

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 11 月 8 日 (08.11.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/125824 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12N 15/00</i> (2006.01)	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
<i>C12N 1/15</i> (2006.01)	<i>C12N 9/78</i> (2006.01)
<i>C12N 1/19</i> (2006.01)	<i>C12N 15/09</i> (2006.01)
<i>C12N 1/21</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/34</i> (2006.01)

(NISHIYA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒9140047 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/058594

(22) 国際出願日: 2007 年 4 月 20 日 (20.04.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2006-120313	2006 年 4 月 25 日 (25.04.2006)	JP
特願2006-247681	2006 年 9 月 13 日 (13.09.2006)	JP
特願2006-303451	2006 年 11 月 9 日 (09.11.2006)	JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 永井 理恵 (NAGAI, Rie) [JP/JP]; 〒9140047 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 北林 雅夫 (KITABAYASHI, Masao) [JP/JP]; 〒9140047 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 西矢 芳昭

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODIFIED CREATININE AMIDE HYDROLASE HAVING IMPROVED AFFINITY FOR SUBSTRATE, AND REAGENT COMPOSITION FOR DETERMINATION OF CREATININE

(54) 発明の名称: 基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体、および、クレアチニン測定用試薬組成物

(57) Abstract: [PROBLEMS] To overcome disadvantages of a known creatinine amide hydrolase, and provide a creatinine amide hydrolase having improved affinity for creatinine or having a decreased Km value for creatinine, and also provide a reagent composition for use in the determination of creatinine, which is adapted to an automated analysis apparatus and is excellent in accuracy, preciseness and economic efficiency. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] Disclosed is a modified creatinine amide hydrolase having improved affinity for a substrate compared to an unmodified one. Also disclosed is a creatinine determination reagent comprising the modified creatinine amide hydrolase, a creatinine amidino hydrolase, sarcosine oxidase and a reagent for detection of hydrogen peroxide.

(57) 要約: 【課題】公知のクレアチニンアミドヒドロラーゼの欠点を克服し、よりクレアチニンに対する親和性が向上した、すなわちクレアチニンに対する Km 値の低下したクレアチニンアミドヒドロラーゼを提供すること、さらには、自動分析装置に適合し、正確性・精密性および経済性に優れたクレアチニン測定用試薬組成物を提供すること。【解決手段】改変前と比較して、基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体、もしくは、該クレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、過酸化水素の検出用試薬を含むクレアチニン測定試薬。

WO 2007/125824 A1

明 細 書

基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体、および、クレアチニン測定用試薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体、該クレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体をコードする遺伝子、該クレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体の製造法及び該クレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体のクレアチニン測定試薬への種々の適用に関する。

背景技術

[0002] クレアチニンは血液または尿中に見出され、その量を迅速かつ正確に検出測定することは、疾病、例えば尿毒症、慢性腎炎、急性腎炎、巨人症、強直性筋異栄養症などを診断するのに非常に重要である。

従来から、クレアチニンアミドヒドロラーゼ(EC 3.5.2.10) は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼおよびペルオキシダーゼと共に使用されている。クレアチニンアミドヒドロラーゼは、水の存在下にクレアチニンに作用してクレアチンを生成する可逆的反応を触媒する酵素である。

[0003] このようなクレアチニンアミドヒドロラーゼは、シュードモナス属(非特許文献1)あるいはアルカリゲネス属(非特許文献2)の細菌が生産することが知られている。さらに、これら以外の細菌としては、フラボバクテリウム属、コリネバクテリウム属、マイクロコッカス属(特許文献1)、ペニシリウム属(特許文献2)等の細菌が生産することが知られているにすぎない。このうち、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*) PS-7 が産生するクレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子は既に分離され、アミノ酸配列が公開されている(特許文献3)。

非特許文献1: Journal of Biochemistry, Vol. 86, 1109-1117(1979)

非特許文献2: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Vol. 34, No. 1, 269-274(1986)

特許文献1:特開昭51-115989号公報

特許文献2:特開昭47-43281号公報

特許文献3:特許第2527035号公報

- [0004] しかしながら、公知の各種菌体から製造されたクレアチニンアミドヒドロラーゼは臨床検査薬用酵素としてはクレアチニンに対する K_m 値が大きく、試薬組成中に大量の酵素を添加する必要があった。例えばアルカリゲネス・フェカリスTE3581由来の酵素(特許文献4)は、クレアチニンに対する K_m 値は約42mMであることが報告されている。さらにアースロバクター・エスピーTE1826由来の酵素は、クレアチニンに対する K_m 値は約66mMと大きい(特許文献5)。

特許文献4:特開平9-154574号公報

特許文献5:特開平10-215874号公報

- [0005] クレアチニンの定量法としては、試料中のクレアチニンにクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼおよびザルコシンオキシダーゼを作用させ、生成する過酸化水素を過酸化水素測定手段により測定して、試料中のクレアチニンを定量する方法が知られている。

このような方法を実施するために、試薬を2つ以上の部分に分けてそれぞれを予め決められた添加順で反応セルに添加し、全工程で数分～20分程度反応させて、その間の吸光度の増減を経時的に測定し、その結果を解析計算することにより目的物質の濃度を求める、汎用の自動分析機がよく用いられる。これらの自動分析機に適用されうるように調製された種々の試薬が公知である。

非特許文献3:Medical Technology, Vol. 10, No. 7, 575-579 (1982)

- [0006] しかし、従来の方法によれば、反応がエンドポイントに達するまでの時間が長い、測定に時間がかかり、処理できる検体数が少なかった。一方、短時間で反応を終わらせるには酵素の添加量を増やす必要があり、経済性に問題があった。

図面の簡単な説明

- [0007] [図1]図1は、本発明試薬と比較例試薬の反応性評価結果を示す。●;本発明製剤, ○;比較例製剤

[図2]図2は、本発明試薬と比較例試薬の反応性評価結果を示す。●;本発明製剤,
○;比較例製剤

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、上述のような公知のクレアチニンアミドヒドロラーゼの欠点を克服し、よりクレアチニンに対する親和性が向上した、すなわちクレアチニンに対するKm値の低下したクレアチニンアミドヒドロラーゼを提供することである。

さらに、本発明の目的は、上記現状に鑑み、自動分析装置に適合し、正確性・精密性および経済性に優れたクレアチニン測定用試薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記目的を達成するために、鋭意検討した結果、シュードモナス・プチダ由来の上記クレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子を用い、蛋白質工学的手法により、クレアチニンに対するKm値のより小さいクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を創出することに成功した。そして、クレアチニンアミドヒドロラーゼのKm値を小さくすれば、クレアチニンの定量において、反応がエンドポイントに達するまでの時間が短くなることを見だし、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は以下の構成からなる。

[項1]

改変前のクレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、基質との結合部位から半径10オングストローム以内の距離にあるアミノ酸であり、かつ、 α ヘリックス両端から5残基以内のアミノ酸において、1もしくは数個のアミノ酸を欠失、置換もしくは付加することにより、改変前と比較して、基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項2]

改変前のクレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が、野生型と比較して、他のアミノ酸に置換している項1記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項3]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する、項1、2のいずれかに記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項4]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する、項1、2のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項5]

改変前のクレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質が配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列を有する、項1、2のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項6]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の44位、122位、179位、180位、181位またはそれらと同等の位置からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている項3～5のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項7]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の179位またはそれと同等の位置のグリシンがセリンに置換されている項3～5のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項8]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の179位またはそれと同等の位置のグリシンがアラニンに置換されている項3～5のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項9]

配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の180位またはそれと同等の位置のグリシンがアラニンに置換されている項3～5のいずれか1項に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項10]

改変後のクレアチニンに対するKm値が、改変前に比べて1/5以下であることを特

徴とする項1～9のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。

[項11]

改変後のクレアチニンに対するKm値が、改変前に比べて1/2.5以下であることを特徴とする項1～9のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。
[項12]

項1～9のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体をコードする遺伝子。

[項13]

項12に記載の遺伝子を含むベクター。

[項14]

項13に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

[項15]

項14に記載の形質転換体を培養し、該培養物からクレアチニンアミドヒドロラーゼを採取するクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体の製造法。

[項16]

項1～11のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を含むクレアチニン測定用試薬。

[項17]

項1～11のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を用いるクレアチニン測定方法。

発明の効果

[0011] 本発明により臨床検査薬用酵素として有用な、Km値の小さい新規クレアチニンアミドヒドロラーゼを創出し、工業的に大量に該クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産できる。

また、本発明により、クレアチニンの定量において、使用酵素量を従来の1/4に減らすことができ、また従来と同等の使用量であれば反応がエンドポイントに達する時間が短いため、測定時間を短縮でき処理検体数を増加させることができる。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0013] クレアチニンアミドヒドロラーゼは、EC3. 5. 2. 10に分類される酵素である。

[0014] 本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は、改変前のクレアチニンアミドヒドロラーゼよりも基質に対する親和性が向上したものである。基質との親和性の向上とは、具体的にはクレアチニンに対するKm値の低下を意味する。

[0015] 本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は、好ましくは、改変後のクレアチニンに対するKm値が、改変前に比べて1/2.5以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体である。さらに好ましくは、改変後のクレアチニンに対するKm値が、改変前に比べて1/5以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体である。

[0016] あるいは、本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は、好ましくは、改変後のクレアチニンに対するKm値(以下に示す方法で測定した値)が、70mM以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体である。さらに好ましくは、改変後のクレアチニンに対するKm値が、55mM以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体である。

[0017] あるいは、本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は、配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列と50%以上(好ましくは80%以上)の相同性を有する。

[0018] Km値は、以下のいずれかの方法を用いて測定する。

実施例1ないし3については、以下のように測定した。

後述のクレアチニンアミドヒドロラーゼの活性測定法において、R2を基質であるクレアチニンの濃度を、反応時に55.6、37.0、22.2、15.9、11.1mMになるよう調製し、それぞれのR2を用いて活性を測定する。得られた測定値を、Lineweaver-Burkプロットを用いてKm値を求める。

[0019] また、実施例4および5については、Km値は以下のように測定した。

後述のクレアチニンアミドヒドロラーゼの活性測定法において、第二試薬の基質であるクレアチニンの濃度を、反応時に各50、30、20、15、10mMになるよう調製(±10%以内の誤差は許容されるものとする。)し、それぞれのR2を用いて活性を測定する。得られた測定値を、Lineweaver-Burkプロットを用いてKm値を求める。

[0020] 本願明細書において、アミノ酸は1文字記号または3文字記号で表す。また、アミノ

酸の変異の位置については次のように表記する。例えば「G179S」は、179位のG (Gly)をS (Ser)に置換することを意味する。

- [0021] 本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼの改変の基になるクレアチニンアミドヒドロラーゼは、コリネバクテリウム属、シュードモナス属、アースロバクター属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属などの微生物由来のもの等が例示されるが、特に限定されるものではない。

具体的には例えば、シュードモナス・プチダ (PS-7) 株に由来するものが挙げられ、そのアミノ酸配列は配列番号2、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子は配列番号1でそれぞれ示される。これらはいずれも特許第2527035号公報に記載されている。なお、配列番号2において、アミノ酸の表記は、メチオニンを1として番号付けされている。

- [0022] 本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼの改変の基になるクレアチニンアミドヒドロラーゼは、クレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有するものであれば、野生型のものに限らず何らかの改変が施されたものであっても良い。改変としては、例えばアミノ酸を欠失、置換もしくは付加されたもの、分子間または分子内架橋が施されたもの、あるいは、糖鎖やその他の官能基により化学修飾されたものなどが含まれるが、特に限定されない。

具体的には例えば、シュードモナス属、アルカリゲネス属由来のもの、あるいは市販品では、東洋紡績製「CNH-311」、キッコーマン製「Creatininase (C1-E)」等に改変を施しても良い。

- [0023] 本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼは、クレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列のうち、基質との結合部位から半径10オングストローム以内の距離にあるアミノ酸配列であり、 α ヘリックス両端から5残基以内のアミノ酸配列が変換された、野生型と比較して、基質との親和性が向上したものである。なお、基質との結合部位とは、Swiss-Pdb Viewer (SPDBV) を使用してクレアチンとクレアチニンアミドヒドロラーゼが結合した状態の立体構造データより定義される部位である。基質との結合部位からの距離も同ソフトを用いることで、定義できる。

このような改変部位として具体的には、例えば、シュードモナス・プチダ(PS-7)株に由来するクレアチニンアミドヒドロラーゼアミノ酸配列(配列番号2)では、Cys41, Met42, Asn43, Val44, Asp45, His120, Tyr121, Asn123, Ser124, Asp155, Glu177, His178, Gly179, Gly180, Val181が例示できる。

なかでも、44位、122位、179位、180位、及び181位に相当する部位のうち少なくとも1つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてなるものが、本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼとして好ましい。

[0024] とりわけ、配列番号2における44位のアミノ酸はアルギニンまたはグリシンまたはセリンに置換されていることが好ましい。

配列番号2における44位のアミノ酸はアスパラギンに置換されていることが好ましい。

配列番号2における122位のアミノ酸はアスパラギン酸に置換されていることが好ましい。

配列番号2における179位のアミノ酸はセリンまたはアラニンに置換されていることが好ましい。

配列番号2における180位のアミノ酸はセリンまたはアラニンに置換されていることが好ましい。

配列番号2における181位のアミノ酸はイソロイシンに置換されていることが好ましい。

[0025] また、44位、122位、179位、180位、及び181位に相当する部位のうち、好ましくは122位、179位、180位、及び181位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが好ましい。さらに好ましくは179位、180位のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが好ましい。

[0026] これらの改変部位は、1もしくは数個が改変されたものであっても良い。また、改変はアミノ酸を欠失、置換もしくは付加のいずれでも良いし、それらの組合せであっても良い。

[0027] なお、上記の置換位置は、シュードモナス・プチダ(PS-7)株以外の起源のクレアチニンアミドヒドロラーゼのアミノ酸配列における同等の位置であっても良い。同等の

位置かどうかは、一次構造、立体構造の知見を基に判断することができる。

- [0028] シュードモナス・プチダ由来のクレアチニンアミドヒドロラーゼの立体構造は既に明らかになっていたが、蛋白質工学的手法によりクレアチニンアミドヒドロラーゼのKm値を低下させることを示唆する記載はなかった(非特許文献4、5)。

非特許文献4:Journal of Molecular Biology, Vol337, 399-416(2004)

非特許文献5:Journal of Molecular Biology, Vol332, 287-301(2004)

- [0029] 発明者らが見出したシュードモナス・プチダ由来のクレアチニンアミドヒドロラーゼの44位、122位、179位、180位、及び181位の変異箇所をこの立体構造に照らし合わせたところ、44位及び122位は α ヘリックス末端から5残基以内に位置し、179位、180位、及び181位はthe flap regionにあることがわかった。

非特許文献3には、クレアチニンアミドヒドロラーゼの立体構造は7つの α ヘリックスと4つの β 構造からなりたっており、クレアチニンアミドヒドロラーゼが基質と結合すると、the flap region(α 5と α 6の間)の配置変化がおきることが記載されている。

この記載と本発明者らが具体的に得た実験結果を合わせて考えると、 α 5と α 6の間の構造を変えることによりthe flap regionの配置に変化がおり、基質との親和性が向上するものと考えられる。

- [0030] したがって、当業者であれば、上記44位、122位、179位、180位、及び181位に限らずその周辺を包含する範囲のアミノ酸(具体的には、the flap regionの α 5と α 6の末端から数えて5残基以内のアミノ酸、さらには、the flap regionだけでなく基質との結合部位から近い、具体的には10オングストローム以内の α ヘリックスの末端から数えて5残基以内のアミノ酸)を変異することにより、the flap regionの配置に変化がおり基質との親和性を向上させる効果を有する改変体を、過度の検討なくして得ることができる。

他の起源のクレアチニンアミドヒドロラーゼについても、一次構造、立体構造の情報を元に、変異すべきアミノ酸位置を推定した上で、基質との親和性を向上させる効果を有する改変体を、過度の検討なくして得ることが可能である。

このように本発明の技術的思想は、具体的に上記で得られた改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼに限定されるものではない。

[0031] なお、上記説明において、基質との結合部位とは、Swiss-Pdb Viewer (SPDB V)を使用してクレアチンとクレアチニンアミドヒドロラーゼが結合した状態の立体構造データより定義される部位である。基質との結合部位からの距離も同ソフトを用いることで、定義できる。

[0032] また、 α ヘリックスとは、タンパク質やポリペプチドのとり2次構造の一つで、アミノ酸3.6残基ごとに1回転し、ピッチ5.4オングストロームのらせん構造である。ペプチド結合が平面をなすこと、ペプチド結合の $-\text{NH}_2-$ 、 $-\text{CO}-$ はすべて水素結合をする。

[0033] 相同性はGENETYX-WINを使用して、2種類の配列のhomology searchにより一致する配列の割合(%)を計算することができる。

[0034] なお、本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼは、クレアチニンに対する作用性が本質的に維持される限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換・挿入等されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加または置換等されていてもよい。

さらに、本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼは、クレアチニンに対する作用性が本質的に維持される限り、クレアチニンアミドヒドロラーゼにヒスチジンタグなどのタグを結合または挿入させた態様、クレアチニンアミドヒドロラーゼの少なくとも一方の末端に他のペプチドや他の蛋白質(たとえばストレプトアビジンやシトクロム)を融合させた態様、糖鎖や他の化合物により化学修飾された態様、クレアチニンアミドヒドロラーゼ分子内および／または分子間でジスルフィド結合などにより架橋されたものやリンカーペプチドなどを介して連結されたもの等の態様を含みうる。あるいは、いくつかの由来の野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼの断片を組み合わせて構成したものを含みうる。

[0035] 本発明はさらに、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を含む。

本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子は、例えば、微生物など種々の起源(由来)より得られる野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を改変することにより得ることができる。具体的には、例えばアルカリゲネス・フェカリス(*Alcaligenes faecalis*)、アースロバクター・エスピ

ー (*Arthrobacter* sp.), フラボバクテリウム・エスピー (*Flavobacterium* sp.), コリネバクテリウム・ウレアファシエンス (*Corinebacterium ureafaciens*), コリネバクテリウム・クレアチノボランス (*Corinebacterium creatinovorans*), マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*), シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等の細菌を挙げることができる。

本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号1に記載の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつクレアチニンアミドヒドロラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAである。

[0036] 本発明の遺伝子は、さらに、野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子の改変により得られた改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子について、クレアチニンアミドヒドロラーゼの発現を向上させるように、さらにコドンユーセージ (Codon usage) を変更したものを含みうる。

[0037] 野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit; Clontech製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

[0038] 本発明はさらに、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を含むベクター、さらには該ベクターで形質転換された形質転換体を含む。

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。

ベクターとしてプラスミドを用いる場合、例えば、エシェリヒア・コリー (*Escherichia coli*) を宿主微生物とする場合にはpBluescript, pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリー W3110、エシェリヒア・コリー C600、エシ

エリヒア・コリーJM109、エシエリヒア・コリーDH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシエリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル(例えば、コンピテントハイJM109;東洋紡績製)を用いても良い。

[0039] このような遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに、PCR法の利用により、クレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

[0040] 本発明において、クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばシュードモナス・プチダ(PS-7)株由来の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を含む組換えベクターを保持する微生物を得る。

[0041] 次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからクレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を採取することができる。例えば、遺伝子供与体であるシュードモナス・プチダ(PS-7)の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

[0042] 該遺伝子供与微生物を例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やドデシル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

- [0043] 上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。
- [0044] 微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。
- [0045] クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。
- [0046] クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したクレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作製する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。
- [0047] クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 α などを用いることができる。
- [0048] 宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレ

ーション法などを用いることができる。

- [0049] 上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のクレアチニンアミドヒドロラーゼを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカー発現する微生物を検索すればよい。
- [0050] 上記の方法により得られたクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子の塩基配列は、Science , 第214巻, 1205(1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、クレアチニンアミドヒドロラーゼのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。
- [0051] 上記のようにして、一度選択されたクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子を保有する組換えベクターより、クレアチニンアミドヒドロラーゼ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、クレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるクレアチニンアミドヒドロラーゼ生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。
- [0052] 本発明はさらに、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする遺伝子を含むベクターで形質転換された形質転換体を培養することを含む改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼの製造法に関する。
- [0053] また、本発明のさらに別の一つの態様は、クレアチニンアミドヒドロラーゼに請求項1～9のうちいずれかに記載のアミノ酸変異を行うことを含む、クレアチニンに対するK_m値を、対応する野生型酵素と比較して低下させたクレアチニンアミドヒドロラーゼを製造する方法を含む。
- [0054] こうしてできた形質転換体を培養することにより、本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼを製造することができる。

例えば上記のようにして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿

主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

。

[0055] 培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

[0056] 培養温度は菌が成育し、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなクレアチニンアミドヒドロラーゼ生産能を有する微生物の場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼが最高収量に達する時期を見計らって適當時期に培養を完了すればよく、通常は6～48時間程度である。培地のpHは菌が発育し、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

[0057] 培養物中の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼ含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してクレアチニンアミドヒドロラーゼを可溶化し、水溶液として分離採取する。

[0058] 上記のようにして得られたクレアチニンアミドヒドロラーゼ含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親

水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたクレアチニンアミドヒドロラーゼを得ることができる。

[0059] 例えば、セファデックス(Sephadex)ゲル(GEヘルスケアバイオサイエンス)などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B(GEヘルスケアバイオサイエンス)、オクチルセファロースCL-6B(GEヘルスケアバイオサイエンス)等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動(SDS-PAGE)的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

[0060] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはGOODの緩衝液であり、なかでも、PIPES、MESもしくはMOPS緩衝液が特に好ましい。また、グルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりクレアチニンアミドヒドロラーゼをより安定化することができる。

[0061] 本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作製される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など)の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の利用が挙げられる。

[0062] 本発明では、配列番号2に示されるクレアチニンアミドヒドロラーゼの44位、122位、179位、180位、及び181位に着目し、これらのアミノ酸部位へ上記変異導入キットを用いてランダムに変異を導入したライブラリーを作製し、基質特異性の変化を指標にスクリーニングしたところ、クレアチニンに対するKm値が低減したクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を得ることができた。

[0063] 本発明の別の形態は、クレアチニンに対するKm値が55mM以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、過酸化水素の検出用試薬を含むクレアチニン測定試薬である。

過酸化水素の検出用試薬としては、例えば、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、トリンダー試薬を含む。

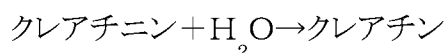
[0064] 上記クレアチニン測定試薬の形態は、請求項1～13のうちいずれかに記載の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを含むクレアチニン測定用組成物を含む。

上記クレアチニン測定試薬の形態は、請求項1～13のうちいずれかに記載の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを含むクレアチニン測定キットを含む。

[0065] 本発明の測定法は、下記反応を利用するものである。

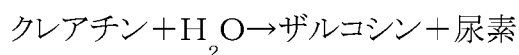
(a) クレアチニンと水から、クレアチニンアミドヒドロラーゼによりクレアチンを生成する反応

(クレアチニンアミドヒドロラーゼ)



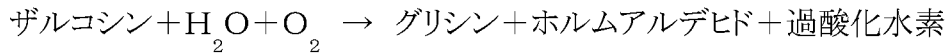
(b) (a) で得られたクレアチンと水から、クレアチンアミジノヒドロラーゼによりザルコシンと尿素を生成する反応

(クレアチンアミジノヒドロラーゼ)



(c) (b) で得られたザルコシンと水と酸素から、ザルコシンオキシダーゼによりグリシンとホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する反応

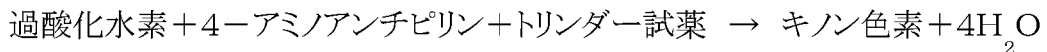
(ザルコシンオキシダーゼ)



(d) (c) で得られた過酸化水素を検出する反応

例えば、(c) で得られた過酸化水素と4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬から、ペルオキシダーゼによりキノン色素と水を生成する反応

(ペルオキシダーゼ)



[0066] 本発明の測定法には、クレアチニンに対するKm値が55mM以下であるクレアチニンアミドヒドロラーゼを用いる。

そのようなクレアチニンアミドヒドロラーゼの起源は、シュードモナス属、アルカリゲネス属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属、フラボバクテリウム属、マイクロコッカス属などの微生物由来のもの等が例示されるが、特に限定されるものではないが、本願明細書の[0012]～[0055]および参考例に後述するものが好適に使用できる。

[0067] 本発明におけるクレアチニン測定の対象となる試料としては、血清、尿、血漿などの生体試料が挙げられるが、これに特定されない。

[0068] 本発明の試薬において、組成物は、液状(水溶液、懸濁液等)、粉末、凍結乾燥など種々の形態をとることができる。凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよい。本発明の酵素を含む組成物は凍結乾燥物に限られず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。

[0069] さらに上記各形態において、本発明の試薬組成物は、その形態や使用方法に応じて、精製された状態であっても良いし、必要により他の成分、例えば界面活性剤、安定化剤、賦形剤など種々の添加物が加えられていても良い。

本発明の試薬へのそれらの添加物の配合法は特に制限されるものではない。例えばクレアチニンアミドヒドロラーゼを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にクレアチニンアミドヒドロラーゼを配合する方法、あるいはクレアチニンアミドヒドロラーゼと安定化剤を緩衝液に同時に配合する方法などが挙げられる。

[0070] 本発明に使用するクレアチンアミドヒドロラーゼの起源は特に限定されるものでは

ない。例えば、アースロバクター由来、アルカリゲネス由来のものを用いることができる。市販品では、東洋紡績製「CRH-221」、キッコーマン製「Creatinase (C2-A T)」等を用いることができる。

- [0071] 本発明に使用するザルコシンオキシダーゼの起源は特に限定されるものではない。例えば、コリネバクテリウム由来、アースロバクター由来のものを用いることができる。市販品では、東洋紡績製「SAO-341」、キッコーマン製「Sarcosine Oxidase (S OD-TE)」等を用いることができる。

- [0072] 本発明に使用するクレアチニンアミドヒドロラーゼの酵素濃度は、測定に適した濃度であれば特に限定するものではないが、好ましくは1-1000U/mLの範囲で好適に用いられる。

クレアチニンアミジノヒドロラーゼの酵素濃度は、測定に適した濃度であれば特に限定するものではないが、好ましくは1-1000U/mLの範囲で好適に用いられる。

ザルコシンオキシダーゼの酵素濃度は、測定に適した濃度であれば特に限定するものではないが、好ましくは1-1000U/mLの範囲で好適に用いられる。

- [0073] 本発明に使用するペルオキシダーゼの起源は特に限定されるものではない。例えば、西洋ワサビ由来のものを用いることができる。市販品では、東洋紡績製「PEO-301」等を用いることができる。

- [0074] 本発明のクレアチニン測定試薬は、上記以外に、リン酸塩やGOODバッファー、トリスバッファーなどの緩衝剤を含有する。更には、酵素反応を妨害するイオンを捕捉するEDTAやO-ジアニシジンなどのキレート試薬や、過酸化水素の定量の妨害物質であるアスコルビン酸を消去するアスコルビン酸オキシダーゼ、トリトンX-100やNP-40などの各種界面活性剤、ストレプトマイシンやアジ化ナトリウムなどの各種抗菌剤や防腐剤などを含んでもよい。これらは、種々の市販の試薬を入手できる。

これらの試薬は、単一試薬でも2種類以上の試薬からなるものであってもよいが、本発明の利点を活かすためには簡便な単一試薬がより好ましい。また、本発明の利点を活かすためには取扱いの簡便な液状試薬が好ましい。

- [0075] 含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0~10.

0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。凍結乾燥物中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1% (重量比) 以上、特に好ましくは0.1~30% (重量比) の範囲で使用される。

[0076] また、さらに血清アルブミンを含有させてもよい。前記の水性組成物に血清アルブミンを添加する場合、その含有量は0.05~0.5重量%であることが好ましい。

使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン(OVA)などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1~80% (重量比)、より好ましくは5~70% (重量比) の範囲で使用される。

[0077] 一方、上記各形態において、本発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチニン測定用組成物ならびにクレアチニン測定用キットは、宿主由来のタンパク質成分以外のタンパク質成分を含有しない構成とすることもできる。

宿主由来のタンパク質成分以外のタンパク質成分としては、例えばBSA等の生体由来物質が挙げられる。

このような構成にすることにより、クレアチニン測定系における非特異反応が低減する可能性が考えられる。

[0078] 緩衝剤としては、一般的に使用されるものであれば良く、通常、組成物のpHを5~10とするものが好ましい。緩衝剤としてさらに好ましくは、ホウ酸や酢酸といった緩衝剤や、BES、Bicine、Bis-Tris、CHES、EPPS、HEPES、HEPPSO、MES、MOPS、MOPSO、PIPES、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、Tricineといったグッド緩衝剤が挙げられる。

また、粉末組成物において、緩衝剤の含有量(W/W)は、1.0%~50%であることが望ましい。

[0079] また、改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼと緩衝剤から基本的に成る組成物に、アミノ酸、あるいは有機酸をさらに加えてもかまわない。また、これらを含有するものであれば、水性組成物、凍結乾燥物を問わない。

[0080] 本発明に使用する緩衝剤として特に好ましくは、6.5~8.5のpH範囲において十分な緩衝能力を有する任意の緩衝剤を使用することができる。このpH範囲の緩衝剤は、リン酸塩、トリス、ビス-トリスプロパン、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルー2-ア

ミノエタンスルホン酸(TES)、および3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(TAPSO)を含む。低価格および高い安定性のため、好ましい緩衝剤はリン酸塩である。好ましい濃度範囲は、20-200mMのリン酸塩であり、pH7~8である。

[0081] 本発明においてクレアチニンに由来する過酸化水素の検出用試薬とは、クレアチニンに由来する過酸化水素を検出するための試薬であれば特に限定されるものではないが、好ましくは、ペルオキシダーゼおよび過酸化水素発色試薬をいう。使用するペルオキシダーゼおよび過酸化水素発色試薬は何ら制限されるものではない。好ましい指示薬は溶液において安定であり、かつビリルビン干渉が低いものである。

[0082] 過酸化水素発色試薬としては、例えば

(1)4-アミノアンチピリンまたは3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドラゾン(MBTH)と、

(2)フェノールまたはその誘導体、もしくは、アニリンまたはその誘導体を組み合わせて使用する。

フェノール誘導体としては、2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、1,2-ジクロロフェノール等が挙げられる。

アニリン誘導体としては、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、N,N-ジエチル-m-トルイジン、N,N-ジメチル-m-アニシジン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(β-ヒドロキシエチル)-m-トルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-N-スルホプロピル)-m-アニシジン等が挙げられる。

また、10-X-メチルカルバモイル-3,7-ジメチルアミノ-10H-フェノチアジン、ビス[8-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン、1,4-

ービス(ジメチルアミノ)ジフェニルー(2, 7-ジヒドロキシ-4-ナフチル)メタン等のロイコ色素を使用してもよい。

これらは、種々の市販の試薬を入手できる。

[0083] 本発明においてクレアチニンに由来する過酸化水素を検出する際の好ましい指示薬は、ベンジジン類、ロイコ染料類、4-アミノアンチピリン、フェノール類、ナフトール類およびアニリン誘導体類を含む。より好ましい指示薬は、4-アミノアンチピリンおよびN-エチルーN-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トリス(4-メチル-5-ヒドロキシ-2-ナフトール)スルホン酸(TOOS)である。好ましい濃度範囲は、4-アミノアンチピリンについては、0.05-10mM、TOOSでは0.05-10mMである。

[0084] 本発明においてクレアチニンに由来する過酸化水素を検出する際に用いるペルオキシダーゼは、高純度かつ低価格のものが商業的に入手可能であることから西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼが好ましい。酵素濃度は、迅速かつ完全な反応のために充分高くなければならず、好ましくは、1,000-50,000U/Lである。

[0085] ビリルビンの干渉を最少とするためにフェロシアニドを試薬に添加してもよい。しかしながら、フェロシアニド等の金属イオンの存在は、指示薬および酵素を不安定化することもある。本発明の試薬の安定性は、フェロシアニドの添加を許容する程に充分高い。フェロシアニドの好ましい濃度範囲は、1-400 μ Mであり、最大濃度は、酵素活性を阻害する濃度である。

[0086] 不活性タンパク質を、更に安定性を増すために添加してもよい。不活性タンパク質は、血清アルブミン類、グロブリン類および繊維性タンパク質類を含む。好ましいタンパク質は、ウシ血清アルブミンであり、wt/volにおける好ましい濃度は、0.05-1%である。より低い濃度が有用であり得る。好ましい不活性タンパク質は、酵素分解を起こすであろうプロテアーゼ不純物を含まないものである。

[0087] クレアチニン濃度の測定は、試料の特定体積および試薬の特定体積を用いて行われる。吸光度測定は、試料ブランクを測定するために、混合後、かつクレアチニンの代謝による有意な吸光度変化が起こる前にできるだけ速やかに行われる。0.5-5秒後の第1の吸光度測定が適当である。第2の吸光度測定は、吸光度が定常的になった後、典型的には5mg/dLのクレアチニン濃度において37°Cにて3-5分間であ

る。典型的には、該試薬は既知のクレアチニン濃度を有する水性または血清溶液にて標準化される。

[0088] 本発明のクレアチニン測定用試薬組成物を用いて、クレアチニンを測定する方法は、試料をクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、トリンダー試薬を含有する該試薬と反応させて、生成するキノン色素の発色量を測定する方法である。

[0089] 本発明の別の形態は、請求項1～13のうちいずれかに記載の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼを含むクレアチニン測定方法を含む。

本願発明は、また、クレアチニンアミドヒドロラーゼを用いるクレアチニン測定系において、請求項1～13のうちいずれかに記載のアミノ酸変異を行ったクレアチニンアミドヒドロラーゼを含有することを含む、クレアチニン測定系における、測定の反応性を向上させる方法を含む。

本願発明は、また、クレアチニンアミドヒドロラーゼを用いるクレアチニン測定系において、請求項1～13のうちいずれかに記載のアミノ酸変異を行ったクレアチニンアミドヒドロラーゼを含有させることを含む、測定の反応性が向上したクレアチニン測定用組成物を、製造する方法を含む。

[0090] 後述の実施例にも記載されているように、本願発明の改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼではクレアチニンに対する K_m 値が野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼに対して著しく低下している。このことは、例えば、臨床サンプルにおけるクレアチニン測定においてクレアチニンアミドヒドロラーゼ量を著しく低下させることができ、低コスト化が見込める。

実施例

[0091] 以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1 改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子の作製

特許第2527035号、および、Biosci. Biotech. Biochem. , 59巻7号、1331-1332ページ(1995)に記載の方法を参照して、シュードモナス・プチダPS-7株の染色体DNAを調製し、次いで、該株由来のクレアチニンアミドヒドロラーゼ遺伝子を含む発現プラスミドpCNH5-13を調製した。

野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼの発現プラスミドpCNH5-13は、ベクターpBluescript SK(-)のマルチクローニング部位にシュードモナス・プチダPS-7株由来のクレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列は配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるクレアチニンアミドヒドロラーゼのアミノ酸配列は配列表の配列番号1に示される。

次に、pCNH5-13と、配列表の配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてQuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(商標 STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号2記載のアミノ酸配列の179番目のグリシンがセリンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM1)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE製)を用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の179番目のグリシンがアラニンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM2)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の180番目のグリシンがアラニンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM3)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号6記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の180番目のグリシンがセリンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM4)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の181番目のバリンがイソロイシンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM5)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号8記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の44番目のアスパラギン酸がアルギニンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM6)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号9記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の44番目のアスパラギン酸がグリシンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM7)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の44番目のアスパラギン酸がセリンに置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM8)を取得した。

pCNH5-13と、配列表の配列番号12記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号2記載のアミノ酸配列の122番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換された変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼをコードする組換えプラスミド(pCNHM9)を取得した。

[0092] 実施例2 改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼの作製

pCNHM1、pCNHM2、pCNHM3、pCNHM4、pCNHM5、pCNHM6、pCNHM7、pCNHM8、pCNHM9、の各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーDH5 α のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

5mlのCNH生産培地(1%ポリペプトン、2%酵母エキス、1%塩化ナトリウム、5mM塩化マンガン)を試験管に分注し、121°C、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを100 μ l/mlになるように添加した。この培地に100 μ l/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地で予め37°C、16時間培養したエシェリヒアコリーDH5 α (pCNHM1)のシングルコロニーを接種し、37°Cで22時間通気攪拌培養した。

上記菌体を遠心分離により集菌し、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。

。また、この変異体をCNHM1と命名した。

pCNHM2、pCNHM3、pCNHM4、pCNHM5、pCNHM6、pCNHM7、pCNHM8、pCNHM9、pCNHM10の各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーDH5 α 形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれCNHM2、CNHM3、CNHM4、CNHM5、CNHM6、CNHM7、CNHM8、CNHM9と命名した。

[0093] 比較例1 野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼの作製

比較例として、pCNH5-13によるエシェリヒアコリーDH5 α 形質転換体について、上記方法と同様にして、改変前の精製酵素標品を取得した。

[0094] 実施例3 改変型クレアチニンアミドヒドロラーゼの評価1

実施例2で取得した変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼ(CNHM1、CNHM2、CNHM3、CNHM4、CNHM5、CNHM6、CNHM7、CNHM8、CNHM9)および比較例1で取得した各種クレアチニンアミドヒドロラーゼをそれぞれ、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)中に1.67U/mlになるように加え、前述した活性測定法によりクレアチニンアミドヒドロラーゼを測定した。その結果を表1に示す。表1から判るように本発明のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は改変前と比べてKm値が小さくなっていることが確認された。

[0095] 実施例1ないし3中、クレアチニンアミドヒドロラーゼの活性測定は以下のようにして行った。なお、本発明の酵素活性の定義は、下記条件下に1分間に1 μ モルのクレアチンを生成する酵素量を1単位(U)とする。

反応混液組成

R1

0.58M HEPES pH8

0.005% 4アミノアンチピリン

0.015% フェノール

60U/mlクレアチンアミドヒドロラーゼ

12U/ml ザルコシンオキシダーゼ

6U/ml ペルオキシダーゼ

R2

0. 25M クレアチニン

0. 27N HCl

R1:200 μ lに、R2:60 μ l及び酵素液10 μ lを加え、37℃で10分間反応させ、505 nmの吸光度変化をHITACHI7060型自動分析装置を用いて測定した。

[0096] 下記表1に本発明の新規なクレアチンアミジノヒドロラーゼと野生型クレアチンアミジノヒドロラーゼのクレアチンに対するKm値をまとめた。表1からも明らかなように本発明の新規なクレアチンアミジノヒドロラーゼが野生型クレアチンアミジノヒドロラーゼに比べて、Km値が低下したことが判る。

[0097] [表1]

酵素	Km (mM)
野生型	81
CNH M1	16
CNH M2	28
CNH M3	27
CNH M4	35
CNH M5	49
CNH M6	49
CNH M7	53
CNH M8	50
CNH M9	37

[0098] 実施例4 クレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を使用したクレアチニン測定試薬の反応性評価

実施例2で取得した変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼ(CNH M1) 100U/mL

を上記第二試薬に添加して、液状クレアチニン測定試薬(本発明試薬)を調整した。対象としてシュードモナス・プチダ由来野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼ(商品コード:CNH-311、東洋紡社製)100U/mLを上記第二試薬に添加して、液状クレアチニン測定試薬(比較例試薬)を調整した。

本発明試薬と比較例試薬の反応性を5mg/dLのクレアチニンを測定して比較した。図1に示すように本発明試薬はエンドポイントに達する時間が短くなっていた。

実施例5 野生型と同一反応性を示すクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体の添加量

実施例2で取得した変異型クレアチニンアミドヒドロラーゼ(CNHM1)100U/mLを上記第二試薬に添加して、液状クレアチニン測定試薬(本発明試薬)を調整した。対象としてシュードモナス・プチダ由来野生型クレアチニンアミドヒドロラーゼ(商品コード:CNH-311、東洋紡社製)400U/mLを上記第二試薬に添加して、液状クレアチニン測定試薬(比較例試薬)を調整した。

本発明試薬と比較例試薬の反応性を5mg/dLのクレアチニンを測定して比較した。図2に示すように本発明試薬のクレアチニンアミドヒドロラーゼ添加Unitは比較例試薬のクレアチニンアミドヒドロラーゼの1/4で同一の反応性であった。

実施例4および5中、5mg/dLクレアチニンを次の組成を有する第一試薬及び第二試薬を用いて下記方法により測定した。

第一試薬

50mM MOPS緩衝液(pH7.5)

10mM NaCl

0.1% トリトンX-100

0.14g/l TOOS

60U/ml クレアチンアミドヒドロラーゼ(東洋紡社製CRH-221)

16U/ml ザルコシンオキシダーゼ(東洋紡社製SAO-351)

第二試薬

50mM MOPS緩衝液(pH7.5)

0.1% トリトンX-100

10U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡社製PEO-301)

0.6g/l 4-アミノアンチピリン

略号は以下を意味する。

TOOS: N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン

測定方法

日立7060形自動分析機を用いた。試料6 μ Lに第一試薬270 μ L添加し、37°Cにて5分間インキュベーションし、第一反応とした。その後第二試薬90 μ L添加し5分間インキュベーションし、第二反応とした。第一反応および第二反応の吸光度を液量補正した各吸光度の差をとる2エンドポイント法で546nmにおける吸光度を測定した。クレアチニン濃度未知試料のクレアチニン濃度の算出は、精製水および5mg/dLクレアチニン水溶液の吸光度より算出して求めた。

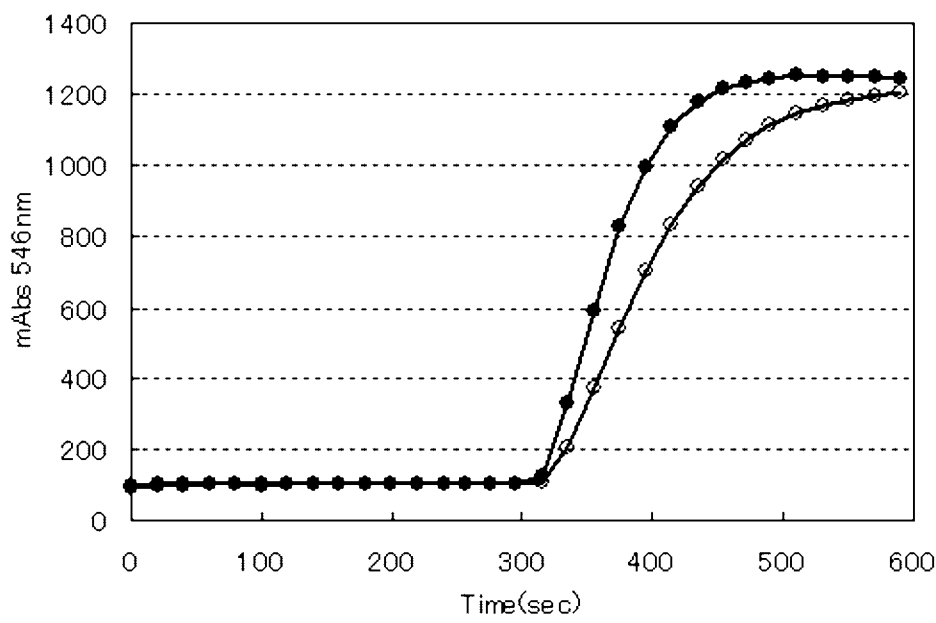
産業上の利用可能性

[0099] 本発明によれば、基質との親和性が向上したクレアチニンアミドヒドロラーゼを得ることができる。このクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体は、クレアチニン測定試薬に利用できる。また、本発明により、クレアチニンの定量において、使用酵素量を従来の1/4に減らすことができ、また従来と同等の使用量であれば反応がエンドポイントに達する時間が短いため、測定時間を短縮でき処理検体数を増加させることができる。

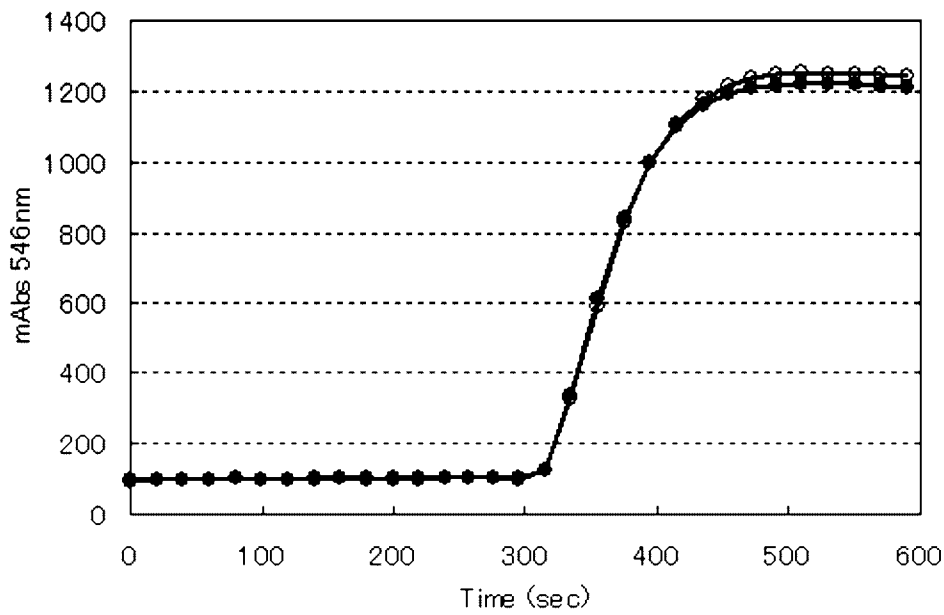
請求の範囲

- [1] 配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の44位、122位、179位、180位、181位またはそれらと同等の位置からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。
- [2] 配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の179位またはそれと同等の位置のグリシンがセリンに置換されている請求項1に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。
- [3] 配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の179位またはそれと同等の位置のグリシンがアラニンに置換されている請求項1に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。
- [4] 配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列の180位またはそれと同等の位置のグリシンがアラニンに置換されている請求項1に記載のクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体。
- [5] 請求項1～4のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体をコードする遺伝子。
- [6] 請求項5に記載の遺伝子を含むベクター。
- [7] 請求項6に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
- [8] 請求項7に記載の形質転換体を培養し、該培養物からクレアチニンアミドヒドロラーゼを採取するクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体の製造法。
- [9] 請求項1～4のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を含むクレアチニン測定用試薬。
- [10] 請求項1～4のいずれか1項に記載されるクレアチニンアミドヒドロラーゼ改変体を用いるクレアチニン測定方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/78(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/78, C12N15/09, C12Q1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JDream2), JMEDPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 3-19690 A (Toyobo Co., Ltd.), 28 January, 1991 (28.01.91), & EP 0402929 A1 & US 5627065 A	1,5-10/2-4
X/A	YAMAMOTO, K., et al., Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from <i>Pseudomonas</i> sp. PS-7, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1995, vol.59, no.7, p.1331-1332	1,5-10/2-4
A	JP 2003-180352 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 02 July, 2003 (02.07.03), & EP 1298213 A1 & US 2003/0119084 A1	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 July, 2007 (05.07.07)

Date of mailing of the international search report
17 July, 2007 (17.07.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, C12N9/78(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/34(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/78, C12N15/09, C12Q1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

MEDLINE(STN)、BIOSIS/WPI(DIALOG)、JSTPlus(JDream2)、JMEDPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	JP 3-19690 A （東洋紡績株式会社） 1991.01.28 & EP 0402929 A1 & US 5627065 A	1, 5-10/ 2-4
X/ A	YAMAMOTO, K., et al., Cloning of the creatinine amidohydrolase gene from <i>Pseudomonas</i> sp. PS-7, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1995, vol.59, no.7, p.1331-1332	1, 5-10/ 2-4

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 5 . 0 7 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 7 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

池上 文緒

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 7 6 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2003-180352 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2003.07.02 & EP 1298213 A1 & US 2003/0119084 A1	1-10