

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5675063号  
(P5675063)

(45) 発行日 平成27年2月25日(2015.2.25)

(24) 登録日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 P 21/06 (2006.01)** C 1 2 P 21/06  
**A 2 3 J 3/34 (2006.01)** A 2 3 J 3/34

請求項の数 3 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2009-136769 (P2009-136769)                  (22) 出願日 平成21年6月8日(2009.6.8)                  (65) 公開番号 特開2010-279313 (P2010-279313A)                  (43) 公開日 平成22年12月16日(2010.12.16)                  審査請求日 平成24年6月6日(2012.6.6)</p> <p>特許法第30条第1項適用 刊行物名: BIOPHYSICAL SCIENCE Vol. 4 (2008) Web版 公開者: 社団法人 日本生物物理学会 (The BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN) 掲載日: 平成20年12月18日</p>	<p>(73) 特許権者 000125347                  学校法人近畿大学                  大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号                  (74) 代理人 100098464                  弁理士 河村 洸                  (74) 代理人 100149630                  弁理士 藤森 洋介                  (74) 代理人 100154449                  弁理士 谷 征史                  (74) 代理人 100111279                  弁理士 三嶋 真弘                  (74) 代理人 100110984                  弁理士 加藤 敬子</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質の分解方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体の加圧下での分解方法であって、

(a) 対象とする蛋白質または蛋白質集合体の折りたたみ配座異性体が無秩序配座異性体になるときの体積変化  $V$  を取得または決定する工程、

(b) 対象とする蛋白質または蛋白質集合体と分解酵素とを緩衝液に溶解または分散させる工程、ならびに

(c) (b) で得られた溶解液または分散液を、前記  $V$  に応じた圧力下で処理し、対象とする蛋白質の折りたたみ配座異性体の構造を変化させることにより、および/または蛋白質集合体を蛋白質単体に解離させた上で配座異性体の構造を変化させることにより、対象とする蛋白質または蛋白質集合体を前記分解酵素により分解する工程を含む分解方法。

【請求項2】

$V$  の決定を高圧NMRまたは高圧蛍光法により行う請求項1記載の分解方法。

【請求項3】

前記プロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体が蛋白質集合体であり、該蛋白質集合体が同一または異なる蛋白質単体が会合した集合体である請求項1または2記載の分解方法。

【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体を分解する、蛋白質の分解方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

酵素によるプロテオリシスが、加圧により促進される例は知られている（例えば、非特許文献1参照）。非特許文献1では、反応速度論による見かけの活性化体積が負になることから、反応の促進は、圧力による酵素自身の活性の増大によるものであると分析された。

10

## 【0003】

一方、蛋白質には、通常の蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが困難な蛋白質または蛋白質集合体が存在することが知られている。これらの蛋白質または蛋白質集合体では、ポリペプチド鎖は折れたたまって堅固な構造をとるため、そのままでは蛋白質分解酵素の触媒部位に結合できないか、たとえ結合しても分解されない。そのため、通常の条件下では蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが困難となる。

## 【0004】

また、蛋白質集合体の中でも多くの神経変性疾患やアミロイド疾患では、その病態から、配座異性化した蛋白質分子の線維状集合体の蓄積が病因と関わっていると考えられている。これらの線維状集合体は、通常の蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが極めて困難である。

20

## 【0005】

したがって、通常の条件下で蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが困難であるこれらの蛋白質または蛋白質集合体を効果的に分解することが重要となる。

【非特許文献1】Morild, E., 「The theory of pressure effects on enzyme」, Adv. Prot. Chem., 34巻、pp93-166、(1981)

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

すなわち、本発明は、上記問題に鑑みなされたものであり、その目的は、通常の条件下で蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが困難である蛋白質または蛋白質集合体を効果的に、ペプチドまたはアミノ酸に分解する方法を提供することにある。

30

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、加圧下における蛋白質の態様について研究を重ねてきた。その結果、通常の条件下では蛋白質分解酵素によるプロテオリシスが困難である蛋白質または蛋白質集合体を、蛋白質分解酵素の存在下で加圧することにより、これらの蛋白質が分解される新たな機構を見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明は以下のとおりである。

## 【0008】

本発明の蛋白質の分解方法では、常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体を加圧下で酵素の存在下で分解する。

40

## 【0009】

前記プロテオリシス抵抗性の蛋白質集合体は、同一または異なる蛋白質単体が会合した蛋白質集合体であってもよい。

## 【0010】

難分解性の蛋白質を効率的に分解する新たな機構では、前記加圧により、分解されるべき蛋白質の配座異性体の構造（立体構造）を変化させる、および/または分解されるべき蛋白質集合体を蛋白質単体に解離させ、さらに配座異性体（立体構造）の構造を変化させる。

50

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明の方法では、従来酵素によるプロテオリシスが行われ難い難分解性の蛋白質または蛋白質集合体を、酵素の存在下で、加圧下に置く。加圧下で難分解性の蛋白質または蛋白質集合体の立体構造が変化し、酵素によるプロテオリシスを受け易い構造になる。この立体構造の変化した蛋白質が酵素により分解される。この結果、常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体を酵素により分解することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0012】

【図1】図1は、上記試料溶液を、37℃で1bar(0.1MPa)~3500bar(350MPa)間で段階的に圧力を変え、50分間処理をした結果を示すSDS-PAGEの写真である。

10

【図2】図2は、トリプトファンの蛍光を用いて、加圧下におけるα-キモトリプシン固有の折りたたみ配座異性体の安定性を測定した結果を示すグラフである。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0013】

以下に、本発明を詳細に説明する。本発明の蛋白質の分解方法は、常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体を加圧下で酵素の存在下で分解するものである。

## 【0014】

20

## [蛋白質]

本発明の分解の対象となる蛋白質は、常圧下においてプロテオリシス抵抗性の蛋白質または蛋白質集合体である。例えば、球状蛋白質、線維状蛋白質などの蛋白質、同一または異なる蛋白質単位が会合した蛋白質集合体である。本発明の方法を用いると、これらの蛋白質または蛋白質集合体を効率よく分解することができる。これらの蛋白質または蛋白質集合体には、分解効率は悪くとも常圧下で、酵素による分解を受けるものあるいは酵素なしに高圧下で分解する蛋白質を含んでいてもよい。本発明の方法において、特に優れている点は、常圧では酵素による分解を受けない蛋白質または蛋白質集合体を、高圧下で分解することができることである。

## 【0015】

30

本発明の分解の対象となる蛋白質または蛋白質集合体は、上記のものであれば特に制限はない。これらの蛋白質は蛋白質単独でも、あるいは食品、ウイルス、医療用器具または金属・ガラス・セラミックス等への付着物または廃棄物等に含まれるものであっても良く、生体に存在するものであっても良い。例えば、ユビキチンなどの球状蛋白質、コラーゲンや筋肉などの線維状蛋白質、アミロイド線維などである。

## 【0016】

## [分解のメカニズム]

本発明者らは、高圧NMR(Nuclear Magnetic Resonance:核磁気共鳴)を用いて蛋白質の構造に関する研究を長年行ってきた。この研究により、蛋白質の構造における新しい熱力学的特徴が解明されてきた。例えば、球状蛋白質の一例として、ユビキチンが知られている。ユビキチンは、76個のアミノ酸からなる小分子の蛋白質である。ユビキチンは、蛋白質分解のタグなどの機能を有する。ユビキチンは、基本的な折りたたみ構造を有する。本発明者らは、極めて生理的な状態においてさえも、ユビキチンが、基本的な折りたたみ配座異性体(フォールド構造)だけでなく、局所開裂配座異性体(局所オープン構造)、部分的な無秩序配座異性体(局所変性構造)、無秩序配座異性体(完全変性構造)などを含む様々な配座異性体(コンフォーメーション)の間に動的平衡が存在することを見出した。しかしユビキチンにおいて、通常の状態では平衡はほとんど基本的な折りたたみ配座異性体に傾き、部分的な無秩序配座異性体、無秩序配座異性体は、極めて少ない。このため、ユビキチンは、α-キモトリプシンによるプロテオリシスに強く抵抗する。しかしながら、一般に生理条件に近い水溶液中では、無秩序配

40

50

座異性体の実効体積は、基本的な折りたたみ配座異性体の実効体積と比べて、小さいことが知られている。

【0017】

この水溶液に1キロバール(1 k b a r ( 1 0 0 M P a ))程度の圧力を加えると、体積の小さな無秩序配座異性体の濃度が劇的に増大する。これは、配座異性体間の実効体積の差  $V$  によって、もともと少ない無秩序配座異性体の割合が、圧力に対して指数関数式  $e \times p ( - P \quad V / R T )$  に従って増加するためである。ここに  $P$  は圧力、 $V$  は折りたたみ配座異性体が無秩序配座異性体になるときの体積変化(通常は負)、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度である。この式から、 $V$  の値が判ると、加圧により無秩序配座異性体の割合がいくら増えるのかがわかる。 $V$  の値は蛋白質の種類、温度、溶媒条件等によって異なるが、高圧NMRまたは高圧蛍光法等の公知の方法を用いて予め決定しておくことができる。例えば  $V = - 9 0 \text{ ml / mol}$  の場合、 $2 0 0 0 \text{ bar ( 2 0 0 M P a )}$  まで加圧すると無秩序配座異性体の割合は1000倍程度増える。

10

【0018】

無秩序配座異性体では蛋白質分子は軟らかく、簡単に酵素の活性中心にはまり込むため、酵素による迅速な加水分解を受ける。すなわち、本発明は、酵素によるプロテオリシスを受け易い無秩序配座異性体の濃度を、加圧により劇的に増加させ、ペプチドやアミノ酸へと加水分解するものである。無秩序配座異性体は、基本的な折りたたみ配座異性体と動的平衡にあるため、分解されてもまた基本的な折りたたみ配座異性体から供給される。このようにして蛋白質の加水分解反応が進行し、一定時間が経過すると、折りたたみ配座異性体を含む全ての蛋白質分子が分解されてしまう。

20

【0019】

なお、上記構成は、ユビキチンを例にして説明したが、これに限定されるものではなく、他の蛋白質や、同一または異なる蛋白質単体が会合した蛋白質集合体なども同様のメカニズムである。

【0020】

また、蛋白質集合体の場合は、反応は2段階に起こる。まず、加圧により蛋白質集合体が蛋白質単体(多くは基本的な折りたたみ配座異性体)に解離し、解離した蛋白質単体が加圧下で無秩序配座異性体へと転移して酵素により分解される。

【0021】

このように、本発明の蛋白質の分解方法では、加圧によって蛋白質の配座異性体の構造の変化あるいは蛋白質集合体の解離と配座異性体の構造の変化を引き起こし、酵素による蛋白質分解を行う。

30

【0022】

適用する圧力は、分解対象である蛋白質により最適の値を選択すればよい。例えば、 $5 0 0 \text{ bar ( 5 0 M P a )}$ 、 $1 0 0 0 \text{ bar ( 1 0 0 M P a )}$ 、さらに $2 0 0 0 \text{ bar ( 2 0 0 M P a )}$ 等である。圧力の上限は、特に制限はないが、酵素の機能を阻害しない程度であれば良い。例えば  $\alpha$ -キモトリプシンの場合、 $3 0 0 0 \text{ bar ( 3 0 0 M P a )}$  以下である。

【0023】

使用する酵素は特に制限はなく、通常のプロテオリシスに用いられる酵素を使用することができる。例えば、 $\alpha$ -キモトリプシン、ペプシン、ズブチリシン、プロテアーゼKなどである。

40

【0024】

本発明の蛋白質の分解方法では、分解対象である蛋白質と分解酵素とを例えばトリス-塩酸緩衝液などの緩衝液などに溶解または分散させたものを耐圧容器に入れて、加圧する。反応時間は、加圧する圧力、分解対象である蛋白質、使用する酵素の種類などにより異なる。加圧する圧力、分解対象である蛋白質、使用する酵素の種類などを考慮して、適する反応条件を適宜決定すればよい。また、温度やpHは、使用する酵素が機能を発揮する温度、pH領域を適宜選択すればよい。

50

## 【0025】

本発明の蛋白質の分解方法を用いて、従来酵素で分解できない、または困難とされていたさまざまな蛋白質や蛋白質集合体を、加圧によって、酵素を用いた温和な条件下で分解することができる。この方法を、例えば、食品の安全性・栄養価・消化性の向上、疾患の原因となる異常化蛋白質集合体・ウイルス等の除去、医療用器具・廃棄物等に付着した難分解性蛋白質の除去などに利用することができる。

## 【実施例】

## 【0026】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

## 【0027】

## (実験)

ユビキチン(シグマ社製)とウシの膵臓タイプIの -キモトリプシン(シグマ社製)とを、さらに精製せずに用いた。試料液として、ユビキチン(31 μM)、 -キモトリプシン(3 μM)を含む、10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。この溶液を、それぞれ上限4000 bar(400 MPa)まで異なる圧力で、最大60分まで時間間隔を変えて、ハンドポンプ(TP-500、Teramecs社製)に接続した高圧容器(PCI-400)に入れた。試料溶液の温度は、37 に保った。圧力は、5分以内に所望の圧力になるように加圧した。加圧後適当な時間が経過した後、1分以内に1 bar(0.1 MPa)まで減圧した。その後、ユビキチンの分解を調べるために、反応生成物をSDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分析した。

## 【0028】

-キモトリプシン(3 μM/10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.0))の圧力に対する形態安定性は、別個に、37 で1 bar(0.1 MPa)~4000 bar(400 MPa)まで圧力を変えて、トリプトファン(Trp)の蛍光を測定した。装置は、ハンドポンプ(TP-500、Teramecs社製)に接続した高圧容器(PCI-400)を備えた蛍光分光光度計(島津製作所(株)製、RF-5300PC)を用いた。

## 【0029】

## (結果)

図1は、上記試料溶液を、37 で1 bar(0.1 MPa)~3500 bar(350 MPa)間で段階的に圧力を変えて、50分間処理をした結果を示す、SDS-PAGEの写真である。図1において、各レーンは、左から、Ub(ユビキチン)、CT(-キモトリプシン)、a(圧力:1 bar(0.1 MPa))、b(圧力:500 bar(50 MPa))、c(圧力:1000 bar(100 MPa))、d(圧力:1500 bar(150 MPa))、e(圧力:2000 bar(200 MPa))、f(圧力:2500 bar(250 MPa))、g(圧力:3500 bar(350 MPa))を意味する。また、ユビキチンは、各レーンの下側に存在するバンドであり、 -キモトリプシンは、14.4 kDaと30 kDa付近に2つのバンドが存在する。

## 【0030】

図1から、圧力が1 bar(0.1 MPa)では、ユビキチンの分解はほとんど起こらないことがわかる。しかし、加圧によりユビキチンが分解されたことがわかる。圧力が500 bar(50 MPa)で、わずかにユビキチンが分解し始め、1000 bar(100 MPa)、1500 bar(150 MPa)まで、ユビキチン分子の減少が続く。圧力が2000 bar(200 MPa)で、ユビキチンのバンドはほぼ完全に消滅し、ユビキチンが分解されたことがわかる。すなわち、 -キモトリプシンによるユビキチンの分解には、50分という圧力処理時間において、少なくとも2000 bar(200 MPa)が必要であることがわかる。

## 【0031】

10

20

30

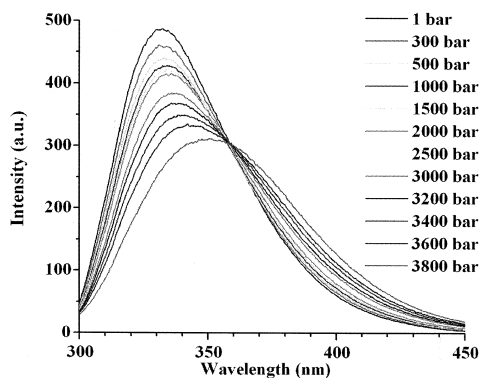
40

50

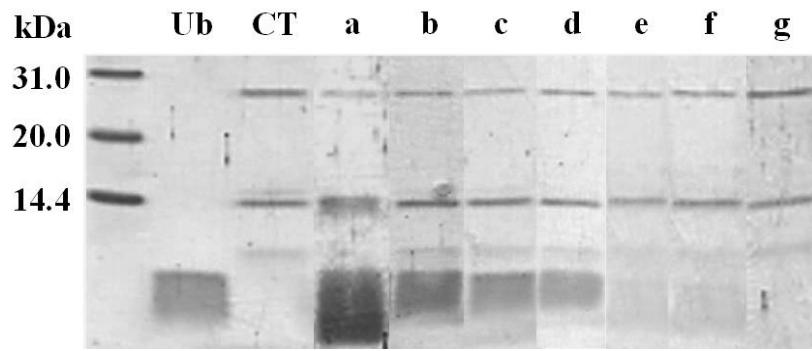
図2は、加圧下における $\alpha$ -キモトリプシン固有の折りたたみ配座異性体の構造安定性を、トリプトファン蛍光によって測定した結果を示す。図2において、横軸は波長(nm)を、縦軸は強度(a.u.)を示す。最大発光波長( $\lambda_{max}$ )は、初期は332.2nmであった。このことから、トリプトファン残基は、 $\alpha$ -キモトリプシンの折りたたみ構造の中に埋め込まれていることを示唆した。加圧後、3000bar(300MPa)以下では、 $\lambda_{max}$ は332~336nm内にとどまった。このことから、3000bar(300MPa)以下の加圧では、 $\alpha$ -キモトリプシン中のトリプトファン残基の状態に大きな変化がないことがわかる。一方、3.8kbar(380MPa)に加圧した場合、 $\lambda_{max}$ は、350.5nmに変化した。このことから、この圧力では、 $\alpha$ -キモトリプシンはほぼ完全に変性していると考えられる。以上から、3000bar(300MPa)以下の加圧では、1bar(0.1MPa)の加圧の場合と同等ではないとしても、 $\alpha$ -キモトリプシンの触媒作用に大きな影響がないことがわかった。

10

【図2】



【 図 1 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 赤坂 一之

和歌山県紀の川市西三谷930 学校法人近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センタ

ー

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特開平04-108343(JP,A)

J. Agric. Food Chem., 2008年, vol.56, no.24, pp.11809-11816

第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム抄録集, 2008年, vol.2, pp.171-179

Biochim. Biophys. Acta., 2006年, vol.1764, no.3, pp.552-557

生物物理, 2007年, vol.47, no.1, pp.12-16

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 21/06

A23J 3/34

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed