

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007年12月27日 (27.12.2007)

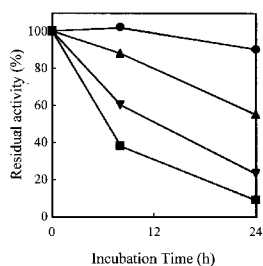
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/148451 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/96 (2006.01) C12N 9/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/052732
- (22) 国際出願日: 2007年2月15日 (15.02.2007)
- (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2006-172080 2006年6月22日 (22.06.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッ
コマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)
[JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田250番地 Chiba
(JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 場家 幹雄
(BAKKE, Mikio) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野
田250番地 キッコマン株式会社内 Chiba (JP). 下
地 一彦 (SHIMOJI, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒2788601 千
葉県野田市野田250番地 キッコマン株式会
社内 Chiba (JP). 梶山 直樹 (KAJIYAMA, Naoki) [JP/JP];
〒2788601 千葉県野田市野田250番地 キッコー
マン株式会社内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉
県船橋市前原西二丁目14番1号ダイアパレス津田
沼1001号 Chiba (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,
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, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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.
- (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), ユーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 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: METHOD FOR STABILIZING POLYAMINE OXIDASE AND METHOD FOR IMPROVING SUBSTRATE SPECIFICITY OF POLYAMINE OXIDASE

(54) 発明の名称: ポリアミンオキシダーゼの安定化方法と基質特異性の改良方法



A ■ : 無添加
B ▼ : 5 mM EDTA
C ▲ : 10% エタノール
D ● : 10% エタノール + 5 mM EDTA

C
処理条件: 5.0 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、30℃

A NO ADDITION
B ETHANOL
C TREATMENT CONDITION
D PHOSPHATE BUFFER

(57) Abstract: It is intended to provide a method for stabilizing polyamine oxidase, a method for improving substrate specificity of polyamine oxidase etc. The polyamine oxidase is used for clinical diagnosis of cancer, production of a useful material such as monoacetylpolyamine or the like. The method for stabilizing polyamine oxidase by allowing an alcohol compound and/or a chelating reagent to coexist, the method for improving substrate specificity of polyamine oxidase by allowing a surfactant to coexist and/or setting the pH at lower than 7.5, a method for producing monoacetylpolyamine and a method for purifying polyamine oxidase using the methods.



(57) 要約:

【課題】癌の臨床診断やモノアセチルポリアミン等の有用物質生産等に用いられるポリアミンオキシダーゼの安定化方法と基質特異性の改良方法等を提供すること。

【解決手段】アルコール化合物及び／又はキレート試薬を共存させることにより、ポリアミンオキシダーゼを安定化する方法、界面活性剤を共存させる及び／又はpHを7.5未満とすることによりポリアミンオキシダーゼの基質特異性を改良する方法、これら方法を利用するモノアセチルポリアミンの製造方法及びポリアミンオキシダーゼの精製方法。

明 細 書

ポリアミノオキシダーゼの安定化方法と基質特異性の改良方法

技術分野

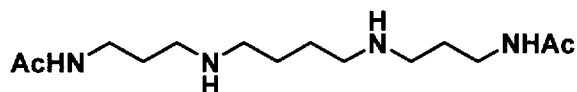
- [0001] 本発明は、臨床診断や有用物質生産等に用いられるポリアミノオキシダーゼの安定化方法、基質特異性の改良方法、ポリアミノオキシダーゼを用いるジアセチルポリアミンの測定方法、及び、それらを利用してポリアミノオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造する方法及びポリアミノオキシダーゼを精製する方法、並びに、安定化されたポリアミノオキシダーゼ製剤及びジアセチルポリアミン測定用試薬等に関する。

背景技術

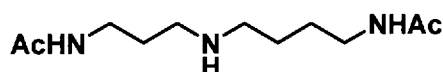
- [0002] ポリアミンとは、同一分子内に2個以上のアミノ基を有する化合物の総称であり、ヒトの体内には、プトレッシン、カダベリン、スペルミジン、スペルミンの4種類のポリアミンとそれらのモノアセチル体及びジアセチル体が存在する。癌患者において、尿中ポリアミンの排泄量が増加することが1971年にRussellによって報告されて以来、癌の診断を目的として尿中のポリアミン含量の測定が行われてきた(例えば、非特許文献1参照)。尿中ポリアミンの大部分はモノアセチル体で存在するため、従来はアセチル基を加水分解し、アセチルポリアミンとアセチル化されていない遊離型のポリアミンを区別しない総ポリアミン含量として測定されていた(例えば、特許文献1参照)。
- [0003] しかしながら、尿中総ポリアミンにおいては悪性腫瘍患者の中に偽陰性例が相当数認められることが明らかになっている。また、悪性腫瘍以外にも、炎症性疾患、心筋梗塞、肝硬変、創傷治癒過程など、種々の病態に関連して有意に上昇することが明らかになり、腫瘍マーカーとしては実用的でないと考えられるようになった。
- [0004] 近年、 N^1 , N^{12} -ジアセチルスペルミン(化1)(以下、単にジアセチルスペルミンと記載する)と N^1 , N^8 -ジアセチルスペルミジン(化2)の2種類のジアセチルポリアミンが尿中に排泄されていることが見出された(例えば、非特許文献2参照)。健常者の尿中においては、これらの成分は総ポリアミンのそれぞれ0.6%、1.4%を占めるにすぎないが、癌患者における増加の割合が総ポリアミンと比較して際立って高く、既

存の腫瘍マーカーよりも真陽性率が高いことから、新たな腫瘍マーカーとして注目を集めている(例えば、非特許文献3、4参照)。

[0005] [化1]



[0006] [化2]



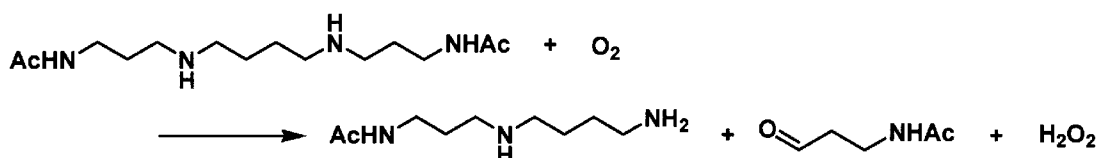
[0007] ジアセチルポリアミンを特異的に測定する方法としては、例えば、HPLC-酵素法(例えば、非特許文献2参照)が挙げられる。まず検体中の各種ポリアミンをHPLCにて分離した後、HPLC検出器中にてアセチル加水分解酵素を作用させて生じるフリーポリアミンをポリアミンオキシダーゼで酸化し、生じる過酸化水素を電気化学検出器を用いて検出する方法である。しかしながら、本方法では多数の検体を短時間で処理できない等の問題が生じていた。最近、ジアセチルスぺルミンに対する特異性が高い抗体が取得され、本抗体を用いる間接競合ELISA法による測定法も開発されたが(例えば、特許文献2、3、4、非特許文献3、4参照)、その操作は煩雑であり、測定値は試料の検体量に反比例するものであった。

[0008] このような背景から、ジアセチルポリアミンに特異的に作用するポリアミンオキシダーゼやデヒドロゲナーゼを用いて、より簡便で直接的にジアセチルポリアミンを測定できる方法が開発されれば非常に有用であると期待されるが(例えば、非特許文献5参照)、これまでにこのような試みはなかった。その理由として、これまでに知られているほとんどのポリアミンオキシダーゼは、モノアセチルポリアミン(例えば、N¹-アセチルスぺルミン、N¹-アセチルスぺルミジン、N⁸-アセチルスぺルミジン、アセチルプトレッシン等)やアミノ基がアセチル化されていないフリーのポリアミン(例えば、スペルミン、スペルミジン、プトレッシン、カタベリン等)に高い反応性を示すものであり、ジアセチ

ルポリアミンの測定には不向きであったためと考えられる。

[0009] しかしながら、最近になって、本発明者等によって、ジアセチルスペルミン(化1)に対して高い反応性を有し、(化3)に示す反応を触媒するポリアミンオキシダーゼがデバリオミセス、キャンディダ、ピキア等から単離された(PCT/JP2006/310648参照)。

[0010] [化3]



[0011] このようなポリアミンオキシダーゼはジアセチルスペルミンの測定に有用であると考えられるが、実用化に向けては、酵素の安定性とジアセチルスペルミンに対する特異性をさらに改善することが必要であると考えられた。

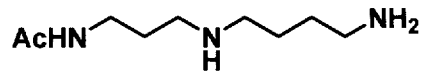
[0012] まず、酵素の安定性について説明する。一般的に、酵素は液体に溶解した状態では不安定であるという欠点を有している。ポリアミンオキシダーゼについても例外ではなく、この解決策として、種々の安定化方法が試みられてきたが有効な方法はなかった。

[0013] 次に、酵素の基質特異性について説明する。本発明者等によって発見された上記の酵素は、ジアセチルスペルミンに対する反応性を100%とすると、例えば、N¹-アセチルスペルミジンにはそれぞれ約30%、50%、90%(pH7.5 リン酸緩衝液条件下)の反応性を示すものであり、ジアセチルスペルミン以外のポリアミンも測定してしまうという問題が生じていた。

[0014] また、ポリアミンオキシダーゼは、ジアセチルポリアミンの測定という用途以外にも、ジアセチルスペルミン(化1)から医薬品や農薬の原料として有用なN¹-アセチルスペルミジン(化4)を製造する方法に利用できることが報告されている(PCT/JP2006/310648)。本法は、従来より知られていた有機合成法(例えば、非特許文献6、7参照)と比較すると工程数が少なく、簡便であるものの、酵素が不安定であるために

多量の酵素が必要となるという欠点を有していた。また、基質特異性が不十分であるために、生成するN¹-アセチルスぺルミジンの一部がプロレッシンに変換されてしまい、収率が低下してしまうという欠点も有していた。

[0015] [化4]



[0016] 特許文献1:特開平1-85080号公報

特許文献2:WO2004/081569パンフレット

特許文献3:特開2006-38594号公報

特許文献4:特開2006-199655号公報

非特許文献1:「Cancer Research」, (米国), 1971年, 31巻, p. 1555-1558

非特許文献2:「Journal of Biochemistry」, (日本), 1995年, 117巻, p. 107-112

非特許文献3:「Clinical Cancer Research」, (米国), 2005年, 11巻, p. 2986-2990

非特許文献4:「Journal of Biochemistry」, (日本), 2006年, 139巻, p. 315-322

非特許文献5:「Clinica Chimica Acta」, (蘭国), 2004年, 340巻, p219-227

非特許文献6:「Journal of Chemical Society, Perkin Transactions I」, (英国), 1988年, p. 1905-1911

非特許文献7:「Acta Chemica Scandinavica」, (デンマーク), 1989年, 43巻, p. 990-994

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明の課題は、ポリアミノオキシダーゼの安定化方法、基質特異性の改良方法、

及びポリアミンオキシダーゼを用いるジアセチルポリアミンの測定方法、及び、それらを利用してポリアミンオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造する方法及びポリアミンオキシダーゼを精製する方法、並びに、安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤及びジアセチルポリアミン測定用試薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは、前記課題解決のために鋭意研究を重ねた結果、(1)アルコール化合物及び／又はキレート試薬を共存させることにより、ポリアミンオキシダーゼの安定性が向上すること、(2)界面活性剤を共存させることにより、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性が改良されること、(3)ポリアミンオキシダーゼをpH7.5未満で作用させることにより、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性が改良されることなどを見出し、これらの知見に基づき本発明を完成するに至った。

[0019] すなわち、本発明は、以下に関する。

(1)アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを共存させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの安定化方法。

(2)ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(1)に記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法。

(3)界面活性剤存在下にてポリアミンオキシダーゼを作用させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。

(4)ポリアミンオキシダーゼをpH7.5未満で作用させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。

(5)ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(3)～(4)のいずれかに記載のポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。

(6)ポリアミンオキシダーゼを含有する試薬を試料に作用させて、ジアセチルポリアミンを測定することを特徴とする、ジアセチルポリアミンの測定方法。

(7)アルコール化合物及び／又はキレート試薬により安定化されたポリアミンオキシダーゼを用いることを特徴とする、上記(6)に記載の測定方法。

(8)界面活性剤により基質特異性が改良されたポリアミンオキシダーゼを用いることを特徴とする、上記(6)～(7)のいずれかに記載の測定方法。

- (9) ポリアミンオキシダーゼをpH7.5未満で作用させることを特徴とする、上記(6)～(8)のいずれかに記載の測定方法。
- (10) ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(6)～(9)のいずれかに記載のジアセチルポリアミンの測定方法。
- (11) アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする、安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤。
- (12) ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記16に記載の安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤。
- (13) ポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする、ジアセチルポリアミンの測定試薬。
- (14) アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする上記(13)に記載のジアセチルポリアミンの測定試薬。
- (15) 界面活性剤とポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする上記(13)又は(14)のいずれかに記載のジアセチルポリアミン測定試薬。
- (16) ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(13)～(15)のいずれかに記載のジアセチルポリアミン測定試薬。
- (17) 上記(1)又は(2)記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法、及び／又は上記(3)～(5)のいずれか一項に記載のポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法を利用することを特徴とする、ジアセチルポリアミンにポリアミンオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造する方法。
- (18) ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(17)記載のモノアセチルポリアミンの製造方法。
- (19) 上記(1)又は(2)記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法を利用することを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの精製方法。
- (20) ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、上記(19)記載のポリアミンオキシダーゼの精製方法。

発明の効果

[0020] 本発明の方法によれば、アルコール化合物及び／又はキレート試薬を共存させる

ことにより、ポリアミンオキシダーゼを安定化することができる。また、界面活性剤を共存させる及び／又はpH7.5未満の条件下とすることにより、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性を改良することができる。さらに、このような安定化方法及び／又は基質特異性の改良方法を用いて、ジアセチルポリアミンへポリアミンオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造したり、ポリアミンオキシダーゼを用いることによりジアセチルポリアミンを測定することができる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]アルコール化合物とキレート試薬を共存させることによる酵素の安定化効果を示すグラフである。

[図2]ポリアミンオキシダーゼ製剤の熱安定性を示すグラフである。

[図3]ジアセチルスペルミンオキシダーゼを含有する試薬を用い、ジアセチルスペルミン試料を測定したときの濃度と吸光度の関係を示すグラフである。

[図4]ジアセチルスペルミンオキシダーゼを含有する試薬を用い、尿にジアセチルスペルミンを添加した試料を測定したときの濃度と吸光度の関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0022] 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられる「ポリアミンオキシダーゼ」は、ジアセチルポリアミンを酸素存在下で酸化して、モノアセチルポリアミン、アルデヒド及び過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素であり、如何なる起源のものでも用いることができる。例えば、微生物、植物、あるいは動物などの生産するポリアミンオキシダーゼ等、いずれであってもよく、特に制限されない。例えば、酵母等を起源とするポリアミンオキシダーゼ等が挙げられ、好ましくはデバリオミセス属、キャンディダ属、ピキア属由来の酵素等が用いられる。

[0023] さらに具体的には、デバリオミセス・ハンセニイ(*Debaryomyces hansenii*)、デバリオミセス・マラム(*Debaryomyces marama*)、デバリオミセス・マラムス(*Debaryomyces maramus*)、キャンディダ・グラブラタ(*Candida glabrata*)及び「FEBS Letters」, (英国), 2000年, 476巻, p. 150-154に記載のキャンディダ・ボイディニイ(*Candida boidinii*)由来のポリアミンオキシダーゼ等が好ましく用いられる。

[0024] ポリアミンオキシダーゼの中でも、特にジアセチルスペルミンオキシダーゼは好まし

く用いられる。ここで述べるジアセチルスペルミンオキシダーゼとは、 N^1 -アセチルスペルミン、 N^1 -アセチルスペルミジン、 N^8 -アセチルスペルミジンに対する活性よりもジアセチルスペルミンに対する活性が高いポリアミノオキシダーゼを指し、例えば、デバリオミセス・ハンセニイ、デバリオミセス・マラマ、デバリオミセス・マラムス、キャンディダ・グラブラタ、ピキア・ミヌタ由来のジアセチルスペルミンオキシダーゼ等が挙げられる。

[0025] このようなジアセチルスペルミンオキシダーゼの好適例として、PCT/JP2006/310648に記載されている以下の酵素を挙げることができる。

[0026] すなわち、以下の(1a)～(1g)に記載の理化学的性質をそれぞれ若しくはそれらを適宜併せて有するジアセチルスペルミンオキシダーゼ(なお、下記の酵素の理化学的性質は、測定上不可避免的な誤差を含んでいる)：

[0027] (1a)作用：化3に示したとおり、酸素存在下にてジアセチルスペルミンの2級アミンのC-N結合を開裂して、 N^1 -アセチルスペルミジン、3-アセトアミドプロパナール及び過酸化水素を生成する。

(1b)基質特異性：ジアセチルスペルミン> N^1 -アセチルスペルミン、 N^1 -アセチルスペルミジン、 N^8 -アセチルスペルミジン

例えば、pH7.5の条件下において、ジアセチルスペルミンを基質として用いたときの活性を100としたとき、 N^1 -アセチルスペルミン、 N^1 -アセチルスペルミジン、 N^8 -アセチルスペルミジンを基質として用いたときの活性が90以下、好ましくは60以下、さらに好ましくは50以下、もっとも好ましくは40以下である理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。本評価におけるpHの条件や緩衝液の種類と濃度についてはなんら制限されない。

(1c)至適pH：6.5～8.5

例えば、緩衝液として200mM 酢酸緩衝液(pH4.5～6.0)、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.0～8.0)、200mM PIPES-NaOH(pH6.5～7.5)、200mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5～9.5)を用い、それぞれのpHにおいて、温度37℃にて酵素反応を行い、至適pHを求める。例えば、至適pHとしてpH6.5～8.5、好ましくはpH7.0～8.0の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(1d) 安定pH: 6.0～8.0

例えば、緩衝液として200mM 酢酸緩衝液(pH4.5～6.0)、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.0～8.0)、200mM PIPES-NaOH(pH6.5～7.5)、200mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5～9.5)を用い、それぞれのpHにおいて、30℃で30分間処理した後、本発明酵素の残存活性を測定する。例えば、安定pHの範囲として、pH6.0～8.0、好ましくはpH6.5～7.5の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(1e) 至適温度: 37～55℃

例えば、後述の活性測定法における反応液と同一組成よりなる反応液を用い、種々の温度にて本酵素の活性測定を行い作用適温の範囲を求める。例えば、作用適温の範囲として37～55℃の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(1f) 熱安定性: 37℃以下

例えば、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を用い、それぞれの温度において30分間処理した後、本発明酵素の残存活性を測定する。このとき好ましくは90%以上の活性が残存している場合、その温度において酵素は安定であると言える。例えば、酵素が安定に存在できる範囲として、37℃以下の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(1g) 分子量: 約92,000(ゲルろ過法)

分子量はゲルろ過法、Native PAGE法、SDS-PAGE法等を用いて測定することができる。本発明酵素の分子量については特に限定されないが、例えば、分子量の一例として、分子量約92,000(ゲルろ過法)の本発明酵素などが挙げられる。

[0028] 以下の(2a)～(2g)に記載の理化学的性質をそれぞれ若しくはそれらを適宜併せて有するジアセチルスペルミンオキシダーゼ(なお、下記の酵素の理化学的性質は、測定上不可避免的な誤差を含んでいる):

(2a) 作用: 化3に示したとおり、酸素存在下にてジアセチルスペルミンの2級アミンのC-N結合を開裂して、N¹-アセチルスペルミジン、3-アセトアミドプロパナール及び過酸化水素を生成する。

(2b) 基質特異性: ジアセチルスペルミン > N¹-アセチルスペルミン, N¹-アセチル

スペルミジン, N⁸-アセチルスペルミジン

例えば、pH7.5の条件下において、ジアセチルスペルミンを基質として用いたときの活性を100としたとき、N¹-アセチルスペルミン、N¹-アセチルスペルミジン、N⁸-アセチルスペルミジンを基質として用いたときの活性が90以下、好ましくは60以下、さらに好ましくは50以下である理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。本評価におけるpHの条件や緩衝液の種類と濃度についてはなんら制限されない。

(2c) 至適pH: 7.0~8.5

例えば、緩衝液として200mM 酢酸緩衝液(pH4.5~6.0)、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.0~8.0)、200mM PIPES-NaOH(pH6.5~7.5)、200mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.5)を用い、それぞれのpHにおいて、温度37℃にて酵素反応を行い、至適pHを求める。例えば、至適pHとしてpH7.0~8.5、好ましくはpH7.5~8.0の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(2d) 安定pH: 5.5~9.5

例えば、緩衝液として200mM 酢酸緩衝液(pH4.5~6.0)、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.0~8.0)、200mM PIPES-NaOH(pH6.5~7.5)、200mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5~9.5)を用い、それぞれのpHにおいて、30℃で30分間処理した後、本発明酵素の残存活性を測定する。例えば、安定pHの範囲として、pH5.5~9.5、好ましくはpH6.5~9.0の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(2e) 至適温度: 45~55℃

例えば、後述の活性測定法における反応液と同一組成よりなる反応液を用い、種々の温度にて本酵素の活性測定を行い作用適温の範囲を求める。例えば、作用適温の範囲として45~55℃の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(2f) 熱安定性: 37℃以下

例えば、200mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を用い、それぞれの温度において30分間処理した後、本発明酵素の残存活性を測定する。このとき好ましくは90%以上の活性が残存している場合、その温度において酵素は安定であると言える。例

えば、酵素が安定に存在できる範囲として、37℃以下の理化学的性質を有する本発明酵素などが挙げられる。

(2g) 分子量: 約90, 000 (ゲルろ過法)

分子量は、ゲルろ過法、Native PAGE法、SDS-PAGE法等を用いて測定することができる。本発明酵素の分子量については、特に限定されないが、例えば、分子量の一例として、分子量約90, 000 (ゲルろ過法) の本発明酵素などが挙げられる。

[0029] なお、上記の一番目に挙げた酵素はデバリオミセス マラマ HUT 7199、デバリオミセス マラムス NBRC 0668及びデバリオミセス ハンセニイ Tsukuba 42 (FERM BP-10603)、並びに、上記の二番目に挙げた酵素はキャンディダ グラブラタ Noda 162がそれぞれ生産するもので、当業者であれば、これらの菌体から容易に調製することができるし、酵素をコードする遺伝子をクローニングして、大腸菌や酵母等の他の宿主で組換え発現させて調製することもできる。

[0030] デバリオミセス ハンセニイ Tsukuba 42 (FERM BP-10603) 及びキャンディダ グラブラタ Noda 162 (FERM BP-10602) は、本発明者らが茨城県内及び千葉県内の土壌よりそれぞれ分離して得た菌株であり、2006年5月10日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づき寄託され、それぞれ、受託番号FERM BP-10603、及び、FERM BP-10602が付与されている。

[0031] ポリアミンオキシダーゼには、FAD又は銅を補酵素とするものが知られており、特に限定はされないが、FADを補酵素として利用するポリアミンオキシダーゼが望ましい。これらのポリアミンオキシダーゼは、遺伝子組換え体によって製造されたものも用いることができる。

[0032] [ポリアミンオキシダーゼの安定性の向上]

本発明において、ポリアミンオキシダーゼの安定性を向上させるために共存させるアルコール化合物とは、ヒドロキシル基(OH)を有する有機化合物であり、そのような官能基を有する化合物であれば当業者に公知の如何なる化合物でも本発明に用いることができる。特に脂肪族炭化水素の1個又は複数個の水素原子をヒドロキシル基で置換した有機化合物は、入手が容易であることから好ましく用いられる。より具体的

には、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、エチレングリコール及びグリセロール等の脂肪族アルコール、並びにトレハロース、キシリトール、スクロース及びグルコース等の糖類が挙げられる。本発明においては、上記アルコール化合物は、それぞれ単独でも複数組み合わせても用いることができる。

[0033] ポリアミンオキシダーゼと共存させる前記アルコール化合物の溶液中の濃度については、ポリアミンオキシダーゼの安定化効果が発揮され、かつ酵素を含む試薬を取り扱う上で不都合のない範囲内であれば特に限定されず、各化合物について適切な安定化効果が認められる濃度で添加することができる。好ましくは0.5～20%、より好ましくは1～10%（以下、特に断りがない限り、「体積%」を意味する）の濃度で用いられる。

[0034] 本発明において、ポリアミンオキシダーゼの安定性を向上させるために共存させるキレート試薬とは、金属イオンに配位しキレート化合物を与えるような化合物であり、そのような作用を有する化合物であれば当業者に公知の如何なる化合物でも本発明に用いることができる。

[0035] 例えば、エチレンジアミン4酢酸(Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid、(以下「EDTA」と称する))、1, 2-Diaminopropane-N, N, N', N'-tetraacetic acid(以下「Me-EDTA」と称する)、N-(2-Hydroxymethyl)ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid(以下「EDTA-OH」と称する)、trans-1, 2-Diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid(以下「CyDTA」と称する)、1, 3-Diamino-2-hydroxypropane-N, N, N', N'-tetraacetic acid(以下「DTPA-OH」と称する)、O, O'-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid(以下「EGTA」と称する)、Triethylenetetramine-N, N, N', N'', N''', N''''-hexaacetic acid(以下「TTHA」と称する)などのポリアミンカルボン酸系のキレート試薬や、クエン酸、リンゴ酸、イソクエン酸などのオキシカルボン酸系のキレート試薬等が挙げられる。上記キレート試薬に配位する塩の有無、種類や数については何ら限定されるものではないが、例えば、ナトリウム塩化合物が好ましく用いられる。

[0036] 上記キレート試薬は、それぞれ単独でも複数組み合わせても用いることができる。ま

た、上記キレート試薬によって安定化させるポリアミンオキシダーゼとして、例えば、酵母等を起源とするポリアミンオキシダーゼが挙げられ、さらに具体的には、デバリオミセス・ハンセニイ、デバリオミセス・マラマ、デバリオミセス・マラムス、キャンディダ・グラブラタ由来のジアセチルスペルミンオキシダーゼ、及び「FEBS Letters」, (英国), 2000年, 476巻, p. 150–154に記載のキャンディダ・ボイディニイ由来のN¹-アセチルスペルミジンオキシダーゼ等が挙げられる。

- [0037] ポリアミンオキシダーゼと共存させる前記キレート試薬の溶液中の濃度については、ポリアミンオキシダーゼの安定化効果が発揮され、かつ酵素を含む試薬を取り扱う上で不都合のない範囲内であれば特に限定されないが、好ましくは0.01～50mM、より好ましくは1～10mMの濃度で用いられる。
- [0038] さらに、前記アルコール化合物と前記キレート試薬を併用することにより、ポリアミンオキシダーゼを安定化させることができる。前記アルコール化合物と前記キレート試薬は、それぞれ単独でも複数組み合わせても用いることができる。
- [0039] このとき、必要により、その他の試薬が共存していてもよい。通常、アルコール化合物及び／又はキレート試薬、ポリアミンオキシダーゼ及び他の試薬等が添加された固体粉末若しくはそれらの溶液をそれぞれ適宜混合することにより共存させることができる。
- [0040] 本発明の安定化方法に用いられるポリアミンオキシダーゼの濃度は、特に制限されないが、例えば、溶液の場合、0.05～1000 U/ml、好ましくは0.2～100 U/mlである。この酵素溶液には、FAD、NAD、NADP、NADH、NADPH等の補酵素、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、フェノール、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トリイジン(TOOS)、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジンナトリウム塩(DA-67)等の過酸化水素検出試薬、1-Methoxy PMSやWST-8(ホルマザン試薬)等の酸化還元系発色試薬、カタラーゼ等の酵素、ジアセチルスペルミン等の各種ポリアミン類のいずれか1つ以上を含有させることもできる。
- [0041] 一般に酵素は、保存時のpHによりその安定性が大きく影響を受けるため、安定なpH域の種々の緩衝液を同時に用いることが好ましい。本発明の酵素の安定化におい

て用いられる緩衝液の種類及びその濃度、pHは特に限定されるものではないが、例えば、pH6～10の間で緩衝能を有し、かつ必要十分な緩衝能を保つ濃度に設定されていることが望ましい。この様な緩衝液として、例えば、汎用的なトリス緩衝液やリン酸緩衝液を挙げることができるし、酢酸、クエン酸、シュウ酸等の有機酸系緩衝液、MES、BES、HEPES、TES、ピシン、トリシン等のグッドバッファー、グリシン-NaOHなどのアミノ酸系緩衝液、ホウ酸緩衝液、Bis-Tris propane緩衝液、イミダゾール緩衝液などを使用することもできる。

[0042] 酵素を保存する際の緩衝液の濃度については特に限定されないが、好ましくは5～500mM、さらに好ましくは20～100mMである。本発明のアルコール化合物及び／又はキレート試薬を緩衝液に添加する場合は、直接添加するか、又は、例えば、pH6～10、好ましくはpH6～8に調整したそれらの水溶液を添加すればよい。アルコール化合物及び／又はキレート試薬を添加することにより、pHが目的とする範囲から外れるときは、例えば、酢酸、塩酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水等の添加によりpHが目的の範囲内におさまるように調整するのが好適である。

[0043] さらに、その他の試薬として、必要により、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、アジ化ナトリウム等の各種無機塩、デキストラン等の多糖類、ウシ血清アルブミン(BSA)、グリセロール、アミノ酸、界面活性剤、抗生物質、サルファ剤等の化学療法剤等を共存させてもよい。これらの試薬は、あらかじめ緩衝液に添加しておいてもよい。

[0044] 安定性の評価は、実際に用いる酵素の保存条件、輸送条件及び測定条件などに即した種々の条件下に、ポリアミノキシダーゼを保存、放置して、経時的にその変化を測定することにより行なわれるが、一般に、短時間で評価を行うために、通常、加速試験が用いられる。例えば、一定の高温下にポリアミノキシダーゼを保温して、経時的にその変化を測定する方法などが挙げられる。

[0045] [安定化されたポリアミノキシダーゼ製剤]

この様にして、アルコール化合物及び／又はキレート試薬を共存させることにより、ポリアミノキシダーゼ、特にジアセチルスペルミンオキシダーゼを安定化することができる。この安定化方法を用いて、アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミノキシダーゼを含有する安定化されたポリアミノキシダーゼ製剤を製造す

ることができる。

[0046] 例えば、アルコール化合物を1～10%、及び／又はキレート試薬を1～50mMの濃度で含有する、pH6～10の緩衝液を調製し、この緩衝液にポリアミノキシダーゼを濃度が0.05～1000U/mlとなるように添加する。次に、FADなどの補酵素を0.01～10mMとなるように添加してもよい。さらに、必要により、例えば、ペルオキシダーゼを10～1000U/ml、TOOSを0.05～5mM、4-アミノアンチピリンを0.1～20mMとなるように加えてもよい。この混合液を攪拌し、ポリアミノキシダーゼ製剤を製造することができる。

[0047] さらに、必要により、この液状の製剤を凍結乾燥や噴霧乾燥してもよい。このようにして得られたポリアミノキシダーゼ製剤は、従来の方法により製造された製剤に比べて著しく安定化されており、本発明の方法により、簡単な方法でかつ安価に、安定化されたポリアミノキシダーゼ製剤を製造することができる。

[0048] [ポリアミノキシダーゼの精製方法]

また、この安定化方法を用いて、精製したポリアミノキシダーゼを製造することができる。酵素の精製法としては、通常酵素精製に用いられる方法が使用でき、例えば、硫酸塩析法、有機溶媒沈殿法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、疎水クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせで行うのが好ましい。例えば、これらの精製工程のいずれか1工程若しくは複数の工程において、アルコール化合物及び／又はキレート試薬を添加、共存させることによってポリアミノキシダーゼを安定化した状態で単離精製することができる。これにより酵素を高い回収率で製造することが可能となる。

[0049] さらに具体的には、PCT/JP2006/310648に記載のジアセチルスペルミンオキシダーゼは、ダイノーミルによる菌体破碎、硫酸沈殿、透析、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過等を組み合わせて精製するが、これらの工程のいずれか1工程若しくは複数の工程においてアルコール化合物及び／又はキレート試薬を添加、共存させることによりジアセチルスペルミンオキシダーゼを安定化した状態で単離精製することができる。

[0050] さらに、この安定化方法を用いて、N¹-アセチルスペルミジンを効率よく製造するこ

とができる。例えば、PCT/JP2006/310648に記載のように、ジアセチルスペルミンに対してジアセチルスペルミンオキシダーゼを作用させることにより、 N^1 -アセチルスペルミジンを得ることができるが、このとき反応系にアルコール化合物及び／又はキレート試薬を添加、共存させることによってジアセチルスペルミンオキシダーゼが安定化されるため、より少量の酵素で反応を行うことが可能となり、産業上有利である。

[0051] 上記の反応は、通常緩衝液中で行うが、必要に応じ、カタラーゼ等の過酸化水素消去酵素やアジ化ナトリウム等の防腐剤を添加してもよい。緩衝液としては、pH5～10の通常の緩衝液であれば特に限定さないが、例えば、汎用的なトリス緩衝液やリン酸緩衝液を挙げることができるし、酢酸、クエン酸、シュウ酸等の有機酸系緩衝液、MES、BES、HEPES、TES、ピシシ、トリシシ等のグッドバッファー、グリシシ-NaOHなどのアミノ酸系緩衝液、ホウ酸緩衝液、Bis-Tris propane緩衝液、イミダゾール緩衝液等を挙げることができる。反応時間はいかなる時間でもよいが、1時間から3日間、好ましくは3時間から2日間程度で反応を停止させるのが好ましい。

[0052] [ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良]

本発明において、「ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良」とは、ポリアミンオキシダーゼの「ジアセチルスペルミンに対する反応性」の「その他のポリアミンに対する反応性」に対する比、すなわち、「ジアセチルスペルミンに対する反応性／その他のポリアミンに対する反応性」を向上させることをいう。ここでいう「その他のポリアミン」とは、例えば、 N^1 -アセチルスペルミン、 N^1 -アセチルスペルミジン、 N^8 -アセチルスペルミジン、スペルミン、スペルミジンなどを指す。

[0053] 基質特異性の評価は、酵素活性の測定に用いる反応液に添加する基質の種類を変えて酵素活性を測定し、ジアセチルスペルミンに対する反応性とその他のポリアミンに対する反応性を比較することにより行う。ここでいう「その他のポリアミン」とは、例えば、 N^1 -アセチルスペルミン、 N^1 -アセチルスペルミジン、 N^8 -アセチルスペルミジン、スペルミン、スペルミジンなど測定する方法などが挙げられる。簡易的な評価を行うために、ジアセチルポリアミンに対する反応性と1種類のその他のポリアミン（例えば、 N^1 -アセチルスペルミジン）に対する反応性を比較して評価することもできる。

[0054] 本発明において、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性を改良するために使用する

界面活性剤とは、親水基と親油基(疎水基)とで構成されており、水に溶けて水の表面張力を低下させる活性を示す物質であり、そのような化合物であれば如何なる化合物でも用いることができる。一般的に、親水基の種類によって界面活性剤は、アニオン界面活性剤(陰イオン界面活性剤)、カチオン界面活性剤(陽イオン界面活性剤)、非イオン性界面活性剤(ノニオン界面活性剤)、両性界面活性剤の4種に分類されている。

- [0055] アニオン界面活性剤(陰イオン界面活性剤)とは、水中で電離して有機陰イオンとなるものであり、例えば、界面活性剤の分子中の親油基をRとすると、 RCOONa 、 RSO_3Na 、 RSO_4Na などがある。
- [0056] カチオン界面活性剤(陽イオン界面活性剤)とは、水中で電離して有機陽イオンとなるものであり、例えば界面活性剤の分子中の親油基をR、ハロゲンをXとすると、 $\text{R-NH}_3^+\text{X}^-$ 、 $[\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4\text{N}]\text{X}$ (第4級アンモニウム塩)、 $(\text{C}_5\text{H}_5)_5\text{N}^+\text{RX}^-$ (アルキルピリジニウム塩)などがある。
- [0057] 非イオン性界面活性剤(ノニオン界面活性剤)とは、親水基が非イオン性のものであり、親水基としてよく用いられるものとして、例えば、オキシエチレン基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)、ソルビタン、ショ糖のエステル、グリセリン誘導体のモノグリセリドなどがあり、例えば、界面活性剤の分子中の親油基をRとすると、 $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ 、 $\text{RCOO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ などがある。
- [0058] 両性界面活性剤とは、分子内にアニオン基とカチオン基の両方をあわせもっているものである。
- [0059] 各種界面活性剤の中でも、特に非イオン性界面活性剤と両性界面活性剤はポリアミンオキシダーゼの基質特異性を向上させるためにより好ましく用いられる。さらに具体的には、非イオン性界面活性剤として、例えば、Triton X-100 [Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ether]、Triton X-405 [p-tertiary Octylphenoxy-Polyethoxy Ethanols]、Tween 20 [Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate]、Tween 40 [Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monopalmitate]、Tween 80 [Polyoxyethylene(20)Sorbitan Monooleate]、Tween 85 [Polyoxyethylene(20)Sorbitan Trioleate]、Brij 35 [Polyoxyethylene(23)Lauryl

Ether]、Brij 58 [Polyoxyethylene(20)Cetyl Ether]、Brij 78 [Polyoxyethylene (20) Stearyl Ether]、エマルゲン913 (Nonyl Phenol Ethoxylate) などが挙げられ、両性界面活性剤として、例えば、3'-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-2-hydroxypropane-sulfonic acid(CHAPSO)などが挙げられる。

[0060] 上記界面活性剤は、それぞれ単独でも複数組み合わせても用いることができる。

[0061] ポリアミノキシダーゼと前記界面活性剤を同一の試薬内にあらかじめ混合し、共存する形で用いることができる。若しくは、ポリアミノキシダーゼによる反応が進行するときに前記界面活性剤が存在していればよいので、例えば、ポリアミノキシダーゼを含有する試薬Aと前記界面活性剤を含有する試薬Bをそれぞれ別途調製し、これらを適宜混合して、前記界面活性剤存在下でポリアミノキシダーゼ反応を進行させることもできる。ポリアミノキシダーゼと共存するときの前記界面活性剤の濃度については特に限定されず、各化合物について適切な基質特異性改良効果が認められる濃度で添加することができる。好ましくは0.001~20%、より好ましくは0.01~5%の濃度で用いられる。

[0062] 本発明の界面活性剤による基質特異性の改善において用いられる緩衝液の種類及びその濃度、pHは特に限定されるものではないが、例えば、pH5~10の間で緩衝能を有し、かつ必要十分な緩衝能を保つ濃度に設定されていることが望ましい。この様な緩衝液として、例えば、汎用的なトリス緩衝液やリン酸緩衝液を挙げることでもできるし、酢酸、クエン酸、シュウ酸等の有機酸系緩衝液、MES、BES、HEPES、TESS、ピシン、トリシン等のグッドバッファー、グリシン-NaOHなどのアミノ酸系緩衝液、ホウ酸緩衝液、Bis-Tris propane緩衝液、イミダゾール緩衝液などを使用することでもできる。緩衝液の濃度については、例えば、好ましくは5~500mM、さらに好ましくは20~100mMである。

[0063] また、ポリアミノキシダーゼの基質特異性を改良するため、pH7.5未満にて酵素反応を行う方法も挙げられる。より好ましいpH条件として、例えば、6.0以上7.5未満が挙げられる。本発明においては、同様にポリアミノキシダーゼの基質特異性を改良する効果が得られる上記界面活性剤を共存させることもできる。

- [0064] ポリアミンオキシダーゼは、pH7.5未満、より好ましくはpH6.0以上7.5未満の試薬内にあらかじめ含有される形で用いることができる。又は、ポリアミンオキシダーゼによる反応が進行するときにpH7.5未満、より好ましくはpH6.0以上7.5未満になっていけばよいので、例えば、2種以上の試薬(いずれかがポリアミンオキシダーゼを含有する)をそれぞれ別途調製し、これらを適宜混合して、pH7.5未満、より好ましくはpH6.0以上7.5未満の条件となるようにしてポリアミンオキシダーゼ反応を進行させることもできる。
- [0065] 本発明の上記の界面活性剤存在下及び／又はpH7.5未満にて酵素反応を行うことによる基質特異性の改良に用いられるポリアミンオキシダーゼの濃度は、特に制限されないが、例えば、溶液の場合、0.05～1000 U/ml、好ましくは0.2～100 U/mlである。この酵素溶液には、FAD、NAD、NADP、NADH、NADPH等の補酵素、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、フェノール、TOOS、DA-67等の過酸化水素検出試薬、1-Methoxy PMSやWST-8(ホルマザン試薬)等の酸化還元系発色試薬、カタラーゼ等の酵素、ジアセチルスペルミン等の各種ポリアミン類のいずれか1つ以上が存在していてもよい。
- [0066] さらに、その他の試薬として、既に記載したような安定化剤であるアルコール化合物及び／又はキレート試薬やその他の試薬を共存させて用いることもできる。また、必要により、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、アジ化ナトリウム等の各種無機塩、デキストラン等の多糖類、ウシ血清アルブミン(BSA)、グリセロール、アミノ酸、抗生物質、サルファ剤等の化学療法剤等を共存させてもよい。
- [0067] さらに、上記の界面活性剤存在下及び／又はpH7.5未満にて酵素反応を行うことによる基質特異性の改良方法を用いて、N¹-アセチルスペルミジンを効率よく製造することができる。例えば、PCT/JP2006/310648に記載のように、ジアセチルスペルミンに対してジアセチルスペルミンオキシダーゼを作用させることにより、N¹-アセチルスペルミジンを得ることができるが、このとき反応系に基質特異性が向上しているため、生成物であるN¹-アセチルスペルミジンがさらなるプロテッシンへの変換を受けにくくなり、回収率が向上するため、産業上有利である。
- [0068] [ジアセチルポリアミンの測定方法]

さらに本発明は、ポリアミノキシダーゼを含有する試薬を試料に作用させて、ジアセチルポリアミンを測定する方法も含む。測定検体は特に限定されないが、例えば、尿、血清、食品やその抽出物等が挙げられる。測定検体中に含まれるジアセチルポリアミンの濃度についても特に限定されないが、例えば、1mM以下が挙げられるし、検体は適宜希釈することができる。用いるポリアミノキシダーゼの量は、特に制限されないが、例えば、終濃度が0.05~1000 U/ml、好ましくは0.2~100 U/mlとなるように添加すればよい。作用させるpHは特に限定されるものではないが、例えば、pH5~10、好ましくはpH6~9、特に好ましくはpH6.0以上7.5未満である。pHの調整法は、特に限定されず、例えば、汎用的なトリス緩衝液やリン酸緩衝液を挙げることもできるし、酢酸、クエン酸、シュウ酸等の有機酸系緩衝液、MES、BES、HEPES、TES、ピシン、トリシン等のグッドバッファー、グリシン-NaOHなどのアミノ酸系緩衝液、ホウ酸緩衝液、Bis-Tris propane緩衝液、イミダゾール緩衝液などを使用することができる。この際、ポリアミノキシダーゼの安定化剤であるアルコール化合物やキレート試薬、基質特異性改良剤である界面活性剤が適宜存在していてもよい。作用時間は、例えば、30秒~120分間、好ましくは1~30分間である。作用温度は、例えば、20~45℃であり、通常の酵素反応に用いられる温度を適宜選択することができる。

[0069] 試料に添加するポリアミノキシダーゼ溶液には、トリス、リン酸、酢酸、クエン酸、シュウ酸、MES、BES、HEPES、TES、ピシン、トリシン、グリシン、ホウ酸、Bis-Tris propane、イミダゾール等の緩衝剤、FAD等の補酵素、ポリアミノキシダーゼの安定化剤であるアルコール化合物やキレート試薬、ポリアミノキシダーゼの基質特異性改良剤である界面活性剤が添加されていてもよい。また、必要により、塩化ナトリウム、塩化カリウム、アジ化ナトリウム等の各種無機塩、デキストラン等の多糖類、BSA、グリセロール、アミノ酸等を共存させてもよい。この液状の製剤を凍結乾燥や噴霧乾燥してもよい。

[0070] ポリアミノキシダーゼの反応による生成物は、いかなる方法により測定してもよい。例えば、生成する過酸化水素は、ペルオキシダーゼ及び適当な発色試薬、発光試薬を用いる酵素的測定法、若しくは酵素電極を用いる電気的方法等で測定すること

ができる。また、生成するアルデヒドをアルデヒドオキシダーゼやアルデヒドデヒドロゲナーゼと適当な発色試薬を組み合わせることもできる。例えば、酵素を用いる反応生成物の検出試薬には、トリス、リン酸、酢酸、クエン酸、シュウ酸、MES、BE S、HEPES、TES、ピシン、トリシン、グリシン、ホウ酸、Bis-Tris propane、イミダゾール等の緩衝剤、FAD、NAD、NADP、NADH、NADPH等の補酵素、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、フェノール、TOOS、DA-67等の過酸化水素検出試薬、1-Methoxy PMSやWST-8(ホルマザン試薬)等の酸化還元系発色試薬、カタラーゼ等の酵素のいずれか1つ以上を含有させることができる。これに、ポリアミノオキシダーゼの安定化剤であるアルコール化合物やキレート試薬、基質特異性改良剤である界面活性剤を適宜添加してもよい。また、必要により、塩化ナトリウム、塩化カリウム、アジ化ナトリウム等の各種無機塩、デキストラン等の多糖類、BSA、グリセロール、アミノ酸等を共存させてもよい。この液状の製剤を凍結乾燥や噴霧乾燥してもよい。

[0071] ポリアミノオキシダーゼ反応の生成物の測定を行う際、ポリアミノオキシダーゼ反応とその生成物の検出を同時に行うことも可能である。前述の反応生成物の検出試薬に、ポリアミノオキシダーゼを0.05~1000 U/ml、好ましくは0.2~100 U/mlとなるように添加することが好ましい。この液状の製剤を凍結乾燥や噴霧乾燥してもよい。

[0072] ジアセチルポリアミンの測定に用いる検体の量、上記の各試薬の添加量、比率については特に限定されない。

[0073] [ジアセチルポリアミンの測定試薬]

さらに本発明では、上記測定方法に使用されるジアセチルポリアミンの測定試薬を提供する。ジアセチルポリアミンの測定試薬は上述の各試薬を異なる容器に含むものとして調製すればよく、例えば、液状品、又は液状品の凍結物若しくは凍結乾燥品として提供できる。あるいは、アルコール化合物及び／又はキレート試薬、及び／又は界面活性剤とポリアミノオキシダーゼを含有する測定試薬を調製することも可能である。

[0074] [モノアセチルポリアミンを製造する方法]

さらに、これまで記載したポリアミンオキシダーゼの安定化方法、及び／又はポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法を用いて、ジアセチルポリアミンへポリアミンオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造することが可能である。

[0075] 以下、実験例及び実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。本発明の技術的範囲は、これらの例により何ら限定されない。

実施例 1

[0076] (ポリアミンオキシダーゼの活性測定法)

0. 2M Tris-HCl緩衝液(pH7. 5) 0. 9ml、7. 0mM ポリアミン(例えば、ジアセチルスぺルミン)溶液 0. 1ml、15mM TOOS溶液 0. 04ml、150U/mlペルオキシダーゼ(キッコーマン社製)溶液 0. 04ml、1. 76% (w/v) 4-アミノアンチピリン溶液 0. 02mlの混合液を37℃で5分間インキュベートした。酵素は希釈液A[1mMのEDTA及び0. 2% (w/v)のウシ血清アルブミン(BSA、シグマ社製)を含有する50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7. 0)]若しくは希釈液B[1mMのEDTA及び5% (v/v)のエタノールを含有する50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7. 0)]にて適宜希釈した。酵素サンプル 0. 05mlを反応液に添加、混合した。全容1. 15mlを37℃で3分間反応させ、反応開始から3分間の、反応溶液の555nmにおける吸光度の変化を、分光光度計を用いて測定した。ジアセチルスぺルミンオキシダーゼの酵素1Uは、上記測定条件下において、ジアセチルスぺルミンを基質とするときに1分間あたり1 μ molの過酸化水素を生成する酵素量とした。なお、本条件におけるミリモル分子吸光係数を1. 57cm²/ μ molとした。なお、本測定方法は一例を示したものであり、活性測定の試薬の種類や濃度、pHについては何ら制限するものではない。例えば、Tris-HCl緩衝液の代わりにリン酸緩衝液等を用いることもできる。

[0077] (ポリアミンオキシダーゼの安定性試験)

ポリアミンオキシダーゼの安定性試験は、各種試薬を添加した50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7. 0)で酵素サンプルを希釈し、30℃保存による加速試験後の残存活性を比較して行った。加速試験を行った後の該酵素溶液の残存活性は、該酵素溶液調製時における吸光度変化量を100%としたときの相対量(%)として表した。

[0078] (各種アルコール化合物の安定化効果の確認)

5%若しくは10%の各種アルコール化合物を含有する50mMのリン酸緩衝液(pH 7.0)をそれぞれ調製した。これらの各種試薬を含有する緩衝液を用いて、PCT/J P2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42(FERM BP-10603)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液0.1U/mlをそれぞれ調製した。なお、比較例として、アルコール化合物を含有しない50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で、上記酵素溶液0.1U/mlを調製した。各酵素溶液について30℃、6時間の加速試験を行い、その結果を表1に示した。このように各種アルコール化合物について安定化効果が認められた。特開平5-211869に記載のように、エタノール等の有機溶媒の添加は酵素を失活させやすいと考えるのが一般的であるが、今回、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノールのような有機溶媒も本酵素の安定化剤として利用可能であることが示された。

[0079] [表1]

添加試薬	濃度	残存活性(%)
メタノール	5% (v/v)	75
メタノール	10% (v/v)	74
エタノール	5% (v/v)	78
エタノール	10% (v/v)	92
エチレングリコール	5% (v/v)	69
エチレングリコール	10% (v/v)	83
1-プロパノール	5% (v/v)	83
1-プロパノール	10% (v/v)	69
2-プロパノール	5% (v/v)	74
2-プロパノール	10% (v/v)	88
トレハロース	5% (w/v)	66
トレハロース	10% (w/v)	71
キシリトール	5% (w/v)	58
キシリトール	10% (w/v)	62
無添加		51

実施例 2

[0080] (各種キレート試薬の安定化効果の確認)

1mM若しくは5mMの各種キレート試薬を含有する50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)をそれぞれ調製した。これらの各種試薬を含有する緩衝液を用いて、PCT/JP2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42(FERM BP-10603)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液、キャンディダ・グラブラタ Noda162(FERM BP-10602)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液、及び「FEBS Letters」, (英国), 2000年, 476巻, p. 150-154に記載のキャンディダ・ボイディニイ NBRC 10574由来ポリアミンオキシダーゼ溶液を0.1U/mlとしてそれぞれ調製した。

[0081] なお、比較例として、キレート試薬を含有しない50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で、上記各種酵素溶液0.1U/mlを調製した。各酵素溶液について30℃、12時間の加速試験を行い、その結果を表2に示した。このように各種キレート試薬について、3種すべての酵素に対する安定化効果が認められた。なお、EDTAの添加濃度が1mM及び5mM添加のときは、安定化効果はほぼ同等であった。

[0082] [表2]

添加試薬	濃度 (mM)	残存活性(%)		
		デバリオミセス ハンセニイ由来	キャンディダ グラブラタ由来	キャンディダ ボイディニイ由来
EDTA	1	52	86	76
EDTA	5	53	88	77
Me-EDTA	5	57	90	79
EDTA-OH	5	52	89	79
CyDTA	5	59	89	77
DTPA-OH	5	60	89	80
EGTA	5	53	88	78
TTHA	5	59	91	80
無添加		32	76	58

実施例 3

[0083] (アルコール化合物とキレート試薬の共存効果)

アルコール化合物である10% (v/v) エタノール、及び／又はキレート試薬である5 mM EDTAを含有する、50mMのリン酸緩衝液(pH7. 0)をそれぞれ調製した。これらの各種試薬を含有する緩衝液を用いて、PCT/JP2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42 (FERM BP-10603) 由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液0. 1U/mlをそれぞれ調製した。なお、比較例として、試薬を含有しない50mMのリン酸緩衝液(pH7. 0)で、上記酵素溶液0. 1U/mlを調製した。各酵素溶液について30℃、6時間の加速試験を行い、加速試験後の酵素活性を測定した。加速試験前の酵素活性と比較して、加速試験後の安定性を評価し、その結果を図1に示した。アルコール化合物であるエタノール、及びキレート試薬であるEDTAを共存させることによりジアセチルスペルミンオキシダーゼがさらに安定に保持された。

実施例 4

[0084] (安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤の製造)

10% (v/v) エタノール及び1mM EDTAを含有する0.2M リン酸緩衝液(pH 7.0) 9ml、15mM TOOS溶液 0.4ml、150U/ml ペルオキシダーゼ(キッコーマン社製)溶液 0.4ml、1.76% (w/v) 4-アミノアンチピリン溶液 0.2ml、0.5U/ml ジアセチルスペルミンオキシダーゼ[デバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42 (FERM BP-10603) 由来、PCT/JP2006/310648記載のとおり]0.5mlを混合し、よく攪拌して、ポリアミノキシダーゼ製剤(溶液)を製造した。対照製剤として、安定化剤を除いたポリアミノキシダーゼ製剤を調製した。本発明製剤と対照製剤について、30℃、24時間の虐待試験を行い、その結果を図2に示した。対照製剤は、酵素活性がほとんど失われているのに対して、本発明製剤は、酵素活性が安定に保持されていた。

実施例 5

[0085] (安定化されたジアセチルスペルミンオキシダーゼを用いるモノアセチルポリアミンの製造)

10% (v/v) エタノール、1mM EDTA、0.5U/ml カタラーゼ(Sigma社製)及び7mM ジアセチルスペルミン・2塩酸塩(150mg)を含有する60mlの20mM リン酸緩衝液(pH7.5)に、ジアセチルスペルミンオキシダーゼ[デバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42 (FERM BP-10603) 由来、PCT/JP2006/310648に記載のとおり]を1U/mlとなるように添加した。30℃で2日間インキュベートし、TLCでN¹-アセチルスペルミジンの生成を確認した(クロロホルム:メタノール:アンモニア水:水=2:4:1:1、ニンヒドリン発色)。

[0086] セントリプレップ10(アミコン社製)を用いて水で透析し、酵素タンパクを除去した。透析外液を陽イオン交換樹脂[DOWEX 50W-X4(H⁺)]カラム(1cm×10cm)に通し、反応生成物を吸着させた。水で洗浄後、1M アンモニアで溶出させた。溶出液を減圧濃縮した後、クロロホルム:メタノール=1:1の溶媒に溶解させて、シリカゲルカラムカラム(2cm×15cm)に吸着させた。展開溶媒としてクロロホルム:メタノール(1:1~0:1)を用いて溶出させ、N¹-アセチルスペルミジン溶出画分に塩酸を添加した後減圧濃縮し、82mgのN¹-アセチルスペルミジン2塩酸塩を得た(収率76%)。

[0087] 上記の82mgのN¹−アセチルスペルミジン2塩酸塩をエタノールで再結晶し、52mgのN¹−アセチルスペルミジン2塩酸塩を得た(収率47%)。融点と¹H, ¹³C−NMRの測定値は文献既知の値(「Acta Chemica Scandinavica」, (デンマーク), 1989年, 43巻, p. 990−994)と一致した。かくして、PCT/JP2006/310648に記載のN¹−アセチルスペルミジンの製造方法では2U/mlのジアセチルスペルミンオキシダーゼを用いていたが、今回、安定化剤を用いることにより、半分の酵素量で同量のN¹−アセチルスペルミジン2塩酸塩を得ることができた。

実施例 6

[0088] (各種界面活性剤の基質特異性改良効果の確認)

0.3%の各種界面活性剤を含有する0.2M リン酸緩衝液(pH7.5)をそれぞれ調製した。これらの各種界面活性剤を含有する緩衝液を用いて、前記のポリアミンオキシダーゼの活性測定法にて、PCT/JP2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42(FERM BP−10603)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液及びキャンディダ・グラブラタ Noda162(FERM BP−10602)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼについて、ジアセチルスペルミン及びN¹−アセチルスペルミジンに対する酵素活性を測定、比較した。その結果を表3に示した。このように各種界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤と両性界面活性剤を添加することにより、基質特異性の改善効果が認められた。

[0089] [表3]

界面活性剤	N ¹ -AcSpdに対する反応性 (%)※ (DASpmに対する反応性を100%とする)	
	デバリオミセス由来	キャンディダ由来
無添加	29.7	49.5
Triton X-100 (非イオン性、和光純薬工業社製)	13.2	
Triton X-405 (非イオン性、ナカライテスク社製)	11.1	
Tween 20 (非イオン性、和光純薬工業社製)	7.4	
Tween 40 (非イオン性、和光純薬工業社製)	11.0	
Tween 80 (非イオン性、和光純薬工業社製)	11.8	
Tween 85 (非イオン性、和光純薬工業社製)	11.9	
Brij 35 (非イオン性、和光純薬工業社製)		38.6
Brij 58 (非イオン性、シグマ社製)	4.4	
Brij 78 (非イオン性、シグマ社製)	7.3	
エマルゲン913 (非イオン性、花王社製)	12.9	
CHAPSO (両性、同仁化学社製)	17.0	

※N¹-AcSpd : N¹-アセチルスぺルミジン

DASpm : ジアセチルスぺルミン

デバリオミセス由来 : デバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42 (FERM BP-10603) 由来ジアセチルスぺルミンオキシダーゼ

キャンディダ由来 : キャンディダ・グラブラタ Noda162 (FERM BP-10602) 由来ジアセチルスぺルミンオキシダーゼ

実施例 7

[0090] (pH条件の基質特異性改良効果の確認)

pH6.5～7.5の0.2M リン酸緩衝液をそれぞれ調製した。これらの緩衝液を用いて、前記のポリアミンオキシダーゼの活性測定法にて、PCT/JP2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42 (FERM BP-10603) 由来ジアセチルスぺルミンオキシダーゼ溶液及びキャンディダ・グラブラタ Noda162 (FERM BP-10602) 由来ジアセチルスぺルミンオキシダーゼについて、各種ポリアミンに対する酵素活性を測定、比較した。その結果を表4に示した。このようにpHを7.5未満にすることにより、基質特異性の改善効果が認められた。

[0091] [表4]

酵素の由来	pH	N ¹ -AcSpdlに対する反応性 (%)※ (DASpmに対する反応性を100とする)
デバリオミセス ハンセニイ Tsukuba 42	7.5	29.7
	7.0	19.9
	6.5	11.9
キャンディダ グラブラタ Noda 162	7.5	49.5
	7.0	34.8
	6.5	21.3

※N¹-AcSpdl : N¹-アセチルスペルミジン

DASpm : ジアセチルスペルミン

実施例 8

[0092] (界面活性剤の添加とpH条件を組み合わせた基質特異性改良効果の確認)

0.3%のTritonX-100を含有する0.2M リン酸緩衝液(pH6.5~7.5)を調製し、前記のポリアミンオキシダーゼの活性測定法にて、PCT/JP2006/310648に記載のデバリオミセス・ハンセニイ Tsukuba42(FERM BP-10603)由来ジアセチルスペルミンオキシダーゼ溶液について、各種ポリアミンに対する酵素活性を測定、比較した。その結果を表5に示した。このようにTritonX-100を添加し、かつpHを7.5未満とすることにより、さらなる基質特異性の改善効果が認められた。なお、いずれの条件においてもプトレッシンには反応しなかった。

[0093] [表5]

pH	0. 3% Triton X-100	各種ポリアミンに対する反応性※ (DASpmに対する反応性を100とする)					
		DASpd	N ¹ - AcSpm	N ¹ - AcSpd	N ⁸ - AcSpd	Spm	Spd
7. 5	無添加	51. 0	36. 7	29. 7	3. 5	0	0
7. 0	無添加	38. 5	19. 5	19. 9	1. 4	0	0
7. 0	添加	18. 6	7. 8	7. 8	1. 0	0	0
6. 5	無添加	25. 8	9. 4	11. 9	0. 6	0	0
6. 5	添加	15. 2	6. 1	7. 0	0. 5	0	0

※DASpm：ジアセチルスペルミン、DASpd：ジアセチルスペルミジン、
N¹-AcSpm：N¹-アセチルスペルミン、N¹-AcSpd：N¹-アセチ
ルスペルミジン、N⁸-AcSpd：N⁸-アセチルスペルミジン、Spm：ス
ペルミン、Spd：スペルミジン

なお、いずれの条件においてもプトレッシンには反応しなかった。

実施例 9

[0094] (ポリアミンオキシダーゼを含有する試薬を用いる、ジアセチルポリアミンの測定方
法。)

第1試薬

MES緩衝液(pH7. 0) 50mM
DA-67 0. 05mM
TritonX-100 0. 04%
アジ化ナトリウム 0. 09%

第2試薬

MES緩衝液(pH7. 0) 50mM
ジアセチルスペルミンオキシダーゼ(デバリオミセス由来) 24U/mL
ペルオキシダーゼ(西洋ワサビ由来) 15U/mL

[0095] 生理食塩水で希釈調製したジアセチルスペルミン試料(125nM~500nM)各10
μLに第1試薬80μLを混和し、37℃で5分間加温した。続いて第2試薬30μLを添
加し、5分間反応させた後の658nmにおける吸光度を測定し、その結果を図3に示

した。かくして、ジアセチルスペルミンオキシダーゼを用いた試薬でジアセチルスペルミンを簡便かつ短時間に測定することができることがわかった。

実施例 10

[0096] (ポリアミンオキシダーゼを含有する試薬を用いる、尿検体中のジアセチルポリアミンの測定方法。)

第1試薬

TES緩衝液(pH7.7)	50mM
TOOS	1mM
TritonX-100	1.5%
KCl	70mM
カタラーゼ	300U/mL
アスコルビン酸オキシダーゼ	3U/mL

第2試薬

TES緩衝液(pH7.7)	50mM
TritonX-100	1.5%
KCl	70mM
4-アミノアンチピリン	4mM
ジアセチルスペルミンオキシダーゼ(デバリオミセス由来)	24U/mL
ペルオキシダーゼ(西洋ワサビ由来)	15U/mL
アジ化ナトリウム	0.09%

[0097] 尿検体にジアセチルスペルミン(32nM~500nM)を添加して調整した試料各10 μ Lに、第1試薬80 μ Lを混和し、37°Cで5分間加温した。続いて第2試薬30 μ Lを5分間反応させた後の550nmにおける吸光度を測定し、その結果を図4に示した。

かくして、ジアセチルスペルミンオキシダーゼを用いた試薬で尿試料中のジアセチルスペルミンを測定することができることがわかった。

産業上の利用可能性

[0098] 本発明の安定化方法を用いて、アルコール化合物及び／又はキレート試薬とポリアミノキシダーゼを含有する安定化されたポリアミノキシダーゼ製剤を、簡単な方法でかつ安価に製造することができる。また、本発明の基質特異性の改良方法を用いて、界面活性剤とポリアミノキシダーゼを含有する基質特異性が改良されたポリアミノキシダーゼ製剤を、簡単な方法でかつ安価に製造することができる。さらに、ジアセチルポリアミン測定用試薬を簡単な方法でかつ安価に製造することができる。

紙面による写し(注意: 電子データが原本となります)
 [この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、	JPO-PAS 0340
0-1-1	右記によって作成された。	
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	PCT-AB07009
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0030
1-3	寄託の表示	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD) 日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 2006年 05月 10日 (10. 05. 2006) IPOD FERM BP-10602
1-3-1	寄託機関の名称	
1-3-2	寄託機関のあて名	
1-3-3	寄託の日付	
1-3-4	受託番号	
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
2-1	段落番号	0030
2-3	寄託の表示	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD) 日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6 2006年 05月 10日 (10. 05. 2006) IPOD FERM BP-10603
2-3-1	寄託機関の名称	
2-3-2	寄託機関のあて名	
2-3-3	寄託の日付	
2-3-4	受託番号	
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

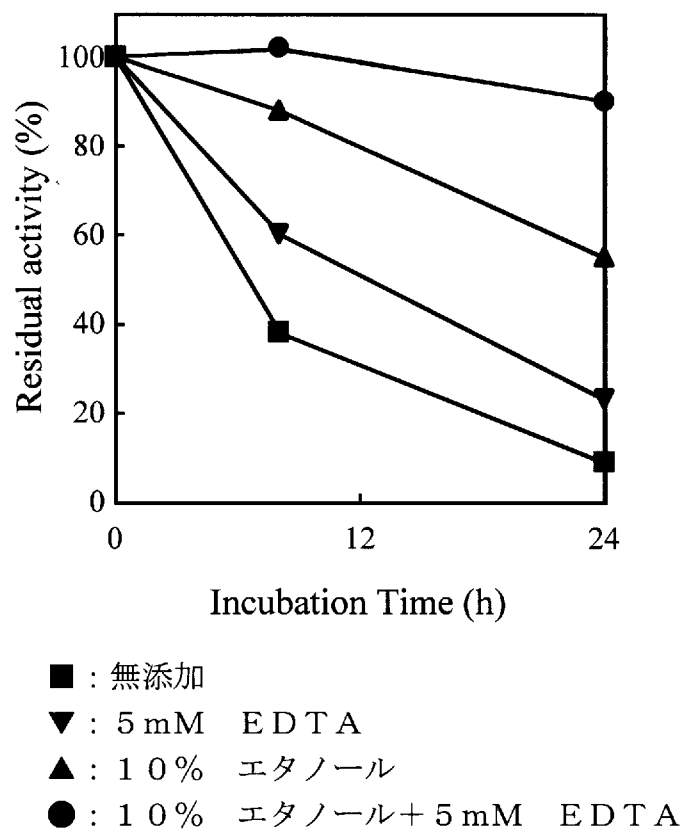
請求の範囲

- [1] アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを共存させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの安定化方法。
- [2] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、請求項1に記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法。
- [3] 界面活性剤存在下にてポリアミンオキシダーゼを作用させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。
- [4] ポリアミンオキシダーゼをpH7.5未満で作用させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。
- [5] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、請求項3～4のいずれかに記載のポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法。
- [6] ポリアミンオキシダーゼを含有する試薬を試料に作用させて、ジアセチルポリアミンを測定することを特徴とする、ジアセチルポリアミンの測定方法。
- [7] アルコール化合物及び／又はキレート試薬により安定化されたポリアミンオキシダーゼを用いることを特徴とする、請求項6に記載の測定方法。
- [8] 界面活性剤により基質特異性が改良されたポリアミンオキシダーゼを用いることを特徴とする、請求項6～7のいずれかに記載の測定方法。
- [9] ポリアミンオキシダーゼをpH7.5未満で作用させることを特徴とする、請求項6～8のいずれかに記載の測定方法。
- [10] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、請求項6～9のいずれかに記載のジアセチルポリアミンの測定方法。
- [11] アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする、安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤。
- [12] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスペルミンオキシダーゼである、請求項11に記載の安定化されたポリアミンオキシダーゼ製剤。
- [13] ポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする、ジアセチルポリアミンの測定試薬。
- [14] アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを含有するこ

とを特徴とする請求項13に記載のジアセチルポリアミンの測定試薬。

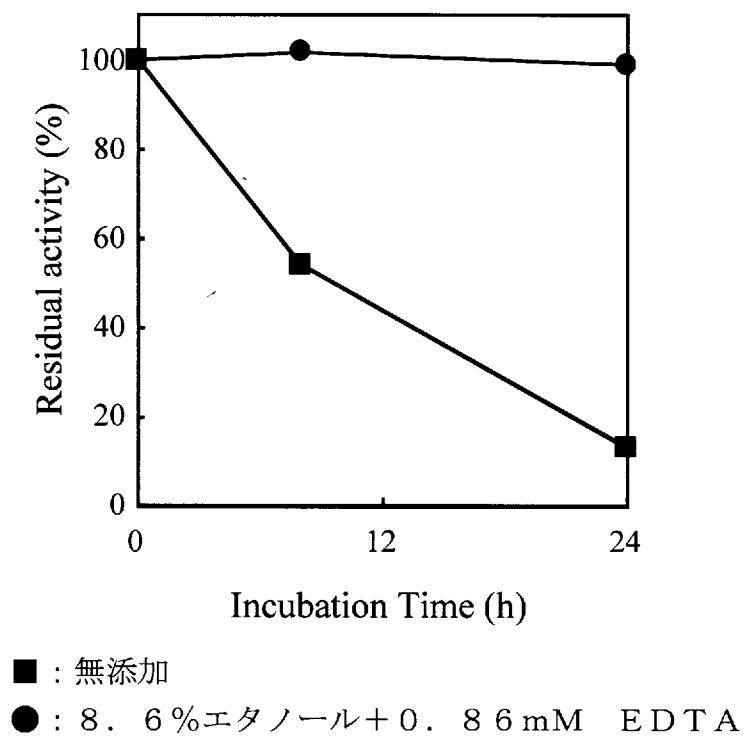
- [15] 界面活性剤とポリアミンオキシダーゼを含有することを特徴とする請求項13又は14のいずれかに記載のジアセチルポリアミン測定試薬。
- [16] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスぺルミンオキシダーゼである、請求項13～15のいずれかに記載のジアセチルポリアミン測定試薬。
- [17] 請求項1又は2記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法、及び／又は請求項3～5のいずれか一項に記載のポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法を用いることを特徴とする、ジアセチルポリアミンへポリアミンオキシダーゼを作用させてモノアセチルポリアミンを製造する方法。
- [18] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスぺルミンオキシダーゼである、請求項17記載のモノアセチルポリアミンの製造方法。
- [19] 請求項1又は2記載のポリアミンオキシダーゼの安定化方法を利用することを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの精製方法。
- [20] ポリアミンオキシダーゼがジアセチルスぺルミンオキシダーゼである、請求項19記載のポリアミンオキシダーゼの精製方法。

[図1]



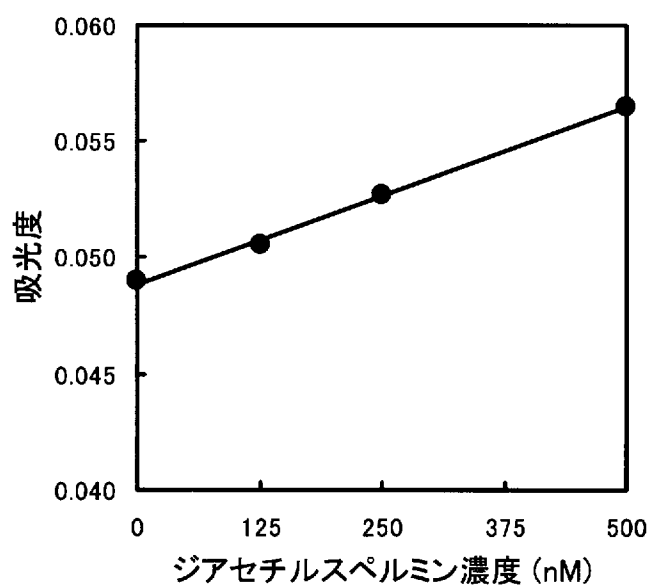
処理条件：50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、30℃

[図2]

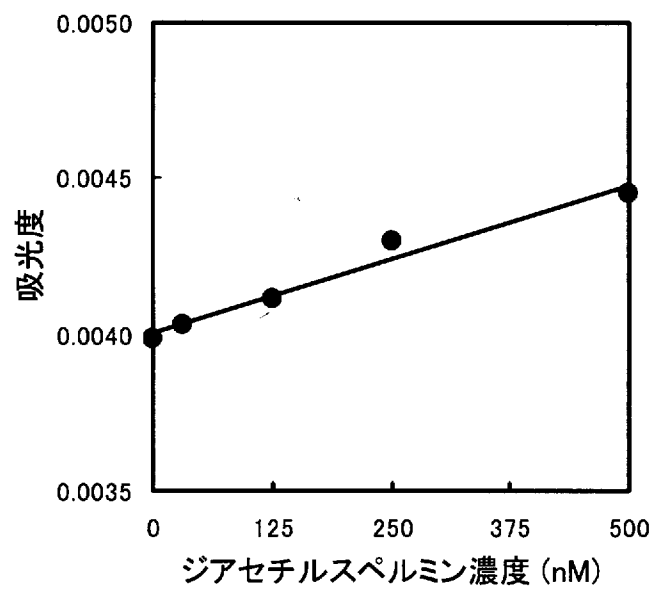


処理条件 : 171 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、30°C

[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/96(2006.01) i, C12N9/06(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)

C12N9/96, C12N9/06

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)

PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHUKLA O.P., et al., Polyamine oxidase from Acanthamoeba culbertsoni specific for N8-acetylspermidine., Mol.Biochem.Parasitol., 1992, Vol. 51, No. 1, p. 91-98, abstract; page 94, left column, line 7 to right column, line 15; table 2	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 7-194378 A (Fuji Seito Kabushiki Kaisha), 01 August, 1995 (01.08.95), (Family: none)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 2003-116539 A (Kikkoman Corp.), 22 April, 2003 (22.04.03), (Family: none)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20

☒ 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
07 May, 2007 (07.05.07)

Date of mailing of the international search report
22 May, 2007 (22.05.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052732

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 43-24452 B1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 October, 1968 (22.10.68), (Family: none)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 32-1848 B1 (American Home Products Corp.), 20 March, 1957 (20.03.57), (Family: none)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052732

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/052732

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The inventions according to claims 1-20 include 3 invention groups described below.

1. The inventions according to claims 1, 2, 7, 11, 12, 14, 19 and 20 and a part of the inventions according to claims 9, 10, 16-18 relate to a method for stabilizing polyamine oxidase, characterized by allowing an alcohol compound and/or a chelating reagent to coexist with polyamine oxidase.

2. The inventions according to claims 3-5, 8 and 15 and a part of the inventions according to claims 9, 10, 16-18 relate to a method for improving substrate specificity of polyamine oxidase, characterized by allowing polyamine oxidase to act on in the presence of a surfactant.

3. The invention according to claim 6 and a part of the inventions according to claims 9 and 10, and invention according to claim 13 and a part of the invention according to claim 16 relate to measurement of diacetyl polyamine containing polyamine oxidase.

The common matter of invention groups 1, 2 and 3 is polyamine oxidase. However, polyamine oxidase is a known enzyme as described in the document 1 below, therefore, this common matter is not a technical feature that defines a contribution which each invention makes over the prior art, therefore, it is not a "special technical feature". Thus, there is no technical relevancy among these 3 invention groups involving one or more of the same or corresponding special technical feature, therefore, they are not so linked as to form a single general inventive concept.

Document 1: SHUKLA O. P., et al., Polyamine oxidase from *Acanthamoeba culbertsoni* specific for N8-acetylspermidine., Mol. Biochem. Parasitol., 1992, Vol. 51, No. 1, pp. 91-98, Abstract, left column line 7 to right column line 15, Page 94, Table 2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N9/96(2006.01)i, C12N9/06(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. C12N9/96, C12N9/06

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

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）

PubMed, JSTPlus(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	SHUKLA O.P., et al., Polyamine oxidase from Acanthamoeba culbertsoni specific for N8-acetylspermidine., Mol.Biochem.Parasitol., 1992, Vol. 51, No. 1, p. 91-98, 要約、第94頁左欄第7行ー右欄第15行、第2表	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 7-194378 A（フジ製糖株式会社）1995.08.01（ファミリーなし）	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20

☒ 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 7 . 0 5 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 5 . 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100-8915

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）

三原 健治

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

3 4 3 4

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 2003-116539 A (キッコーマン株式会社) 2003. 04. 22 (ファミリーなし)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 43-24452 B1 (小野薬品工業株式会社) 1968. 10. 22 (ファミリーなし)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20
A	JP 32-1848 B1 (アメリカン、ホーム、プロダクツ、コーポレーション) 1957. 03. 20 (ファミリーなし)	1, 2, 7, 9-12, 14, 16-20

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1、2、7、9－12、14、16－20

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

請求の範囲 1－20 に係る発明は以下のとおり 3 つの発明を包含するものである。

1. 請求の範囲 1、2、7、11、12、14、19、20 に係る発明、及び、請求の範囲 9、10、16－18 に係る発明の一部は、アルコール化合物及び／又はキレート試薬と、ポリアミンオキシダーゼを共存させることを特徴とするポリアミンオキシダーゼの安定化方法に関するものである。

2. 請求の範囲 3－5、8、15 及び、請求項 9、10、16－18 に係る発明の一部は、界面活性剤存在下においてポリアミンオキシダーゼを作用させることを特徴とする、ポリアミンオキシダーゼの基質特異性の改良方法に関するものである。

3. 請求の範囲 6 に係る発明及び 9、10 に係る発明の一部、並びに、13 に係る発明及び請求の範囲 16 に係る発明の一部は、ポリアミンオキシダーゼを含有するジアセチルポリアミンの測定に関するものである。

第 1、2 及び 3 の発明の共通事項は、ポリアミンオキシダーゼであるが、下記文献 1 に記載されるように、ポリアミンオキシダーゼが公知の酵素である以上、当該共通事項は、先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴とはいえず、「特別な技術的特徴」とは認められない。したがって、これらの 3 つの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

文献 1 : SHUKLA O.P., et al., Polyamine oxidase from *Acanthamoeba culbertsoni* specific for N8-acetylspermidine., Mol.Biochem.Parasitol., 1992, Vol. 51, No. 1, p. 91-98, 要約、第 94 頁左欄第 7 行－右欄第 15 行、第 2 表