

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3054692号
(P3054692)

(45)発行日 平成12年6月19日(2000.6.19)

(24)登録日 平成12年4月14日(2000.4.14)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 0 7 K 14/435

C 0 7 K 14/435

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 21/00

C

// C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:19)

請求項の数2(全 5 頁)

(21)出願番号

特願平9-341956

(22)出願日

平成9年11月28日(1997.11.28)

(65)公開番号

特開平11-158199

(43)公開日

平成11年6月15日(1999.6.15)

審査請求日

平成9年12月3日(1997.12.3)

(73)特許権者 391030284

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長
茨城県つくば市大わし1-2

(72)発明者

レアル バルター スアレス

茨城県つくば市大わし1-2 農林水産
省 蚕糸・昆虫農業技術研究所内

(72)発明者

ヒューバート ヴォイタセク

茨城県つくば市松代3-17-22-102

(74)代理人

100080447

弁理士 太田 恵一

審査官

新見 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フェロモン結合タンパク質及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 Bombyx mori から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてpelBシグナルペプチドを含むpET-22bベクターにより発現させることで得られた、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質。

【請求項2】 Bombyx mori から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてpelBシグナルペプチドを含むpET-22bベクターにより発現させることで製造する、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

【0002】本発明は、フェロモン結合タンパク質及び

その製造方法に関し、詳細には、Bombyx mori の組み換えフェロモン結合タンパク質(rPB P)及びその製造方法に関する。

【0003】Bombyx mori の組み換えフェロモン結合タンパク質(rPB P)は、昆虫のにおい分子結合タンパク質(OBP)の三次元構造や配位子結合の研究に用いられるだけでなく、このようなタンパク質の配位子複合体の嗅覚受容体に対する研究等に利用されるものである。

【0004】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

【0005】におい分子結合タンパク質(OBP)は、昆虫の触角内のリンパ液の中で最も豊富な成分である。

【0006】このようなタンパク質は、昆虫の情報伝達物質の輸送、保護、不活性化のいずれか、あるいはそれ

らの組合せに關与すると考えられている。

【0007】におい分子結合タンパク質は、蝶蛾類鱗翅目で調査されており、少なくとも2つのグループに區別されている。

【0008】フェロモン結合タンパク質(PBP)は、におい分子結合タンパク質の一つに属し、(性)フェロモンの認識に關与するタンパク質として區別されている。

【0009】また、におい分子結合タンパク質の他方のグループに属するタンパク質は、一般的なにおい物質の認識に關与するにおい分子結合タンパク質(GBP)である。

【0010】性フェロモンの認識に關与するタンパク質であるフェロモン結合タンパク質(PBP)は、*Antheraea polyphemus*(ポリフェムス蚕)で初めて同定されてから、いくつかの昆虫目の中から検出され特徴付けされている。

【0011】機能的には、このようなタンパク質は、リポカリン、すなわち疎水性配位子を結合するタンパク質として分類することができる。

【0012】しかし、昆虫におい分子結合タンパク質(昆虫OBP)は、主として、バレルを形成する8個ないし10個の逆平行鎖で構成され、他のリポカリンと相同性をほとんど有さない。

【0013】そして、円二色性測定および理論構造計算によって、昆虫OBPが主としてヘリックス状であることが明らかになった。

【0014】そこで、昆虫OBPの三次元構造や配位子結合の研究を行うことにより、このようなタンパク質の嗅覚受容体に対する研究を行うことができると考えられる。

【0015】そのため、研究素材として大量の生理活性昆虫OBPが求められていたが、直接昆虫のみから抽出するだけでは、十分な量の昆虫OBPを得ることは不可能である。

【0016】昆虫におい分子結合タンパク質は、従来、細菌系と真核系の両方で発現することが知られている。

【0017】*Antheraea pernyi*(サク蚕)は、バキュロウィルス系で発現しているが、収率が低く、十分な量の昆虫OBPを得るための手段としては完全なものではない。

【0018】また、従来、大腸菌中の*Antheraea polyphemus*(ポリフェムス蚕)から得たPBPは、収率が低く、生理的不活性状態のため、構造研究および機能研究のために立体構造の再生を行う必要があった。

【0019】従って、十分な量の昆虫OBPを供給することが可能であり、しかも、生理的活性のある状態で大量生産する手段が望まれていた。

【0020】

【課題を解決するための手段】

【0021】我々は、上記課題を解決するための研究を行った結果、*Bombyx mori*から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてp_{el}Bシグナルペプチドを含むpET-22bベクターで発現させることにより、生理的活性を有するものを高収率で得ることができることを見出し、また、より効率的な発現条件は、一般的な温度(37℃)ではなく、29℃で、さらに誘導物質(IPTG)がないときに達成されることを見出した。

【0022】即ち、本発明の課題を解決するための手段は、下記のとおりである。

【0023】(1)*Bombyx mori*から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてp_{el}Bシグナルペプチドを含むpET-22bベクターにより発現させることで得られた、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質。

(2)*Bombyx mori*から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてp_{el}Bシグナルペプチドを含むpET-22bベクターにより発現させることで製造する、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質の製造方法。

(3)*Bombyx mori*から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてp_{el}Bシグナルペプチドを含むpET-22bベクターを用い、36~38℃、望ましくは28~30℃で発現させることで製造する、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質の製造方法。

(4)*Bombyx mori*から得たフェロモン結合タンパク質を、大腸菌を用いてp_{el}Bシグナルペプチドを含むpET-22bベクターを用い、36~38℃、望ましくは28~30℃で、かつ誘導物質(IPTG)がないときに発現させることで製造する、生理活性状態のフェロモン結合タンパク質の製造方法。

【0024】本発明に係る組み換えタンパク質は、非SDS電気泳動検定時に同位体標識フェロモン(ボンピコール)と効率的に結合した。

【0025】

【実施例】

【0026】[材料および方法]

【0027】1.分子クローニングおよび組み換えベクターの調製

【0028】20匹の*B. mori*オスの触角から単一ステップグアニジウム酸・フェノール・クロロホルム抽出によってRNAを分離した。Poly ATtract(Promega)を使用してmRNAを精製し、cDNA鎖をAMV逆転写酵素(Promega)およびオリゴ(dT)プライマーによって合成した。逆転写酵素を70℃で10分間不活性化し、反応混合物を20倍に希釈し、約1ngのcDNAを使用してDNA増幅反

応(PCR)を生じさせた。周知のB.mori PBPの配列に基づいて下記のプライマーを設計した。

【0029】CGTCTCAAGAAGTCATGA (MscI部位への5'-プライマープラントエンド連結反応)

【0030】AGACACTCGAGATTCTCAA ACTTCAGCT(単純構造Xho I部位用の3'-プライマーに下線を施してある)

【0031】ACAGAGTTCGACTTTCAGCTAA AATTCTCC(Xho Iに匹敵しC-末端バリンを保存するHisTag構造Sal I部位用の3'-プライマーに下線を施してある)。

【0032】pH8.5の50mMのTris-HCl、15mMの(NH₄)₂SO₄、15mMのMgCl₂中のPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)を使用してMiniCycler PTC-150、MJ Research)で重合酵素鎖反応を実施し、50°Cでのアニリングを施した。PCR生成物をXho IまたはSal Iを用いて消化し、GeneClean(Bio101)によって低融点アガロースから精製し、Msc IおよびXho Iを用いて事前に消化され同様に精製されたpET22b(Novagen)と連結反応させた。連結反応を使用してEpicurian大腸菌MRF' Kan細胞(Stratagene)を形質転換させ、組み換えベクターを含むコロニーをPCRによって識別した。プラスミドを分離し、ABI PRISMモデル373A自動DNAシーケンサ(PE Applied Biosystems)を用いてDye Terminator Reaction Ready kits(Perkin Elmer)を使用し、この構造とT7プロモータおよびT7ターミネータのプライマーとの配列を決定した。

【0033】2. 組み換えタンパク質の発現

【0034】検証された配列を有する組み換えベクターを、発現宿主BL21(DE3)またはBL21(DE3)pLysS(Novagen)に転写した。単一コロニーを使用して溶液媒体(50μg/mlのカルペニシリンを含むLB)を接種し、30°Cで一晩あるいは29°Cで24時間成長させた。次いで、培養液をOD₅₅₀=0.8に希釈し、前誘導した培養液のアリコートを得て、最終濃度が1mMになるようにIPTGを添加した。誘導から2時間および3時間後(37°C)、あるいは3時間および5時間(29°C)後に追加アリコートを得た。製造業者(Novagen)の説明に従って、浸透圧ショックによってペリプラズムタンパク質を放出させた。別法として、音波処理または凍結融解サイクルによって可溶タンパク質を放出させた。B.moriオス触角抽出物を対照試料として得て、SDSおよび非SDS-PAGEによってすべてのサンプルを分析した。

【0035】3. 組み換えタンパク質の精製および特徴

付け

【0036】ペルプラズム分画にpH8.0のTris-HClを最終濃度が20mMになるように添加し、MonoQカラム(HR5/5、Pharmacia)上にサンプルを載置した。Pharmacia FPLCシステムを使用して、直線勾配の0mMないし400mMのNaClとpH8.0の10mMのTris-HClとの混合物でタンパク質を溶離させた。組み換えPBPを含む分画をプルし(5ml)、pH8.0の10mMのTris-HClで事前に平衡化されたゲル濾過カラム(Sephacryl S-100 HR、Pharmacia、2.5×50cm)に付与し、サンプル緩衝液を用いてタンパク質を25ml/時で溶離させた。Beckman System Gold HPLC上のPTH分析を用いてBeckman LF 300 PS気相ペプチドシーケンサ上で、精製したPBPのN末端配列を判定した。3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸をマトリックスとして用いて、陽イオンモードのMALDI-TOF質量分析計(Voyager、PerSeptive Biosystems)によって組み換えタンパク質の分子量を測定した。周知の手順に従って標識ボンビコールを用いた結合評価法によって組み換えタンパク質の活性を試験した。

【0037】[手順および考察]

【0038】我々は、発現したタンパク質を大腸菌ペリプラズムへ送るN-末端PelBシグナルペプチドを含むPET-22bベクターを選択した。これによって、ジスルフィド結合を形成する適切な酸化環境が与えられる。昆虫PBPは、分泌タンパク質であり、2つまたは3つのジスルフィド結合の存在が仮定されている。大きさ、機能、特性が、フェロモン結合タンパク質(PBP)に類似している血清レチノール結合タンパク質の場合、ペリプラズム発現が成功した。フェロモン結合タンパク質(PBP)は、リボカリン類から得た大半のタンパク質とは異なり、3つのジスルフィド結合を有する。リボカリン類には、そのような結合が欠落している。この発現系を使用して一般的宿主BL21(DE3)中のB.mori rPBPおよびHis-TaggedバージョンのrPBPについて高レベルの発現を達成した(図1)。

【0039】図1は、本発明によって得たB.mori PBPの発現を示す電気泳動検定時の結果を示す図で、Aは37°C、Bは29°Cの場合を示す。15%のSDSポリアクリルアミドゲル上で、全細胞ペレット(100μl培養液相当物)、浸透圧ショックまたは凍結融解サイクルによって放出された可溶性タンパク質(500μl培養液相当物)の各試料を分離した。試料は、誘導前(0)および図示した時点(37°Cでは2時間、29°Cでは3時間)に得た。長いインキュベーション時間(37°Cでは3時間、29°Cでは5時間)では可溶タン

パク質の収量はさらに低下した。

【0040】我々のヌクレオチド配列は、周知の配列とは（配列決定されたすべての6つのクローンのうちで）4つの位置が異なっていたが、このような置換によってタンパク質のアミノ酸配列が変化することはなかった。IPTGを用いて誘導する前でもかなりの発現があった。誘導後、高度に発現された2つのバンドが現れ、全組み換えタンパク質の量は、37で発現させると、40mg/Lないし50mg/Lに上昇した。しかし、誘導後にペリプラズムへの伝達が著しく低減し、IPTGがない状態で高収量の可溶タンパク質が得られた。このような条件（37、前誘導された培養液）の下では、浸透圧ショックを与えてもペリプラズム部分から10%ないし20%（<2mg）しか放出されなかった（図1中のA）。音波処理および凍結融解サイクルはより効率的であったが、これらの方法ではずっと大量の細菌のタンパク質も放出され（図1）、そのため精製手順が複雑なものになり、したがって最終収量が低減した。HisTag構造では精製効率に関する利点は得られず、したがってそれ以上の操作は追求しなかった。

【0041】低温での発現では、全組み換えタンパク質の量が著しく低減されても、可溶タンパク質の割合が増加することが一般に知られている。組み換えタンパク質が低速で産生されると、適切なタンパク質プロセッシングおよび折り畳みにより適した条件が得られ、細胞プロテアーゼおよびシャペロニンに十分な時間が与えられる。したがって、29でのB.mori rPBPの発現を試験した。誘導物質がない状態では、37の場合と比べて組み換えタンパク質の量はそれほど低減しなかった。しかし、次に、ほぼすべて（>80%）の組み換えタンパク質が可溶形態で産生され、ペリプラズムへ送られた（図1中のB）。組み換えタンパク質が蓄積され、培養液が高密度に成長し（OD550 = 1.6）、そのような条件を使用して大規模な発現を得た（図2）。

【0042】図2は、本発明に係る精製した組み換えタンパク質の電気泳動検定時の結果を示す図である。培養液を遅いlogフェイズまで成長させ、ペリプラズムタンパク質を浸透圧ショックによって放出させ、イオン交換（Mono Q）およびゲル濾過（Sephacryl S-100HR）クロマトグラフィーによって精製した。15% SDSポリアクリルアミドゲル上でそれぞれほぼ等しい量の全細胞リゼイト（WC）またはペリプラズム分画（Per）中の組み換えタンパク質、あるいは純粋な形態の組み換えタンパク質を分離した。

【0043】浸透圧ショックによって1リットル当たり約8mgの可溶組み換えタンパク質を比較的純粋な形態で分離することができ、完全な精製（>99%）が2ステップで容易に達成された（図2）。

【0044】N-末端配列決定および質量分析計によって、前誘導相中に発現しペリプラズムへ送られるより低

いバンドが、PelBシグナルペプチドを含まない適切に成熟したタンパク質であることが分かった。単純タンパク質に関して求められた分子量は、15888Da（計算値15884Da）であり、His-Tag構造の場合は16843（計算値16836Da）であった。（天然タンパク質と等価の）単純構造から得られたより低いバンドも、非SDS-ゲルの触角抽出物から得たB.mori PBPと一致した。したがって、2番目に高いバンドは、シグナルペプチドを含む未成熟プリタンパク質（preprotein）であった。明らかに、標的タンパク質が急速に産生されると、シグナルペプチドの容量を超えた。誘導物質のない状態での標的タンパク質の低速発現によって、組み換えタンパク質が適切に成熟しペリプラズムへ送られるのに十分な時間が与えられた。Manduca sextaから得た一般的な分子結合タンパク質の場合、pH11+ベクターにおいて細胞内で発現させると、誘導前に組み換えタンパク質の顕著な発現が観測された。したがって、誘導物質のない状態での発現はこのようなタンパク質のより一般的な特徴であり、ペリプラズムターゲティングと組み合わせれば、大腸菌中でこのようなタンパク質を産生する効率的な方法を形成することができる。ペリプラズム局在化では、たとえばM.sexta GOBP1の場合、組み換えタンパク質の劣化も回避される。したがって、我々は、ペリプラズム発現系は一般に、大腸菌でのこの種のタンパク質の発現に適用することができる結論する。

【0045】組み換えタンパク質の活性を試験するために、標識フェロモンを用いて結合能の測定を実施した。タンパク質は効率的に同位体配位子に結合し、タンパク質が適切に折り畳まれており生理的活性を有することが示された。

【0046】なお、図3は、天然フェロモン結合タンパク質（PBP）と結合された、ペリプラズム分画（Per）中の組み換えタンパク質または純粋な組み換えタンパク質の電気泳動検定時の結果を示す図である。

【0047】

【発明の効果】

【0048】本発明によれば、十分な量の昆虫OBPを発現させることが可能であり、しかも、生理的活性のある状態で大量生産することができる。

【図面の簡単な説明】

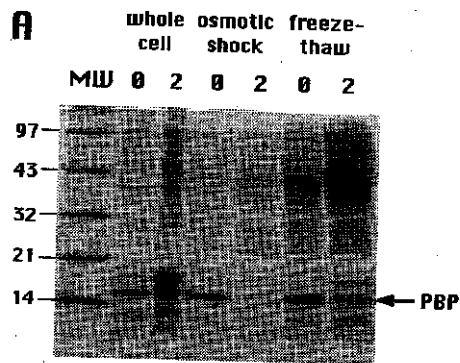
【図1】本発明によるB.moriのフェロモン結合タンパク質の電気泳動検定時の結果を示す図で、Aは37、Bは29の場合を示す。

【図2】本発明に係る精製した組み換えタンパク質の電気泳動検定時の結果を示す図である。

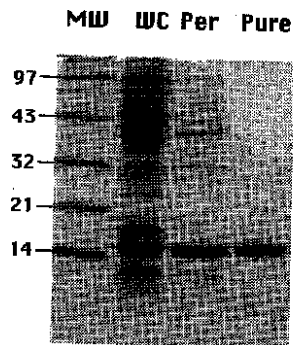
【図3】天然フェロモン結合タンパク質（PBP）と結合された、ペリプラズム分画（Per）中の組み換えタンパク質または純粋な組み換えタンパク質の電気泳動

検定時の結果を示す図である。

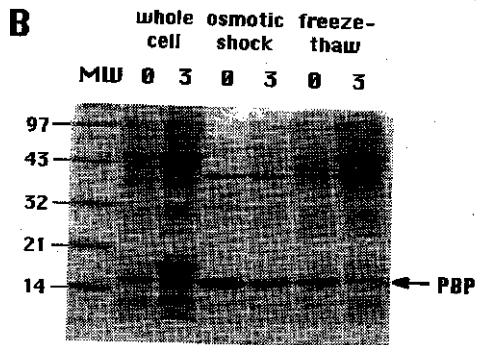
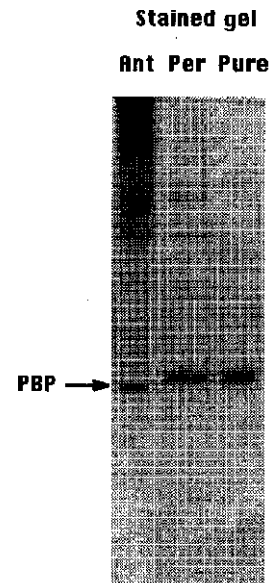
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

- (56) 参考文献 Insect Biochem. Mol. Biol. (1993) Vol. 23, No. 2, p. 243 - 253
 Insect Biochem. Mol. Biol. (1996) Vol. 26, No. 3, p. 297 - 307

- (58) 調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
 C07K 14/435
 C12P 21/00 - 21/02
 C12N 15/12 - 15/28
 BIOSIS (DIALOG)
 CA (STN)
 REGISTRY (STN)
 WPI (DIALOG)