

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6863626号
(P6863626)

(45) 発行日 令和3年4月21日(2021.4.21)

(24) 登録日 令和3年4月5日(2021.4.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 24 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-534088 (P2019-534088)	(73) 特許権者	518230854
(86) (22) 出願日	平成29年12月22日 (2017.12.22)		シェンツェン ヘパリンク ファーマスー ティカル グループ カンパニー リミテ ッド
(65) 公表番号	特表2020-501585 (P2020-501585A)		SHENZHEN HEPALINK P HARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.
(43) 公表日	令和2年1月23日 (2020.1.23)		中華人民共和国, 広東 518057, シェンツェン, ナンシャン ディスト リクト, ソンピンシャン, ランシャン ロード 21
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/117986	(74) 代理人	100107456
(87) 国際公開番号	W02018/113775		弁理士 池田 成人
(87) 国際公開日	平成30年6月28日 (2018.6.28)	(74) 代理人	100162352
審査請求日	令和1年8月16日 (2019.8.16)		弁理士 酒巻 順一郎
(31) 優先権主張番号	201611195653.5		
(32) 優先日	平成28年12月22日 (2016.12.22)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		
微生物の受託番号	CCTCC CCTCC M 2017174		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘパリナーゼ産生シュードモナス・スタツェリ株及びそれから得られるヘパリナーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

寄託番号 CCTCC M 2017174 で中国典型培養物保蔵センター (CCTCC) に寄託されているシュードモナス・スタツェリ (Pseudomonas stutzeri) 株。

【請求項2】

請求項1に記載のシュードモナス・スタツェリ株を培養するステップと、前記シュードモナス・スタツェリ株の培養細胞を溶解するステップと、前記溶解物からヘパリナーゼを単離及び/又は精製するステップとを含む、ヘパリナーゼを生産する方法。

【請求項3】

- i) 分子量 74791 Da であること、
- ii) 等電点 7.77 であること、
- iii) 基質としてヘパリン (HEP) 及び HS (ヘパラン硫酸) を用いた HEP/HS 酵素活性比が 0.87 : 1 であること、
- iv) 基質として HEP を用いたミハエリス定数が 4.20 であること、
- v) 基質として HS を用いたミハエリス定数が 0.28 であること、並びに
- vi) HEP が基質として使用される場合、主要なヘパリン二糖類産物が IIS 及び IS であること

の特徴を有する、ヘパリナーゼ。

【請求項4】

i) 分子量 94716 Da であること、
 ii) 等電点 5.76 であること、
 iii) 基質としてヘパリン (HEP) 及び HS (ヘパラン硫酸) を用いた HEP/HS 酵素活性比が 1:4.3 であること、
 iv) 基質として HEP を用いたミハエリス定数が 0.09 であること、並びに
 v) 基質として HS を用いたミハエリス定数が 0.25 であること
の特徴を有する、ヘパリナーゼ。

【請求項 5】

a) 請求項 1 に記載のシュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

10

b) 緩衝液中にステップ a) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

c) 飽和度 20% ~ 100% の硫酸アンモニウムによりステップ b) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、前記緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップ c) の産物を、陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、ロード通過画分及び平衡化通過画分を採集し、前記緩衝液に対して採集した前記ロード通過画分及び前記平衡化通過画分を透析するステップと、

e) 陽イオン交換カラムにステップ d) の産物をロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集するステップと

20

を含む、ヘパリナーゼを生産する方法。

【請求項 6】

ステップ e) が、前記緩衝液に対して採集した前記溶出液を透析することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記方法が、前記ヘパリナーゼをさらに精製するために、ヘパリナーゼアフィニティークラムを使用する 1 つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含む、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が、

30

f) ヘパリナーゼアフィニティークラムにステップ e) の産物をロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、前記緩衝液に対して採集した前記溶出液を透析するステップをさらに含む、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 9】

a) 請求項 1 に記載のシュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

b) 緩衝液中にステップ a) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

40

c) 飽和度 20% ~ 100% の硫酸アンモニウムによりステップ b) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、前記緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップ c) の産物を陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集するステップと

を含む、ヘパリナーゼを生産する方法。

【請求項 10】

ステップ d) が、前記緩衝液に対して採集した前記溶出液を透析することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法が、前記ヘパリナーゼをさらに精製するために、ヘパリナーゼアフィニティークラム

50

カラムを使用する1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含む、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項12】

前記方法が、

e) ヘパリナーゼアフィニティークラムにステップd)の産物をロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ前記溶出液の画分を採集し、前記緩衝液に対して採集した前記溶出液を透析するステップと、

f) ヘパリナーゼアフィニティークラムにステップe)の産物をロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で、定組成溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集するステップと、

g) ヘパリナーゼアフィニティークラムにステップf)の産物をロードし、緩衝液で前記カラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、前記緩衝液に対して採集した前記溶出液を透析するステップと

をさらに含む、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項13】

配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、配列番号2に示されるアミノ酸配列と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むか、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、ヘパリナーゼ。

【請求項14】

配列番号2に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項13に記載のヘパリナーゼ。

【請求項15】

請求項13又は14に記載のヘパリナーゼをコードしているヌクレオチド配列、又は配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項16】

発現制御配列に作動可能に連結されている請求項15に記載のポリヌクレオチドを含む、発現構築物。

【請求項17】

請求項15に記載のポリヌクレオチドを含むか、又は請求項16に記載の発現構築物で形質転換されており、前記ヘパリナーゼを発現する能力がある、宿主細胞。

【請求項18】

請求項13又は14に記載のヘパリナーゼを生産する方法であって、

a) 前記ヘパリナーゼの発現を可能にする条件下で請求項17に記載の宿主細胞を培養するステップと、

b) ステップa)から得られた培養物から、前記宿主細胞によって発現されたヘパリナーゼを得るステップと

を含む、方法。

【請求項19】

c) ステップb)から得られたヘパリナーゼを精製するステップをさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

ヘパリンを、請求項1に記載のシュードモナス・スタツェリ株、請求項3、4、13及び14のいずれか一項に記載のヘパリナーゼ又は請求項17に記載の宿主細胞と接触させるステップを含む、低分子量ヘパリン若しくは超低分子量ヘパリンを生産する方法。

【請求項21】

前記陰イオン交換カラムが、Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL、及びQ-Sep

10

20

30

40

50

harose High Performanceカラムから選択され、前記陽イオン交換カラムがSP-Sephacryl Fast Flowカラムであり、前記塩化ナトリウム溶液が、0～0.5M塩化ナトリウム溶液である、請求項5に記載の方法。

【請求項22】

前記ヘパリナーゼアフィニティークラムが、Cellufine Sulfateカラム及びヘパリンコンジュゲートCNBr活性化型Sephacryl CL-4Bヘパリナーゼアフィニティークラムから選択され、ステップf)における前記塩化ナトリウム溶液が、0.15～0.6M塩化ナトリウム溶液である、請求項8に記載の方法。

【請求項23】

前記陰イオン交換カラムが、Q-Sephacryl Fast Flow、Q-Sephacryl Big Beads、Q-Sephacryl XL、及びQ-Sephacryl High Performanceカラムから選択され、前記塩化ナトリウム溶液が、0～0.5M塩化ナトリウム溶液である、請求項9に記載の方法。

10

【請求項24】

前記ヘパリナーゼアフィニティークラムが、Cellufine Sulfateカラム及びヘパリンコンジュゲートCNBr活性化型Sephacryl CL-4Bヘパリナーゼアフィニティークラムから選択され、ステップe)における塩化ナトリウム溶液が0.05～0.5M塩化ナトリウム溶液であり、ステップf)における塩化ナトリウム溶液が2.5M塩化ナトリウム溶液であり、ステップg)における塩化ナトリウム溶液が0～0.5M塩化ナトリウム溶液である、請求項12に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学の分野に関する。特に、本発明は、ヘパリナーゼ産生シュードモナス・スタツエリ (*Pseudomonas stutzeri*) 株及びそれから得られるヘパリナーゼに関する。さらに、本発明は、前記ヘパリナーゼの調製品及び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘパリナーゼとは、ヘパリン及びヘパリノイドの骨格においてグルコシド結合を特異的に壊すことができる酵素を指す。ヘパリナーゼは、例えば、血液から残留ヘパリンを除去する、低分子量ヘパリンを調製する、ヘパリン構造を研究する、又はヘパリンの品質試験を行う、等に広く使用されている。ヘパリナーゼは、フラボバクテリウム・ヘパリナム (*Flavobacterium heparinum*) から当初発見、単離され、いくつかの微生物及び動物組織においてその後見いだされた。文献には20種類以上のヘパリナーゼが報告されている。例えば、Yang V. C. は、フラボバクテリウム・ヘパリナムからヘパリナーゼI、II、IIIを見いだし; Robert W. Bellamyらは、細胞外に分泌されるヘパリナーゼをバチルス (*Bacillus*) BH100 (FERM BP-2613) から見いだし; Wan-Seok Kimらは、バクテロイデス・スターコリス (*Bacteroides stercoris*) HJ-15からヘパリンリアーゼを見いだした (*Carbohydrate Research*, 2012年、359:37~43頁)。中国特許出願第201410839278.8号は、スフィンゴバクテリウム・デジョネンス (*Sphingobacterium daejonesense*) の細菌から得た新規のヘパリナーゼSDhepI及びSDhepIIを開示した。中国特許出願第201510040524.8号は、クリセオバクテリウム・メニンゴセプティカム (*Chryseobacterium meningosepticum*) の細菌から得た新規のヘパリナーゼCMHEPIを開示した。上記ヘパリナーゼの全ては、各々異なるものである。

30

40

【0003】

最も広く研究され、広く使用されているヘパリナーゼは、フラボバクテリウム・ヘパリ

50

ナム由来のヘパリナーゼI、ヘパリナーゼII及びヘパリナーゼIIIであり、それぞれ、分子量約43、78、66kDa及び等電点およそ9.0を持つモノマータンパク質である。ヘパリナーゼの発見は、ヘパリンの構造研究及び品質試験の促進に重要な役割を演じてきた。フラボバクテリウム・ヘパリナムから産生されるヘパリナーゼI、II及びIIIは、ヘパリンの品質試験及び低分子量ヘパリンの生産に使用されてきた。

【0004】

天然から得られた様々なヘパリナーゼ産生微生物によって産生される様々なヘパリナーゼがあり、それを用いて様々な産物をヘパリンの酵素性分解によって得ることができる。調査及び産業における様々な要求を満たすために、新たなヘパリナーゼが、当業者において今なお必要とされている。

10

【発明の詳細な説明】

【0005】

第1の態様において、本発明は、寄託番号CCTCC M 2017174で中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)に寄託されているシュードモナス・スタツェリ株を提供する。

【0006】

この株は、本発明者らによって畑で単離されたシュードモナス・スタツェリ株であり、ヘパリン又はその誘導体を溶解する活性を有し、Z7と名づけられる。本発明者らは、その株から新規の2つの細胞内ヘパリナーゼPShepI及びPShepIIをさらに単離し、精製した。これら新規の2つのヘパリナーゼは、現在公知のヘパリナーゼと異なる物理化学的特性を有し、ヘパリンの酵素性分解の間に溶解部位に対して高い選択性を有し、その選択性は、ヘパリン産物の品質試験又は低分子量若しくは超低分子量ヘパリンの調製に使用され得る。

20

【0007】

したがって別の態様において、本発明は、Z7シュードモナス・スタツェリ株を用いてヘパリナーゼを生産する用途及び方法も包含する。例えば、Z7株からヘパリナーゼを生産する方法は、Z7シュードモナス・スタツェリ株を培養するステップと、シュードモナス・スタツェリ株の培養細胞を溶解するステップと、溶解物からヘパリナーゼを単離及び/又は精製するステップとを含んでもよい。培養は適切な条件下で実施されることが好ましい。例えば、Z7シュードモナス・スタツェリ株は約30の温度で培養されてもよい。一部の実施形態において、培養は発酵である。シュードモナス・スタツェリ株の適切な培養/発酵条件は、当業技術者によって直ちに決定され得る。溶解は、凍結融解溶解、超音波処理、高圧処理など細胞を破壊するための当業者に公知の様々な方法によって実施され得る。加えて、当業者は、分子量、等電点などヘパリナーゼの特定の特性にしたがって細胞溶解物からヘパリナーゼを単離及び/又は精製する適切な方法を選択することができる。例えば、特定のヘパリナーゼは、分子ふるい、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリナーゼアフィニティークロマトグラフィーなどによって単離及び/又は精製され得る。

30

【0008】

別の態様において、本発明は、シュードモナス・スタツェリ株、好ましくは本発明のZ7シュードモナス・スタツェリ株から得られるヘパリナーゼを提供する。ヘパリナーゼは、例えば、PShepI又はPShepIIである。

40

【0009】

一部の実施形態において、ヘパリナーゼ(PShepIなど)は、
 i) 分子量74791Daであること、
 ii) 等電点約7.77であること、
 iii) 基質としてヘパリン(HEP)及びHS(ヘパラン硫酸)をそれぞれ用いたHEP/HS酵素活性比が約0.87:1であること、
 iv) 基質としてHEPを用いたミハエリス定数が約4.20であること、
 v) 基質としてHSを用いたミハエリス定数が約0.28であること、

50

v i) H E P が基質として使用される場合、主要なヘパリン二糖類産物が I I S 及び I S であること

からなる群から選択される特徴の1つ又は複数を有する。

【0010】

一部の実施形態において、ヘパリナーゼ (P S h e p I など) は、例えば、

a) 本発明の Z 7 シュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

b) 緩衝液中にステップ a) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

c) 飽和度 20% ~ 100% の硫酸アンモニウムによりステップ b) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップ c) の産物を、Q - S e p h a r o s e F a s t F l o w、Q - S e p h a r o s e B i g B e a d s、Q - S e p h a r o s e X L 又は Q - S e p h a r o s e H i g h P e r f o r m a n c e カラムを含むがこれに限定されない陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液で平衡化し、ロード通過画分及び平衡化通過画分を採集し、緩衝液に対して採集したロード通過画分及び平衡化通過画分を透析するステップと、

e) S P - S e p h a r o s e F a s t F l o w カラムなどの陽イオン交換カラムにステップ d) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば 0 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと

を含む方法によって得ることができる。

【0011】

中国特許出願第 201110241260.4 号に記述される方法などヘパリナーゼの活性を測定する様々な方法が、当業者に公知である。したがって、本発明の方法において、ヘパリナーゼを調製する間クロマトグラフィーステップにおけるあらゆる画分のヘパリナーゼ活性を監視して、所望の画分を採集することができる。

【0012】

P S h e p I は、上記ステップ d) における陰イオン交換カラムによる粗分離後に P S h e p I I から分離され、ステップ e) のように、大量の望ましくないタンパク質が、陽イオン交換カラムによって除去され、得られた P S h e p I は、したがって精製されている。しかしながら、1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含めて、P S h e p I ヘパリナーゼをさらに精製してもよい。C e l l u f i n e S u l f a t e カラム又はヘパリンコンジュゲート C N B r 活性化型 S e p h a r o s e C L - 4 B ヘパリナーゼアフィニティークラムなどのヘパリナーゼアフィニティークラムを使用して1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップが実行される。

【0013】

例えば、いくつかの好ましい実施形態において、本方法は、

f) C e l l u f i n e S u l f a t e カラム又はヘパリンコンジュゲート C N B r 活性化型 S e p h a r o s e C L - 4 B ヘパリナーゼアフィニティークラムなどのヘパリナーゼアフィニティークラムにステップ e) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば 0.15 ~ 0.6 M 塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップをさらに含む。

【0014】

一部の実施形態において、本方法は、産物を濃縮するステップをさらに含む。

【0015】

一部の実施形態において、緩衝液はトリス - H C l 緩衝液である。一部の実施形態において、緩衝液は C a C l ₂ 含有トリス - H C l 緩衝液である。一部の実施形態において、

10

20

30

40

50

トリス - HCl の濃度は、約 10 mM ~ 約 50 mM、好ましくは約 25 mM である。一部の実施形態において、緩衝液中の $CaCl_2$ の濃度は、約 1 mM ~ 約 50 mM、好ましくは約 10 mM である。一部の実施形態において、緩衝液の pH は、約 7.0 ~ 約 7.5 の範囲、好ましくは約 7.0 である。一部の実施形態において、同じ緩衝液が、全てのステップにおいて使用される。

【0016】

他の実施形態において、ヘパリナーゼ (P Shep I I など) は、

i) 分子量 94716 Da であること、

ii) 等電点約 5.76 であること、

iii) 基質としてヘパリン (HEP) 及び HS (ヘパラン硫酸) をそれぞれ用いた HEP / HS 酵素活性比が約 1 : 4.3 であること、

iv) 基質として HEP を用いたミハエリス定数が約 0.09 であること、

v) 基質として HS を用いたミハエリス定数が約 0.25 であること

からなる群から選択される特徴の 1 つ又は複数を有する。

【0017】

一部の実施形態において、ヘパリナーゼ (P Shep I I など) は、例えば、

a) 本発明の Z7 シュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

b) 緩衝液中にステップ a) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

c) 飽和度 20% ~ 100% の硫酸アンモニウムによりステップ b) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップ c) の産物を、Q - Sepharose Fast Flow、Q - Sepharose Big Beads、Q - Sepharose XL 又は Q - Sepharose High Performance カラムを含むがこれに限定されない陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば 0 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと

を含む方法によって得ることができる。

【0018】

中国特許出願第 201110241260.4 号に記述される方法などヘパリナーゼの活性を測定する様々な方法が、当業者に公知である。したがって本発明の方法において、ヘパリナーゼを調製する間クロマトグラフィーステップにおけるあらゆる画分のヘパリナーゼ活性を監視して、所望の画分を採集することができる。

【0019】

上記ステップ d) における陰イオン交換カラムに対する粗分離後、P Shep I 及び P Shep I I は分離され、そうして得た P Shep I I はすでに精製されている。しかしながら、1 つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含めて、P Shep I I ヘパリナーゼをさらに精製してもよい。Cellufine Sulfate カラム又はヘパリンコンジュゲート CNBr 活性化型 Sepharose CL-4B ヘパリナーゼアフィニティークラムなどのヘパリナーゼアフィニティークラムを使用して 1 つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップが実行される。

【0020】

例えば、一部の好ましい実施形態において、本方法は、

e) ヘパリナーゼアフィニティークラム (Cellufine Sulfate カラムなど) にステップ d) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば 0.05 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと、

f) ヘパリナーゼアフィニティーカラム (例えば、Cellufine Sulfateカラム) にステップe) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば2.5 M塩化ナトリウム溶液) で、定組成溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集するステップと、

g) ヘパリナーゼアフィニティーカラム (Cellufine Sulfateカラムなど) にステップf) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば0~0.5 M塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと

をさらに含む。

10

【0021】

一部の実施形態において、本方法は、産物を濃縮するステップをさらに含む。

【0022】

一部の実施形態において、緩衝液はトリス-HCl緩衝液である。一部の実施形態において、緩衝液はCaCl₂含有トリス-HCl緩衝液である。一部の実施形態において、トリス-HClの濃度は、約10 mM~約50 mM、好ましくは約25 mMである。一部の実施形態において、緩衝液中のCaCl₂の濃度は、約1 mM~約50 mM、好ましくは約10 mMである。一部の実施形態において、緩衝液のpHは、約7.0~約7.5の範囲、好ましくは約7.0である。一部の実施形態において、同じ緩衝液が、全てのステップにおいて使用される。

20

【0023】

別の態様において、本発明は、ヘパリナーゼ (P Shep I など) を生産する方法を提供し、方法は、

a) 本発明のシュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

b) 緩衝液中にステップa) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

c) 飽和度20%~100%の硫酸アンモニウムによりステップb) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップc) の産物を、Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose Big Beads、Q-Sepharose XL又はQ-Sepharose High Performanceカラムなどの陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、ロード通過画分及び平衡化通過画分を採集し、緩衝液に対して採集したロード通過画分及び平衡化通過画分を透析するステップと、

30

e) SP-Sepharose Fast Flowカラムなどの陽イオン交換カラムにステップd) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液 (例えば0~0.5 M塩化ナトリウム溶液) で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと

を含む。

40

【0024】

一部の実施形態において、本方法は、ヘパリナーゼをさらに精製するために、1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含み、1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップは、Cellufine Sulfateカラム又はヘパリンコンジュゲートCNBr活性化型Sepharose CL-4Bヘパリナーゼアフィニティークラムなどのヘパリナーゼアフィニティークラムを使用する。

【0025】

一部の実施形態において、本方法は、

f) Cellufine Sulfateカラム又はヘパリンコンジュゲートCNBr活性化型Sepharose CL-4Bヘパリナーゼアフィニティークラムなどのヘパ

50

リナーゼアフィニティーカラムにステップ e) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液（例えば 0.15 ~ 0.6 M 塩化ナトリウム溶液）で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップをさらに含む。

【0026】

一部の実施形態において、本方法は、産物を濃縮するステップをさらに含む。

【0027】

さらに別の態様において、本発明は、ヘパリナーゼ (P S h e p I I など) を生産する方法を提供し、方法は、

a) 本発明のシュードモナス・スタッツェリ株を培養し、培養した細菌細胞を採集するステップと、

b) 緩衝液中にステップ a) で得られた細胞を再懸濁し、溶解し、遠心分離後に上清を採集するステップと、

c) 飽和度 20% ~ 100% の硫酸アンモニウムによりステップ b) で得られた上清を沈殿させ、得られた沈殿物を緩衝液に溶解し、緩衝液に対して透析するステップと、

d) ステップ c) の産物を、Q - S e p h a r o s e F a s t F l o w、Q - S e p h a r o s e B i g B e a d s、Q - S e p h a r o s e X L 又は Q - S e p h a r o s e H i g h P e r f o r m a n c e カラムなどの陰イオン交換カラムにロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液（例えば 0 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液）で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップとを含む。

【0028】

一部の実施形態において、本方法は、ヘパリナーゼをさらに精製するために、1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップをさらに含み、1つ又は複数のアフィニティークロマトグラフィーステップは、C e l l u f i n e S u l f a t e カラム又はヘパリンコンジュゲート C N B r 活性化型 S e p h a r o s e C L - 4 B ヘパリナーゼアフィニティーカラムなどのヘパリナーゼアフィニティーカラムを使用する。

【0029】

一部の実施形態において、本方法は、

e) ヘパリナーゼアフィニティーカラム (C e l l u f i n e S u l f a t e カラムなど) にステップ d) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液（例えば 0.05 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液）で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップと、

f) ヘパリナーゼアフィニティーカラム（例えば、C e l l u f i n e S u l f a t e カラム）にステップ e) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液（例えば 2.5 M 塩化ナトリウム溶液）で、定組成溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集するステップと、

g) ヘパリナーゼアフィニティーカラム (C e l l u f i n e S u l f a t e カラムなど) にステップ f) の産物をロードし、緩衝液でカラムを平衡化し、同じ緩衝液に基づく塩化ナトリウム溶液（例えば 0 ~ 0.5 M 塩化ナトリウム溶液）で直線勾配溶出を実行し、ヘパリナーゼ活性を持つ溶出液の画分を採集し、任意選択で緩衝液に対して採集した溶出液を透析するステップとをさらに含む。

【0030】

一部の実施形態において、本方法は、産物を濃縮するステップをさらに含む。

【0031】

本発明のヘパリナーゼを生産する上記方法の一部の実施形態において、緩衝液はトリス - H C l 緩衝液である。一部の実施形態において、緩衝液は C a C l ₂ 含有トリス - H C

10

20

30

40

50

1 緩衝液である。一部の実施形態において、トリス - H C l の濃度は、約 1 0 m M ~ 約 5 0 m M、好ましくは約 2 5 m M である。一部の実施形態において、緩衝液中の C a C l₂ の濃度は、約 1 m M ~ 約 5 0 m M、好ましくは約 1 0 m M である。一部の実施形態において、緩衝液の p H は、約 7 . 0 ~ 約 7 . 5 の範囲、好ましくは約 7 . 0 である。一部の実施形態において、同じ緩衝液が、全てのステップにおいて使用される。

【 0 0 3 2 】

本発明者らは、P S h e p I の配列をさらに同定し、そのアミノ酸配列は配列番号 2 に示され、そのコーディングヌクレオチド配列は配列番号 1 に示される。

【 0 0 3 3 】

したがって、別の態様において、本発明は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 9 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と比較して 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 1 0 個のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むヘパリナーゼをさらに提供する。ヘパリナーゼは、P S h e p I の活性を保持する又は実質的に保持することが好ましい。一部の実施形態において、ヘパリナーゼは、シュードモナス・スタツェリから得られる、又は由来する、又は単離される。一部の実施形態において、ヘパリナーゼは組換えにより生産される、すなわち、ヘパリナーゼは組換えヘパリナーゼである。ヘパリナーゼの組換え生産の方法は、以下でさらに記述される。

【 0 0 3 4 】

用語「含む」が、タンパク質又は核酸の配列を記述するために本明細書において使用される場合、タンパク質又は核酸は配列からなってもよく、又はタンパク質又は核酸の一方又は両方の端で追加のアミノ酸又はヌクレオチドを有してもよいが、本明細書に記述される活性を依然として有する。

【 0 0 3 5 】

一部の実施形態において、本発明のヘパリナーゼは、追加のリンカーを含んでも又は別のタグタンパク質に融合されてもよい。そのようなリンカー及び/又はタグは、対象の宿主細胞における本発明のヘパリナーゼの産生を容易にし、発現量を増大させ、又は可溶性発現を増大させ、ヘパリナーゼの単離及び精製を容易にし得るが、ヘパリナーゼの活性に実質的に影響を及ぼさない。そのような様々なリンカー及び/又はタグが、当業者に公知である。適切なリンカー及び/又はタグには、例えば、6 × H i s、G S T (グルタチオントランスフェラーゼ)、M B P (マルトース結合タンパク質) などがある。適切なリンカー及び/又はタグは、適切な商業的発現ベクターを選択することによって一般に入手することができる。

【 0 0 3 6 】

ペプチド又はタンパク質における適切な保存的アミノ酸置換は当業技術者に公知であり、得られる分子の生物活性を改変することなく一般に実施することができる。一般に、当業者は、ポリペプチドの非必須領域における 1 つのアミノ酸置換が、生物活性を実質的に改変しないことを認識することになる (例えば、W a t o s o n ら、M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e G e n e、第 4 版、1 9 8 7 年、T h e B e n j a m i n / C u m m i n g s P u b C o .、2 2 4 頁を参照のこと)。

【 0 0 3 7 】

配列「同一性」は、当業者に周知の意味を有し、2 つの核酸若しくはポリペプチド分子又は領域間の配列同一性のパーセンテージは、開示されている技術を使用して算出することができる。配列同一性は、ポリヌクレオチド若しくはポリペプチドの全長に沿って又は分子の領域に沿って測定され得る。(例えば: C o m p u t a t i o n a l M o l e c u l a r B i o l o g y、L e s k, A . M . 編、O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s、N e w Y o r k、1 9 8 8 年; B i o c o m p u t i n g : I n f o r m a t i c s a n d G e n o m e P r o j e c t s、S m i t h, D . W . 編、

10

20

30

40

50

Academic Press、New York、1993年；Computer Analysis of Sequence Data、第I部、Griffin, A. M. 及びGriffin, H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G. Academic Press、1987年；及びSequence Analysis Primer、Gribskov, M. 及びDevereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991年を参照のこと）。2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド間の同一性を測定する方法は多く存在するが、用語「同一性」は、当業者に周知である（Carrillo, H. 及びLipman, D. SIAM J Applied Math 48:1073 頁[1988年]）。

10

【0038】

別の態様において、本発明は、上述した本発明のヘパリナーゼをコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0039】

本明細書で使用される、「ポリヌクレオチド」とは、3' - 5' リン酸ジエステル結合によって接続された複数のヌクレオチドの巨大分子を指し、ヌクレオチドは、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドの配列は、大腸菌（E. coli）など異なる宿主細胞用にコドン最適化されて、ヘパリナーゼの発現を改善されてもよい。コドン最適化を実行する方法は、当業者に公知である。

20

【0040】

この態様の一部の特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含む。

【0041】

別の態様において、本発明は、発現制御配列に作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含む発現構築物を提供する。

【0042】

本発明の発現構築物において、本発明のヘパリナーゼをコードしているポリヌクレオチドの配列は、宿主細胞におけるヘパリナーゼの所望の転写及び産生を可能にするように発現制御配列に作動可能に連結されている。適切な発現制御配列には、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合部位などのリボソーム動作部位、ポリアデニル化部位、転写スプライシング配列、転写終結配列及びmRNA安定化配列などがあるが、これに限定されない。

30

【0043】

本明細書で使用される、用語「作動可能に連結される」とは、対象のヌクレオチド配列の転写を転写制御配列によって制御及び調節する目的で対象のヌクレオチド配列に制御配列を取り付けることを指す。対象のヌクレオチド配列に発現制御配列を作動可能に連結する技術は、当業者に公知である。

【0044】

本発明の発現構築物に使用するベクターには、プラスミドベクターなど宿主細胞において独立して複製するベクター；さらに、宿主細胞のDNAに組み込まれ、宿主細胞のDNAと共に複製する能力があるベクターがある。本発明に適切なベクターが多く市販されている。特定の実施形態において、本発明の発現構築物は、Novagen社製pET30aから得られる。特定の実施形態において、本発明の発現構築物は、Novagen社製pET28aから得られる。

40

【0045】

別の態様において、本発明は、本発明のヘパリナーゼをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む又はそのポリヌクレオチドを含む発現構築物で形質転換された宿主細胞を提供し、宿主細胞は本発明のヘパリナーゼを発現する能力がある。宿主細胞は組換え宿主細胞であることが好ましい。

50

【 0 0 4 6 】

本発明のヘパリナーゼを発現するための宿主細胞には、原核生物、酵母及び高等真核生物がある。典型的な原核生物の宿主には、エシェリキア属、バチルス属、サルモネラ属、及びシュードモナス属及びストレプトマイセス属の細菌がある。好ましい実施形態において、宿主細胞はエシェリキア属、好ましくは大腸菌の細胞である。本発明の特定の実施形態において、使用される宿主細胞は、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 株の細胞である。

【 0 0 4 7 】

本発明の組換え発現構築物は、熱ショックトランスフォーメーション、エレクトロポレーション、D E A E デキストラントランスフェクション、顕微鏡下注射、脂質体媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プロトプラスト融合、微粒子銃、ウイルス

10

【 0 0 4 8 】

別の態様において、本発明は、

- a) ヘパリナーゼの発現を可能にする条件下で本発明の宿主細胞を培養するステップと、
- b) ステップ a) から得られた培養物から、宿主細胞によって発現されたヘパリナーゼを得るステップと、
- c) 任意選択で、ステップ b) から得られたヘパリナーゼをさらに精製するステップとを含む、ヘパリナーゼを組換えにより生産する方法を提供する。

20

【 0 0 4 9 】

さらに別の態様において、本発明は、低分子量ヘパリン又は超低分子量ヘパリンを生産すること、又はヘパリン、低分子ヘパリン又は超低分子量ヘパリンの品質を試験することにおける、本発明のシュードモナス・スタッツェリ株、本発明のヘパリナーゼ又は本発明の宿主細胞の使用を提供する。

【 0 0 5 0 】

さらに別の態様において、本発明は、ヘパリンを、本発明のシュードモナス・スタッツェリ株、本発明のヘパリナーゼ又は本発明の宿主細胞と接触させるステップを含む、低分子量ヘパリン若しくは超低分子量ヘパリンを生産する方法を提供する。

【 図面の簡単な説明 】

30

【 0 0 5 1 】

【 図 1 】 精製した P S h e p I、P S h e p I I の S D S - P A G E 画像を示す図である
 【 図 2 】 P S h e p I による H E P の酵素性分解産物の液体クロマトグラフィー画像である。

【 実施例 】

【 0 0 5 2 】

本発明は、例によって以下でさらに記述されるが、その例に限定されることを目的としない。

【 0 0 5 3 】

本出願の例において、ヘパリン (H E P) 及びヘパリン硫酸 (H S) の酵素活性は、中国特許出願第 2 0 1 1 1 0 2 4 1 2 6 0 . 4 号を参照することにより決定される。タンパク質含有量及び酵素純度を決定する方法は、C a r b o h y d r a t e R e s e a r c h、2 0 1 2 年、3 5 9 : 3 7 ~ 4 3 頁に記述されている。

40

【 0 0 5 4 】

デスルフラナーゼを検出する方法：1 m g / m l I - S 1 0 μ l と反応させるために 5 2 m I U ヘパリナーゼを使用し、2 5 m M トリス - H C l (1 0 m M C a C l 2、p H 7 . 0 を含有する) 緩衝液を添加して反応系を 2 0 0 μ l にした。反応を、室温で 2 4 時間実行し、ヘパリナーゼを 1 0 0 水浴中で 5 分間煮沸することによって不活性化し、H P L C - S A X カラムにロードして、I I - S 及び I - S の相対的パーセンテージを決定した。

50

【0055】

実施例1：新たなシュードモナス・スタッツェリ株の単離及び同定
ヘパリナーゼ産生株のスクリーニング

土壌サンプルを、中湖北省雲夢県城関鎮の西部から採集し；ヘパリンを精製水に溶解し（8 g / L 以下）、各土壌サンプルに注いで、各土壌サンプルを保湿した。サンプルを、2 週間に1回そのように処理し（頻度は、土壌サンプルの乾燥によって決めた）、35 ~ 40 日間培養した。スプーン2杯の土壌サンプルを、秤量スプーンで取り、加圧殺菌した精製水に添加し、シェーカー中で、30 で2 ~ 3 時間振盪して（150 rpm）、土壌サンプルを精製水中に均一に分布させた。溶解した土壌サンプルを含む精製水20 ml を、加圧殺菌した種培養培地200 ml にピペットで移し、シェーカー中で、30 で16 10 時間振盪し（150 rpm）、次いで細菌液体2.5 ml を4 ml 石英キュベットにピペットで移してOD600 を試験し、それにより株の増殖を決定した。前のステップにおいて株のOD600 が2.4 より大きい場合、次いで、細菌液体20 ml を、加圧殺菌した発酵培地200 ml にピペットで移し、シェーカー中で、30 で24 時間振盪し（150 rpm）、次いで細菌液体3 ml をサンプルとしてピペットで取った。

【0056】

細菌液体2.5 ml を、細菌液体サンプル3 ml からピペットで取り、4 ml 石英キュベットに添加してOD600 を検出し、それにより株の増殖を決定した。株のOD600 が2.0 より大きい場合、そのことは、株が発酵培地中でよく増殖したことを意味する。同時に、残りの細菌液体0.5 ml を遠心分離して（4、5000 g、5 分間）上清を 20 得、次いで上清を超純水で10 倍に希釈して使用した。ヘパリンを超純水に溶解して、0.1 mg / ml、0.2 mg / ml、0.3 mg / ml、0.4 mg / ml、0.5 mg / ml、0.6 mg / ml、0.7 mg / ml、0.8 mg / ml に希釈した。Azur e A 溶液（20 mg / L）2.5 ml 及びヘパリン水溶液25 µ l をキュベットに添加し、混合して、620 nm で吸収値を検出し、次いで標準曲線をプロットした。その後、希釈した株上清の吸収値を620 nm で同様に検出し、ヘパリン濃度を算出した。ヘパリン濃度が5.5 g / L 未満の場合、細菌液体は、ヘパリンを消費できる株を含有すると見なす（ヘパリナーゼ産生）。5.5 g / L 未満のヘパリン濃度をもたらした細菌液体を希釈し、平板培養し（10 e - 6、10 e - 7、10 e - 8、10 e - 9）、約3 ~ 4 日後にコロニー又は微生物集団を固形培地表面上で観察した。複数のコロニーを、前ステップ 30 における培地表面から拾って、プレート画線を実施し、培養2 ~ 3 日後に比較的純粋な単一コロニーを選択した。

【0057】

プレート画線により得たコロニーをこすり取り、種培地に添加し、16 時間培養し、次いで発酵培地に約24 時間移した（10 % 接種原）。サンプルを発酵培地から取り出し、そのヘパリン消費を、上述したステップを参照して検出した。ヘパリンの消費が、なお5.5 g / L 未満の場合、純粋な単一コロニーが得られるまで、次いで希釈、コーティング及びプレート画線のステップを繰り返して、株をさらに精製した。コロニーの純度によって、再スクリーニングを数回実施することもできる。この実験では、所望の活性を持つ土壌サンプル全てを3 回スクリーニングした。 40

【0058】

単一コロニーを斜面培地に画線し、液体培地中で貯蔵した。画線した斜面培地を、低温庫に貯蔵し、培養した細菌液体を50 % グリセリン中に貯蔵し、-20 で冷凍庫に貯蔵した。

【0059】

ヘパリナーゼ産生株の同定

ヘパリナーゼ産生株を、純粋な単一コロニーに精製し、次いでGuangdong Provincial Microbial Analysis and Testing Center に送付して、同定した。

【0060】

細菌顕微鏡観察、物理化学的特性分析及び16S rDNA配列整列化によって、本発明者らが、ヘパリナーゼを産生できるシュードモナス・スタツェリ株をスクリーニングしたことが確認され、その株をZ7と名づけた。株を、ブタペスト条約に基づき2017年4月10日に寄託番号CCTCC M 2017174で中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)(武漢大学、中国武漢市、430072)に寄託した。

【0061】

シュードモナス・スタツェリは、ヒトに対して基本的に非病原性であり、カラゲーンを分解できることが公知である。その細菌は、下水処理及び土壌汚物処理に有効な細菌であり、金属を腐食する能力を持つ脱窒細菌である。しかしながら、シュードモナス・スタツェリがヘパリナーゼを産生する能力について報告は全くなかった。

10

【0062】

Z7株のヘパリナーゼ活性の同定

所望の酵素活性を持つ同定されたZ7株を発酵し、HEP及びHSに対する活性を細胞破碎後に測定した(発酵細胞1L)。結果を、表1に示す。

【表1】

表1. Z7株の発酵及び細胞破碎後に測定されるHEP及びHS活性

HEP酵素活性(IU/L)	HS酵素活性(IU/L)
592.2	602.1

20

【0063】

実施例2：Z7株由来ヘパリナーゼの調製及び活性決定

培地の調製：

種培地の配合：牛肉エキス5g/L、ペプトン10g/L、酵母粉末5g/L、塩化ナトリウム5g/L、pH7.0；発酵培地の配合：ヘパリン8g/L、ペプトン2g/L、リン酸二水素カリウム2.5g/L、硫酸アンモニウム1g/L、硫酸マグネシウム0.5g/L、塩化ナトリウム5g/L、pH7.0；固形培地は、発酵培地に寒天粉末20g/Lを添加することによって調製する。

【0064】

株の発酵及び粗酵素溶液の調製：

Z7シュードモナス・スタツェリ株を、細菌を2環こすり取ることによりプレート又は斜面から種培養培地に植菌した。培養16時間後に、種を、15%植菌量で二次液体種培養培地に添加し、1日間培養し、次いで20%植菌量で発酵培地2Lに植菌し、1日間培養した。細菌細胞を、3800rpm、4、45分間の遠心分離により採集し、次いで沈殿物を25mMトリス-HCl緩衝液(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)に懸濁し、高圧ホモジナイザーにより4、800パールで3~4サイクル溶解し、30分間遠心分離した(12000rpm、4)。上清を、氷浴中で硫酸アンモニウムにより沈殿させ、硫酸アンモニウム飽和度20%~100%における沈殿物を採集し、トリス-HCl緩衝液100mlに溶解し、同じ緩衝液に対して終夜透析した。

30

【0065】

調製方法I

Q-Sepharose Fast Flowカラム分離：前ステップ後の透析した粗酵素溶液を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した2.5x30cm Qカラムにロードした。カラムを、同じ緩衝液3カラム容積で平衡化し、0~0.5M塩化ナトリウムを含有する緩衝液の直線勾配で溶出した。所望の活性を持つピークが1つ得られ、PShepIIと呼んだ。ロード通過画分及び平衡化通過画分を検出し、ヘパリナーゼ活性を有することを見だし、この部分の酵素溶液をPShepIと名づけた。PShepI及びPShepII画分を採集し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液2Lに対して終夜透析した。

40

50

【0066】

Cellufine SulfateカラムIによるP Shep Iの精製：透析したP Shep I含有酵素溶液を、CSカラム(2.5×30cm)に適用し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液3カラム容積で平衡化した。カラムを、0~1M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の勾配で次いで溶出した。酵素活性を持つ画分を検出し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液2Lに対して終夜透析した。

【0067】

Cellufine SulfateカラムIIによるP Shep Iの精製：前ステップ後の透析した酵素溶液を取り出し、同じサイズの十分に平衡化したCSカラムにロードした。カラムを、0.15M塩化ナトリウムを含有する25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液3カラム容積で平衡化し、0.15~0.6M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の勾配で次いで溶出した。酵素活性を持つ画分を検出し、終夜透析した。

10

【0068】

SPカラムによるP Shep Iの精製：前ステップ後の透析した酵素溶液を、十分に平衡化したSPカラム(仕様：2.5×30cm)にロードした。カラムを、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液3カラム容積で次いで平衡化し、0~0.5M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の勾配で次いで溶出した。ヘパリナーゼ活性を検出した。炭水化物鎖から硫酸を除去し得る望ましくない酵素の検出を、酵素活性を持つ単一画分に対して実施し、そのような反応が全くなく、ヘパリン処理後に1%未満のIIS含有量である画分を採集し、その画分は、不純物バンドを基本的に全く有さない。最終的に、産物を30K限外濾過遠心管中で濃縮した。濃縮した酵素は、高純度のP Shep I酵素である。濃縮した酵素を、対応する緩衝液で0.5mlにし、比1:1でグリセロールと混合し、-20℃で冷凍庫に貯蔵した。

20

【0069】

Cellufine SulfateカラムIを用いる勾配溶出によるP Shep IIの精製：透析したP Shep II画分を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した2.5×30cm CSカラムにロードした。カラムを、0.05M塩化ナトリウムを含有する緩衝液3カラム容積で平衡化し、0.05~0.5M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の直線勾配で次いで溶出した。酵素活性を持つ画分を採集し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液2Lを使用して終夜透析した。

30

【0070】

Cellufine SulfateカラムIIを用いる定組成溶出によるP Shep IIの精製：前ステップ後の透析したP Shep II画分を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した2.5×30cm CSカラムにロードした。カラムを、同じ緩衝液3カラム容積で、次いで平衡化した。酵素活性を持つ画分を、0.25M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液で定組成溶出によって次いで採集した。

40

【0071】

Cellufine SulfateカラムIIIによるP Shep IIの濃縮：前ステップにおける定組成溶出後の活性P Shep II画分を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液1容積に添加し、平衡化した2.5×30cm CSカラムにロードした。カラムを、同じ緩衝液3カラム容積で平衡化し、0~0.5M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の勾配で次いで溶出した。酵素活性を持つ画分を、炭水化物鎖から硫酸を除去し得る望ましくない酵素の検出に、別々に供した。望ましくない酵素反応が全くなく、ヘパリン処理後に1%未満のIIS含有量である画分を採集し、その画分は、高純度の新たな酵素P Shep IIである。SDS-PAGEを実行して、その画分が不純物バンドを基本的に含まないことを確認した。高純度P Sh

50

e p I I を、30KD 限外濾過遠心管を使用して濃縮し、グリセロール1容積と混合し、
-20 で冷凍庫に貯蔵した。

【0072】

各ステップ後の P S h e p I 並びに P S h e p I I の酵素活性、タンパク質含有量、(比活性) 精製比及び(総活性) 収率を、それぞれ表2及び表3に示す。

【表2】

表2 方法IによるPShepl精製の各ステップの酵素活性及びタンパク質含有量

PShepl精製ステップ	総容積 (ml)	総タンパク質 (mg)	HEP 酵素活性 (IU/ml)	総活性 (IU)	比活性 (IU/mg)	精製比	収率 (%)
粗酵素	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫酸アンモニウム沈殿	415.00	144.93	0.51	211.60	1.46	1.54	96.13
Qカラム	75.00	10.53	0.76	56.00	5.32	5.60	25.44
CS-Iカラム	30.00	3.88	1.35	40.50	10.45	11.00	18.41
CS-IIカラム	45.00	2.18	0.65	29.00	13.31	30.53	13.17
SPカラム	1.00	0.50	12.80	12.80	25.60	26.95	5.81

10

20

【表3】

表3 方法IによるPSheplII精製の各ステップの酵素活性及びタンパク質含有量

PSheplII 精製比ステップ	総容積 (ml)	総タンパク質 (mg)	HEP 酵素活性 (IU/ml)	総活性 (IU)	比活性 (IU/mg)	精製比	収率 (%)
粗酵素	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫酸アンモニウム沈殿	415.00	144.93	0.51	211.6	1.46	1.54	96.13
Qカラム	99.00	18.11	0.45	40.00	2.21	2.33	18.17
CS-Iカラム	31.00	3.88	0.52	16.00	4.12	4.34	7.27
CS-IIカラム	22.00	1.94	0.64	14.00	7.20	7.58	6.36
セファデックスG-100	1.00	0.46	8.20	8.20	18.00	18.95	3.73

30

【0073】

調製方法 I I

Q - S e p h a r o s e F a s t F l o wカラム分離：上記硫酸アンモニウム沈殿によって調製した透析した粗酵素溶液を、25mM トリス - H C l (10mM C a C l₂、pH7.0を含有する) 緩衝液で平衡化した標準2.5×30cm Q - S e p h a r o s e F a s t F l o wカラムにロードし、カラムを、同じ緩衝液3カラム容積で平衡化した。同じ緩衝液中の0~1M塩化ナトリウムによる直線勾配溶出を実行した。酵素活性を持つ画分を検出し、P S h e p I I と標識し、採集し、25mM トリス - H C l (10mM C a C l₂、pH7.0を含有する) 緩衝液2Lで終夜透析した。ロード通過画分及び平衡化通過画分を検出し、酵素活性を持つ画分を採集し、P S h e p I と標識した。

40

【0074】

S PカラムによるP S h e p I の精製：前ステップで得られたP S h e p I 含有酵素溶液を、25mM トリス - H C l (10mM C a C l₂、pH7.0を含有する) 緩衝液で平衡化した2.5×30cm S P - S e p h a r o s e F a s t F l o wにロー

50

ドした。カラムを、同じ緩衝液3カラム容積で平衡化し、0～0.5M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の直線勾配で次いで溶出した。活性画分を採集し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液2Lに対して終夜透析した。

【0075】

Cellufine SulfateカラムによるPShepIの精製：前ステップで得られた酵素溶液を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した2.5×30cm Cellufine Sulfateカラムにロードし、カラムを、0.15M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液3カラム容積で次いで平衡化し、0.15～0.6M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の直線勾配

10

【0076】

Cellufine Sulfate-Iを用いる直線勾配溶出によるPShepIIの精製：Qカラムによって分離した透析した酵素溶液を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した標準2.5×30cm Cellufine Sulfateカラムにロードし、カラムを、0.05M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液で次いで平衡化し、0.05～0.5M塩化ナトリウムを含有する緩衝液で勾配溶出を得た。活性画分を採集し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液に対して終夜透析した。

20

【0077】

Cellulide Sulfate-IIカラムを用いる定組成溶出によるPShepIIの精製：これまでのステップからの透析した酵素溶液を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した標準2.5×30cm Cellufine Sulfateカラムに再びロードし、次いで、0.25M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液800mlで定組成的に溶出した。活性画分を、次いで採集した。

【0078】

Cellufine Sulfate-IIIカラム濃度：定組成溶出後に25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液1容積を活性PShepII溶液に添加し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で平衡化した2.5×30cm CSカラムにロードした。カラムを、同じ緩衝液で平衡化し、0～0.5M塩化ナトリウムを含有する同じ緩衝液の直線勾配

30

【0079】

精製過程の各ステップで得られた酵素活性及びタンパク質含有量を、以下の表4及び表5に示す：

【表 4】

表4 方法IIIにおけるPShepI精製の各ステップの酵素活性及びタンパク質含有量

PShepI精製ステップ	総容積 (ml)	総タンパク質 (mg)	HEP 酵素活性 (IU/ml)	総活性 (IU)	比活性 (IU/mg)	精製比	収率 (%)
粗酵素	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫酸アンモニウムの沈殿	415.00	144.93	0.51	211.60	1.46	1.54	96.13
Qカラム	115.08	41.66	1.18	135.80	3.26	3.43	61.69
SPカラム	54.00	9.49	1.91	103.14	10.87	11.44	46.86
CSカラム	1.00	1.35	57.70	57.70	42.70	44.95	26.21

10

【表 5】

表5 方法IIIにおけるPShepII精製の各ステップの酵素活性及びタンパク質含有量

PShepII精製比ステップ	総容積 (ml)	総タンパク質 (mg)	HEP 酵素活性 (IU/ml)	総活性 (IU)	比活性 (IU/mg)	精製比	収率 (%)
粗酵素	461.00	231.71	0.48	220.12	0.95	/	/
硫酸アンモニウムの沈殿	415.00	144.93	0.51	211.6	1.46	1.54	96.13
Qカラム	99.00	18.11	0.45	40.00	2.21	2.33	18.17
CS-Iカラム	31.00	3.88	0.52	16.00	4.12	4.34	7.27
CS-IIカラム	1.00	1.94	0.64	14.00	7.20	7.58	6.36

20

【0080】

実施例3：ヘパリナーゼPShepI及びPShepIIの特徴付け

SDS-PAGEで決定したPShepIの分子量は、およそ74700Daであった。MALDI-TOF-MS質量分析で決定したPShepIの正確な分子量は、74791Daであった。等電点電気泳動で決定したPShepIの等電点は、7.77であった。

30

【0081】

SDS-PAGEで決定したPShepIIの分子量は、約94000Daであり、MALDI-TOF-MS質量分析で決定した正確な分子量は、94716Daであった。等電点電気泳動で決定したPShepIIの等電点は、5.76であった。

【0082】

ヘパラン硫酸(HS)基質を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH 7.0を含有する)緩衝液に溶解して、1mg/mLの濃度でヘパラン硫酸溶液を調製した。ヘパラン硫酸基質の濃度をそれぞれ0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mg/mLに設定し、様々なヘパラン硫酸基質濃度での酵素の活性を測定して、ヘパラン硫酸について酵素のミハエリス定数を算出した。

40

【0083】

ヘパリン(HEP)基質を、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH 7.0を含有する)緩衝液に溶解して、1mg/mLの濃度でヘパリン溶液を調製した。ヘパリン基質の濃度をそれぞれ0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0mg/mLに設定し、様々なヘパリン基質濃度での酵素の活性を測定して、ヘパリンについて酵素のミハエリス定数を算出した。各条件下での酵素反応の初速度を異なる基質濃度で決定して、ミハエリス定数を決定した。

50

【0084】

HEP及びHSを基質として使用した場合、PShepIのミハエリス定数をそれぞれ4.20及び0.28と決定した。HEP及びHSを基質として使用した場合、PShepIIのミハエリス定数をそれぞれ0.09及び0.25と決定した。

【0085】

実施例4：PShepI及びPShepIIの基質特異性及び産物特異性

PShepIの基質特異性に関する研究：PShepIの活性を、基質としてヘパリン(HEP)、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸(CS)及びデルマタン硫酸(DS)をそれぞれ使用して決定した。PShepIは、CS及びDSを基質として使用した場合酵素活性を有さず、HEP及びHSを基質として使用した場合に酵素活性を有し、活性比がHEP：HS=約0.87：1であることが判明した。

10

【0086】

PShepIIの基質特異性に関する研究：PShepIIの活性を、基質としてヘパリン(HEP)、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸(CS)及びデルマタン硫酸(DS)をそれぞれ使用して決定した。PShepII酵素は、CS及びDSを基質として使用した場合酵素活性を有さず、HEP及びHSを基質として使用した場合に酵素活性を有し、活性比がHEP：HS=約1：4.3であることが判明した。

【0087】

HEPのPShepI酵素的加水分解に関する二糖類分析：PShepIの3IU(ヘパリンに基づく酵素活性)を、50mgヘパリンに添加し、25mMトリス-HCl(10mM CaCl₂、pH7.0を含有する)緩衝液で500μlにし、37℃で24時間酵素的加水分解し、次いで100℃水浴中に5分間置いて不活性化し、次いでサンプルの二糖類成分について液相分析を実施した。結果を、図2に示す。PShepIによるHEPの酵素的加水分解後、産物の主要な二糖類成分はIIS及びISであり、ISのピーク領域が67.92%を占めた。

20

【0088】

実施例5：ヘパリナーゼPShepIの配列決定

Z7シュードモナス・スタツェリ株のゲノムDNAを、キットの指示にしたがって「TIANamp Bacteria DNA Kit Bacterial Genomic DNA Extraction Kit」を使用することによって抽出した。その後、Z7シュードモナス・スタツェリ株の抽出したゲノムDNAを配列決定して、Z7シュードモナス・スタツェリ株のゲノム配列を得た。

30

【0089】

Z7シュードモナス・スタツェリから単離、精製したPShepI酵素を、Kumaran法(略してK法)によるゲル内消化に供し、その後MALDI分析して、ヘパリナーゼPShepIのペプチドスペクトルを得た。ペプチドスペクトルによって得られたタンパク質配列情報を、Z7株のゲノム配列から得られたORFと整列して、PShepIのコード配列(1971bp、配列番号1)及びアミノ酸配列(656アミノ酸残基、配列番号2)を最終的に得た。

【0090】

実施例6：PShepI操作した細菌の調製

PShepIの収率をさらに増大させるために(Z7株の酵素収率は、約150IU/Lであった)、発明者らは、大腸菌BL21(DE3)のcodon優先傾向にしたがってPShepIのコード配列にcodon最適化を実行し、PShepI酵素のN末端に6xHisタグを付加した。対応するコード配列を、pET-30aベクターにクローニングし、次いで大腸菌BL21(DE3)株に形質転換して操作した株を得た。操作した細菌を発酵して、最高約10000IU/L(Z7株の収率は、約150IU/Lであった)の収率で操作した酵素を得た。操作した酵素並びに野生型の酵素の232nm終点吸光度値、分子量、ヘパリンを加水分解する効力及び収率は、一致しており、したがって、操作した酵素及び野生型の酵素が、実質的に同じ特性を有することを確認した。

40

50

【図 1】

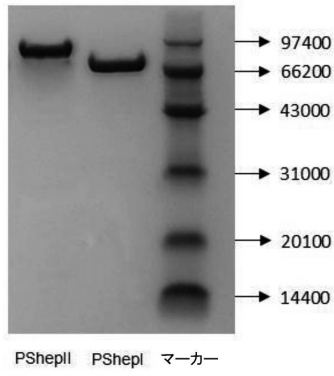


Figure 1

【図 2】

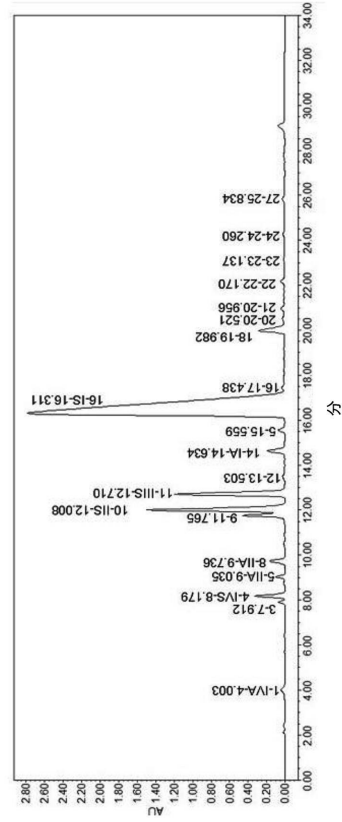


Figure 2

【配列表】

0006863626000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	19/04 (2006.01)	C 1 2 P	19/04 C

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 リ, リ

中華人民共和国, グアンドン 5 1 8 0 5 7, シェンツェン, ナンシャン ディストリクト, ソンピンシャン, ランシャン ロード 2 1

(72)発明者 バイ, ジアク

中華人民共和国, グアンドン 5 1 8 0 5 7, シェンツェン, ナンシャン ディストリクト, ソンピンシャン, ランシャン ロード 2 1

(72)発明者 ガオ, ジンリヤン

中華人民共和国, グアンドン 5 1 8 0 5 7, シェンツェン, ナンシャン ディストリクト, ソンピンシャン, ランシャン ロード 2 1

(72)発明者 マ, シャオライ

中華人民共和国, グアンドン 5 1 8 0 5 7, シェンツェン, ナンシャン ディストリクト, ソンピンシャン, ランシャン ロード 2 1

審査官 坂井田 京

(56)参考文献 中国特許出願公開第104593347(CN,A)

中国特許出願公開第104630197(CN,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 1 2 N 9 / 0 0

C 1 2 P 1 9 / 0 0

UniProt/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)