(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年3月3日(03.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/045151 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 21/00 (2006.01) *C12N 9/90* (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01) *C12P 21/06* (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/031039

(22) 国際出願日： 2021年8月24日(24.08.2021)

(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 2020-141053 2020年8月24日(24.08.2020) JP

(71) 出願人: 天野エンザイム株式会社 (**AMANO ENZYME INC.**) [JP/JP]; 〒4608630 愛知県名古屋市中区錦１丁目２番７号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 松原 寛敬 (**MATSUBARA, Hirotaka**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザー丁目６番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP). 酒井 杏匠 (**SAKAI, Kiyota**); 〒5090109 岐阜県各務原市テクノプラザー丁目６番 天野エンザイム株式会社 イノベーションセンター内 Gifu (JP).

(74) 代理人: 田中 順也，外 (**TANAKA, Junya** et al.); 〒5300005 大阪府大阪市北区中之島６－２－４０ 中之島インテス２１階 Osaka (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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2022/045151 A1

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING MODIFIED PROTEIN

(54) 発明の名称： 改変タンパク質の製造方法

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a new means capable of modifying a protein material. According to the present invention, a protein material can be modified by causing a peptidylprolyl isomerase, or a peptidylprolyl isomerase and a protein modification enzyme to act on the protein material.

(57) 要約：本発明は、タンパク質素材を改質できる新たな手段を提供することを課題とする。タンパク質素材に、ペプチジルプロリルイソメラーゼ、又は、ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素を作用させることにより、タンパク質素材を改質できる。

明　細　書

発明の名称 ： 改変タンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は改変タンパク質の製造方法及び改質されたタンパク質素材の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ペプチジルプロリルイソメラーゼ（以下、「PPIase」と略称することがある）はペプチド又はタンパク質中のプロリン（Pro）残基のN末端側のペプチド結合に作用し、シス・トランス異性化を触媒する。PPIaseは、タンパク質のフォールディングに関与する、所謂シャペロン機能を持つ（例えば非特許文献１を参照）。PPIaseのシャペロン機能は、例えば、宿主細胞での異種タンパク質の発現効率の向上に利用されている（例えば特許文献１～３を参照）。一方、免疫抑制物質のスクリーニングにもPPIaseが利用されている（例えば特許文献４を参照）。また、PPIaseによって酵素の熱安定性を向上できることが知られている（例えば特許文献５を参照）。非特許文献２には、キモトリプシンが合成基質（ペプチド）のトランス型にのみ作用することを利用したPPIase活性測定法が開示されている。

[0003] 一方、酵素によってタンパク質素材を改質させる研究が盛んに行われている。タンパク質素材の改質には、プロテアーゼなどによるタンパク質分解、プロテイングルタミナーゼなどによるタンパク質側鎖修飾、トランスグルタミナーゼ又はオキシダーゼによるタンパク質分子間架橋などの、タンパク質分子の分子変換反応が利用されており、このような分子変換反応が、タンパク素材の呈味性、物性、機能性（例えば、起泡性、乳化安定性、可溶性など）などの特性変化（つまり、改質）を可能にしている。このようなタンパク質素材の改質のより具体的な態様として、例えば、プロテアーゼによる食肉の軟化、トランスグルタミナーゼによる食肉の結着、及びプロテイングルタミナーゼによるタンパク質素材の可溶性向上などの技術が知られており、こ

のような技術により改質されたタンパク質素材が、新しいタンパク質素材として提供されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２００２－５２５１２０号公報

特許文献2：特開２００４－２１５５９１号公報

特許文献3：特開２００５－０４６０６６号公報

特許文献4：特開平２－１２４１００号公報

特許文献5：特開平１１－０７５８３７号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Biochim Biophys Acta. 2015 October ; 1850(10): 2017-2034.

非特許文献2：Biomed Biochim Acta 1984;43(10):1101-11.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 改質されたタンパク質素材は、特性が改良していたり、新たな機能が付与されていたりするため、様々な分野への応用が期待でき、その利用価値は高い。このような利用価値の高いタンパク質素材を提供するための、更なる手段に対するニーズは依然として高い。そこで本発明は、タンパク質素材を改質（加工）するための新たな手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、PPIaseが、それ自体、タンパク質素材の改質を可能にすることを見出した。PPIaseが異性化の反応を触媒することしか知られていないことに鑑みると、これまでタンパク質分子の分子変換反応を触媒する酵素によってなされてきたタンパク質素材の改質がPPIaseによって可能になることは予想外であった。さらに、PPIaseを、タンパク質分子の分子変換反応を触媒する酵素（以下において、「タンパク質改変酵素」とも記載する）と併用す

ることで、タンパク質改変酵素による反応効率を調節できることも見出した。以下の発明は主として上記知見に基づく。

[0008] ［１］　タンパク質に、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素とを作用させる工程を含む、改変タンパク質の製造方法。

［２］　前記タンパク質改変酵素を作用させる処理と前記ペプチジルプロリルイソメラーゼを作用させる処理とを同時に行う、［１］に記載の製造方法。

［３］　前記タンパク質改変酵素が、タンパク質分解酵素、タンパク質側鎖修飾酵素、及びタンパク質架橋酵素からなる群より選択される、［１］又は［２］に記載の製造方法。

［４］　前記タンパク質改変酵素が、プロテアーゼ、タンパク質脱アミド酵素、トランスグルタミナーゼ、及びタンパク質の架橋化を触媒する酸化還元酵素からなる群より選択される、［１］又は［２］に記載の製造方法。

［５］　前記タンパク質が、豆、穀物、ナッツ、及び種子に由来する植物タンパク質；乳タンパク質、卵タンパク質、血液タンパク質、筋肉タンパク質及び腱タンパク質；並びに、微生物、藻、及び昆虫に由来するタンパク質からなる群より選択される、［１］～［４］のいずれか一項に記載の製造方法。

［６］　タンパク質を含有する食品素材、医薬素材又は工業素材を、ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素で処理する工程を含む、改質されたタンパク質素材の製造方法。

［７］　前記タンパク質改変酵素による処理を前記ペプチジルプロリルイソメラーゼによる処理と同時に行う、［６］に記載の製造方法。

［８］　ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素を含有する、タンパク質改変用酵素剤。

［９］　前記タンパク質改変酵素が、タンパク質分解酵素、タンパク質側鎖修飾酵素、及びタンパク質架橋酵素からなる群より選択される、［８］に記載のタンパク質改変用酵素剤。

［１０］　タンパク質改変酵素が、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、タンパク質脱アミド酵素、トランスグルタミナーゼ、及びタンパク質の架橋化を触媒する酸化還元酵素からなる群より選択される、［８］に記載のタンパク質改変用酵素剤。

［１１］　タンパク質を含有する品素材、医薬素材又は工業素材をペプチジルプロリルイソメラーゼで処理する工程を含む、改質されたタンパク質素材の製造方法。

［１２］　ペプチジルプロリルイソメラーゼを含有する、タンパク質素材の改質用酵素剤。

発明の効果

[0009]　本発明によれば、タンパク質素材を改質できる新たな手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]上：大豆タンパク質の脱アミド化の評価。プロテイングルタミナーゼを反応させる際にPPIase（Cyclophilin A）を添加した場合（白抜きのバー）と添加しない場合（塗りつぶしのバー）の間で脱アミド化を比較した。下：小麦グルテンの脱アミド化の評価。プロテイングルタミナーゼを反応させる際にPPIase（Cyclophilin A）を添加した場合（白抜きのバー）と添加しない場合（塗りつぶしのバー）の間で脱アミド化を比較した。

[図2]小麦グルテン由来33merペプチドの分解後残存率。ペプシン単独で反応させた場合（塗りつぶしのバー。人工胃液の消化に相当する）と、ペプシンとPPIase（Cyclophilin A）を併用して反応させた場合（白抜きのバー）との間で33merペプチドの残存率（％）（ペプシン単独で反応させた場合の残存率を100％とした相対値）を比較した。

[図3]Streptomyces griseus由来PPIase（SgPPI）の性質を示す。

[図4]小麦グルテン、大豆タンパク質、エンドウ豆タンパク質、乳カゼイン、又は卵アルブミンに、SgPPIとプロテイングルタミナーゼとを併用して処理した場合の効果を示す。

[図5]SgPPIがプロテイングルタミナーゼ（PG）と併用される場合の、PGへの

影響の有無を確認した結果を示す。

[図6]乳カゼインにSgPPIとラッカーゼとを併用して処理した場合の効果を示す。

[図7]ひよこ豆タンパク質にPPIaseを単独で処理した場合の効果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本明細書においてタンパク質の「改変」（modification）とは、分解、合成、架橋等より分子変換すること、言い換えればタンパク質分子（「タンパク質基質」とも記載する）の構成原子の数及び／又は種類を変えるようにタンパク質の構造を変化させる加工を行うこと（従って、単なる異性化は含まれない）を指し、後述の「改質」に対して構造的改変（structural-modification）を意味する。また、タンパク質を含む素材（「タンパク質素材」とも記載する）に対してタンパク質の酵素処理を行うことでタンパク質の物性変化に基づきタンパク質素材の特性が変化するように加工することを、「改質」（property modification）と記載する。本発明において、タンパク質素材の「改質」は、タンパク質の「改変」に基づく作用効果と、ペプチジルプロリルイソメラーゼによるタンパク質の異性化に基づく作用効果と、それら両方の作用効果が相まって奏される作用効果を含む。

[0012] さらに、本発明における「タンパク質」は、複数のアミノ酸がペプチド結合した物質を広く包含する。従って、本発明における「タンパク質」には、アミノ酸残基１０個以下のオリゴペプチド、アミノ酸残基１０個超のポリペプチド、及びポリペプチドが三次元構造を形成したタンパク質のいずれも含まれる。

[0013] １．改変タンパク質の製造方法

本発明の第１の局面は改変タンパク質の製造方法に関する。本発明の改変タンパク質の製造方法は、タンパク質（以下「基質タンパク質」とも記載する）に、ペプチジルプロリルイソメラーゼ（PPIase）とタンパク質改変酵素とを作用させる工程を含むことを特徴とする。

[0014] タンパク質を、PPIaseとタンパク質改変酵素との両方の酵素を用いて処理

することで、タンパク質改変酵素によるタンパク質の改変反応の調節が可能になる。タンパク質の処理を当該調節は、典型例かつ好ましい例においては上方調節（反応の促進）であり、この場合、タンパク質改変酵素の反応を促進する。一方、当該調節は、下方調節（反応の抑制）であることも許容され、この場合、PPIaseとタンパク質改変酵素の反応を抑制する。このような下方調節の態様は、例えば、反応が進み過ぎるという問題（例えば、タンパク質改変酵素が架橋酵素であれば過架橋による食感等の悪化、タンパク質改変酵素が分解（切断）酵素であれば呈味性や物性の悪化など）がある場合に適用される。

[0015] １－１．タンパク質（基質タンパク質）

本発明で用いられるタンパク質（基質タンパク質）の起源に特段の制約はない。たとえば、本発明で用いられるタンパク質の一例である植物性タンパク質としては、大豆（Soy beans）、えんどう豆（Green peas）、レンズ豆（Lentils）、ひよこ豆（Chickpeas） 、黒豆（Black beans）等の豆；小麦、大麦、ライ麦、燕麦（Oat）、米などの穀物；アーモンド、ピーナッツ等のナッツ；大麻種子（Hemp）、チア種子（Chia）、キヌア（Quinoa）、アマランサス（Amaranthus）などの種子に由来するタンパク質が挙げられる。本発明で用いられるタンパク質の他の例である動物性タンパク質としては、カゼイン、β－ラクトグロブリンなどの乳タンパク質；オボアルブミンなどの卵タンパク質；血清アルブミンなどの血液タンパク質；ミオシン、アクチンなどの筋肉タンパク質；ゼラチン、コラーゲンなどの腱タンパク質が挙げられる。本発明で用いられるタンパク質のさらなる例である他のタンパク質としては、コオロギ、シルクなどの昆虫；酵母、糸状菌などの微生物、スピルリナなどの藻に由来するタンパク質が挙げられる。

[0016] 本発明において用いられるタンパク質の更に別の例としては、上記の天然タンパク質の他、当該天然タンパク質が、酸、アルカリなどにより化学的に部分分解を受けたタンパク質、当該天然タンパク質が、プロテアーゼなどにより酵素的に部分分解を受けたタンパク質、当該天然タンパク質が、各種試

薬により化学修飾を受けたタンパク質等の、予備改変タンパク質も挙げられる。

[0017] なお、本発明において処理対象となるタンパク質は、産業上有用であるタンパク質（つまり、本発明による処理により新たな特性が付与されることで有用性が高まるもの）だけでなく、産業上有用でないタンパク質（つまり、本発明による処理により当該タンパク質が持つ所望しない特性を低減又は消失させることにより、新たに有用性が付与されるもの）も含む。産業上有用でないタンパク質としては、各種アレルゲン（小麦、大麦、ライ麦、燕麦等の麦に含まれるグルテン等が挙げられる）、毒性ペプチド（例えば、グルテン分解物に含まれる33merグリアジンペプチド等が挙げられる）、外因性オピオイドペプチド（例えば、カゼイン分解物に含まれるカソモルフィン、グルテン分解物に含まれるグリアドルフィン等が挙げられる）等が挙げられる。

[0018] １－２．ペプチジルプロリルイソメラーゼ（PPIase）

PPIaseは、ペプチド又はタンパク質中のプロリン（Pro）残基のN末端側のペプチド結合に作用し、シス・トランス異性化を触媒する酵素である。換言すれば、PPIaseは、ペプチド又はタンパク質中のPro残基のN末端側のペプチド結合をシス/トランス型に変化させる活性（PPIase活性）を有する。本発明で用いられるPPIaseとしては、当該活性を有するポリペプチドである限り特に限定されない。従って、公式データベース上でPPIaseに分類されていなくとも、PPIase活性を有するポリペプチドは本発明で用いられるPPIaseに該当する。

[0019] PPIase活性の有無は、合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA(Suc-AAPF-pNA)にPPIaseとキモトリプシンを入れ、pNAの遊離を検出する方法；Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA、PPIase及びプロテアーゼを添加し、Abzの蛍光を検出する方法；FRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer：蛍光共鳴エネルギー移動）基質を用いた活性検出法などが挙げられ、これらの少なくともいずれかの方法によってPPIase活性が検出できれば、PPIase活性を有していると判断することができる。好ましくは、PPIase活性の有無は、上記の方法のうちpNAの遊

離を検出する方法によって確認することができる。なお、本発明において、PPIaseの活性の具体的な値については、pNAの遊離を検出する方法に基づいて測定されるものとする。

[0020] 本発明で用いられるPPIaseの由来は特に限定されず、原核生物、真核生物、アーキア（Biochim Biophys Acta. 2015 Oct; 1850(10): 2017-2034.）を含む広範な生物が挙げられる。また、PPIaseの活性は側鎖の存在とは無関係に、直径10Å、深さ6Åの特徴的なポケット（キャビティ）があれば具備することができる（Protein Engineering, Design and Selection, Volume21, Issue2, February2008, Pages83-89）ため、当該ポケットを有するポリペプチドであれば本発明のPPIaseとして用いることができる。PPIase活性を有するポリペプチドの具体例としては、シクロフィリン（Cyclophilin A等）、FKBP（FKBP12等）、Pin1、パルブリン、下記［１］～［３］のポリペプチド等）等が挙げられる。

[0021] ［１］配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド

［２］配列番号１に示すアミノ酸配列において、１個又は数個のアミノ酸が置換、付加、挿入又は欠失されてなるアミノ酸配列からなり、且つ、PPIase活性を有するポリペプチド

［３］配列番号１に示すアミノ酸配列に対する配列同一性が６８％以上のアミノ酸配列からなり、且つ、PPIase活性を有するポリペプチド

[0022] ［１］における配列番号１は、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｇｒｉｓｅｕｓ由来のPPIaseのアミノ酸配列である。

[0023] ［２］及び［３］のポリペプチドは、［１］のポリペプチドのアミノ酸配列を基本骨格とする配列類似のPPIaseである。

[0024] 前記［２］のポリペプチドに導入されるアミノ酸の改変については、置換、付加、挿入、および欠失の中から１種類の改変（例えば置換）のみを含むものであってもよく、２種以上の改変（例えば、置換と挿入）を含んでいてもよい。前記［２］のポリペプチドにおいて、置換、付加、挿入又は欠失されるアミノ酸は、１個又は複数個若しくは数個であればよく、例えば１～９

７個、１～８０個、１～６０個、１～４０個、１～２０個、１～１０個、好ましくは１～８個、１～６個、１～５個、又は１～４個、更に好ましくは１～３個、特に好ましくは１又は２個或いは１個が挙げられる。

[0025] また、前記［３］のポリペプチドにおいて、配列同一性は、６８％以上であればよいが、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、一層好ましくは９８％以上、より一層好ましくは９９％以上、特に好ましくは９９．５％以上、最も好ましくは９９．８％以上が挙げられる。

[0026] ここで、前記［３］のポリペプチドにおいて、例えば配列番号１に示すアミノ酸配列に対する配列同一性とは、配列番号１に示すアミノ酸配列と比較して算出される配列同一性である。また、「配列同一性」とは、ＢＬＡＳＴＰＡＣＫＡＧＥ［ｓｇｉ３２ ｂｉｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｖｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２；ａｖａｉｌａｂｌｅ ｆｒｏｍ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）］のｂｌ２ｓｅｑ ｐｒｏｇｒａｍ（Ｔａｔｉａｎａ Ａ．Ｔａｔｓｕｓｏｖａ，Ｔｈｏｍａｓ Ｌ．Ｍａｄｄｅｎ，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，Ｖｏｌ．１７４，ｐ２４７－２５０，１９９９）により得られるアミノ酸配列の同一性の値を示す。パラメーターは、Ｇａｐ ｉｎｓｅｒｔｉｏｎ Ｃｏｓｔ ｖａｌｕｅ：１１、Ｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ Ｃｏｓｔ ｖａｌｕｅ：１に設定すればよい。

[0027] 前記［２］及び［３］のポリペプチドにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列における第４１位～１６５位、第２２０～第３０９位は、ＦＫ５０６ ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ （ＦＫＢＰ）ドメインを構成しているため、これらの部位には置換又は欠失を導入しないことが望ましい。

[0028] 前記［２］及び［３］のポリペプチドにアミノ酸置換が導入される場合、アミノ酸置換の態様として、保存的置換が挙げられる。即ち、［２］及び［３］のポリペプチドにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列に対して導入されるアミノ酸置換としては、例えば、置換前のアミノ酸が非極性アミノ酸

であれば他の非極性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が非荷電性アミノ酸であれば他の非荷電性アミノ酸への置換、置換前のアミノ酸が酸性アミノ酸であれば他の酸性アミノ酸への置換、及び置換前のアミノ酸が塩基性アミノ酸であれば他の塩基性アミノ酸への置換が挙げられる。

[0029] 前記［２］及び［３］のポリペプチドにアミノ酸付加が導入される場合、アミノ酸付加の態様として、例えば、Ｎ末端へのメチオニン残基の付加、精製用タグ（例えば、オリゴヒスチジン等の結合性オリゴペプチド）の付加等が挙げられる。

[0030] 前記［２］及び［３］のポリペプチドには、人為的に変異させて得られるポリペプチドのみならず、ポリペプチドが由来する生物の個体差又は種の違いに基づく、天然に生じる変異（ミュータント又はバリアント）によって生じるポリペプチドも含まれる。

[0031] さらに、前記［２］及び［３］のポリペプチドにおける「PPIase活性」の確認方法は、上述の通りである。好ましくは、前記［２］及び［３］のポリペプチドにおける「PPIase活性」は、前記［１］のポリペプチドと同等であり、具体的には、前記［２］及び［３］のポリペプチドについて、キモトリプシンの共存下で合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA(Suc-AAPF-pNA)からpNAの遊離を検出する方法に基づいて測定される遊離pNAの量が、前記［１］のポリペプチドについて測定される遊離pNAの量の８０～１２０％、好ましくは９０～１１０％である。

[0032] いくつかのPPIaseは市販されており（例えばSigma社のFKBP12、Sigma社のCyclophilin A）、容易に入手することができる。これらのPPIaseは１種を単独で使用してもよいし、二種類以上を組み合わせて使用してもよい。

[0033] PPIaseの使用量については、基質タンパク質１ｇ当たりの量として、例えば０．０００１ｍｇ～１ｇ、好ましくは０．０１ｍｇ～１００ｍｇ、又は、例えば０．０１～１０００００Ｕ、好ましくは０．１～１００００Ｕ、より好ましくは１～１０００Ｕ、さらに好ましくは１０～２００Ｕが挙げられる。

[0034] １－３．タンパク質改変酵素

本発明の改変タンパク質の製造方法では、PPIaseにタンパク質改変酵素（タンパク質加工酵素）を併用する。即ち、基質タンパク質に対してPPIaseを作用させるとともにタンパク質改変酵素も作用させる。

[0035] タンパク質改変酵素とは、その触媒作用によって基質タンパク質分子を改変できる（タンパク質分子の構成原子の数及び／又は種類を変えるようにタンパク質の構造を変化させる加工を行うことができる）酵素である。タンパク質改変酵素の例としては、タンパク質分解酵素、タンパク質側鎖修飾酵素、及びタンパク質架橋酵素が挙げられる。タンパク質分解酵素の具体例としては、プロテアーゼ（ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、金属プロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、酸性プロテアーゼ等のプロテイナーゼ、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ等）が挙げられる。タンパク質側鎖修飾酵素の具体例としては、タンパク質脱アミド酵素（プロテイングルタミナーゼ、プロテインアルギニンデイミナーゼ等、トランスグルタミナーゼが挙げられる。タンパク質架橋酵素の具体例としては、タンパク質の架橋化を触媒する酸化還元酵素（リジルオキシダーゼ、スルフヒドリルオキシダーゼ、チロシナーゼ、ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、セルロプラズミン、パーオキシダーゼ等）が挙げられる。

[0036] タンパク質脱アミド酵素とは、タンパク質中のグルタミン残基及びアスパラギン残基のアミド基を脱アミドする酵素である。タンパク質中のグルタミン残基を脱アミドする酵素としては、例えばChryseobacterium proteolyticum由来のプロテイングルタミナーゼ（Eur J Biochem, 268 (5), 1410, 2001, Protein-glutaminase From Chryseobacterium Proteolyticum, an Enzyme That Deamidates Glutaminyl Residues in Proteins. Purification, Characterization and Gene Cloning, S Yamaguchi 1 , D J Jeenes, D B Archer或いはFront Microbiol , 9, 1975, 2018, Complete Genome Sequence and Characterization of a Protein-Glutaminase Producing Strain, Chryseobacteri

um proteolyticum QSH1265, Ruidan Qu, Xiaoyu Zhu, Min Tian, Yingjie Liu, Wenjuan Yan, Jian Ye, Hongliang Gao, Jing Huang）がよく知られているが、これに限定されるものではない。タンパク質中のアスパラギン残基を脱アミドする酵素については、例えばWO2015/133590に開示されているが、これに限定されるものではない。本発明でいうタンパク質脱アミド酵素には、アルギニン残基を脱イミノ化する酵素も含まれる。アルギニン残基を脱イミノ化する酵素としては、例えばFusarium graminearum由来のアルギニンデイミナーゼが知られている。

[0037] 一般にタンパク質中のグルタミン及びアスパラギン残基を脱アミド化し、カルボキシル基を生じさせると、そのタンパク質の負電荷が増加し、その結果等電点が低下、水和力が増加する。さらに静電反撥力の上昇によるタンパク質間の相互作用の低下すなわち会合性の低下がもたらされる。これらの変化によりタンパク質の可溶性、水分散性は大きく増大する。またタンパク質の負電荷の増加は、そのタンパク質の折りたたみをほぐし、高次構造を変化させ、分子内部に埋もれていた疎水性領域を分子表面に露出させる。したがって脱アミド化タンパク質は両親媒性を有し理想的な界面活性剤となり、タンパク質の乳化力、乳化安定性、起泡性、泡沫安定性が大きく向上する。このように、タンパク質の脱アミド化は、タンパク質の様々な機能特性の向上をもたらし、そのタンパク質の用途は飛躍的に増大する(例えばMolecular Approaches to Improving Food Quality and Safety, D. Chatnagar and T. E. Cleveland, eds., Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, p. 37)。また、タンパク質中のアルギニン残基を脱イミノ化した場合も、タンパク質の疎水性を増大させて、タンパク質の高次構造を変化させる。

[0038] トランスグルタミナーゼは、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基のγ－カルボキシルアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素であり、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基のε－アミノ基が作用すると、タンパク質分子の分子内あるいは分子間においてε－（γ－Ｇｌｎ）－Ｌｙｓ架橋結合を形成させる。トランスグルタミナーゼの作用を利用すればタンパク質の改

質を行うことができるため、ストレプトミセス属由来のトランスグルタミナーゼが肉の結着、ソーセージ、豆腐、パン、麺類の製造に使用されている。また、食品分野に限らず、繊維分野、医療分野、香粧品分野等でのトランスグルタミナーゼの利用が図られている。

[0039] 上記のタンパク質改変酵素は、１種を単独で使用してもよいし、２種類以上を組み合わせて使用してもよい。２種類以上のタンパク質改変酵素の組合せの例としては、プロテイングルタミナーゼとトランスグルタミナーゼの組合せ、プロテイングルタミナーゼとラッカーゼの組合せ、トランスグルタミナーゼとラッカーゼの組合せ、プロテアーゼとトランスグルタミナーゼの組合せ等が挙げられる。

[0040] タンパク質改変酵素の使用量については、基質タンパク質1g当たりの量として、例えば０．００１ｍｇ～１ｇ、好ましくは０．０１ｍｇ～０．１ｇ、又は、例えば０．００１～１００００Ｕ、好ましくは０．０１～５０００Ｕ、より好ましくは０．１～３０００Ｕが挙げられる。

[0041] １－４．反応操作、反応条件等

PPIaseを作用させる処理とタンパク質改変酵素を作用させる処理とは、同時に行ってもよいし、逐次的に行ってもよい。本発明においては、作業効率及び／又は反応効率等の観点から、好ましくは、PPIaseによる処理とタンパク質改変酵素による処理とを同時に行う。

[0042] PPIaseによる処理とタンパク質改変酵素による処理とを同時に行う場合、基質タンパク質溶液中にPPIaseとタンパク質改変酵素が併存する状態を形成すればよく、処理の開始タイミングは同時であってもよいし、いずれか一方の処理の開始タイミングを遅くしてもよい。また、両処理を同時に行う場合、処理の終了タイミングは同時であってもよいし、いずれか一方の処理の終了タイミングを遅くしてもよい。例えば、二以上のタンパク質改変酵素を組み合わせて使用する場合、全てのタンパク質改変酵素をPPIaseとの同時反応に使用してもよいし、一部のタンパク質改変酵素をPPIaseとの同時反応に使用し、残りのタンパク質改変酵素を当該同時反応後に用いてもよい。

[0043] タンパク質の処理における温度条件及びｐＨ条件については、使用する酵素の至適温度及び至適ｐＨに応じて当業者が適宜決定することができる。PPIaseによる処理及びタンパク質改変酵素による処理のいずれについても、温度条件としては、例えば10℃～60℃、好ましくは20℃～50℃が挙げられ、ｐＨ条件としては、例えば3～9、好ましくは4～8が挙げられる。

[0044] また、タンパク質の処理にかかる反応時間については、PPIaseによる処理とタンパク質改変酵素による処理とにかかる時間の合計として、例えば1分～24時間、好ましくは10分～16時間が挙げられる。

[0045] 尚、具体的に最適な反応条件は予備実験を通して決定すればよい。

[0046] １－５．改変タンパク質

本発明の改質タンパク質の製造方法によって得られる改変タンパク質は、上記の「１－１．タンパク質（基質タンパク質）」に記載されるタンパク質が、上記の「１－３．タンパク質改変酵素」に記載されるタンパク質改変酵素による改変作用を受けて生じるものである。改変タンパク質の具体例としては、タンパク質改変酵素としてタンパク質分解酵素を用いた場合にあってはタンパク質分解物；タンパク質改変酵素としてタンパク質側鎖修飾酵素を用いた場合にあっては側鎖修飾を受けたタンパク質；タンパク質改変酵素としてタンパク質架橋酵素を用いた場合にあっては分子間及び／又は分子内で架橋されたタンパク質が挙げられる。

[0047] ２．改質されたタンパク質素材の製造方法

本発明の第２の局面は改質されたタンパク質素材の製造方法に関する。上記第１の局面に係る改変タンパク質の製造方法で述べたとおり、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素との組み合わせは、基質タンパク質の改変に用いることができるため、タンパク質素材の処理に適用することで、タンパク質素材の改質が可能になる。さらに、ペプチジルプロリルイソメラーゼは、単独であっても、タンパク質素材の処理に適用することで、タンパク質素材の改質が可能になる。従って、本発明は、改質されたタンパク質素材の製造方法も提供する。

[0048] 具体的には、本発明の改質されたタンパク質素材の製造方法は、タンパク質を含有する食品素材、医薬素材又は工業素材を、ペプチジルプロリルイソメラーゼ、又は、ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素で処理する工程を含むことを特徴とする。

[0049] 改質の具体的な形態については、タンパク質改質酵素の作用効果から期待できる形態であればいかなる形態であってもよい。

[0050] 改質の具体的な形態の例としては、タンパク質素材の種類及び／又は形態等に応じ、タンパク質素材におけるタンパク質の水分散性の向上、タンパク質素材におけるタンパク質可溶性の向上、タンパク質素材の乳化安定性の向上、タンパク質素材の体内消化性の向上、タンパク質素材の呈味の向上、タンパク質素材の起泡性の向上、タンパク質素材のゲル化特性の向上等が挙げられる。

[0051] 改質の具体的な形態の別の例としては、アレルギー性又はオピオイド性の低減又は消失、減感作療法に有用な制限されたアレルギー特性の付与（つまり、アレルギー性を低減し且つ所定の制限された範囲内で残存させること）等も挙げられる。

[0052] 本発明の改質されたタンパク質素材の製造方法で処理対象となるタンパク質素材とは、タンパク質を含み、且つ、各種産業界で流通する物品（具体例として、食品、医薬品、工業物品が挙げられる）の製造に用いられる原料である。タンパク質素材に含まれるタンパク質については、上記の「１－１．タンパク質（基質タンパク質）」に記載される通りである。タンパク質素材の具体例としては、食品素材、医薬素材及び工業素材が挙げられる。食品素材のより具体的な例としては、動物組織及び植物組織、並びにそれらの分散液（特に好ましくは、植物の可食部の粉砕物を水中に分散させた植物性ミルクが挙げられる）、抽出物等の加工品等、所謂食材として用いられるもの全般と、アレルゲンと食品学的に許容される成分とを含む組成物、外因性オピオイドペプチドと食品学的に許容される成分とを含む組成物、毒性ペプチドと食品学的に許容される成分とを含む組成物等が挙げられる。また、医薬素

材のより具体的な例としては、アレルゲンと薬学的に許容される成分とを含む組成物等が挙げられる。さらに、工業素材のより具体的な例としては、絹及び羊毛等の繊維等が挙げられる。

[0053] 本発明の改質されたタンパク質素材の製造方法で得られる改質されたタンパク質素材は、上記のタンパク質素材が、ペプチジルプロリルイソメラーゼの作用、又は、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素との作用を受けて生じるものである。

[0054] 改質されたタンパク質素材のうち、上記のタンパク質素材がペプチジルプロリルイソメラーゼの作用を受けて生じるものの例としては、タンパク質の水分散性が向上した、タンパク質の可溶性が向上した、及び／又は乳化安定性が向上したタンパク質素材（具体的には食品素材又は医薬素材）等が挙げられる。

[0055] 改質されたタンパク質素材のうち、上記のタンパク質素材がペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素との作用を受けて生じるものの例としては、タンパク質の水分散性が向上した、タンパク質の可溶性が向上した、乳化安定性が向上した、起泡性が向上した、及び／又はゲル化特性が向上したタンパク質素材（具体的には食品素材又は医薬素材）、体内消化性が向上した及び／又は呈味が向上したタンパク質素材（具体的には食品素材）、並びに、アレルギー性、オピオイド性、毒性、及び／又は不要物が低減又は消失したタンパク質素材（具体的には食品素材、医薬素材又は工業素材）等が挙げられる。

[0056] 上記の改質されたタンパク質素材の中でも、体内消化性が向上した食品素材は、例えば、消化機能が低減した動物用の飲食品、消化吸収能を高めた健康飲食品等に用いることができ；アレルギー性が低減又は消失した食品素材は、アレルゲンが低減又は消失しているため、例えば、当該アレルゲンに対してアレルギーを起こす体質を持つ動物用の飲食品等に用いることができ；オピオイド性が低減又は消失した食品素材は、外因性オピオイドペプチドが低減又は消失しているため、例えば、当該オピオイドペプチドに起因する自

閉症等の精神疾患に罹患した動物用の飲食品等に用いることができ；毒性が低減又は消失した食品素材は、毒性ペプチドが低減又は消失しているため、例えば、セリアック病及び他のグルテン関連疾患に罹患した動物用の飲食品等に用いることができる。

[0057] 上記の改質されたタンパク質素材の中でも、アレルギー性が低減した医薬素材は、アレルゲンと薬学的に許容される成分とを含む組成物から一部のアレルゲンが分解等されアレルゲン含量が所定の制限された濃度範囲内に残存するように調整されているため、例えば、アレルギーの減感作療法用の医薬品として用いることができる。

[0058] 上記の改質されたタンパク質素材の中でも、アレルギー性が低減又は消失した工業素材は、肌に触れる繊維製品の材料に用いることができ；不要物が低減又は消失した工業素材としては、セリシン除去された（精練された）絹、スケール除去された羊毛等が挙げられ、風合いが向上した繊維製品の材料に用いることができる。

[0059] なお、上記の動物について、その種類は特に制限されないが、例えば、哺乳類及び鳥類等が挙げられ、好ましくは哺乳類が挙げられ、さらに好ましくはヒトが挙げられる。

[0060] 本発明の改質されたタンパク質素材の製造方法で適用される、PPIase、タンパク質改変酵素、それら酵素の使用量、反応操作、反応条件等の詳細については、上記第１の局面に係る改変タンパク質の製造方法に記載される通りである。

[0061] ３．タンパク質改変用酵素剤

本発明の第３の局面はタンパク質改変用酵素剤に関する。上記第１の局面に係る改変タンパク質の製造方法で述べたとおり、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素との組み合わせは、基質タンパク質の改変に用いることができる。従って、本発明は、ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素を含有するタンパク質改変用酵素剤も提供する。

[0062] タンパク質改変用酵素剤において、有効成分であるPPIase及びタンパク質

改変酵素の含有量は特に限定されない。例えば、タンパク質改変用酵素剤1g当たりのPPIaseの含有量としては、例えば0.0001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mgが挙げられる。タンパク質改変用酵素剤1g当たりのタンパク質改変用酵素の含有量としては、タンパク質改変用酵素としてプロテアーゼを用いる場合、例えば、0.0001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mgが挙げられ；タンパク質改変用酵素としてペプチダーゼを用いる場合、例えば0.0001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mgが挙げられ；タンパク質改変用酵素としてプロテイングルタミナーゼを用いた場合、例えば、本酵素剤1g当たり0.0001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mgが挙げられ；タンパク質改変用酵素としてトランスグルタミナーゼを用いる場合、例えば0.0001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mgが挙げられる。

[0063] 本発明のタンパク質改変用酵素剤は、有効成分である上記酵素の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などの他の成分を含有していてもよい。賦形剤としては、乳糖、ソルビトール、D-マンニトール、マルトデキストリン、白糖等が挙げられる。緩衝剤としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等が挙げられる。安定剤としては、プロピレングリコール、アスコルビン酸等が挙げられる。保存剤としては、フェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等が挙げられる。防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等が挙げられる。

[0064] 本発明のタンパク質改変用酵素剤の性状としては特に限定されず、固体状、液体状及び担持状が挙げられる。本発明のタンパク質改変用酵素剤が固体状である場合、より具体的な形態としては、顆粒及び粉体等が挙げられる。本発明のタンパク質改変用酵素剤が担持状である場合、より具体的な形態としては、シリカ、多孔質ポリマー等の不溶性担体の表面に有効成分である上記酵素が固定化されている形態が挙げられる。

[0065] 本発明のタンパク質改変用酵素剤で使用される、PPIase、タンパク質改変酵素、改変の態様、対象となるタンパク質、及び使用方法の詳細については

、上記第１の局面に係る改変タンパク質の製造方法に記載される通りである。

[0066] ４．タンパク質素材の改質用酵素剤

本発明の第４の局面はタンパク質素材の改変用酵素剤に関する。上記第２の局面に係る改質されたタンパク質素材の製造方法で述べたとおり、ペプチジルプロリルイソメラーゼは単独で、又は、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素との組み合わせで、タンパク質素材の改質に用いることができる。従って、本発明は、ペプチジルプロリルイソメラーゼを含有するタンパク質素材の改質用酵素剤も提供する。本発明の改質用酵素剤は、さらにタンパク質改変酵素を含有することができる。

[0067] 本発明のタンパク質素材の改質用酵素剤において、有効成分である酵素の含有量、さらに含有していてもよい他の成分の種類、及び性状については、上記第３の局面に係るタンパク質改変用酵素剤と同様である。

[0068] 本発明のタンパク質素材の改質用酵素剤で使用される、PPIase、タンパク質改変酵素、改質の態様、対象となるタンパク質素材、及び使用方法の詳細については、上記第２の局面に係る改質されたタンパク質素材の製造方法に記載される通りである。

実施例

[0069] 以下に実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0070] ＜ラッカーゼ活性の測定法＞

ラッカーゼの活性については、基質である２，２’－Ａｚｉｎｏ－ｄｉ－［３－ｅｔｈｙｌｂｅｎｚｔｈｉａｚｏｌｉｎｅ ｓｕｌｆｏｎａｔｅ］（ＡＢＴＳ）の５０ｍＭ溶液２０μＬ及び１２５ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液１６０μＬに、酵素液２０μＬを加えて３７℃で反応を行い１５分後と０分後の４０５ｎｍの吸光度を測定した場合に、１分間に１μｍｏｌのＡＢＴＳの酸化を触媒する酵素量を１ユニット（Ｕ）とした。

[0071] ＜PPIase活性の測定法＞

PPIaseの活性については、Ｐｒｏｔｅａｓｅ－ｃｏｕｐｌｅｄ ａｓｓａｙを用いて測定した。０．２ｍＭ テトラペプチド（Ｓｕｃ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－ｐＮＡ）を０．４７Ｍ 塩化リチウム（ＬｉＣｌ）＋トリフルオロエタノール溶液に溶解して基質溶液とした。基質溶液に０．３ｍｇ/ｍｌ キモトリプシンと適当量のＰＰＩａｓｅとを加えて、混合し、３０℃で３分処理後、３９０ｎｍの吸光度（Ａｂｓ３９０（Ｃｈ＋ＰＰＩ））を測定した。ブランクとして、０．１μＭ ＰＰＩａｓｅを加えない条件で上記同様に実施し、吸光度（Ａｂｓ３９０（Ｃｈ））を測定した。１分間に１μｍｏｌのｐＮＡを遊離させる酵素量を１Ｕとして、以下の式から算出する。

[0072] [数1]

U/mL又はU/g = {Abs390(Ch+PPI)-Abs390(Ch)} ÷ 0.0133 ÷ 3 ÷ n

0.0133：係数

3：処理時間（分）

n：反応系における酵素サンプルの終濃度（mL/L又はg/L）

[0073] ＜試験例１：PPIaseとプロテアーゼを併用した場合の効果＞

（１）方法

100μLの基質水溶液（20mM 酢酸Na（pH6.0）にアゾカゼイン（Sigma社製）を2%(w/v)で溶解）に10μLの1mg/mLウマミザイムG（Aspergillus oryzae由来プロテアーゼ、天野エンザイム株式会社製、150u/g）と10μLの0.1mg/mL FKBP12（微生物由来PPIase、Sigma社製、0.15mg/ml）を加えて、37℃で0、10又は30分反応後、240μLの10%(w/v) TCA溶液を加えることで反応を停止した。遠心分離後、上清120μLを回収した。回収した上清に140μLの1N NaOHを添加し、混合・発色させ、OD440nmの吸光度を測定し、アゾカゼインの分解性を評価した。アゾカゼインの分解性について、FKBP12の代わりに精製水を添加したサンプル（プロテアーゼのみ）を基準にして比較した。

[0074] （２）結果

プロテアーゼにPPIaseを組み合わせた場合、プロテアーゼのみの場合よりもアゾカゼインがより多く分解された。具体的には、プロテアーゼのみの場合の分解度を100%としたときの相対値で評価した結果、PPIaseを組み合わせ

た場合、10分の反応で102%、30分の反応で105%の分解が認められた。反応時間が長いほど、プロテアーゼのみの場合との間で分解度に差が生じた。PPIaseはタンパク質を異性化する作用しかなく、これまでシャペロン機能が利用されてきたすぎなかったが、プロテアーゼを組み合わせることで、プロテアーゼによる分解を促進することが確認できた。

[0075] ＜試験例２：PPIaseとプロテイングルタミナーゼを併用した場合の効果＞

（１）方法

1mLの基質溶液（10%(w/v）大豆タンパク質（フジプロF、不二製油社製）水溶液又は10%(w/v)小麦グルテン水溶液）に、10μLの25u/mLのPG-500（プロテイングルタミナーゼ「アマノ」500、天野エンザイム株式会社製）と10μLの0.1mg/ml Cyclophilin A（ウシ胸腺由来PPIase、Sigma社製C7696）又は精製水とを加え、37℃で10、60、120又は960分振とう反応させた後、1mLの10%(w/v) TCA溶液を加えることで反応を停止した。アンモニア・テストワコー（FUJIFILM社製）を用いて各反応停止後サンプル中のアンモニアの生成量を測定することで脱アミド化の程度を評価した。具体的には、各反応停止後サンプルをキット付属の除タンパク質液で5倍希釈した後、遠心分離して上清を回収した（タンパク成分の除去）。上清中のアンモニア体窒素を発色させて、630nmの吸光度を比較した。

[0076] （２）結果

結果を図１に示す。図１に示されるとおり、大豆タンパク質及び小麦タンパク質のいずれについても、プロテイングルタミナーゼにPPIaseを組み合わせた場合、プロテイングルタミナーゼのみの場合よりも、脱アミド化反応が促進されることが確認できた。

[0077] ＜試験例３：PPIaseとペプシンを併用した場合の効果＞

（１）方法

小麦グルテン由来の毒性ペプチドとして知られる33merペプチド（ペプチド研究所社製）を水中で1.0mg/mlに調整し、基質溶液とした。この基質溶液10μlに対し1M 酢酸ナトリウムバッファー(pH4.5)を0.5μl、5mg/mLのペプシン

（Sigma社製）溶液2.5μl及び0.1mg/mLのCyclophilin A（Sigma社製）溶液10μl若しくは蒸留水10μlを加え、37℃で1時間反応した。抗33merペプチド抗体を用いたELISAアッセイによって反応液中の33merペプチドの残存率を算出した。ペプチドの分解性について、酵素としてペプシンのみを用いた場合（Cyclophilin Aを併用しない場合）の当該ペプチドの残存率を100%とした相対量で評価した。

[0078] （２）結果

結果を図２に示す。図２に示される通り、ペプシンにPPIaseを組み合わせた場合、ペプシンのみの場合よりも、小麦グルテン由来33merペプチドの分解が促進されることが確認できた。

[0079] ＜試験例３：Streptomyces griseus由来PPIase(SgPPI)とプロテイングルタミナーゼを併用した場合の効果＞

（１）Streptomyces griseus由来PPIaseの取得と性質確認

BLAST検索にて細胞外分泌シグナルを有するPPIaseを探索した結果、Streptomyces griseus（BSL1）ゲノムに細胞外分泌シグナルを有する PPIase がコードされていることを見出した。このStreptomyces griseus由来PPIase（以下において、「SgPPI」とも記載する。）のアミノ酸配列は、配列番号１に示される通りである。

[0080] SgPPIをE. coli BL21にて発現させて回収し、性質を検討した。SgPPIの、至適ｐＨ、至適温度、ｐＨ安定性、及び温度安定性を図３に示す。また、図示しないが、SgPPIに、熱安定性向上効果等の公知のPPIase作用があることも確認した。

[0081] （２）方法

５%(w/v)の小麦グルテン水溶液、５%(w/v)の大豆タンパク質水溶液、５%(w/v)のエンドウ豆タンパク質水溶液、５%(w/v)の乳カゼイン水溶液、５%(w/v)の卵アルブミン水溶液それぞれについて、タンパク質１ｇ当たり０．１ＵのPG-500（プロテイングルタミナーゼ「アマノ」500、天野エンザイム株式会社製）、又は、タンパク質１ｇ当たり０．１ＵのPG-500とタンパク質１ｇ当た

り１７４ＵのSgPPIとを加えて、４０℃で４時間振とう反応させた後、1mLの10%(w/v) TCA溶液を加えることで反応を停止した。試験例２と同様にして脱アミド化の程度を評価した。

[0082] （３）結果

結果を図４に示す。図４に示すように、小麦グルテン、大豆タンパク質、エンドウ豆タンパク質、乳カゼイン、卵アルブミンのいずれについても、プロテイングルタミナーゼにSgPPIを組み合わせた場合、プロテイングルタミナーゼのみの場合よりも、脱アミド化反応が促進されることが確認できた。

[0083] （４）補足：SgPPIがプロテイングルタミナーゼ（PG）と併用される場合のPGへの影響の確認

プロテイングルタミナーゼ（PG）の基質であるCbz-Gln-GlyとPGとの共存系と、Cbz-Gln-GlyとPGとSgPPIとの共存系とを構築し、それぞれの系について、PG 活性（Cbz-Gln-Glyを基質としてアンモニアを生じさせる活性）を経時的に調べた。結果を図５に示す。図５に示す通り、SgPPI は、Cbz-Gln-Gly に対する PG 活性を向上しなかった。従って、図４に示された効果は、SgPPIがPGではなく、基質タンパク質に作用することにより得られた効果であると推認できる。

[0084] ＜試験例４：SgPPIとラッカーゼを併用した場合の効果＞

（１）方法

５%(w/v)の乳カゼイン水溶液に、タンパク質１ｇ当たり２４００ＵのLC-Y120（ラッカーゼ、天野エンザイム株式会社製）、又は、タンパク質１ｇ当たり２４００ＵのLC-Y120とタンパク質１ｇ当たり１７４ＵのSgPPIとを加えて、４０℃で４時間振とう反応させ、その後、反応液をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供した。タンパク質の架橋化及びその程度は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいて原点により近いバンドの存在及び当該バンドの濃さにより確認することができる。

[0085] （２）結果

結果を図６に示す。図６に示すように、ラッカーゼのみを用いた場合に得

られる架橋タンパク質の量に比べて、ラッカーゼとSgPPIとを組み合わせて用いた場合に、架橋タンパク質の量が増加していることが分かった。

[0086] ＜試験例５：PPIase単独で使用した場合の効果＞

（１）方法

インド産の「ひよこ豆」（KOBE GROCERS）タンパク質を、イオン水中10w/v%となるように懸濁させ、ひよこ豆ミルクを調製した。得られたひよこ豆ミルク10 mLに、SgPPI をタンパク質１ｇあたり８７Ｕとなるように添加し、24時間で40℃の条件でインキュベートした（静置）。その後、ひよこ豆ミルクの性状を撮影した。

[0087] （２）結果

結果を図７に示す。図７に示すとおり、PPIaseを用いなかった場合（Control）ではひよこ豆ミルクが分散せず多量の沈殿を生じたが、PPIaseを用いた場合ではひよこ豆ミルクが均一分散し、分散性向上の改質効果が確認された。

産業上の利用可能性

[0088] 本発明によれば、タンパク質素材を改質できる新たな手段が提供される。具体的には、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素とをタンパク質に作用させることでタンパク質の改変反応を調節（典型的には促進）できるため、これら酵素を組み合わせてタンパク質素材を処理することで、タンパク質素材を改質することができる。また、ペプチジルプロリルイソメラーゼでタンパク質素材を処理することでも、タンパク質素材を改質することができる。このような改質されたタンパク質素材は、食品素材、医薬素材及び工業素材等の産業用素材として用いることができ、食品、医薬及び工業製品等の産業製品の製造に寄与する。

[0089] この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によっ

て引用することとする。

請求の範囲

[請求項1] タンパク質に、ペプチジルプロリルイソメラーゼとタンパク質改変酵素とを作用させる工程を含む、改変タンパク質の製造方法。

[請求項2] 前記タンパク質改変酵素を作用させる処理と前記ペプチジルプロリルイソメラーゼを作用させる処理とを同時に行う、請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] 前記タンパク質改変酵素が、タンパク質分解酵素、タンパク質側鎖修飾酵素、及びタンパク質架橋酵素からなる群より選択される、請求項１又は２に記載の製造方法。

[請求項4] 前記タンパク質改変酵素が、プロテアーゼ、タンパク質脱アミド酵素、トランスグルタミナーゼ、及びタンパク質の架橋化を触媒する酸化還元酵素からなる群より選択される、請求項１又は２に記載の製造方法。

[請求項5] 前記タンパク質が、豆、穀物、ナッツ、及び種子に由来する植物タンパク質；乳タンパク質、卵タンパク質、血液タンパク質、筋肉タンパク質及び腱タンパク質；並びに、微生物、藻、及び昆虫に由来するタンパク質からなる群より選択される、請求項１～４のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項6] タンパク質を含有する食品素材、医薬素材又は工業素材を、ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素で処理する工程を含む、改質されたタンパク質素材の製造方法。

[請求項7] 前記タンパク質改変酵素による処理を前記ペプチジルプロリルイソメラーゼによる処理と同時に行う、請求項６に記載の製造方法。

[請求項8] ペプチジルプロリルイソメラーゼ及びタンパク質改変酵素を含有する、タンパク質改変用酵素剤。

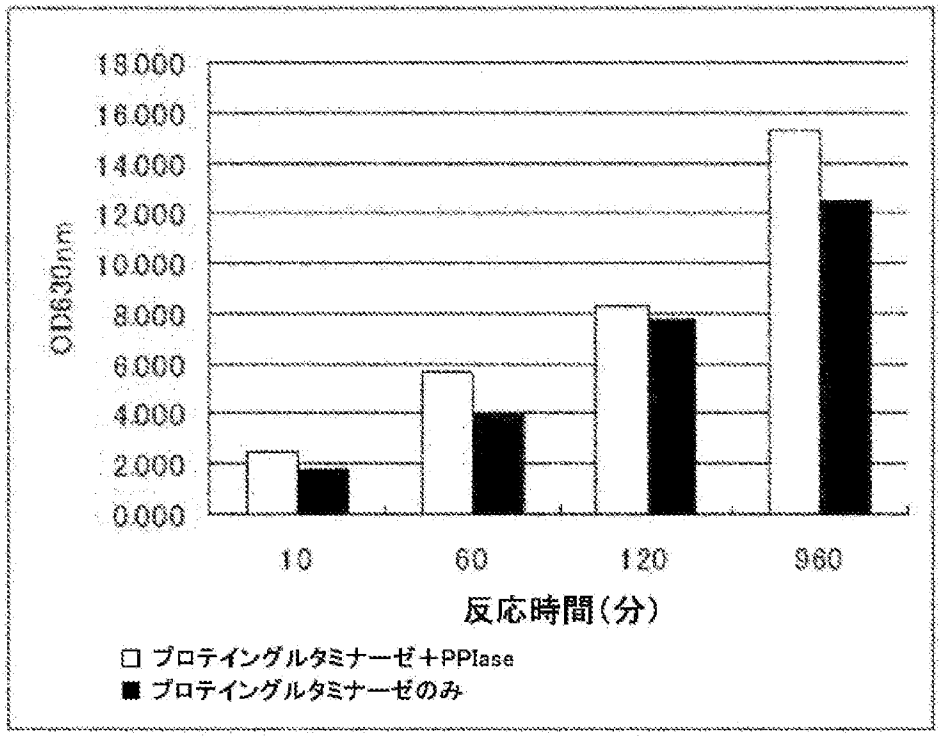
[請求項9] 前記タンパク質改変酵素が、タンパク質分解酵素、タンパク質側鎖修飾酵素、及びタンパク質架橋酵素からなる群より選択される、請求項８に記載のタンパク質改変用酵素剤。

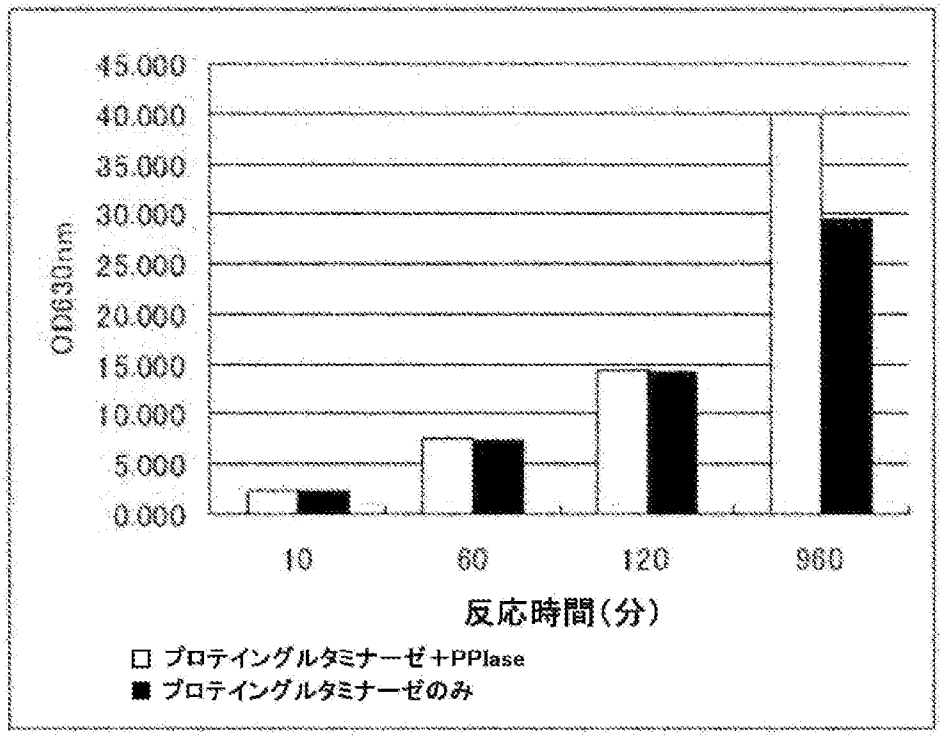
[請求項10] タンパク質改変酵素が、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、タンパク質脱アミド酵素、トランスグルタミナーゼ、及びタンパク質の架橋化を触媒する酸化還元酵素からなる群より選択される、請求項８に記載のタンパク質改変用酵素剤。

[請求項11] タンパク質を含有する食品素材、医薬素材又は工業素材をペプチジルプロリルイソメラーゼで処理する工程を含む、改質されたタンパク質素材の製造方法。

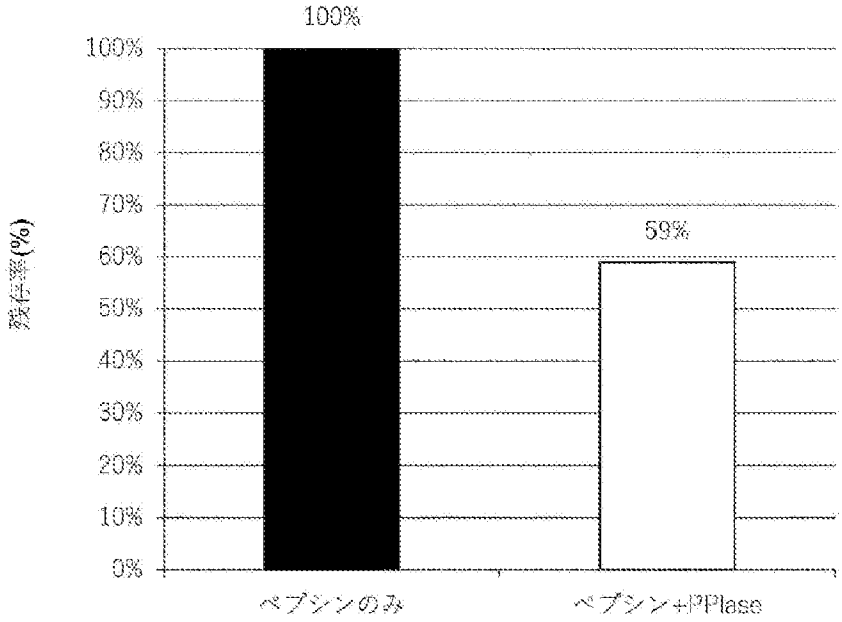
[請求項12] ペプチジルプロリルイソメラーゼを含有する、タンパク質素材の改質用酵素剤。

[図1]

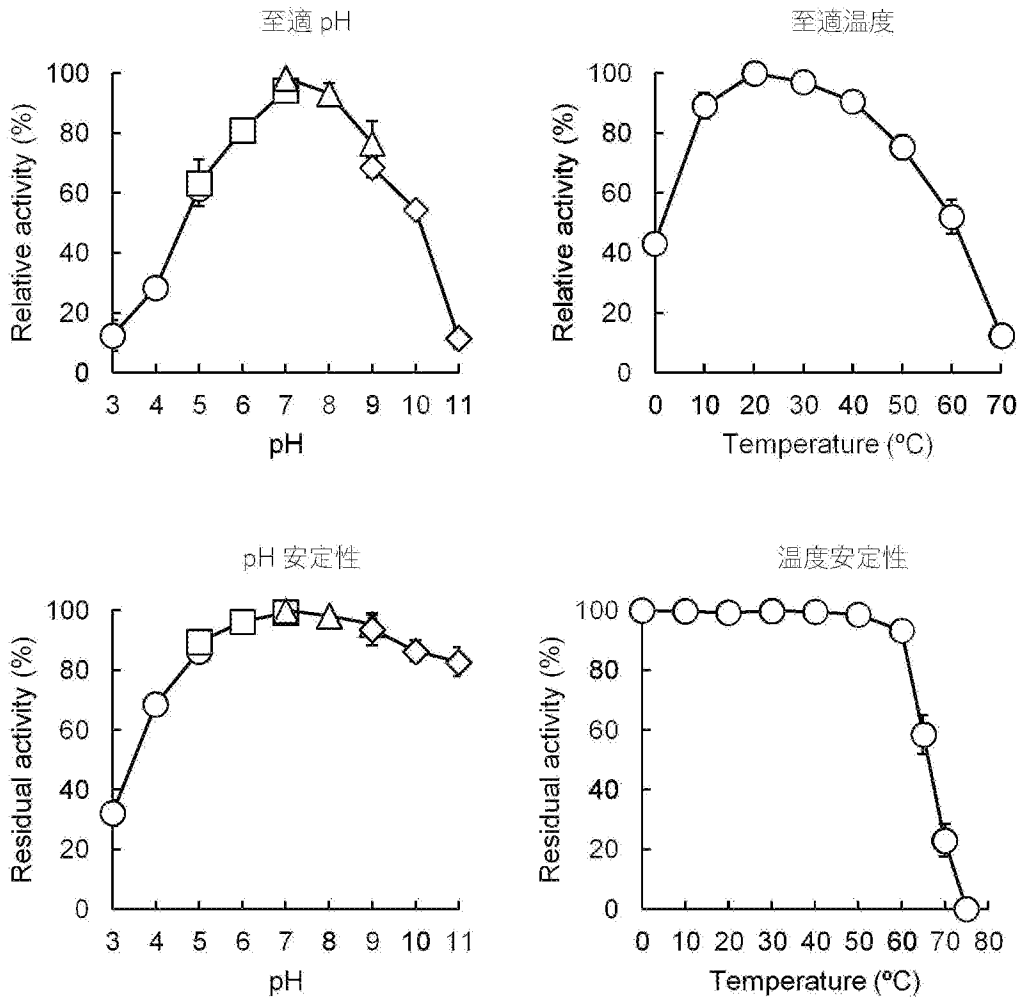

18.000
16.000
14.000
12.000
10.000
8.000
6.000
4.000
2.000
0.000
OD630nm
10
60
120
960
反応時間(分)
□ プロテイングルタミナーゼ+PPIase
■ プロテイングルタミナーゼのみ


45.000
40.000
35.000
30.000
25.000
20.000
15.000
10.000
5.000
0.000
OD630nm
10
60
120
960
反応時間(分)
□ プロテイングルタミナーゼ+PPIase
■ プロテイングルタミナーゼのみ

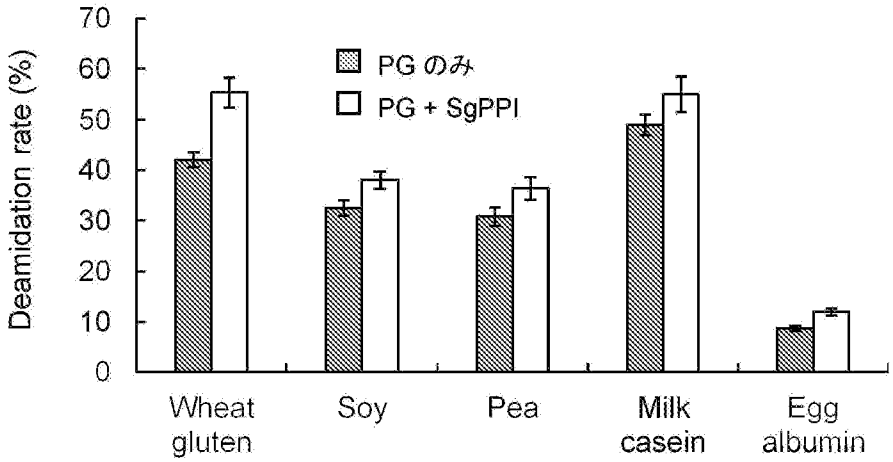
[図2]


100%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
残存率(%)
59%
ペプシンのみ
ペプシン+PPlase

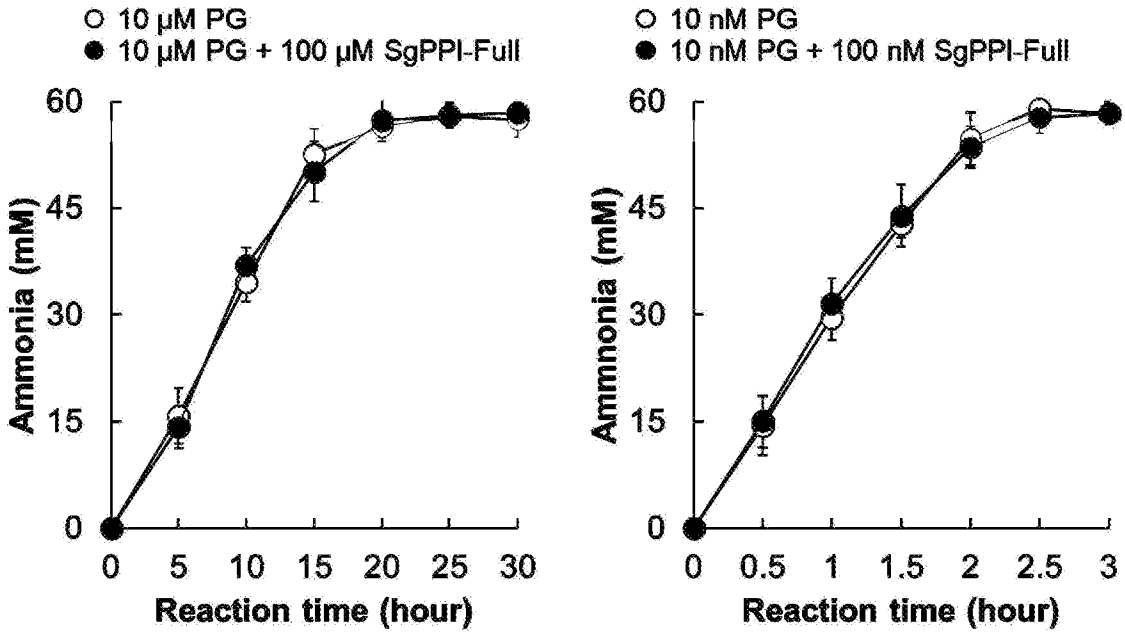
[図3]


至適 pH
Relative activity (%)
pH
至適温度
Relative activity (%)
Temperature (°C)
pH 安定性
Residual activity (%)
pH
温度安定性
Residual activity (%)
Temperature (°C)

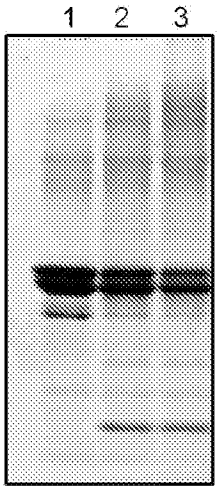
[図4]



[図5]

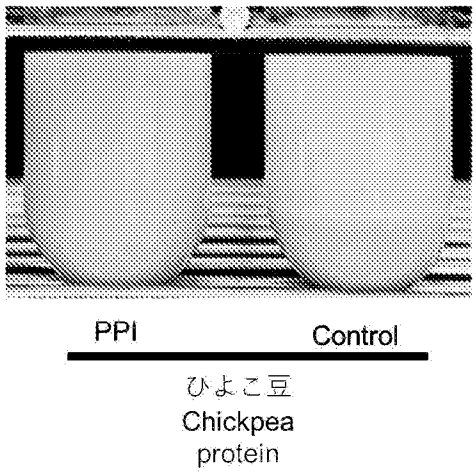


[図6]



1. Non-enzyme
2. LC-Y120 のみ
3. LC-Y120 + SgPPI

[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/031039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/00(2006.01)i; ***C12N 9/50***(2006.01)i; ***C12N 9/78***(2006.01)i; ***C12N 9/90***(2006.01)i; ***C12P 21/06***(2006.01)i
FI: C12P21/00 Z ZNA; C12P21/06; C12N9/90; C12N9/50; C12N9/78

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)

C12P21/00; C12N9/50; C12N9/78; C12N9/90; C12P21/06

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-510848 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 07 August 2001 (2001-08-07) entirety. in particular, claims, examples	1-12
X	JP 2001-66309 A (SEKISUI CHEM CO LTD) 16 March 2001 (2001-03-16) entirety. in particular, claims, examples	11, 12
X	JP 2019-508366 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 28 March 2019 (2019-03-28) entirety. in particular, claims, examples	1-12
Y	WO 2006/082922 A1 (SAN-EI GEN F.F.I., INC) 10 August 2006 (2006-08-10) claims, examples	1-12
Y	JP 2018-74967 A (NISSHIN PHARMA INC) 17 May 2018 (2018-05-17) claims, examples	1-12
Y	WO 2019/083795 A1 (PFENEX INC.) 02 May 2019 (2019-05-02) paragraphs [0102], [0103]	1-12

☐ 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	Date of mailing of the international search report
08 November 2021	**16 November 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/031039

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/031039

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2001-510848 A	07 August 2001	US 2003/0077692 A1 claims, examples WO 1999/005163 A1 EP 998485 A1	
JP 2001-66309 A	16 March 2001	(Family: none)	
JP 2019-508366 A	28 March 2019	US 2019/0381181 A1 claims, examples WO 2017/102759 A1 EP 3390424 A1 KR 10-2018-0087431 A CN 108699104 A	
WO 2006/082922 A1	10 August 2006	JP 4637896 B2	
JP 2018-74967 A	17 May 2018	(Family: none)	
WO 2019/083795 A1	02 May 2019	US 2019/0127744 A1 EP 3700915 A1 KR 10-2020-0073280 A CN 111372941 A JP 2021-501157 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/031039

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 21/00(2006.01)i; C12N 9/50(2006.01)i; C12N 9/78(2006.01)i; C12N 9/90(2006.01)i;
C12P 21/06(2006.01)i
FI: C12P21/00 Z ZNA; C12P21/06; C12N9/90; C12N9/50; C12N9/78

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（ＩＰＣ））

C12P21/00; C12N9/50; C12N9/78; C12N9/90; C12P21/06

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	関連する請求項の番号
X	JP 2001-510848 A (メディカル　リサーチ　カウンシル) 07.08.2001 (2001-08-07) 全体。特に、特許請求の範囲、実施例	1-12
X	JP 2001-66309 A (積水化学工業株式会社) 16.03.2001 (2001-03-16) 全体。特に、特許請求の範囲、実施例	11,12
X	JP 2019-508366 A (エフ．ホフマンーラ　ロシュ　アーゲー) 28.03.2019 (2019-03-28) 全体。特に、特許請求の範囲、実施例	1-12
Y	WO 2006/082922 A1 (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) 10.08.2006 (2006-08-10) 特許請求の範囲、実施例	1-12
Y	JP 2018-74967 A (日清ファルマ株式会社) 17.05.2018 (2018-05-17) 特許請求の範囲、実施例	1-12
Y	WO 2019/083795 A1 (PFENEX INC.) 02.05.2019 (2019-05-02) ［００１０２］、［００１０３］段落	1-12

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
08.11.2021	16.11.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
上村　直子 4B 4508
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/031039

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/031039

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2001-510848 A	07.08.2001	US 2003/0077692 A1 特許請求の範囲、実施例 WO 1999/005163 A1 EP 998485 A1	
JP 2001-66309 A	16.03.2001	（ファミリーなし）	
JP 2019-508366 A	28.03.2019	US 2019/0381181 A1 特許請求の範囲、実施例 WO 2017/102759 A1 EP 3390424 A1 KR 10-2018-0087431 A CN 108699104 A	
WO 2006/082922 A1	10.08.2006	JP 4637896 B2	
JP 2018-74967 A	17.05.2018	（ファミリーなし）	
WO 2019/083795 A1	02.05.2019	US 2019/0127744 A1 EP 3700915 A1 KR 10-2020-0073280 A CN 111372941 A JP 2021-501157 A	