



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118234866 A

(43) 申请公布日 2024.06.21

(21) 申请号 202280070903.X

(22) 申请日 2022.11.22

(30) 优先权数据

2021-189716 2021.11.22 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/043242 2022.11.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/090461 JA 2023.05.25

(71) 申请人 天野酶制品株式会社

地址 日本国爱知县

(72) 发明人 松原宽敬

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 孙明 王刚

(51) Int.Cl.

C12N 15/55 (2006.01)

A23L 5/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

蛋白质脱酰胺酶

(57) 摘要

本发明提供了一种新的蛋白质脱酰胺酶。一种蛋白质脱酰胺酶,其包含:包含序列号1所示的氨基酸序列或其部分序列(序列号1的第1位~第221位的氨基酸序列、序列号1的第36位~第231位的氨基酸序列、或序列号1的第36位~第221位的氨基酸序列)的多肽;包含在序列号1所示的氨基酸序列或它们的部分序列中替换、添加、插入或缺失1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列、且具有蛋白质谷氨酰胺酶活性的多肽;或包含相对于序列号1所示的氨基酸序列或它们的部分序列的序列一致性为70%以上的氨基酸序列、且具有蛋白质谷氨酰胺酶活性的多肽。

1. 一种蛋白质脱酰胺酶,其特征在于,包含下述(I)~(III)中任一项所示的多肽:
 - (I) 多肽,其包含(A)序列号1所示的氨基酸序列、或者、(B)序列号1的第1位~第221位的氨基酸序列、(C)序列号1的第36位~第231位的氨基酸序列、或(D)序列号1的第36位~第221位的氨基酸序列;
 - (II) 多肽,其包含在所述氨基酸序列(A)~(D)中替换、添加、插入或缺失1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性;
 - (III) 多肽,其包含相对于所述氨基酸序列(A)~(D)的序列一致性为70%以上的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性。
2. 一种DNA,其特征在于,编码权利要求1所述的蛋白质脱酰胺酶。
3. 一种表达盒或重组载体,其特征在于,包含权利要求2所述的DNA。
4. 一种转化体,其特征在于,是使用权利要求3所述的表达盒或重组载体转化宿主而得到的。
5. 一种蛋白质脱酰胺酶的制造方法,其特征在于,包含培养权利要求4所述的转化体的工序。
6. 一种酶制剂,其特征在于,包含权利要求1所述的蛋白质脱酰胺酶。
7. 根据权利要求6所述的酶制剂,其中,所述酶制剂为含有蛋白质的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的改性剂。
8. 一种谷氨酰胺残基被脱酰胺化的蛋白质的制造方法,其特征在于,包含使权利要求1所述的蛋白质脱酰胺酶作用于蛋白质的工序。
9. 根据权利要求8所述的制造方法,其中,在饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料中含有所述蛋白质。
10. 一种改性的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的制造方法,其特征在于,包含使权利要求1所述的蛋白质脱酰胺酶作用于含有蛋白质的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的工序。

蛋白质脱酰胺酶

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型的蛋白质脱酰胺酶。

背景技术

[0002] 蛋白质脱酰胺酶是催化作用于作为高分子的蛋白质而脱酰胺化的反应的酶。蛋白质脱酰胺酶通过将蛋白质中的谷氨酰胺残基脱酰胺化而产生负电荷的羧基,因此针对蛋白质引起各种特性变化。例如,由蛋白质的等电点降低引起的水合力的增加和静电斥力的上升会使蛋白质间的相互作用降低(即,使缔合性降低),因此使蛋白质的可溶性和水分散性增大。另外,由于蛋白质的高级结构变化引起的内部疏水性区域的外露对蛋白质赋予表面活性,因此使蛋白质的乳化力、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性提高。蛋白质脱酰胺酶能够如此使蛋白质的特性大幅变化,因此使蛋白质的用途显著增大。因此,蛋白质脱酰胺酶的有用性非常高,在该技术领域受到了高的关注。

[0003] 最初发现的蛋白质脱酰胺酶是2000年从解脲金黄杆菌(*Chryseobacterium proteolyticum*)中发现的蛋白质谷氨酰胺酶(非专利文献1)。然而,蛋白质谷氨酰胺酶,尽管其具有高实用性和被高度关注,但在此后约20年的长时间内没有新的发现,也是非常特殊的酶。在约20年后,从溃疡拟杆菌(*Bacteroides helcogenes*)中发现了蛋白质谷氨酰胺酶(非专利文献2),但在2021年11月现在,产业利用的蛋白质谷氨酰胺酶仅来自解脲金黄杆菌(*C. proteolyticum*)。

现有技术文献

非专利文献

[0004] 非专利文献1:A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp.nov., a newly isolated bacterium from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66(8):3337-43

非专利文献2:A novel protein glutaminase from *Bacteroides helcogenes*-characterization and comparison, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2020) 104:187-199

发明内容

发明所要解决的技术问题

[0005] 作为本领域技术人员的一般技术常识,因为在报告了来自解脲金黄杆菌(*C. proteolyticum*)的蛋白质谷氨酰胺酶之后的长年时间内没有发现,因此认定具有蛋白质谷氨酰胺酶活性的蛋白质脱酰胺酶是自然界中几乎不存在的特殊的酶,在常规的筛选中无法得到。发现除了来自解脲金黄杆菌(*C. proteolyticum*)的蛋白质谷氨酰胺酶以外的具有蛋白质谷氨酰胺酶活性的蛋白质脱酰胺酶的例子仅一例,即,来自溃疡拟杆菌(*B. helcogenes*)的蛋白质谷氨酰胺酶,本领域技术人员对该酶的认识依然受到上述技术常识的约束。

[0006] 其中,本发明的目的在于特意发现新的蛋白质脱酰胺酶。

用于解决技术问题的技术方案

[0007] 本发明人为了发现新的蛋白质脱酰胺酶而进行了深入研究,但从与公知的蛋白质脱酰胺酶序列一致性高的候选中,完全没有发现具有蛋白质脱酰胺化活性的酶。然而,本发明人通过独特的方法进行了筛选,结果发现,尽管是与公知的蛋白质脱酰胺酶序列一致性低的蛋白质,但存在具有蛋白质脱酰胺化活性的酶。另外,在这样新发现的具有蛋白质脱酰胺化活性的酶中,还判明存在具有非常特殊的序列结构的酶,其构成活性中心的氨基酸残基之一不是半胱氨酸残基而是丝氨酸残基。本发明是基于这些见解而完成的。

[0008] 即,本发明提供下述揭示的方式的发明。

项1.一种蛋白质脱酰胺酶,其包含下述(I)~(III)中任一项所示的多肽:

(I)多肽,其包含(A)序列号1所示的氨基酸序列、或者(B)序列号1的第1位~第221位的氨基酸序列、(C)序列号1的第36位~第231位的氨基酸序列、或(D)序列号1的第36位~第221位的氨基酸序列;

(II)多肽,其包含在所述氨基酸序列(A)~(D)中替换、添加、插入或缺失1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性;

(III)多肽,其包含相对于所述氨基酸序列(A)~(D)的序列一致性为70%以上的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性。

项2.一种DNA,其编码项1所述的蛋白质脱酰胺酶。

项3.一种表达盒或重组载体,其包含项2所述的DNA。

项4.一种转化体,其是使用项3所述的表达盒或重组载体转化宿主而得到的。

项5.一种蛋白质脱酰胺酶的制造方法,其包含培养项4所述的转化体的工序。

项6.一种酶制剂,其包含项1所述的蛋白质脱酰胺酶。

项7.根据项6所述的酶制剂,其为含有蛋白质的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的改性剂。

项8.一种谷氨酰胺残基被脱酰胺化的蛋白质的制造方法,其包含使项1所述的蛋白质脱酰胺酶作用于蛋白质的工序。

项9.根据项8所述的制造方法,其中,在饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料中含有所述蛋白质。

项10.一种改性的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的制造方法,其包含使项1所述的蛋白质脱酰胺酶作用于含有蛋白质的饮食品或饮食品用原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的工序。

发明效果

[0009] 根据本发明,提供一种新的蛋白质脱酰胺酶。

具体实施方式

[0010] 在本说明书中,“非极性氨基酸”包含丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。“非电荷氨基酸”包含甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺。“酸性氨基酸”包含天冬氨酸和谷氨酸。“碱性氨基酸”包含赖氨酸。

酸、精氨酸和组氨酸。

[0011] 1. 蛋白质脱酰胺酶

本发明的蛋白质脱酰胺酶是来自 *Chryseobacterium nematophagum* 的蛋白质脱酰胺酶、以及与该蛋白质脱酰胺酶序列类似的蛋白质脱酰胺酶。

[0012] 具体而言,本发明的蛋白质脱酰胺酶包含下述 (I) ~ (III) 中任一项所示的多肽。

[0013] (I) 多肽,其包含 (A) 序列号1所示的氨基酸序列(以下,也记载为“氨基酸序列(A)”)、或者(B)序列号1的第1位~第221位的氨基酸序列(以下,也记载为“氨基酸序列(B)”)、(C)序列号1的第36位~第231位的氨基酸序列(以下,也记载为“氨基酸序列(C)”)、或(D)序列号1的第36位~第221位的氨基酸序列(以下,也记载为“氨基酸序列(D)”);

(II) 多肽,其包含在所述氨基酸序列(A)~(D)中替换、添加、插入或缺失1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性;

(III) 多肽,其包含相对于所述氨基酸序列(A)~(D)的序列一致性为70%以上的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性。

以下,对包含(I)~(III)的多肽的蛋白质脱酰胺酶进行详述。需要说明的是,以下,(I)~(III)的多肽中,将以上述氨基酸序列(A)为基础的多肽也记载为“全长多肽”,以及将其序列也记载为“全长氨基酸序列”,将以上述氨基酸序列(B)~(D)为基础的多肽也记载为“非全长多肽”,以及将其序列也记载为“非全长氨基酸序列”。

[0014] 1-1. 包含(I)的多肽的蛋白质脱酰胺酶

氨基酸序列(A)即序列号1是来自 *Chryseobacterium nematophagum* 的蛋白质脱酰胺酶的一个例子的全长氨基酸序列。氨基酸序列(A)是包含推定为Pro序列的序列和C末端序列的、包含231氨基酸残基的序列。

[0015] 氨基酸序列(B)即序列号1的第1位~第221位的氨基酸序列,是从氨基酸序列(A)中去除C末端序列而得到的。

[0016] 氨基酸序列(C)即序列号1的第36位~第231位的氨基酸序列,是从氨基酸序列(A)中去除推定为Pro序列的序列而得到的。

[0017] 氨基酸序列(D)即序列号1的第36位~第221位的氨基酸序列,是从氨基酸序列(A)中去除推定为Pro序列的序列和C末端序列而得到的。

[0018] 氨基酸序列(A)~(D)的序列号1中的构成活性中心的第64位的氨基酸残基为丝氨酸残基。在将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的公知的蛋白质脱酰胺酶中,构成活性中心的氨基酸残基之一为半胱氨酸残基,因此包含包含氨基酸序列(A)~(D)的多肽的蛋白质脱酰胺酶在包含上述丝氨酸残基方面,具有在公知的蛋白质脱酰胺酶中没有的、非常特殊的序列结构。进而,由于(I)的多肽的活性中心包含丝氨酸残基而构成,因此与通常的蛋白质脱酰胺酶相比,在能够期待优异的氧化稳定性的方面优选。

[0019] 作为(I)的多肽的优选例,可举出:包含序列号1所示的氨基酸序列(氨基酸序列(A))的多肽、包含序列号2所示的氨基酸序列(氨基酸序列(B))的多肽、包含氨基酸序列(C)的多肽、以及包含氨基酸序列(D)的多肽。

[0020] 作为(I)的多肽的优选的其他示例,从提高催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性等观点出发,可举出:去除包含Pro序列的N末端序列和/或C末端序列的非

全长多肽,即,包含序列号2所示的氨基酸序列(氨基酸序列(B))的多肽、包含氨基酸序列(C)的多肽、以及包含氨基酸序列(D)的多肽。

[0021] 作为(I)的多肽的具体例,可举出:包含序列号1所示的氨基酸序列(氨基酸序列(A))的多肽、以及包含序列号2所示的氨基酸序列(氨基酸序列(B))的多肽。

[0022] 1-2. 包含(II)和(III)的多肽的蛋白质脱酰胺酶

(II)和(III)的多肽是以(I)的多肽的氨基酸序列为基本骨架的序列类似的蛋白质脱酰胺酶。

[0023] 关于导入至所述(II)的多肽的氨基酸的改变,可以仅包含替换、添加、插入和缺失中的1种改变(例如,替换),也可以包含2种以上的改变(例如,替换和插入)。在所述(II)的多肽中,替换、添加、插入或缺失的氨基酸为1个或多个或者数个即可,例如可举出1个~10个,优选为1个~8个、1个~6个、1个~5个、或1个~4个,进一步优选为1个~3个,特别优选为1个或2个或者1个。

[0024] 另外,在所述(III)的多肽中,序列一致性为70%以上即可,可举出:优选为80%以上、85%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上、99.5%以上。

[0025] 在此,在所述(III)的多肽中,相对于氨基酸序列(A)~(D)的序列一致性是指与氨基酸序列(A)~(D)分别比较而算出的序列一致性。另外,“序列一致性”是指通过BLAST PACKAGE[sgi32 bit edition,Version2.0.12;available from National Center for Biotechnology Information(NCBI)]的bl2seq program(Tatiana A.Tatsusova,Thomas L.Madden,FEMS Microbiol.Lett.,Vol.174,p247-250,1999)得到的氨基酸序列的一致性的值。参数设定为Gap insertion Cost value:11、Gap extension Cost value:1即可。

[0026] 在所述(II)和(III)的多肽中,序列号1所示的氨基酸序列中的第64位的丝氨酸残基、第105位的组氨酸残基以及第124位的天冬氨酸残基有助于活性,这些氨基酸残基中,对于第64位的丝氨酸残基除了替换为半胱氨酸残基以外的氨基酸残基,优选不导入替换或缺失,对于第105位的组氨酸残基和第124位的天冬氨酸残基优选不导入替换或缺失。

[0027] 在所述(II)和(III)的多肽中导入氨基酸替换的情况下,作为氨基酸替换的方式,可举出保守性替换。即,在(II)和(III)的多肽中,作为对氨基酸序列(A)~(D)导入的氨基酸替换,例如可举出:如果替换前的氨基酸为非极性氨基酸,则替换为其他的非极性氨基酸;如果替换前的氨基酸为非电荷性氨基酸,则替换为其他的非电荷性氨基酸;如果替换前的氨基酸为酸性氨基酸,则替换为其他的酸性氨基酸;以及如果替换前的氨基酸为碱性氨基酸,则替换为其他的碱性氨基酸。

[0028] 在所述(II)和(III)的多肽中导入氨基酸添加的情况下,作为氨基酸添加的方式,例如可举出:向N末端的蛋氨酸残基的添加、纯化用标记(例如,寡聚组氨酸等结合性寡肽)的添加等。

[0029] 所述(II)和(III)的多肽不仅包含人为变异而得到的多肽,还包含通过基于多肽来源的生物的个体差异或物种的变化的天然产生的变异(突变体或变体)而产生的多肽。

[0030] 在所述(II)和(III)的多肽中,“具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性”(以下,也记载为“蛋白质谷氨酰胺酶活性”)能够通过检测伴随谷氨酰胺残基脱酰胺化的产物来确认。例如,蛋白质谷氨酰胺酶活性以包含谷氨酰胺残基且不包含天冬酰胺

胺残基的2个残基以上的肽(例如,N-苄氧基羰基-L-谷氨酰胺基甘氨酸(Z-Gln-Gly)等)为底物使蛋白质脱酰胺酶作用,作为产物,能够通过检测谷氨酰胺残基被转换为谷氨酸残基的底物或游离的氨来确认。蛋白质谷氨酰胺酶活性值能够定量地基于上述产物的量、优选基于游离的氨的量来算出。

[0031] 在所述(II)和(III)的多肽中,关于维持了序列号1所示的氨基酸序列中的第64位的丝氨酸残基的多肽,由于活性中心包含丝氨酸残基而构成,因此与通常的蛋白质脱酰胺酶相比,在能够期待优异的氧化稳定性方面特别优选。

[0032] 作为(II)和(III)的多肽的优选的其他示例,可举出:包含在所述氨基酸序列(A)~(D)中替换、添加、插入或缺失1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性的多肽;以及包含相对于所述氨基酸序列(A)~(D)的序列一致性为70%以上(优选为80%以上、85%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上、99.5%以上)的氨基酸序列,且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性的多肽。

[0033] 作为(II)和(III)的多肽的优选的进一步的其他示例,从提高蛋白质谷氨酰胺酶活性等观点出发,可举出:去除包含Pro序列的N末端序列和/或C末端序列而得到的非全长多肽,即,包含在(B)~(D)中1个或多个氨基酸被替换、添加、插入或缺失而成的氨基酸序列、且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性的多肽;以及包含相对于所述氨基酸序列(B)~(D)的序列一致性为70%以上(优选为80%以上、85%以上、90%以上,进一步优选为95%以上、97%以上、98%以上,特别优选为99%以上、99.5%以上)的氨基酸序列、且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性的多肽。

[0034] 作为(II)和(III)的多肽的具体例,可举出:包含序列号3所示的氨基酸序列(氨基酸序列(D)中在N末端添加有蛋氨酸残基的序列)的多肽、包含序列号4所示的氨基酸序列(氨基酸序列(A)中序列号1的第64位被替换为半胱氨酸残基的序列)的多肽、包含序列号5所示的氨基酸序列(氨基酸序列(B)中序列号1的第64位被替换为半胱氨酸残基的序列)的多肽、包含序列号6所示的氨基酸序列(氨基酸序列(D)中在N末端添加有蛋氨酸残基且序列号1的第64位被替换为半胱氨酸残基的序列)的多肽。

[0035] 在上述(I)~(III)的多肽中,特别优选地可举出包含相对于序列号1~3中的任一氨基酸序列序列一致性为90%以上(更优选为95%以上,进一步优选为97%以上,进一步优选为98%以上,特别优选为99%以上、99.5%以上)的氨基酸序列、且具有催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性的多肽。

[0036] 2. DNA

编码本发明的蛋白质脱酰胺酶的DNA(以下,有时也表述为“本发明的DNA”),只要是本领域技术人员,就能够按照本发明的蛋白质脱酰胺酶的氨基酸序列适当制备和设计。

[0037] 关于本发明的DNA的碱基序列,本领域技术人员能够按照本发明的蛋白质脱酰胺酶中所述的氨基酸序列适当设计。

[0038] 作为本发明的DNA的序列的例子,可举出序列号13所示的碱基序列。序列号13是编码来自*Chryseobacterium nematophagum*的、序列号1所示的蛋白质脱酰胺酶的序列。

[0039] 本发明的DNA优选为使密码子利用频率在宿主中最适化的DNA。例如,如果是使用大肠杆菌作为宿主的情况,则优选为使密码子利用频率在大肠杆菌中最适化的DNA。

[0040] 作为本发明的DNA的优选例,可举出以下(i)~(iii)中的任一者所示的DNA。

[0041] (i)包含(a)序列号7所示的碱基序列(以下,也记载为“碱基序列(a)”),或者(b)序列号7的第1位~第663位的碱基序列(以下,也记载为“碱基序列(b)”),(c)序列号7的第106位~第696位的碱基序列(以下,也记载为“碱基序列(c)”),或(d)序列号7的第106位~第663位的碱基序列(以下,也记载为“碱基序列(d)”)的DNA;

(ii)包含在严格条件下与包含与上述碱基序列(a)~(d)互补的碱基序列的DNA杂交的DNA的碱基序列的DNA;

(iii)包含相对于上述碱基序列(a)~(d)具有70%以上的同源性的碱基序列的DNA。

以下,对(i)~(iii)的DNA进行详述。

[0042] 2-1. (i)的DNA

碱基序列(a)即序列号7是包含编码序列号1的696个碱基的序列,该序列号1是来自*Chryseobacterium nematophagum*的蛋白质脱酰胺酶的全长氨基酸序列,是将序列号13所示的碱基序列的密码子利用频率在大肠杆菌中最适化的序列。

[0043] 碱基序列(b)即序列号7的第1位~第663位的碱基序列,是从碱基序列(a)中去除编码推定为C末端序列的序列的序列而得到。

[0044] 碱基序列(c)即序列号7的第106位~第696位的碱基序列,是从碱基序列(a)中去除编码推定为Pro序列的序列的序列而得到的。

[0045] 碱基序列(d)即序列号7的第106位~第663位的碱基序列,是从碱基序列(a)中去除编码推定为C末端序列的序列的序列以及编码推定为Pro序列的序列的序列而得到的。

[0046] 作为(i)的DNA的优选例,可举出:包含序列号7所示的碱基序列(碱基序列(a))的DNA、包含碱基序列(b)的DNA、包含碱基序列(c)的DNA、以及包含碱基序列(d)的DNA。

[0047] 作为(i)的DNA的优选的另一示例,从提高催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性等观点出发,可举出:编码非全长多肽的序列,即,包含碱基序列(b)的DNA、包含碱基序列(c)的DNA、以及包含碱基序列(d)的DNA。

[0048] 2-2. (ii)和(iii)的DNA

(ii)和(iii)的DNA是以(i)的DNA的碱基序列为基本骨架的序列类似的DNA。

[0049] 在所述(ii)的DNA中,“严格条件”是指,在包含0.5% SDS、5×Denhartz's (Denhartz's、0.1%牛血清白蛋白(BSA)、0.1%聚乙烯吡咯烷酮、0.1%聚蔗糖400)以及100 μg/ml鲑鱼精子DNA的6×SSC(1×SSC为0.15M NaCl、0.015M柠檬酸钠、pH7.0)中,在50°C~65°C下保温4小时~一夜的条件。

[0050] 在严格的条件下的杂交,具体通过以下方法进行。即,制成将DNA文库或cDNA文库固定化而成的尼龙膜,在包含6×SSC、0.5% SDS、5×Denhartz's、100 μg/ml鲑鱼精子DNA的预杂交溶液中,在65°C下封闭尼龙膜。然后,加入用³²P标记的各探针,在65°C下保温一夜。将该尼龙膜在6×SSC中,室温下清洗10分钟,在包含0.1% SDS的2×SSC中,室温下清洗10分钟,在包含0.1% SDS的0.2×SSC中,45°C下清洗30分钟后,采取放射自显影术,能够检测出与探针特异性杂交的DNA。

[0051] 在所述(iii)的DNA中,上述同源性为70%以上即可,优选地可举出80%以上、90%以上,进一步优选地可举出95%以上、97%以上、98%以上,特别优选地可举出99%以上、

99.5%以上。

[0052] 此处,碱基序列的“同源性”是指根据BLAST PACKAGE[sgi32 bit edition, Version 2.0.12;available from the National Center for Biotechnology Information(NCBI)]的bl2seq program(Tatiana A.Tatsusova,Thomas L.Madden,FEMS Microbiol.Lett.,Vol.174,p247-250,1999)得到的一致性的值。参数设定为Gap insertion Cost value:11,Gap extension Cost value:1即可。

[0053] 在所述(ii)和(iii)的DNA的例子中,可以在所述(i)的DNA中进一步添加编码起始密码子、终止密码子、纯化用标记(例如,寡聚组氨酸等结合性寡肽)的碱基序列中的至少任一者。

[0054] 作为(ii)和(iii)的DNA的优选例,可举出:包含在严格条件下与包含与所述碱基序列(a)~(d)互补的碱基序列的DNA杂交的DNA的碱基序列的DNA、以及包含相对于所述碱基序列(a)~(d)具有70%以上的同源性的碱基序列的DNA。

[0055] 作为(ii)和(iii)的DNA的优选的另一示例,从提高催化将蛋白质的谷氨酰胺残基脱酰胺化的反应的活性等观点出发,可举出:编码非全长多肽的序列,即,包含在严格条件下与包含与所述碱基序列(b)~(d)互补的碱基序列的DNA杂交的DNA的碱基序列的DNA、以及包含相对于所述碱基序列(b)~(d)具有70%以上的同源性的碱基序列的DNA。

[0056] 作为(ii)和(iii)的DNA的具体例,可举出:包含序列号8所示的碱基序列(在碱基序列(b)中添加有终止密码子的序列)、序列号9所示的碱基序列(在碱基序列(d)中添加有起始密码子和终止密码子的序列)的DNA,包含序列号10所示的碱基序列(在碱基序列(a)中序列号7的第190位~第192位被替换为编码半胱氨酸残基的序列的序列)的DNA,包含序列号11所示的碱基序列(在碱基序列(b)中添加有终止密码子且序列号7的第190位~第192位替换为编码半胱氨酸残基的序列的序列)的DNA,包含序列号12所示的碱基序列(在碱基序列(d)中添加有起始密码子和终止密码子且序列号7的第190位~第192位被替换为编码半胱氨酸残基的序列的序列)的DNA。

[0057] 2-3.DNA的制备

作为得到本发明的DNA的方法,可举出以下所示的基于杂交的方法。

[0058] 首先,按照常规方法将从适当的基因源得到的DNA连接到质粒、噬菌体载体上,制作DNA文库。将该文库导入适当的宿主而得到的转化体在平板上培养,将生长的菌落或斑块转移到硝化纤维素或尼龙的膜上,在改性处理后将DNA固定在膜上。在包含预先利用³²P等标记该膜的探针的上述组成的溶液中,在上述严格条件下保温,进行杂交。作为探针,能够使用编码所述(I)~(III)中任一者的多肽的多核苷酸。

[0059] 杂交结束后,冲洗非特异性吸附的探针,通过放射自显影术等鉴定与探针形成杂交体的克隆。重复该操作直到杂交体形成克隆能够分离。最后,从得到的克隆中,选择编码具有目标酶活性的蛋白质的基因。基因的分离可以通过碱法等公知的多核苷酸提取法来实施。

[0060] 本发明的DNA也能够从Chryseobacterium nematophagum分离。例如,能够以来自Chryseobacterium nematophagum的基因组DNA为模板,通过使用从已知的氨基酸序列信息中考虑基因的简并而设计的引物或探针或基于已知的碱基序列信息而设计的引物或探针的PCR或杂交法,从该微生物的基因组中分离目标DNA。

[0061] 在本发明的DNA中,包含源自密码子的简并的多种DNA。人为制作编码相同氨基酸序列的多种DNA,可以使用公知的基因工程学方法容易地进行。例如,在基因工程学的蛋白质的生产中,在编码目标蛋白质的本来的基因上使用的密码子在宿主中使用频率低的情况下,有时蛋白质的表达量低。在这样的情况下,可以通过不改变编码的氨基酸序列并在宿主中将密码子利用频率最优化,实现目标蛋白质的高表达。

[0062] 作为表示密码子利用频度的指标,可以选择各密码子的宿主最适密码子利用频度的总计。最适密码子可定义为对应于同一氨基酸的密码子中利用频度最高的密码子。密码子利用频率只要是在宿主中最优化的密码子利用频率就没有特别限定,例如,作为大肠杆菌的最适密码子的示例,可举出以下密码子。F:苯丙氨酸(ttt)、L:亮氨酸(ctg)、I:异亮氨酸(att)、M:蛋氨酸(atg)、V:缬氨酸(gtg)、Y:酪氨酸(tat)、终止密码子(taa)、H:组氨酸(cat)、Q:谷氨酰胺(cag)、N:天冬酰胺(aat)、K:赖氨酸(aaa)、D:天冬氨酸(gat)、E:谷氨酸(gaa)、S:丝氨酸(agc)、P:脯氨酸(ccg)、T:苏氨酸(acc)、A:丙氨酸(gcg)、C:半胱氨酸(tgc)、W:色氨酸(tgg)、R:精氨酸(cgc)、G:甘氨酸(ggc)。

[0063] 作为在基因中导入突变并人为改变氨基酸序列的方法,可以使用Kunkel法、Gappedduplex法等公知的方法、以及利用了位点特异性突变诱导法的突变导入试剂盒,例如QuikChange™定点突变试剂盒(Site-Directed Mutagenesis Kit)(Stratagene公司)、GeneArt™定点突变PLUS系统(Invitrogen公司)、TaKaRa定点突变系统(Mutan-K,Mutan-Super Express Km,PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit等;Takara Bio公司)等。

[0064] DNA的碱基序列的确认能够通过使用惯用的方法进行序列确定来进行。例如,能够通过双脱氧核苷酸链终止法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463)等进行。另外,可以利用适当的DNA测序仪来分析序列。

[0065] 得到的DNA是否为编码目标的蛋白质脱酰胺酶的DNA的确认,能够将确定的碱基序列与碱基序列(a)~(d)进行比较来进行。或者可以将由确定的碱基序列推定的氨基酸序列与氨基酸序列(A)~(D)进行比较来进行。

[0066] 3. 表达盒或重组载体

包含编码本发明的蛋白质脱酰胺酶的DNA的表达盒或重组载体(以下,也表述为“本发明的表达盒”或“本发明的重组载体”),包含编码本发明的蛋白质脱酰胺酶的DNA。

[0067] 本发明的表达盒或重组载体能够通过在本发明的DNA中连接启动子和终止子、或者在表达载体中插入本发明的表达盒或本发明的DNA而得到。

[0068] 在本发明的表达盒或重组载体中,作为控制因子,除了启动子和终止子以外,还可以根据需要包含增强子、CCAAT盒、TATA盒、SPI位点等转录要素。这些控制因子只要可工作地连接于本发明的DNA即可。可工作地连接是指,调节本发明的DNA的各种控制因子和本发明的DNA以能够在宿主细胞中工作的状态连接。

[0069] 另外,在表达非全长多肽的情况下,在本发明的表达盒或本发明的重组载体中,可以设计成直接表达非全长多肽,如下记载所示,也可以设计成在暂时表达包含蛋白酶识别序列的全长多肽后能够利用蛋白酶切断末端序列。

[0070] 在将本发明的表达盒或本发明的重组载体设计成暂时表达包含蛋白酶识别序列的全长多肽后能够利用蛋白酶切断末端序列的情况下,本发明的表达盒或重组载体能够构成组合包含编码蛋白酶识别序列的碱基序列和编码N末端序列和/或C末端序列的碱基序

列。具体而言,本发明的表达盒或重组载体能够构成为:除了编码非全长多肽的碱基序列以外,在编码包含Pre序列和/或Pro序列的N末端序列的碱基序列与编码非全长多肽的碱基序列等之间、和/或、编码非全长多肽的碱基序列等与编码C末端序列的碱基序列之间,包含编码特定的蛋白酶的识别序列的碱基序列。在这种情况下,在表达全长多肽后,利用该特定的蛋白酶,特异性地去除N末端序列和/或C末端序列,由此能够得到包含非全长多肽的蛋白质脱酰胺酶。

[0071] 作为表达载体,优选在宿主内可自律性增殖的噬菌体、质粒、或由病毒作为基因重组用途而构建的表达载体。这样的表达载体是公知的,本领域技术人员能够适当选择使用与宿主细胞的适当组合。例如,在将微生物作为宿主的情况下,可举出:pBluescript (pBS) II SK (-) (Stratagene公司制造)、pSTV系载体 (Takara Bio公司制造)、pUC系载体 (Takara Bio公司制造)、pET系载体 (Sigma-Aldrich Japan合同会社制造)、pGEX系载体 (Global Life Sciences Technologies Japan公司制造 (Cytiva))、pCold系载体 (Takara Bio公司制造)、pHY300PLK (Takara Bio公司制造)、pUB110 (Mckenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15 (2), p.93-103)、pBR322 (Takara Bio公司制造)、pRS403 (Stratagene公司制造) 和pMW218/219 (Nippon Gene公司制造) 等。在将藻类或微细藻类作为宿主的情况下,可举出:pUC19 (Takara Bio公司制造)、P66 (Chlamydomonas Center)、P-322 (Chlamydomonas Center)、pPha-T1 (参考Yangmin Gong, et al., Journal of Basic Microbiology, 2011, vol.51, p.666-672)、或pJET1 (Thermo Fisher Scientific公司制造) 等。在将植物细胞作为宿主的情况下,可举出pRI系载体 (Takara Bio公司制造)、pBI系载体 (Clontec公司制造) 和IN3系载体 (Inplanta innovations公司制造)。

[0072] 4. 转化体

通过使用本发明的表达盒或重组载体转化宿主,能够得到转化体(以下,有时也表述为“本发明的转化体”)。

[0073] 作为转化体的制造中使用的宿主,只要能够导入基因,且能够自律性增殖,还能够表达本发明的基因的性状,就没有特别限制,例如可举出:属于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等埃希氏菌属、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等芽孢杆菌属、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 等假单胞菌属等细菌;放线菌等;酵母等;丝状菌等微生物作为优选的示例,此外,也可以为动物细胞、昆虫细胞、植物等。其中,特别优选为大肠杆菌。

[0074] 作为转化体的制造中使用的宿主,可以是本发明的蛋白质脱酰胺酶的来源菌即 *Chryseobacterium nematophagum*。

[0075] 本发明的转化体可以通过在宿主中导入本发明的表达盒或重组载体而得到。导入本发明的DNA的位置只要能够表达目标基因就没有特别限定,可以在质粒上,也可以在基因组上。作为导入本发明的表达盒或本发明的重组载体的具体方法,例如可举出重组载体法、基因组编辑法。

[0076] 将本发明的表达盒或重组载体导入至宿主的条件根据宿主的种类等适当设定即可。在宿主为微生物的情况下,例如可举出使用基于钙离子处理的感受态细胞的方法、电穿孔法、原生质球法和醋酸锂法等。如果是宿主为动物细胞的情况,则例如可举出电穿孔法、磷酸钙法和脂质转染法等。如果是宿主为昆虫细胞的情况,则例如可举出:磷酸钙法、脂质转染法和电穿孔法等。如果是宿主为植物细胞的情况,则例如可举出电穿孔法、农杆菌法、

基因枪法、以及PEG法等。

[0077] 5. 蛋白质脱酰胺酶的制造方法

本发明还提供了上述蛋白质脱酰胺酶的制造方法。上述蛋白质脱酰胺酶能够通过培养所述本发明的转化体来制造。另外,上述蛋白质脱酰胺酶也能够通过培养来源菌或来源细胞即*Chryseobacterium nematophagum*本身(未转化)来制造。

[0078] 本发明的转化体或者来源菌或来源细胞的培养条件只要考虑宿主或者来源菌或来源细胞的营养生理性质而适当设定即可,优选地可举出液体培养。另外,如果是进行工业制造的情况,则优选通气搅拌培养。

[0079] 培养本发明的转化体或者来源菌或来源细胞,通过离心分离培养液等方法回收培养上清或者培养菌体或培养细胞。如果是本发明的蛋白质脱酰胺酶蓄积在培养菌体内或培养细胞内的情况,则将菌体或细胞利用超声波、弗氏压碎器等机械方法或溶菌酶(lysozyme)等溶解菌酶实施处理,根据需要通过使用蛋白酶等酶或十二烷基硫酸钠(SDS)等表面活性剂而进行助溶,可以得到包含本发明的蛋白质脱酰胺酶的水溶性级分。

[0080] 另外,也可以通过选择适当的表达载体和宿主,使表达的本发明的蛋白质脱酰胺酶分泌到培养液中。

[0081] 在蛋白质脱酰胺酶的制造方法的一个方式中,作为转化体的制作中使用的表达盒或重组载体,通过选择以能够表达全长多肽的方式构成的表达盒或重组载体,从而能够直接表达全长蛋白质;在另一个方式中,作为转化体的制作中使用的表达盒或重组载体,通过选择以能够表达非全长多肽的方式构成的表达盒或重组载体,从而能够直接表达非全长蛋白质。

[0082] 另外,在上述一个方式中,可举出:作为转化体的制作中使用的表达盒或重组载体,选择以包含编码全长多肽的碱基序列的方式构成的表达盒或重组载体的情况、以及选择与编码非全长多肽的碱基序列一起组合包含编码蛋白酶识别序列的碱基序列和编码N末端序列和/或C末端序列的碱基序列的方式构成的表达盒或重组载体的情况;这些情况下的本发明的蛋白质脱酰胺酶的制造方法如下所述,为了由暂时表达的全长多肽得到非全长多肽,还可以包含去除N末端序列和/或C末端序列的工序(得到非全长多肽的工序)。

[0083] 在得到非全长多肽的工序的一个例子中,作为转化体的制作中使用的表达盒或重组载体,选择以包含编码全长多肽的碱基序列的方式构成的表达盒或重组载体,N末端序列的去除,例如,能够通过利用加工酶处理蛋白质脱酰胺酶来进行。作为加工酶,可举出蛋白酶。作为蛋白酶,具体而言,可举出:枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶;木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、胱天蛋白酶(Caspases)、钙蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶;胃蛋白酶、组织蛋白酶等酸性蛋白酶;嗜热菌蛋白酶等金属蛋白酶。

[0084] 关于得到非全长多肽的工序的另一示例,作为转化体的制作中使用的表达盒或重组载体,选择以与编码非全长多肽的碱基序列一起组合包含编码蛋白酶识别序列的碱基序列和编码N末端序列和/或C末端序列的碱基序列的方式构成的表达盒或重组载体,在编码N末端序列的碱基序列与编码非全长多肽的碱基序列之间、和/或编码非全长多肽的碱基序列与编码C末端序列的碱基序列之间表达包含特定蛋白酶的识别序列的全长多肽,然后能够利用该特定蛋白酶特异性地去除N末端序列和/或C末端序列。

[0085] 如此得到的包含本发明的蛋白质脱酰胺酶的培养液、水溶性级分或蛋白酶处理物可以直接供于纯化处理,也可以将该培养液、水溶性级分或蛋白酶处理物中的本发明的蛋白质脱酰胺酶浓缩后供于纯化处理。

[0086] 浓缩例如可通过减压浓缩、膜浓缩、盐析处理、基于亲水性有机溶剂(例如甲醇、乙醇和丙酮)的分级沉淀法等而进行。

[0087] 本发明的蛋白质脱酰胺酶的纯化处理例如可以通过适当组合凝胶过滤、疏水性色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等方法来进行。

[0088] 如此纯化的本发明的蛋白质脱酰胺酶可以根据需要通过冷冻干燥、真空干燥、喷雾干燥等进行粉末化。

[0089] 6. 酶制剂

本发明的蛋白质脱酰胺酶可以以酶剂的方式提供。因此,本发明还提供包含上述本发明的蛋白质脱酰胺酶的酶剂。

[0090] 作为本发明的酶剂中的上述本发明的蛋白质脱酰胺酶的含量,没有特别限定,可以在发挥蛋白质谷氨酰胺酶活性的范围内适当设定。

[0091] 本发明的酶剂除了上述本发明的蛋白质脱酰胺酶以外,也可以在不影响本发明的效果的程度下包含其他成分。作为其他成分,可举出上述本发明的蛋白质脱酰胺酶以外的其他酶、添加剂、上述制造方法中产生的培养残渣等。

[0092] 作为其他酶,可以根据其用途适当确定,例如可举出:淀粉酶(α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡糖淀粉酶)、葡糖苷酶(α -葡糖苷酶、 β -葡糖苷酶)、半乳糖苷酶(α -半乳糖苷酶、 β -半乳糖苷酶)、蛋白酶(酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶)、肽酶(亮氨酸胺酶、氨基胺酶)、脂肪酶、酯酶、纤维素酶、磷酸酶(酸性磷酸酶、碱性磷酸酶)、核酸酶、脱氨酶、氧化酶、脱氢酶、谷氨酰胺酶、果胶酶、过氧化氢酶、葡聚糖酶、谷氨酰胺转胺酶、蛋白质脱酰胺酶(不包括上述本发明的蛋白质脱酰胺酶)、普鲁兰酶等。这些其他酶可以单独包含1种,也可以包含多种的组合。

[0093] 作为添加剂,可以根据上述本发明的多肽的用途和酶剂的制剂形态适当确定,可举出赋形剂、缓冲剂、悬浊剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理盐水等。作为赋形剂,可举出淀粉、糊精、麦芽糖、海藻糖、乳糖、D-葡萄糖、山梨糖醇、D-甘露醇、白糖、甘油等。作为缓冲剂,可举出磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐等。作为稳定剂,可举出丙二醇、抗坏血酸等。作为保存剂,可举出苯甲酸盐(钾盐、钠盐等碱金属盐)、山梨酸盐(钾盐、钠盐等碱金属盐)、苯酚、苯扎氯铵、苜醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯等。作为防腐剂,可举出乙醇、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。这些添加剂可以单独包含1种,也可以包含多种的组合。

[0094] 作为培养残渣,可举出:来自培养基的成分、夹杂蛋白质、菌体成分、细胞成分等。

[0095] 作为本发明的酶剂的制剂形态,没有特别限定,例如可举出液状、固体状(粉末、颗粒等)等。这些制剂形态的酶制剂通常可以通过公知的方法来制备。

[0096] 作为本发明的酶制剂的具体例,可举出含有蛋白质的饮食品或其原料的改性剂。另外,作为本发明的酶制剂的具体的其他示例,可举出蛋白质的酰胺基含量定量用试剂、蛋白质的增溶用试剂等蛋白质的分析用和/或研究用试剂。

[0097] 7. 蛋白质脱酰胺酶の利用

本发明的蛋白质脱酰胺酶可用于利用将蛋白质中的谷氨酰胺残基脱酰胺化的作

用的任意用途。因此,本发明还提供一种谷氨酰胺残基被脱酰胺化的蛋白质的制造方法,其包含使上述本发明的蛋白质脱酰胺酶作用于蛋白质的工序。

[0098] 关于被蛋白质脱酰胺酶脱酰胺化的蛋白质(底物蛋白质)只要是包含谷氨酰胺残基的蛋白质,就没有特别限制。底物蛋白质的长度只要为2个残基(二肽)以上就没有特别限制,底物蛋白质中不仅包含蛋白质,还包含肽。另外,底物蛋白质中包含天然物和人工物中的任一种。在底物蛋白质为天然物的情况下,作为底物蛋白质的来源,可以是动物和植物中的任一种。进而,底物蛋白质可以是饮食品或其原料中含有的蛋白质,也可以是作为分析对象或研究对象使用的蛋白质。

[0099] 蛋白质脱酰胺酶能够由蛋白质中的谷氨酰胺残基脱酰胺化而产生负电荷的羧基,因此能够通过使蛋白质的可溶性和水分散性增大、或者提高蛋白质的乳化力、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性等公知的蛋白质脱酰胺酶具有的公知的作用相同的作用,使蛋白质的特性变化(改性)。因此,蛋白质脱酰胺酶在将饮食品或饮食品用原材料(饮食品原料)中含有的蛋白质作为底物使用的情况下特别有用。进而,蛋白质脱酰胺酶不限于饮食品或饮食品用原材料,在将纤维领域和化妆品领域等中使用的产业用原材料中含有的蛋白质、以及医药用原材料中含有的蛋白质作为底物使用的情况下也是有用的。因此,本发明还提供一种改性的饮食品或饮食品原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的制造方法,其包含使上述本发明的蛋白质脱酰胺酶作用于含有蛋白质的饮食品或饮食品原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的工序。

[0100] 在本发明的谷氨酰胺残基被脱酰胺化的蛋白质的制造方法和改性的饮食品或饮食品原材料、产业用原材料、或者医药用原材料的制造方法中,对于上述的本发明的蛋白质脱酰胺酶与底物蛋白质的反应条件(酶量、反应时间、反应温度、反应pH等),只要能够实现期望的程度的脱酰胺化,就没有特别限制,本领域技术人员可以根据本发明的蛋白质脱酰胺酶的种类和/或纯度、底物蛋白质的种类和/或浓度、和/或、期望的脱酰胺化的程度等各种条件适当设定。

实施例

[0101] 以下,举出实施例具体说明本发明,但本发明不被解释为限定于以下实施例。

[0102] 试验例

按照以下步骤制备蛋白质脱酰胺酶。将序列号7~12的碱基序列分别克隆至pET21a中,制作质粒。将得到的质粒导入至大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3),而得到转化体。将转化体接种于TB+Amp培养基或Over Night Expression TB(OETB)(Sigma-Aldrich Japan合同会社制造)+Amp培养基,在37°C下使用罐通气搅拌培养一夜。在使用TB+Amp培养基的情况下,在培养开始起6小时后添加IPTG使最终浓度为0.1mM。回收得到的培养液的菌体后,利用溶菌酶溶解菌体,而回收可溶性级分(蛋白质脱酰胺酶级分)。

[0103] 对于得到的可溶性级分(蛋白质脱酰胺酶级分),按照以下步骤评价蛋白质谷氨酰胺酶活性。将可溶性级分10 μ L与底物溶液(5mM Z-Gln-Gly、0.0023% TritonX-100,0.2M磷酸一钾二钠,pH6.5)130 μ L混合后,在37°C下反应一晚。在反应溶液中添加内部标准品马尿酸(6.25mM马尿酸、0.2M磷酸一钾二钠,pH6)10 μ L,混合后,在以下的条件下对MF过滤后的试样进行HPLC分析,根据Z-Glu-Gly(产物)的峰的有无来评价蛋白质谷氨酰胺酶活性的有无。将结果示于表1。

[0104] (HPLC条件)

柱(Column): ZORBAX SB-C18 2.1×50mm, 1.8μm

溶剂(Solvent) A: 0.1% TFA/H₂O 溶剂(Solvent) B: 0.1% TFA/乙腈

(acetonitrile)

程序(Program): 0~0.3min_B:10%

0.3~2.0min_B:10%~25%

2.0~2.2min_B:25%

2.2~3.0min_B:100%

进样量(Injection volume): 2μL

流速(Flow rate): 1.0mL/min

检测(Detection): UV 205nm

[0105] [表1]

| | 碱基序列 | 氨基酸序列 | 概要 | 蛋白质谷氨酰胺酶活性 |
|------|-------|-------|-------------------------|------------|
| 比较例1 | - | - | 无酶 | 无 |
| 实施例1 | 序列号7 | 序列号1 | 全长 | 有 |
| 实施例2 | 序列号8 | 序列号2 | 去除C末端序列 | 有 |
| 实施例3 | 序列号9 | 序列号3 | 去除C末端和N末端序列、且添加蛋氨酸 | 有 |
| 实施例4 | 序列号10 | 序列号4 | S64C、全长 | 有 |
| 实施例5 | 序列号11 | 序列号5 | S64C、去除C末端序列 | 有 |
| 实施例6 | 序列号12 | 序列号6 | S64C、去除C末端和N末端序列、且添加蛋氨酸 | 有 |

[0106] 如表1所示, 确认到制备的全部酶(实施例1~6)产生了谷氨酰胺残基被脱酰胺化的产物的峰。即, 确认到制备的所有酶为具有蛋白质谷氨酰胺酶活性的蛋白质脱酰胺酶。通常, 在现有的蛋白质谷氨酰胺酶中, 如果将催化位点的半胱氨酸残基替换为丝氨酸残基, 则其活性丧失。因此, 催化位点为丝氨酸残基且具有蛋白质谷氨酰胺酶活性是预料不到的结果。另外, 在将丝氨酸残基替换为半胱氨酸残基的情况下(实施例4~6)也具有蛋白质谷氨酰胺酶活性, 这也是预料不到的结果。

[0107] (序列表)

序列号1是Chryseobacterium nematophagum蛋白质脱酰胺酶的氨基酸序列。

序列号2是去除序列号1的C末端序列的序列。

序列号3是去除序列号1的C末端和N末端序列且添加蛋氨酸的序列。

序列号4是序列号1的S64C替换的序列。

序列号5是序列号1的S64C替换且去除C末端序列的序列。

序列号6是序列号1的S64C替换且去除C末端和N末端序列且添加蛋氨酸的序列。

序列号7是编码序列号1并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号8是编码序列号2并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号9是编码序列号3并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号10是编码序列号4并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号11是编码序列号5并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号12是编码序列号6并在大肠杆菌中进行了密码子最适化的碱基序列。

序列号13是编码序列号1的来自Chryseobacterium nematophagum的碱基序列。