセス・セレヴィシエ由来のHSP26を使用した(図7)。

【0068】

図7は、同じ濃度のヒト血清アルブミンが添加された溶解溶液でsHSPsによるプロテアーゼ抑制効果を示す電気泳動写真である。(A)は、対照群でsHSPsが添加されていない溶解溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $1.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $0.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $1.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $0.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液を示す。(B)はIbpAが添加された溶液を示し、(C)はIbpBが添加された溶液を示し、(D)

はHSP26が添加された溶液を示す。(B),(C)および(D)において、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.005 μg/μlのsHSPだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに1.5 × 10⁻³ μg/μlのプロテイナーゼKと0.005 μg/μlのsHSPが添加された溶液、レーン3は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.5 × 10⁻³ μg/μlのプロテイナーゼKと0.005 μg/μlのsHSPが添加された溶液、レーン4は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに1.5 × 10⁻⁴ μg/μlのプロテイナーゼKと0.005 μg/μlのsHSPが添加された溶液、レーン5は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.5 × 10⁻⁴ μg/μlのプロテイナーゼKと0.005 μg/μlのsHSPが添加された溶液を示す。(E)は様々なプロテアーゼ阻害剤が添加された溶解溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.5 × 10⁻³ μg/μlのプロテイナーゼKと4 mMのペファブロクSC (PefablocSC)添加されている溶液、レーン3は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに1.5 × 10⁻⁴ μg/μlのプロテイナーゼKと4 mMのペファブロクSC (PefablocSC)添加されている溶液、レーン4は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.5 × 10⁻³ μg/μlのプロテイナーゼKとカクテル阻害剤(7ml/tablet)が添加されている溶液、レーン5は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに1.5 × 10⁻⁴ μg/μlのプロテイナーゼKとカクテル阻害剤(7ml/tablet)が添加されている溶液、レーン6は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに0.5 × 10⁻³ μg/μlのプロテイナーゼKと1 mMのEDTAが添加されている溶液、レーン7は0.5 μg/μlのヒト血清アルブミンに1.5 × 10⁻⁴ μg/μlのプロテイナーゼKと1 mMのEDTAが添加されている溶液を示す。矢印はヒト血清アルブミンを示す。

【0069】

図7に示すように、sHSPが添加された溶液では目的タンパク質であるヒト血清アルブミンの殆んどが分解されなかった反面、対照群ではプロテアーゼの攻撃によってヒト血清アルブミンの殆んどが分解された。図7(A)、(B)、(C)および(D)のレーン3と4を比較するとヒト血清アルブミンがほとんど完全に分解されることが観察できる。しかし、少量のsHSPsを添加すればヒト血清アルブミンはほぼ分解されなかった。また、図7の(B)から(D)までのレーン3と(E)のレーン2、レーン4、およびレーン6を比較すれば、一般的に使用されているプロテアーゼ阻害剤よりsHSPsのほうがずっと効果的にプロテアーゼの攻撃を防止した。

【0070】

(実施例4：プロテオーム研究のための2次元ゲル電気泳動の際の細胞内におけるIbpAおよび/またはIbpBの効果)

既存のIbpAおよび/またはIbpB発現プラスミドである、pACTacIbpA、pACTacIbpBまたはpACTacIbpABと、対照群のプラスミドp184ΔCmとを、IbpAB遺伝子の除去された突然変異大腸菌WIB101 (PCT/KR03/01371)にそれぞれ導入した後、前記実施例2と同様の方法で細胞培養を行った。IbpAおよび/またはIbpBタンパク質の発現は培養液を分光光度計(波長: 600 nm)で測定した光学密度(O.D.)が0.7であるとき、1 mMのIPTGを添加して誘導した。誘導発現の後、4時間経過してから培養液を1 mLずつとり、4℃、600 rpmで5分間遠心分離して沈殿物を得た後、-20℃で保管した。

【0071】

それぞれの形質変換された大腸菌に対する2次元ゲル電気泳動を下記のような方法で行った。2次元ゲル電気泳動法は、2次元空間に、タンパク質の固有の特性である分子量および電荷量の差を利用し、細胞内の全体のタンパク質を展開する方法である(Hochstrasser et al., Anal. Biochem., 173:424-35, 1988; Han et al., J.Bacteriol.183:301-8, 2001)。

【0072】

本実施例においては、PROTEAN IEF cell および PROTEAN II x i cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) を用い、2次元ゲル電気泳動を行った。

【0073】

2次元ゲル電気泳動のための試料は、次のように処理して用意した。細胞培養液を4℃、6000rpmで5分間遠心分離した後、上清液を捨て、500μlの低塩緩衝溶液(KCl 3mM、KH₂PO₄ 1.5mM、NaCl 68mM、NaH₂PO₄ 9mM)で沈殿物中の残存の培地を洗浄した。前記沈殿物を100μl細胞溶解溶液(cell lysis buffer; 尿素 8M, CHAPS 4% (w/v), DTT 65mM, Tris 40mM)に懸濁させた後、4℃、12000rpmで10分間遠心分離し、全体のタンパク質を

10

【0074】

タンパク質はBradford法(Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976)を用いて定量した。タンパク質200μgをIEF変性溶液(尿素8M、CHAPS 0.5% (w/v)、DTT 10mM、Bio-lyte pH3~10 0.2% (w/v)、ブロモフェノールブルー 0.001% (w/v))340μlに溶かした後、17cmReadyStripTM IPG Strips pH 3~10 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)に入れ、20℃で12時間水和させた後、等電点電気泳動法(isoelectricfocusing)を行った。

【0075】

20

その後、ストリップ(strip)を平衡緩衝溶液I(尿素6M、SDS 2% (w/v)、Tris-HCl (pH8.8) 0.375M、グリセロール 20% (v/v)、DTT 130mM)に約15分間振盪させながら浸した後、再び平衡緩衝溶液II(尿素6M、SDS 2% (w/v)、Tris-HCl (pH8.8) 0.375M、グリセロール 20% (v/v)、ヨードアセトアミド 135mM、ブロモフェノールブルー 3.5M)に約15分間振盪させながら浸漬した後、ストリップをSDS-PAGEゲルにのせて分子量による分離を行った。

【0076】

タンパク質は銀染色キット(silver staining kit; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)で染色し、2次元ゲルはGS710Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)でスキャンし、MelanieII (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)のソフトウェアでゲル上のタンパク質のスポット数(spot number)を測定した(図8)。

30

【0077】

図8は、過量のIbpAおよび/またはIbpBが発現される形質転換された大腸菌WIB101の2次元ゲル電気泳動写真であって、(A)は大腸菌WIB101(p184△Cm)を、(B)は大腸菌WIB101(pACTacIbpA)を、(C)は大腸菌WIB101(pACTacIbpB)を、(D)は大腸菌WIB101(pACTacIbpAB)をそれぞれ示す。また、2次元ゲル上に示した円は、IbpAおよび/またはIbpBタンパク質を示す。

40

【0078】

図8に示すように、対照群である大腸菌WIB101(p184△Cm)よりIbpAおよび/またはIbpBタンパク質が過量に発現される、形質転換された大腸菌WIB101(pACTacIbpA)、WIB101(pACTacIbpB)またはWIB101(pACTacIbpAB)において、格段に多くのタンパク質スポットを有する2次元ゲルを得ることができた。

【0079】

(実施例5：大腸菌W3110の2次元ゲル電気泳動の際のIbpA、IbpB、およびHSP26の効果)

前記実施例4と同様の方法で大腸菌W3110に対する2次元ゲル電気泳動を行った。

50

まず、精製された I b p A または I b p B タンパク質 10 μ g に対する純度を確認するために、2次元ゲル電気泳動を行った（図9）。

【0080】

図9は、精製された I b p A および I b p B タンパク質の2次元ゲル電気泳動写真であって、(A)は I b p A を示し、(B)は I b p B を示す。図9に示すように、2次元ゲル電気泳動の結果、I b p A および I b p B タンパク質以外の他のタンパク質はほとんど存在していなかった。したがって、I b p A および I b p B の純度は、ほぼ100%であることが分かった。

【0081】

s H S P s の効果を確認するために、定量化された大腸菌 W 3 1 1 0 タンパク質 200 μ g に I b p A、I b p B、および H S P 2 6 タンパク質をそれぞれ10 μ g 加え、2次元ゲル電気泳動を行った。また、s H S P とタンパク質の分解を抑制するために一般的に使用されるプロテアーゼ阻害剤の効果を比較するため電気泳動を行った（図10）。対照群として、定量化された大腸菌 W 3 1 1 0 タンパク質 200 μ g を用いた。

【0082】

図10は、試験管内 (in vitro) において、I b p A、I b p B または H S P 2 6 が添加された大腸菌 W 3 1 1 0 の2次元ゲル電気泳動写真であって、(A)は対照群として大腸菌 W 3 1 1 0 を、(B)は大腸菌 W 3 1 1 0 に1mMの P M S F を添加した溶液、(C)は大腸菌 W 3 1 1 0 に4mMの A E B S F (PefablocSC) を添加した溶液、(D)は大腸菌 W 3 1 1 0 に1mMの E D T A を添加した溶液、(E)は大腸菌 W 3 1 1 0 にカクテル阻害剤(7ml/tablet)を添加した溶液、(F)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g の I b p A を添加した溶液、(G)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g の I b p B を添加した溶液、(H)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g のシュードモナス由来 I b p A を添加した溶液、(I)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g のサッカロマイセス・セレヴィシエ由来 H S P 2 6 を添加した溶液を示す。

【0083】

図10-1～3に示すように、大腸菌の溶解溶液に対するプロテアーゼ阻害能力は s H S P s > カクテル阻害剤 > A E B S F > E D T A > P M S F の順序だった。P M S F は溶液の中で早く不活性化されるし、D D T または 2-メルカプトエタノールのようなチオール剤の存在時に効果が減少するため、2次元ゲル電気泳動には適切ではなかった。カクテル阻害剤または A E B S F は大腸菌の2次元電気泳動に普通用いられるプロテアーゼ阻害剤で、プロテアーゼ阻害剤は目的タンパク質の性質よっての選択するものである。一方、I b p A、I b p B または H S P 2 6 を用いた2次元電気泳動ゲルには既存の方法より多いタンパク質のスポットが観察された。

【0084】

図11は、s H S P s を使用した電気泳動ゲルの結果を比較するため、ゲルの小さい面積を拡大した写真である。(A)は対照群として大腸菌 W 3 1 1 0 を、(B)は大腸菌 W 3 1 1 0 にカクテル阻害剤(7ml/tablet)を添加した溶液、(C)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g の I b p A を添加した溶液、(D)は大腸菌 W 3 1 1 0 に10 μ g のサッカロマイセス・セレヴィシエ由来 H S P 2 6 を添加した溶液を示す。

【0085】

図11に示すように、s H S P s を添加した2次元ゲルは、s H S P s を添加しなかった2次元ゲルよりタンパク質スポットの数が多くて、遥かにきれいだった。これは s H S P s を添加したゲルが定量的と定性的に向上したタンパク質スポットを持っていることである。また、s H S P s は高い分子量及び小さい分子量を持つタンパク質の損失を防止した。

【0086】

市販されているプロテアーゼ阻害剤と s H S P s の2次元電気泳動間のプロテアーゼ阻害能力を比較すると s H S P s は次のような長所がある。一番は阻害能力がもっと高いことである。タンパク質の分解を減少させて、全ての種類の試料に対して最大数のタンパク

10

20

30

40

50

質スポットを見せられる。二番目は市販されているプロテアーゼ阻害剤よりずっと経済的である。三番目は添加された s H S P s の量を標準タンパク質として用いてタンパク質試料を定量することができる。s H S P s は植物抽出物、臍臓、胃、肝臓、脾臓などの動物器官及び液胞、リソゾムなどの小器官を含む試料などのプロテアーゼが多い試料を使用する場合有用である。また、s H S P s はタンパク質を精製する場合にも新たなプロテアーゼ阻害剤として使用することができる。

【0087】

(実施例6：シュードモナスの2次元ゲル電気泳動の際の I b p A の効果)

前記実施例4と同様の方法でシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 に対する2次元ゲル電気泳動を行った。I b p A 効果を確認するために、定量化されたシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 タンパク質 2 0 0 μ g に I b p A タンパク質 1 0 μ g を加え、2次元ゲル電気泳動を行った(図12)。対照群として、定量化されたシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 タンパク質 2 0 0 μ g を用いた。

10

【0088】

図12は、シュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 に対する2次元ゲル電気泳動写真であって、(A)はシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 を、(B)はシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 に I b p A タンパク質 1 0 μ g を添加した場合を示す。図12に示すように、I b p A タンパク質が加えられた2次元ゲル電気泳動写真では格段に多いタンパク質スポットが現われることを確認することができた。

【0089】

20

(実施例7：ヒト血清(Human serum)の2次元ゲル電気泳動の際の I b p A の効果)

前記実施例4と同様の方法でヒト由来の血清に対する2次元ゲル電気泳動を行った。I b p A および I b p B の効果を確認するために、定量化されたヒト由来の血清タンパク質 2 0 0 μ g に I b p A タンパク質および I b p B タンパク質を各々 1 0 μ g を添加し、2次元ゲル電気泳動を行った。対照群として、定量化されたヒト由来の血清タンパク質 2 0 0 μ g を用いた(図13)。

【0090】

図13は、ヒト由来の血清に対する2次元ゲル電気泳動写真であって、(A)はヒト由来の血清を、(B)はヒト由来の血清に I b p A タンパク質 1 0 μ g を添加した場合を、(C)はヒト由来の血清に I b p B タンパク質 1 0 μ g を添加した場合を示す。図13に示すように、I b p A タンパク質および I b p B タンパク質の加えられた2次元ゲル電気泳動写真では、格段に多いタンパク質スポットが現われていることを確認することができた。

30

【産業上の利用可能性】

【0091】

本発明の I b p A、I b p B、I b p A B、および H S P 2 6 のような s H S P s を用いた2次元ゲル電気泳動法によれば、電気泳動の際にタンパク質スポットが減少することを防止でき、格段に多いタンパク質スポットを含む2次元電気泳動ゲルを得ることができる。よって、本発明は、細胞内タンパク質の研究における効率の改善に画期的に寄与できる。

40

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1は、プラスミド p T a c 9 9 I b p A H の遺伝子地図である。

【図2】図2は、プラスミド p T a c 9 9 I b p B H の遺伝子地図である。

【図3】図3は、プラスミド p T a c 9 9 _{p p} I b p A H の遺伝子地図である。

【図4】図4は、プラスミド p T a c 9 9 H S P 2 6 H の遺伝子地図である。

【図5】図5は、それぞれの組換えプラスミドである、p T a c 9 9 I b p A H、p T a c 9 9 I b p B H、p T a c 9 9 _{p p} I b p A H または p T a c 9 9 H S P 2 6 H によって形質転換された組換え大腸菌 X L 1 - B l u e から発現された I b p A、I b p B、または H S P 2 6 タンパク質を精製した後の電気泳動写真である。(A)において、レーン

50

Mはタンパク質の標準分子量を示し、レーン1および2は精製されたI b p Aを、レーン3および4は精製されたI b p Bを、レーン5は精製された_{p p}I b p Aを示す。(B)において、レーンMはタンパク質の標準分子量を示し、レーン1ないし3は精製されたH S P 2 6を示す。

【図6】図6は、同じ濃度のヒト血清アルブミンが添加された溶液でs H S P sのプロテアーゼ阻害効果を示す電気泳動写真であって、(A)はs H S P sが添加されていない対照群溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加された溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加された溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.017 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加された溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加された溶液を示す。(B)はI b p Aが添加された溶液を示す。(C)はI b p Bが添加された溶液を示す。(D)はH S P 2 6が添加された溶液を示す。レーンMはタンパク質標準分子量を示す。(B), (C)および(D)において、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ s H S Pだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のs H S Pが添加された溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のs H S Pが添加された溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.017 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のs H S Pが添加された溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のs H S Pが添加された溶液を示し、(E)は種々のプロテアーゼ阻害剤が添加された溶解溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加されている溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンが添加されている溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのP M S Fが添加されている溶液、レーン5は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMのP M S Fが添加されている溶液、レーン6は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと4mMのペファブロクSC (P e f a b l o c SC)が添加されている溶液、レーン7は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと4mMのペファブロクSC (P e f a b l o c SC)が添加されている溶液、レーン8は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンとカクテル阻害剤(7ml/t a b l e t)が添加されている溶液、レーン9は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンとカクテル阻害剤(7ml/t a b l e t)が添加されている溶液、レーン10は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMの E D T Aが添加されている溶液、レーン11は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のトリプシンと1mMの E D T Aが添加されている溶液を示す。矢印はヒト血清アルブミンを示す。

【図7】図7は、同じ濃度のヒト血清アルブミンが添加された溶解溶液でs H S P sによるプロテアーゼ抑制効果を示す電気泳動写真である。(A)は対照群でs H S P sが添加されていない溶解溶液であって、レーンMはタンパク質標準分子量を示し、レーン1は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン2は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $1.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン3は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $0.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン4は0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに $1.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼKが添加された溶液、レーン5は0.

5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K が添加された溶液を示す。(B) は I b p A が添加された溶液を示して、(C) は I b p B が添加された溶液を示して、(D) は H S P 26 が添加された溶液を示す。(B)、(C) および (D) において、レーン M はタンパク質標準分子量を示し、レーン 1 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の s H S P だけを添加した溶解溶液、レーン 2 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 1.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の s H S P が添加された溶液、レーン 3 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の s H S P が添加された溶液、レーン 4 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 1.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の s H S P が添加された溶液、レーン 5 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 0.005 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の s H S P が添加された溶液を示す。(E) は様々なプロテアーゼ阻害剤が添加された溶解溶液であって、レーン M はタンパク質標準分子量を示し、レーン 1 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンだけを添加した溶解溶液、レーン 2 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 4 mM のペファブロク SC (Pefabloc SC) が添加されている溶液、レーン 3 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 1.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 4 mM のペファブロク SC (Pefabloc SC) が添加されている溶液、レーン 4 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K とカクテル阻害剤 (7 ml / tablet) が添加されている溶液、レーン 5 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 1.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K とカクテル阻害剤 (7 ml / tablet) が添加されている溶液、レーン 6 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 0.5 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 1 mM の EDTA が添加されている溶液、レーン 7 は 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のヒト血清アルブミンに 1.5 $\times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプロテイナーゼ K と 1 mM の EDTA が添加されている溶液を示す。矢印はヒト血清アルブミンを示す。

10

20

【図 8】図 8 は、I b p A 及び／または I b p B が過発現された大腸菌 W 3 1 1 0 の 2 次元ゲル電気泳動写真であって、(A) は大腸菌 W I B 1 0 1 (p 1 8 4 Δ C m) を、(B) は大腸菌 W I B 1 0 1 (p A C T a c I b p A) を、(C) は大腸菌 W I B 1 0 1 (p A C T a c I b p B) を、(D) は大腸菌 W I B 1 0 1 (p A C T a c I b p A B) を示す。

30

【図 9】図 9 は、精製された I b p A 及び I b p B タンパク質の 2 次元ゲル電気泳動写真であって、(A) は I b p A タンパク質を、(B) は I b p B タンパク質を示す。

【図 10-1】図 10-1 は、試験管内 (in vitro) において、I b p A、I b p B または H S P 26 が添加された大腸菌 W 3 1 1 0 の 2 次元ゲル電気泳動写真であって、(A) は対照群として大腸菌 W 3 1 1 0 を、(B) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 1 mM の P M S F F を添加した溶液、(C) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 4 mM の A E B S F (Pefabloc SC) を添加した溶液、(D) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 1 mM の E D T A を添加した溶液を示す。

40

【図 10-2】図 10-2 は、図 10-1 の続きであって、(E) は大腸菌 W 3 1 1 0 にカクテル阻害剤 (7 ml / tablet) を添加した溶液、(F) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 10 μg の I b p A を添加した溶液、(G) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 10 μg の I b p B を添加した溶液、(H) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 10 μg のシュードモナス由来 I b p A を添加した溶液を示す。

【図 10-3】図 10-3 は、図 10-2 のさらに続きであって、(I) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 10 μg のサッカロマイセス・セレヴィシエ由来 H S P 26 を添加した溶液を示す。

【図 11】s H S P s を使用した電気泳動ゲルの結果を比較するため、ゲルの小さい面積を拡大した写真である。(A) は対照群として大腸菌 W 3 1 1 0 を、(B) は大腸菌 W 3 1 1 0 にカクテル阻害剤 (7 ml / tablet) を添加した溶液、(C) は大腸菌 W 3 1 1 0 に 10

50

μg の I b p A を添加した溶液、(D) は大腸菌 W 3 1 1 0 に $10\mu\text{g}$ のサッカロマイセス・セレヴィシエ由来 H S P 2 6 を添加した溶液を示す。

【図 1 2】対照群および s H S P s によるシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 の 2 次元ゲル電気泳動写真であって、(A) はシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 を、(B) はシュードモナス・プチダ K T 2 4 4 0 に I b p A タンパク質 $10\mu\text{g}$ を添加した場合を示す。

【図 1 3】試験管内において、対照群および s H S P s によるヒト血清の 2 次元ゲル電気泳動写真であって、(A) はヒト由来の血清を、(B) はヒト由来の血清に I b p A タンパク質 $10\mu\text{g}$ を添加した場合を (C) はヒト由来の血清に I b p B タンパク質 $10\mu\text{g}$ を添加した場合を示す。

【化 1】

【配列表】

<110>	Korea Advanced Institute of Science and Technology	
<120>	Composition for Protecting a Protein Degradation Comprising Small Heat Shock Proteins(sHSPs) and Method of Two Dimensional Gel Electrophoresis Using the sHSPs	10
<130>	F104P81339	
<150>	KR2003-0062756	20
<151>	2003-09-08	
<160>	8	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	30
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	PCR primer	40
<400>	1	
	ggaattcatg cgtaactttg atttatcccc g	31
<210>	2	

<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

10

<400> 2

cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttgatttcg ataaggcgcg g

51

<210> 3

<211> 34

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

30

<400> 3

ggaattcatg cgtaacttcg atttatcccc actg

34

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ccaagctttt aatggtgatg atggtgatgg ctatttaacg cgggacgttc gct

53

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

ggaattcatg accatgacta ctgctttc

28

20

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttcagcgct gggtttt

47

40

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR Primer

10

<400> 7

ggaattcatg tcatttaaca gtccat

29

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> PCR Primer

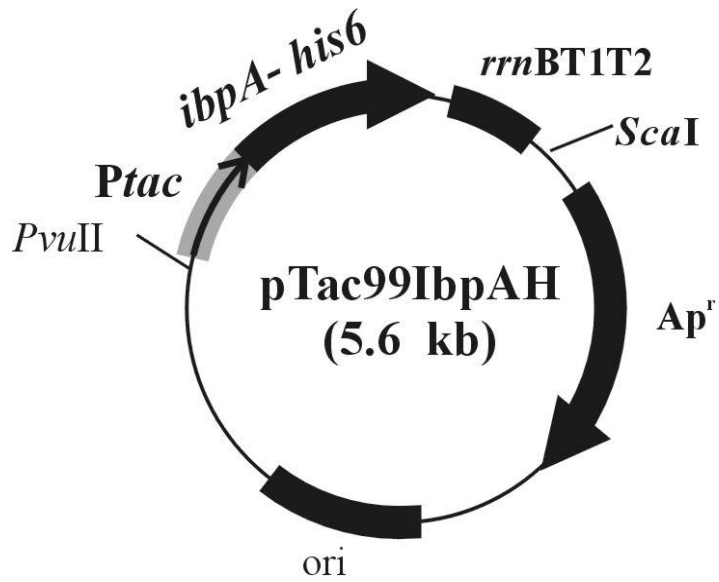
<400> 8

cccaagcttt taatggtgat gatggtgatg gttacccac gattcttgag a

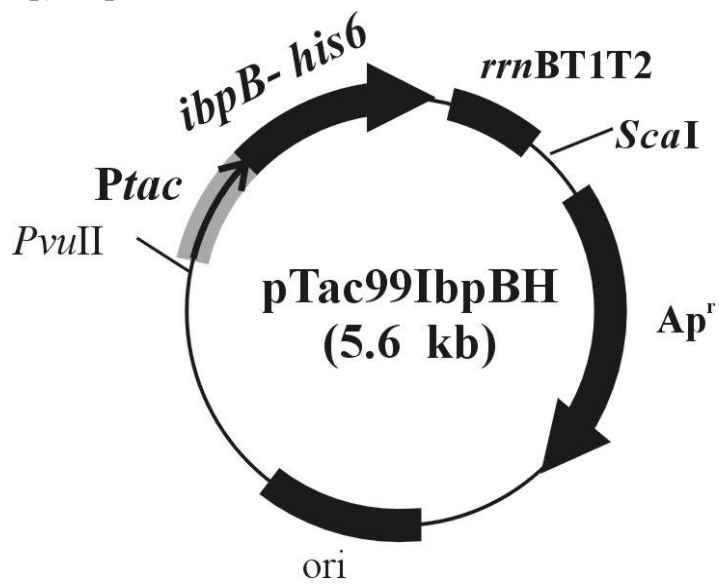
51

30

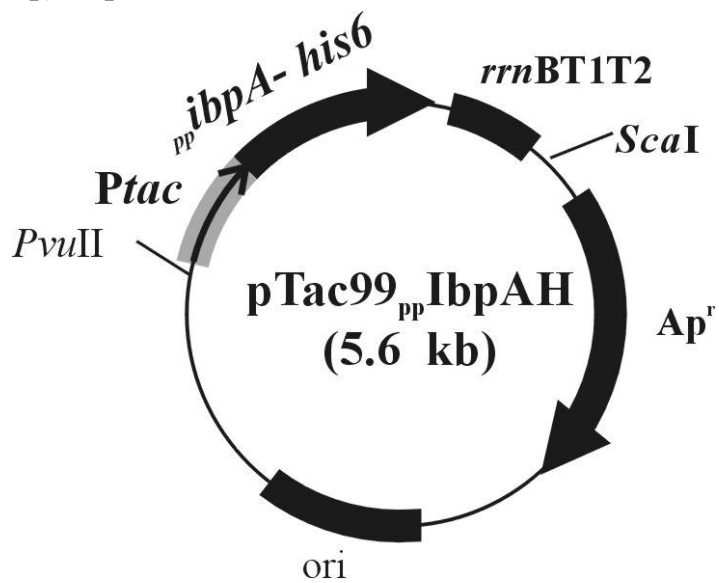
【図 1】



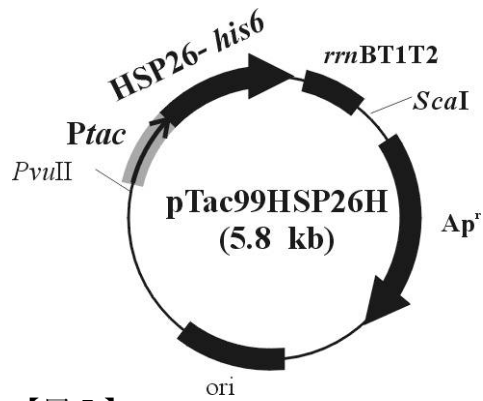
【図 2】



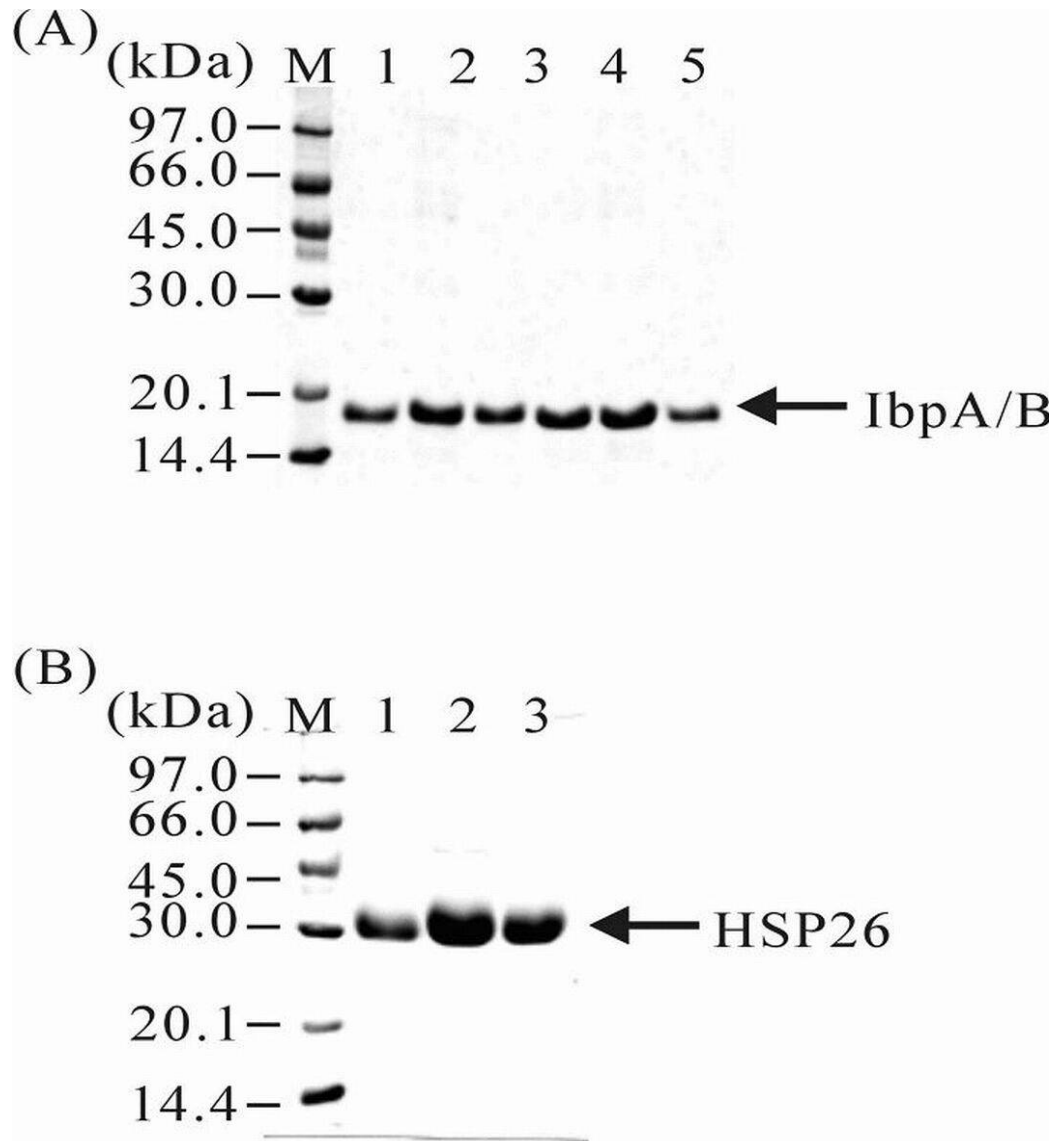
【図 3】



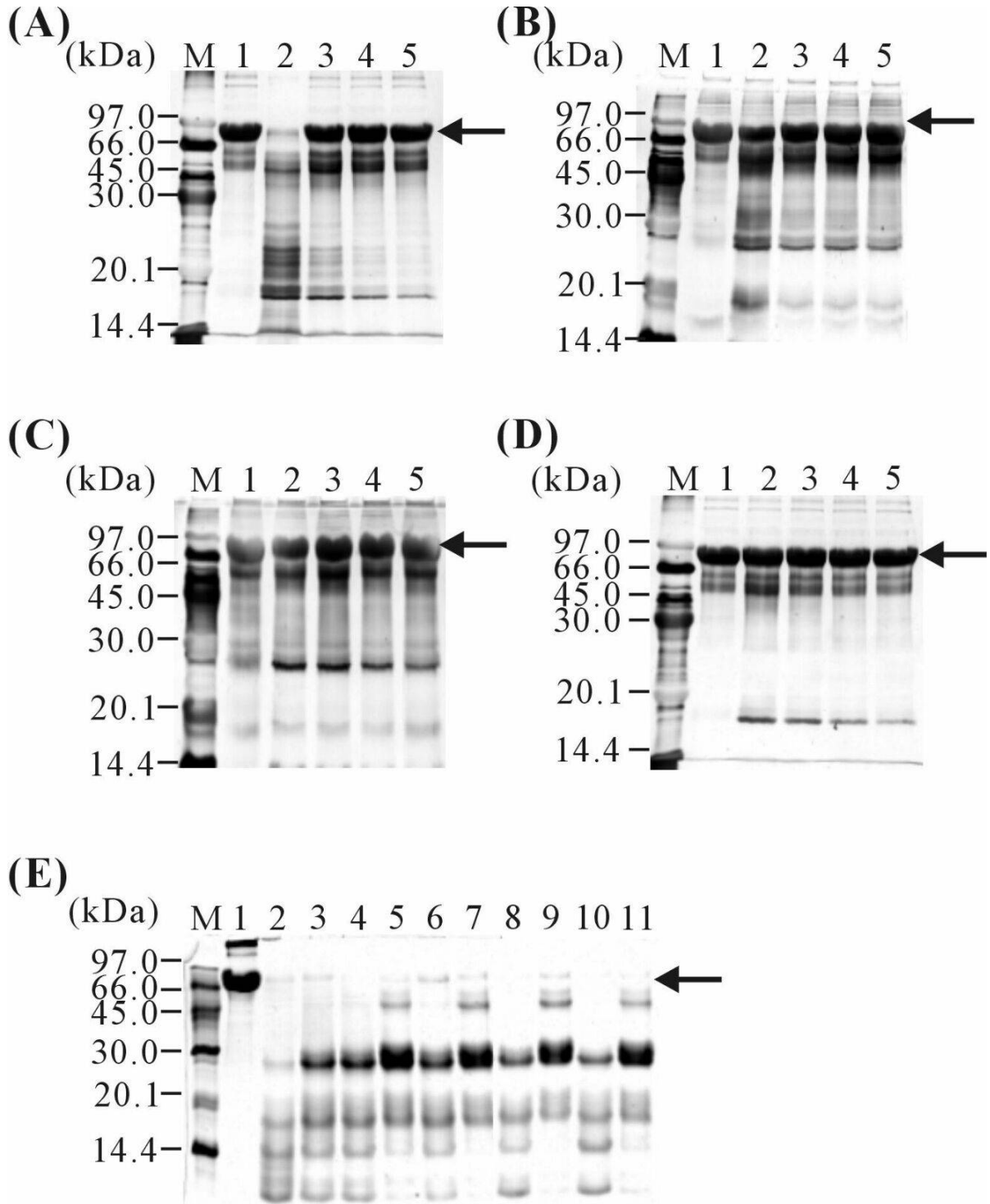
【図 4】



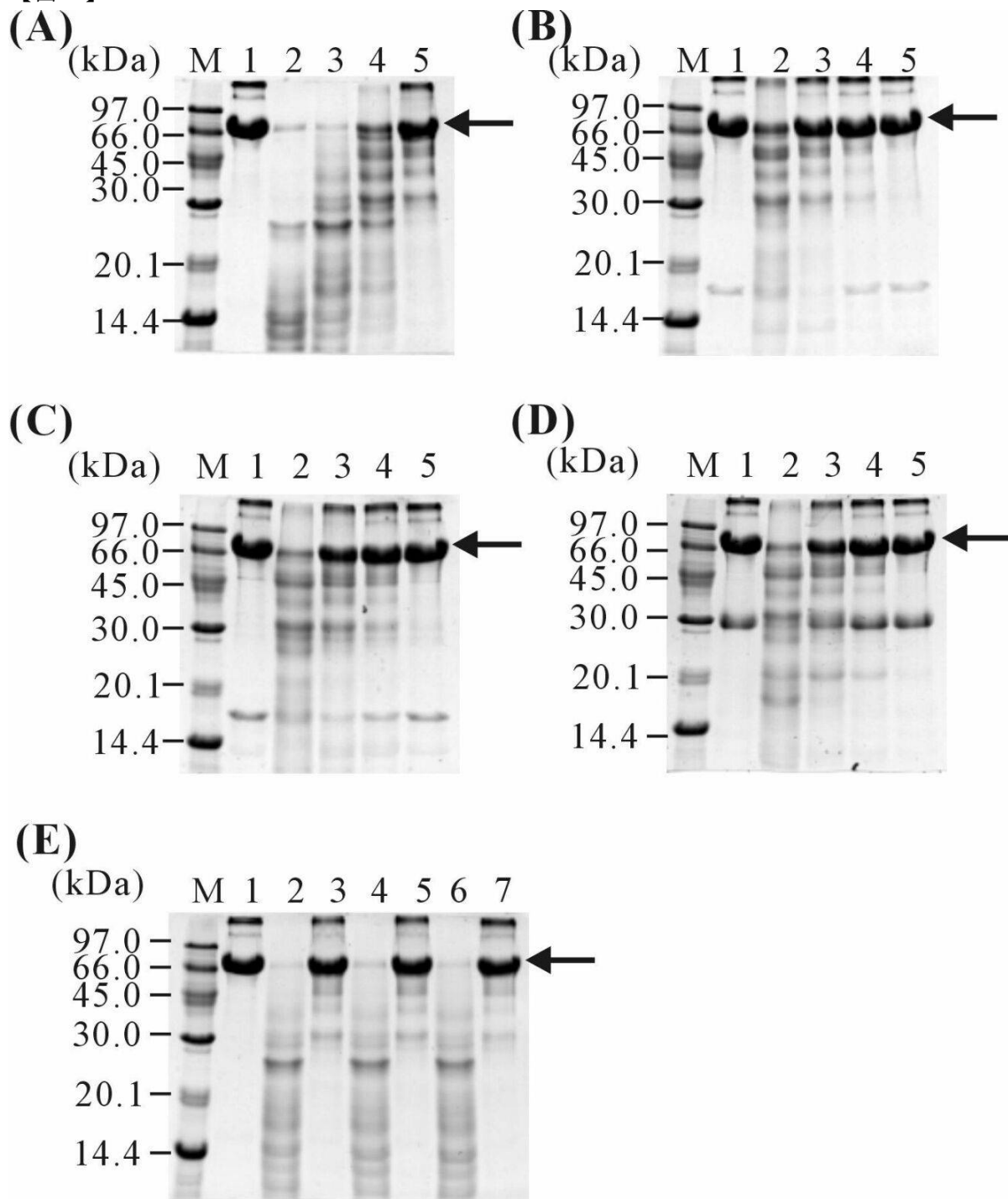
【図 5】



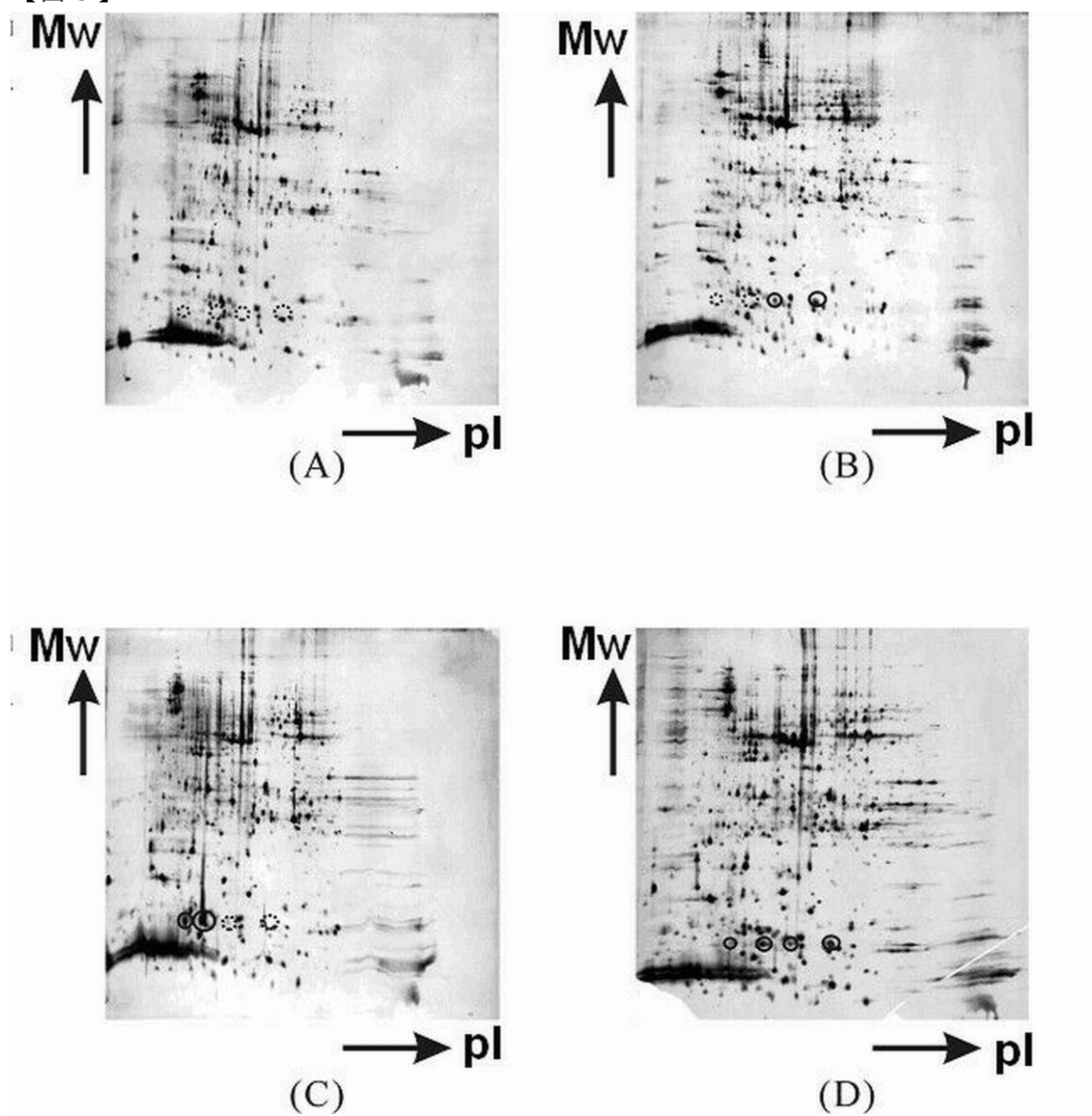
【図 6】



【図 7】

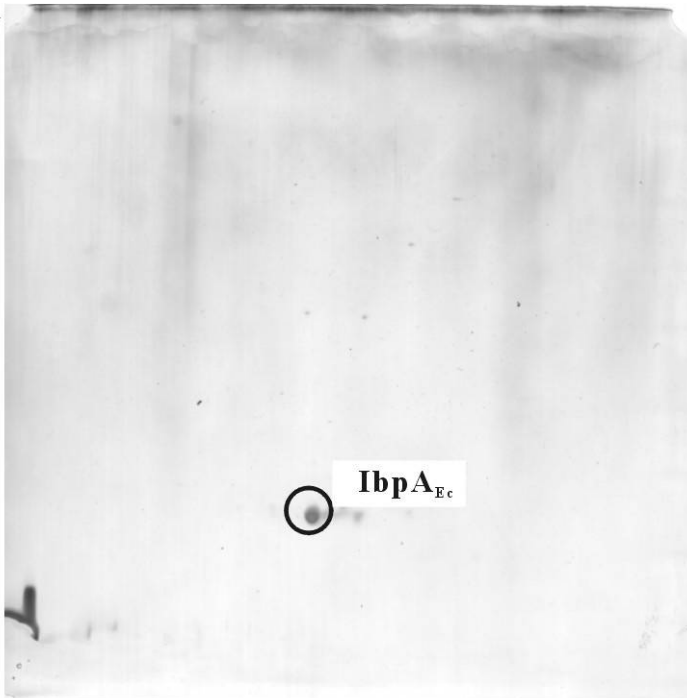


【図 8】



【図 9】

Mw

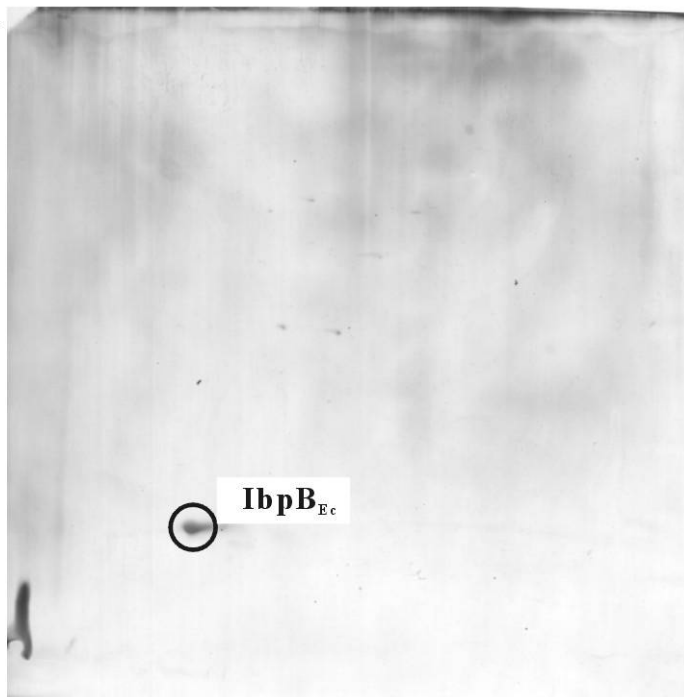


(A)



pI

Mw

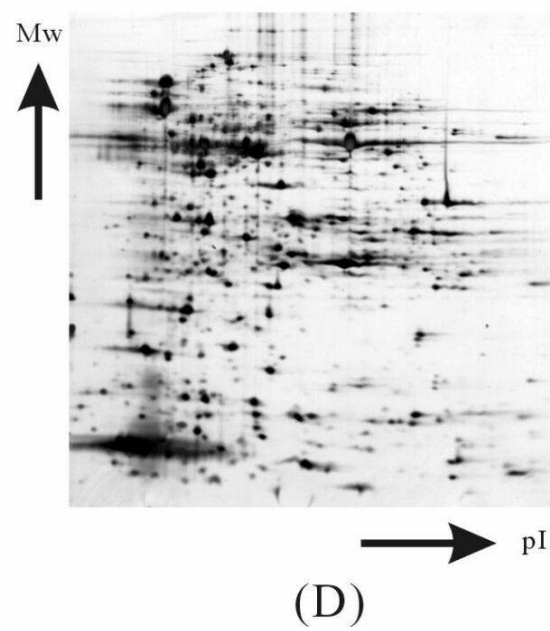
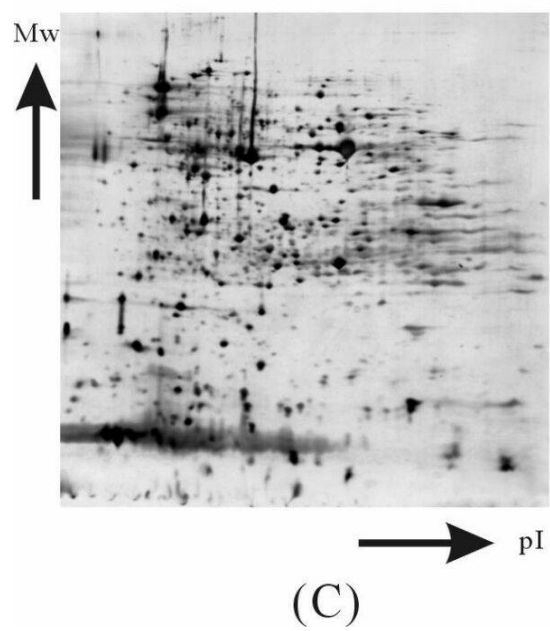
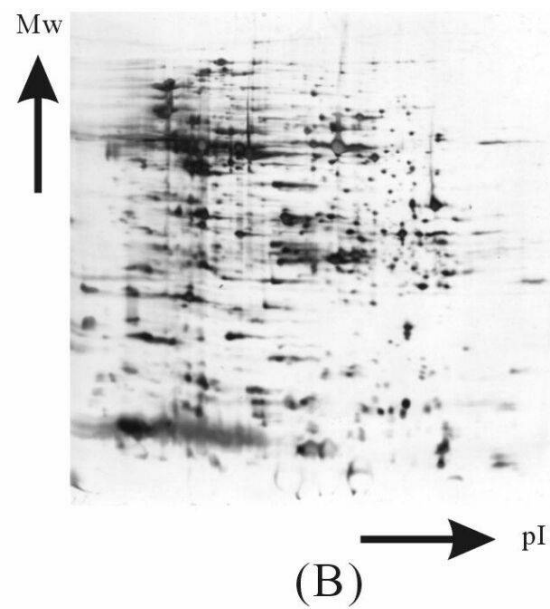
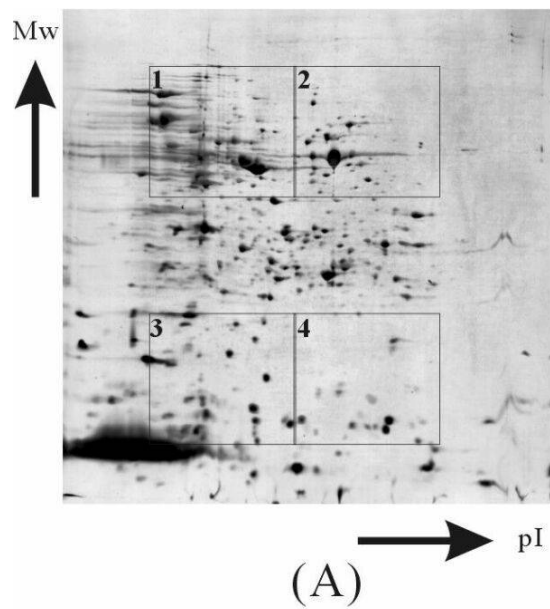


(B)

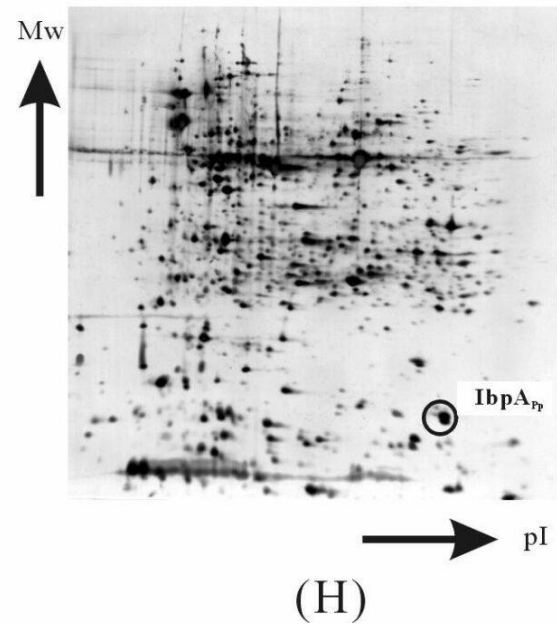
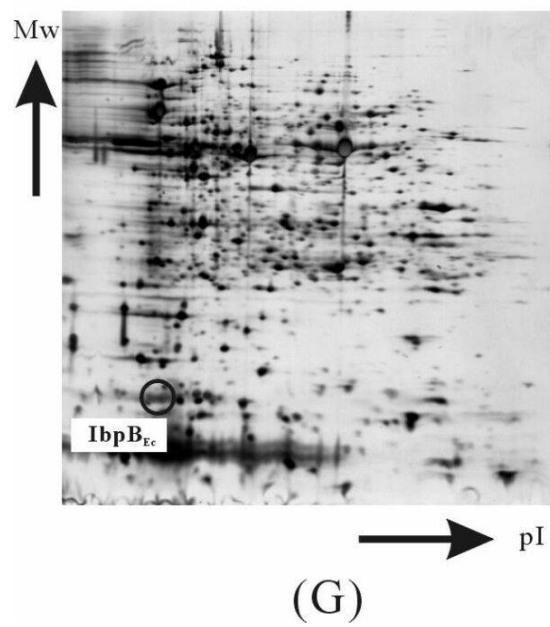
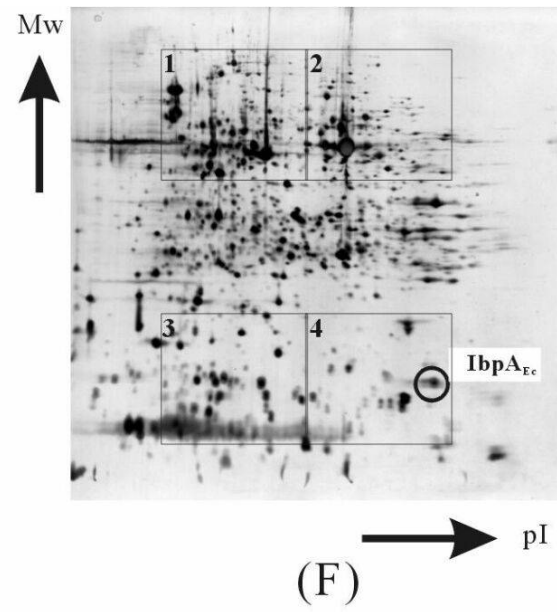
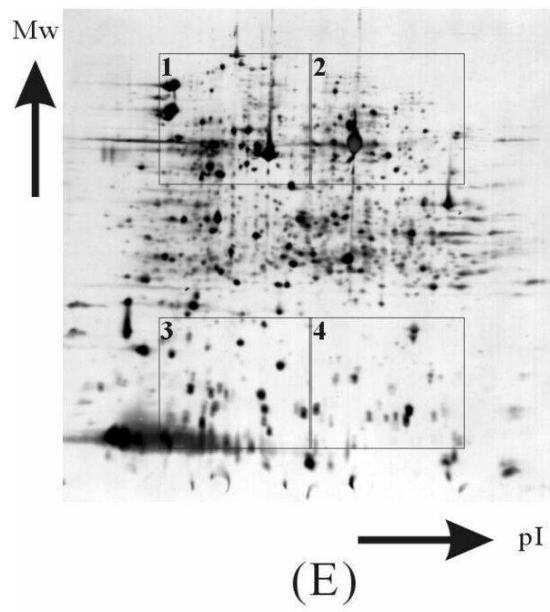


pI

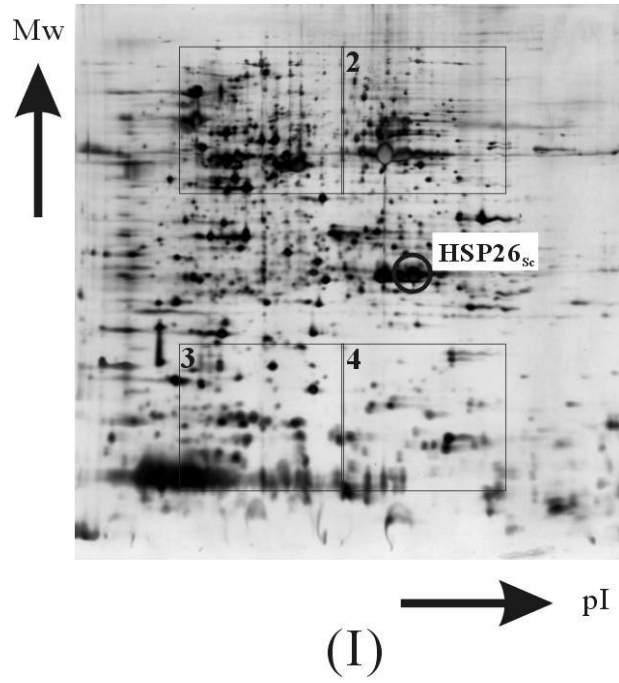
【図 10-1】



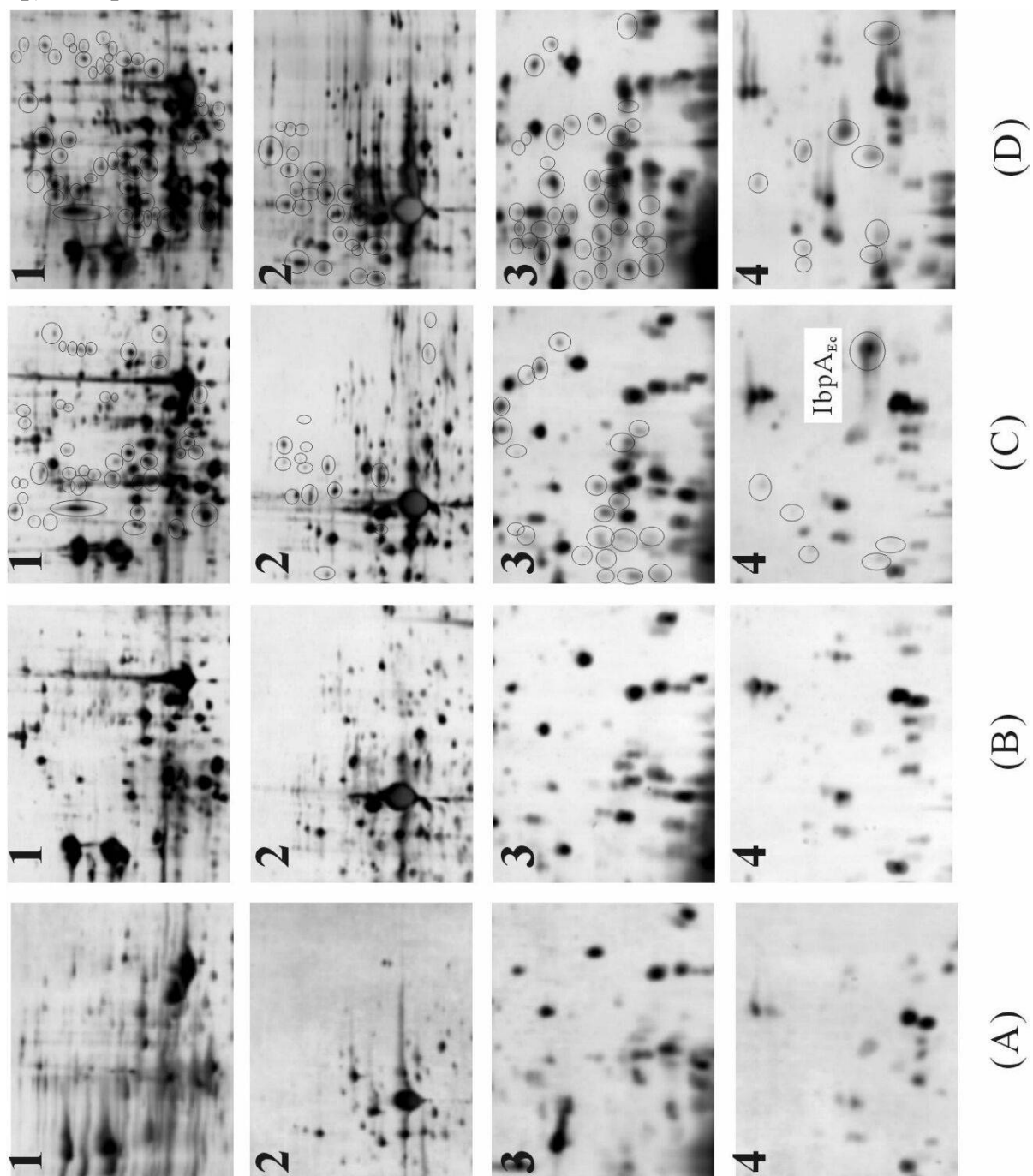
【図 10-2】



【図 10-3】



【図 11】



【図 1 2】

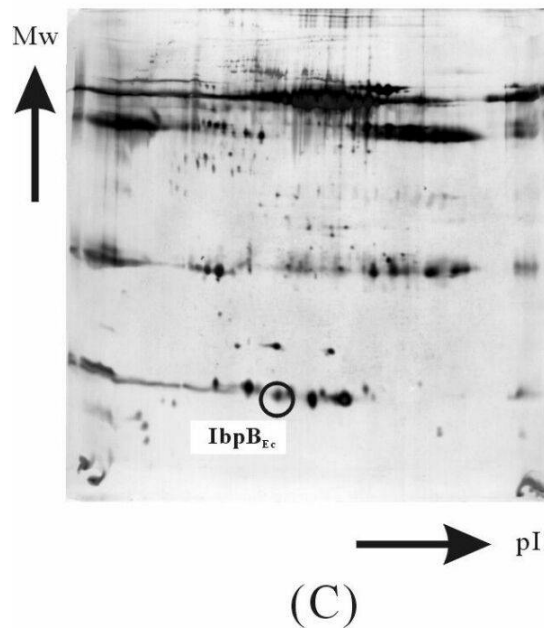
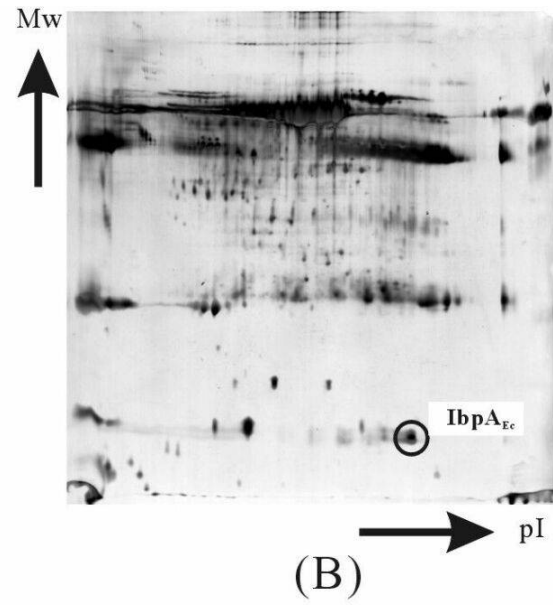
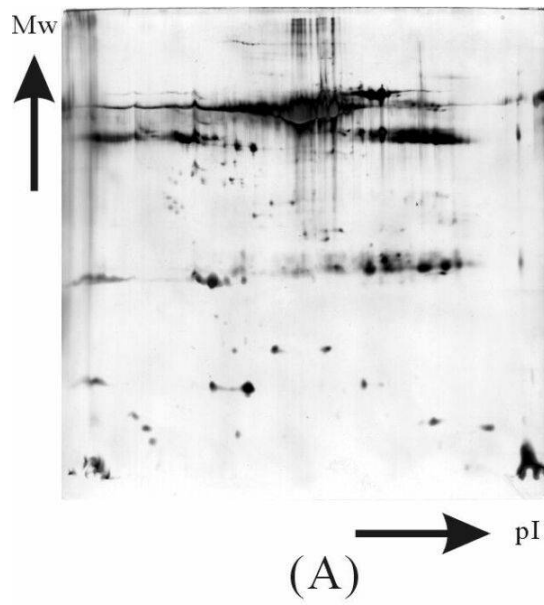
Mw

(A)  pI

Mw

(B)  pI

【図 1 3】



【配列表】

[0004268556000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 リー サン ユップ
大韓民国 デジョン 305-761, ユソング, ジョンミンードン 464-1, エク
スポ アpartment 212-702

(72)発明者 ハン ミージュン
大韓民国 デジョン 305-701, ユソング, グソンドン 373-1, デパートメ
ント オブ ケミカル アンド バイオモレキュラー エンジニアリング

(72)発明者 パク シ ジェ
大韓民国 デジョン 302-740, ソグ, マニョンドン チョウォン アpartment
ト 108-1203

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開2001-061487 (JP, A)
特表平10-504097 (JP, A)
特表2005-523693 (JP, A)
特表2002-516288 (JP, A)
特開平10-052272 (JP, A)
国際公開第01/083804 (WO, A1)
特開平07-025897 (JP, A)
国際公開第01/079250 (WO, A1)
SKYLAS DJ et al, he wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identi
fication, Proteomics, vol.1,no.12, p.1542-1546

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/447
G01N 33/483
G01N 33/68
PubMed
JMEDPlus (JDreamII)
JST7580 (JDreamII)