(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-123302
(P2016-123302A)
(43)公開日　平成28年7月11日(2016.7.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q	1/26		4B029
C12M 1/34	(2006.01)	C12M	1/34	E	4B050
C12N 9/06	(2006.01)	C12N	9/06	B	4B063
C12Q 1/54	(2006.01)	C12Q	1/54		

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 52 頁）

(21)出願番号　特願2014-265479 (P2014-265479)
(22)出願日　平成26年12月26日 (2014.12.26)

(71)出願人　000004477
キッコーマン株式会社
千葉県野田市野田２５０番地
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(74)代理人　100182992
弁理士　江島　孝毅
(72)発明者　鉞　陽介
千葉県野田市野田２５０番地　キッコーマン株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】グッド緩衝液に対して安定なアマドリアーゼ

(57)【要約】　（修正有）
【課題】糖尿病の診断用酵素として使用するグッド緩衝液の存在下で安定なアマドリアーゼ及びこれを含む糖化ヘモグロビン測定用組成物の提供。
【解決手段】特定のアミノ酸配列に示すアマドリアーゼの２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであるか、又は特定のアミノ酸配列に示すアマドリアーゼの２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであるか、又は特定のアミノ酸配列に示すアマドリアーゼの３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンであり、グッド緩衝液の存在下でも活性を有するアマドリアーゼ、並びにこれを含む糖化ヘモグロビン測定用組成物。前記アマドリアーゼを用いることによりグッド緩衝液の存在下でも安定性に優れた酵素及び糖化ヘモグロビン測定用組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
(i)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位、２９０位、及び３１１位からなる群より選択される位置に対応する位置において1以上のアミノ酸置換を有し、アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１、６又は９のアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有するアマドリアーゼ、
(ii)前記(i)のアマドリアーゼにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位、２９０位及び３１１位に対応する位置以外の位置における１又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアマドリアーゼ活性を有するアマドリアーゼ、或いは
(iii)前記(i)のアマドリアーゼにおいて、当該アマドリアーゼの全長アミノ酸配列が配列番号１、６又は９のアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有し、配列番号１の第１０位～３２位、３６～４１位、４９～５２位、５４～５８位、６３～６５位、７３～７５位、８４～８６位、８８～９０位、１２０～１２２位、１４５～１５０位、１５６～１６２位、１６４～１７０位、１８０～１８２位、２０２～２０５位、２０７～２１１位、２１４～２２４位、２２７～２３０位、２３６～２４１位、２４３～２４８位、２５８～２６１位、２６６～２６８位、２７０～２７３位、２７５～２８７位、２９５～２９７位、３０６～３０８位、３１０～３１６位、３２４～３２９位、３３２～３３４位、３４１～３４４位、３４６～３５５位、３５７～３６３位、３７０～３８３位、３８５～３８７位、３８９～３９４位、４０５～４１０位及び４２３～４３１位のアミノ酸配列からなる相同性領域におけるアミノ酸配列と当該アマドリアーゼの対応する位置の相同性領域におけるアミノ酸配列とが９０％以上の配列同一性を有し、かつアマドリアーゼ活性を有するアマドリアーゼ。
【請求項２】
アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンである、配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンである、及び配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、からなる群より選択されるアミノ酸置換を1以上有する、請求項１に記載のアマドリアーゼ。
【請求項３】
アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、
（i）配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンである、
（ii）配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、又は
（iii）配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、請求項１又は２に記載のアマドリアーゼ。
【請求項４】
アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、配列番号１に示すアミノ酸配列における２

９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、請求項１～３のいずれか１項に記載のアマドリアーゼ。

【請求項５】

前記アマドリアーゼが、コニオカエタ(Coniochaeta)属、ユーペニシリウム(Eupenicillium)属、ピレノケータ(Pyrenochaeta)属、アルスリニウム(Arthrinium)属、カーブラリア(Curvularia)属、ネオコスモスポラ(Neocosmospora)属、クリプトコッカス(Cryptococcus)属、フェオスフェリア(Phaeosphaeria)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、エメリセラ(Emericella)属、ウロクラディウム(Ulocladium)属、ペニシリウム(Penicillium)属、フザリウム(Fusarium)属、アカエトミエラ(Achaetomiella)属、アカエトミウム(Achaetomium)属、シエラビア(Thielavia)属、カエトミウム(Chaetomium)属、ゲラシノスポラ(Gelasinospora)属、ミクロアスカス(Microascus)属、レプトスフェリア(Leptosphaeria)属、オフィオボラス(Ophiobolus)属、プレオスポラ(Pleospora)属、コニオケチジウム(Coniochaetidium)属、ピチア(Pichia)属、デバリオマイセス(Debaryomyces)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、又はアルスロバクター(Arthrobacter)属由来である、請求項１～４のいずれか１項に記載のアマドリアーゼ。

【請求項６】

配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２又は配列番号１３に示すアミノ酸配列を有し、かつ請求項１～４のいずれかに規定したアミノ酸置換を有する、請求項１～４のいずれか１項に記載のアマドリアーゼ。

【請求項７】

請求項１～６のいずれか１項に記載のアミノ酸配列をコードするアマドリアーゼ遺伝子。

【請求項８】

以下の工程：

（ｉ）請求項７に記載の遺伝子が形質導入された宿主細胞を培養する工程；

（ｉｉ）宿主細胞に含まれるアマドリアーゼ遺伝子を発現させる工程；及び

（ｉｉｉ）培養物からアマドリアーゼを単離する工程を含む、アマドリアーゼを製造する方法。

【請求項９】

請求項１～６のいずれか１項に記載のアマドリアーゼ、並びに、アセトアミドグリシン、ＡＣＥＳ（N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸）、ＡＤＡ（N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸)、ＢＥＳ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸）、Ｂｉｃｉｎ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン）、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ（ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン）、コラミン塩酸、ＥＰＰＳ（4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸)、グリシンアミド、ＨＥＰＥＳ（4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸）、ＨＥＰＰＳＯ（N-(ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＭＥＳ（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）、ＭＯＰＳ（3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸）、ＭＯＰＳＯ（2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸）、ＰＩＰＥＳ（ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)）、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)）、ＴＡＰＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＴＡＰＳＯ（3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＴＥＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸）、トリシン（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン）、ＡＭＰＳＯ（N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＣＡＢＳ（4-(シクロヘキシルアミノ)-1-ブタンスルホン酸）、ＣＡＰＳ（N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＣＨＥＳ（N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸）、ＣＡＰＳＯ（N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）

、ＤＩＰＳＯ（3-(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）及びこれらの混合物からなる群より選択されるグッド緩衝剤を含む、ヘモグロビンＡ１ｃ測定用試薬キット。

【請求項１０】

請求項１～６のいずれか１項に記載のアマドリアーゼ又は請求項９に記載のキットを用いる、糖化ヘモグロビンの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、糖尿病の診断用酵素として、また、糖尿病マーカーの測定キットに有利に利用され得るグッド緩衝液に対して安定なアマドリアーゼ、その遺伝子及び組換え体ＤＮＡ並びに製造方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

糖化タンパク質は、グルコースなどのアルドース（アルデヒド基を潜在的に有する単糖及びその誘導体）のアルデヒド基と、タンパク質のアミノ基が非酵素的に共有結合を形成し、アマドリ転移することにより生成したものである。タンパク質のアミノ基としてはアミノ末端のαアミノ基、タンパク質中のリシン残基側鎖のεアミノ基が挙げられる。生体内で生じる糖化タンパク質としては血液中のヘモグロビンが糖化された糖化ヘモグロビン、アルブミンが糖化された糖化アルブミンなどが知られている。

【０００３】

これら生体内で生じる糖化タンパク質の中でも、糖尿病の臨床診断分野において、糖尿病患者の診断や症状管理のための重要な血糖コントロールマーカーとして、糖化ヘモグロビン（ＨｂＡ１ｃ）が注目されている。血液中のＨｂＡ１ｃ濃度は過去の一定期間の平均血糖値を反映しており、その測定値は糖尿病の症状の診断や管理において重要な指標となっている。

【０００４】

このＨｂＡ１ｃを迅速かつ簡便に測定する方法として、アマドリアーゼを用いる酵素的方法、すなわち、ＨｂＡ１ｃをプロテアーゼ等で分解し、そのβ鎖アミノ末端より遊離させたα－フルクトシルバリルヒスチジン（以降「αＦＶＨ」と表す。）若しくはα－フルクトシルバリン（以降「αＦＶ」と表す。）を定量する方法が提案されている（例えば、特許文献１～７参照。）。実際には、ＨｂＡ１ｃからαＦＶを切り出す方法では、夾雑物等による影響が大きく、正確な測定値が得られないという課題があり、より正確な測定値を得る目的から、特に現在ではαＦＶＨを測る方法が主流となっている。

【０００５】

アマドリアーゼは、酸素の存在下で、イミノ２酢酸若しくはその誘導体（「アマドリ化合物」ともいう）を酸化して、グリオキシル酸又はα－ケトアルデヒド、アミノ酸又はペプチド及び過酸化水素を生成する反応を触媒する。

【０００６】

アマドリアーゼは、細菌、酵母、真菌から見出されているが、特にＨｂＡ１ｃの測定に有用である、αＦＶＨ及び／又はαＦＶに対する酵素活性を有するアマドリアーゼとしては、例えば、コニオカエタ（Coniochaeta）属、ユーペニシリウム（Eupenicillium）属、ピレノケータ（Pyrenochaeta）属、アルスリニウム（Arthrinium）属、カーブラリア（Curvularia）属、ネオコスモスポラ（Neocosmospora）属、クリプトコッカス（Cryptococcus）属、フェオスフェリア（Phaeosphaeria）属、アスペルギルス（Aspergillus）属、エメリセラ（Emericella）属、ウロクラディウム（Ulocladium）属、ペニシリウム（Penicillium）属、フザリウム（Fusarium）属、アカエトミエラ（Achaetomiella）属、アカエトミウム（Achaetomium）属、シエラビア（Thielavia）属、カエトミウム（Chaetomium）属、ゲラシノスポラ（Gelasinospora）属、ミクロアスカス（Microascus）属、レプトスフェリア（Leptosphaeria）属、オフィオボラス（Ophiobolus）属、プレオスポラ（Pleospo

ra）属、コニオケチジウム（Coniochaetidium）属、ピチア（Pichia）属、コリネバクテリウム（Corynebacterium）属、アグロバクテリウム（Agrobacterium）属、アルスロバクター（Arthrobacter）属由来のアマドリアーゼが報告されている（例えば、特許文献１、６～１５、非特許文献１～１１参照。）。なお、上記報告例の中で、アマドリアーゼは、文献によってはケトアミンオキシダーゼやフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、フルクトシルアミンオキシダーゼ等の表現で記載されている場合もある。

【０００７】

ＨｂＡ１ｃを測定する際に、測定用の試薬組成物中にはアマドリアーゼが過剰に含有されていることが知られている。例えば、終濃度０．３６μＭのＨｂＡ１ｃを測定する際に、アマドリアーゼは１．４ｋＵ／Ｌ、すなわち１分間当たり１．４ｍＭの基質を反応させることができる濃度を用いている（特許文献１６参照。）。アマドリアーゼを用いたＨｂＡ１ｃの測定は、自動分析装置を用いた手法が主流となっており、そのアマドリアーゼの基質との反応時間は５分～２５分程度で測定を行うことが多い。アマドリアーゼを過剰量で含有させる理由は、上記のような短時間の測定時間の中で基質に対し十分に反応させるためであり、また、アマドリアーゼの反応性や安定性に大きな負の影響を与え得る物質が測定用組成物中に共存する場合には、この影響への対策として、アマドリアーゼを過剰に配合せざるを得ないためである。

【０００８】

測定用組成物にはリン酸緩衝液やクエン酸緩衝液等が使用されることがある。しかしながらＨｂＡ１ｃ測定キットでは、リン酸やクエン酸は血液中のカルシウムと反応し、沈殿物を生じさせるという問題がある。

【０００９】

公知の文献中に各種アマドリアーゼの液状における安定性に関する開示がみられる：Coniochaeta sp. NISL 9330株由来アマドリアーゼを含んだ溶液に、５ｍＭのエチレンジアミン４酢酸及び３％のグリシンを添加した際は、３０℃、７日間後において７９％の残存活性を維持していることが特許文献１７に示されている。特許文献１７では、安定化剤を使用しない場合、20mMのトリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）にConiochaeta sp. NISL 9330株由来アマドリアーゼを添加し、３０℃、７日間保存した後の酵素活性が１％まで低下したことが報告されている。また、Fusarium oxysporum IFO-9972株由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含んだ溶液に、３％のＬ－アラニン、３％のグリシン又は３％のザルコシンを添加した際は、３７℃、２日間後において１００％の残存活性を維持していることが特許文献１８に示されている。特許文献１８では、安定化剤を使用しない場合、150mMのトリス－HCl緩衝液（pH 8.5）及びFusarium oxysporum IFO-9972株由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含んだ溶液を、３７℃、２日間保存した後の相対感度は３０％に低下したことが記載されている。特許文献１９は、ＡＣＥＳ、ＡＤＡ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含む組成物における、ハロゲン酸化物の有無による測定への影響を記載している。記載されている組成物は安定化剤を含むものである。

【００１０】

しかしながら、グッド緩衝液に対して安定なアマドリアーゼ、例えばグッド緩衝液の存在下で熱安定なアマドリアーゼに関する報告はされていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】国際公開第２００４／１０４２０３号
【特許文献２】国際公開第２００５／４９８５７号
【特許文献３】特開２００１－９５５９８号公報
【特許文献４】特公平０５－３３９９７号公報
【特許文献５】特開平１１－１２７８９５号公報
【特許文献６】国際公開第９７／１３８７２号

【特許文献７】特開２０１１－２２９５２６号公報
【特許文献８】特開２００３－２３５５８５号公報
【特許文献９】特開２００４－２７５０１３号公報
【特許文献１０】特開２００４－２７５０６３号公報
【特許文献１１】特開２０１０－３５４６９号公報
【特許文献１２】特開２０１０－５７４７４号公報
【特許文献１３】国際公開第２０１０／４１７１５号
【特許文献１４】国際公開第２０１０／４１４１９号
【特許文献１５】国際公開第２０１１／１５３２５号
【特許文献１６】国際公開第２０１２／０２０７４４号
【特許文献１７】特開２００６－３２５５４７号公報
【特許文献１８】特開２００９－０００１２８号公報
【特許文献１９】国際公開第２０１２／１７３１８５号
【非特許文献】
【００１２】
【非特許文献１】Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 104-11, 2003
【非特許文献２】Biotechnol. Bioeng. 106, 358-66, 2010
【非特許文献３】J. Biosci. Bioeng. 102, 241-3, 2006
【非特許文献４】Eur. J. Biochem. 242, 499-505, 1996
【非特許文献５】Arch.Microbiol.178,344-50, 2002
【非特許文献６】Mar.Biotechnol.6,625-32, 2004
【非特許文献７】Biosci. Biotechnol. Biochem.59, 487-91, 1995
【非特許文献８】Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 813-819, 2007
【非特許文献９】Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 1256-61, 2002
【非特許文献１０】Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 2323-29, 2002
【非特許文献１１】Biotechnol. Letters 27, 27-32, 2005
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
上述のように従来、アマドリアーゼは、測定時間中に基質に対し十分に反応するよう過剰量で使用されてきた。本発明者は、従来より利用されているアマドリアーゼ（FPOX）がリン酸のようなアニオンに対して高い安定性を示す一方で、ＨＥＰＥＳやＴＥＳ等のグッド緩衝液に対して安定性が低いことを今回新たに見出した。よって、従来のアマドリアーゼよりも、グッド緩衝液の存在下で安定な酵素を作製すれば、生化学検査に広く使用されているグッド緩衝剤の使用が容易となり、酵素及びキットの流通や反応における利便性や、キットに処方するアマドリアーゼや安定化剤の量の低減による低コスト化に貢献することができる。したがって本発明が解決しようとする課題は、従来のアマドリアーゼと比較してグッド緩衝液の存在下でも安定なアマドリアーゼを提供すること、例えばグッド緩衝液の存在下でも熱安定性の高いアマドリアーゼを提供すること、並びにグッド緩衝液存在下でも、ＨｂＡ１ｃ又はそれに由来する糖化ペプチドの定量が可能な試薬組成物を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
酵素に、グッド緩衝液の存在下での安定性をアマドリアーゼに付与するための情報がほとんど開示されていない中で、本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、アマドリアーゼに特定のアミノ酸残基の置換を導入することにより、また、グッド緩衝液の存在下でも活性が残存するアマドリアーゼを試薬組成物に含有することにより、上記課題を解決し得ることを見出した。
【００１５】
すなわち、本発明は以下を包含する。

[１] (i)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位、２９０位、及び３１１位からなる群より選択される位置に対応する位置において1以上のアミノ酸置換を有し、アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１、６又は９のアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有するアマドリアーゼ、

(ii)前記(i)のアマドリアーゼにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位、２９０位及び３１１位に対応する位置以外の位置における１又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアマドリアーゼ活性を有するアマドリアーゼ、或いは

(iii)前記(i)のアマドリアーゼにおいて、当該アマドリアーゼの全長アミノ酸配列が配列番号１、６又は９のアミノ酸配列と７０％以上の配列同一性を有し、配列番号１の第１０位～３２位、３６～４１位、４９～５２位、５４～５８位、６３～６５位、７３～７５位、８４～８６位、８８～９０位、１２０～１２２位、１４５～１５０位、１５６～１６２位、１６４～１７０位、１８０～１８２位、２０２～２０５位、２０７～２１１位、２１４～２２４位、２２７～２３０位、２３６～２４１位、２４３～２４８位、２５８～２６１位、２６６～２６８位、２７０～２７３位、２７５～２８７位、２９５～２９７位、３０６～３０８位、３１０～３１６位、３２４～３２９位、３３２～３３４位、３４１～３４４位、３４６～３５５位、３５７～３６３位、３７０～３８３位、３８５～３８７位、３８９～３９４位、４０５～４１０位及び４２３～４３１位のアミノ酸配列からなる相同性領域におけるアミノ酸配列と当該アマドリアーゼの対応する位置の相同性領域におけるアミノ酸配列とが９０％以上の配列同一性を有し、かつアマドリアーゼ活性を有するアマドリアーゼ。

[２] アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンである、配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンである、及び配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、からなる群より選択されるアミノ酸置換を1以上有する、１に記載のアマドリアーゼ。

[３] アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、

（i）配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンである、

（ii）配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、又は

（iii）配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、１又は２に記載のアマドリアーゼ。

[４] アマドリアーゼ活性を有し、配列番号１記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号１に示すアミノ酸配列における２８８位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アラニン、若しくはグルタミンであり、配列番号１に示すアミノ酸配列における２９０位に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、かつ、配列番号１に示すアミノ酸配列における３１１位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン、アスパラギン、若しくはアラニンである、１～３のいずれかに記載のアマドリアーゼ。

[５] 前記アマドリアーゼが、コニオカエタ(Coniochaeta)属、ユーペニシリウム(Eupenicillium)属、ピレノケータ(Pyrenochaeta)属、アルスリニウム(Arthrinium)属、カーブラ

リア(Curvularia)属、ネオコスモスポラ(Neocosmospora)属、クリプトコッカス(Cryptococcus)属、フェオスフェリア(Phaeosphaeria)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、エメリセラ(Emericella)属、ウロクラディウム(Ulocladium)属、ペニシリウム(Penicillium)属、フザリウム(Fusarium)属、アカエトミエラ(Achaetomiella)属、アカエトミウム(Achaetomium)属、シエラビア(Thielavia)属、カエトミウム(Chaetomium)属、ゲラシノスポラ(Gelasinospora)属、ミクロアスカス(Microascus)属、レプトスフェリア(Leptosphaeria)属、オフィオボラス(Ophiobolus)属、プレオスポラ(Pleospora)属、コニオケチジウム(Coniochaetidium)属、ピチア(Pichia)属、デバリオマイセス(Debaryomyces)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、又はアルスロバクター(Arthrobacter)属由来である、１～４のいずれかに記載のアマドリアーゼ。

[６] 配列番号１、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２又は配列番号１３に示すアミノ酸配列を有し、かつ１～４のいずれかに規定したアミノ酸置換を有する、１～４のいずれかに記載のアマドリアーゼ。

[７] １～６のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードするアマドリアーゼ遺伝子。

[８] 以下の工程：

（ｉ）７に記載の遺伝子が形質導入された宿主細胞を培養する工程；

（ｉｉ）宿主細胞に含まれるアマドリアーゼ遺伝子を発現させる工程；及び

（ｉｉｉ）培養物からアマドリアーゼを単離する工程を含む、アマドリアーゼを製造する方法。

[９] １～６のいずれかに記載のアマドリアーゼ、並びに、アセトアミドグリシン、ＡＣＥＳ（N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸）、ＡＤＡ（N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸)、ＢＥＳ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸）、Ｂｉｃｉｎ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン）、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ（ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン）、コラミン塩酸、ＥＰＰＳ（4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸)、グリシンアミド、ＨＥＰＥＳ（4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸）、ＨＥＰＰＳＯ（N-(ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＭＥＳ（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）、ＭＯＰＳ（3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸）、ＭＯＰＳＯ（2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸）、ＰＩＰＥＳ（ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)）、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)）、ＴＡＰＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＴＡＰＳＯ（3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＴＥＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸）、トリシン（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン）、ＡＭＰＳＯ（N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＣＡＢＳ（4-(シクロヘキシルアミノ)-1-ブタンスルホン酸）、ＣＡＰＳ（N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＣＨＥＳ（N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸）、ＣＡＰＳＯ（N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＤＩＰＳＯ（3-(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）及びこれらの混合物からなる群より選択されるグッド緩衝剤を含む、ヘモグロビンＡ１ｃ測定用試薬キット。

[１０] １～６のいずれかに記載のアマドリアーゼ又は９に記載のキットを用いる、糖化ヘモグロビンの測定方法。

【発明の効果】

【００１６】

本発明は、糖尿病の診断用酵素として、また、糖尿病マーカーの測定キットに利用されるグッド緩衝液の存在下で安定なアマドリアーゼ、例えばグッド緩衝液の存在下で熱安定性の高いアマドリアーゼ及びそれをコードする遺伝子等を提供する。このアマドリアーゼを用いると、グッド緩衝液の存在下でも糖化ヘモグロビンの測定を行うことができる。ま

た、従来よりも高温環境での測定が可能となり、さらに測定試薬の長期保存安定性も向上する。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１－１】各種公知のアマドリアーゼのアミノ酸配列のアライメントである。

【図１－２】図１－１の続きである。

【図１－３】図１－２の続きである。

【図１－４】図１－３の続きである。

【図１－５】図１－４の続きである。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

以下、本発明を詳細に説明する。

【００１９】

（糖化タンパク質、ヘモグロビンＡ１ｃ）

本発明における糖化タンパク質とは、非酵素的に糖化されたタンパク質を指す。糖化タンパク質は生体内、外を問わず存在し、生体内に存在する例としては、血液中の糖化ヘモグロビン、糖化アルブミンなどがあり、糖化ヘモグロビンの中でもヘモグロビンのβ鎖アミノ末端のバリンが糖化された糖化ヘモグロビンを特にヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）と言う。生体外に存在する例としては、タンパク質やペプチドと糖が共存する液状調味料などの飲食品や輸液などがある。

【００２０】

（糖化ペプチド、フルクトシルペプチド）

本発明における糖化ペプチドとは、糖化タンパク質由来の非酵素的に糖化されたペプチドを指し、ペプチドが直接非酵素的に糖化されたものや、プロテアーゼ等により糖化タンパク質が分解された結果生じたものや糖化タンパク質を構成する（ポリ）ペプチドが糖化されたものが含まれる。糖化ペプチドをフルクトシルペプチドと表記することもある。糖化タンパク質において、糖化を受けるペプチド側のアミノ基としては、アミノ末端のα－アミノ基、ペプチド内部のリシン残基側鎖のε－アミノ基などが挙げられるが、本発明における糖化ペプチドとは、より具体的には、α－糖化ペプチド（α－フルクトシルペプチド）である。α－糖化ペプチドは、Ｎ末端のα－アミノ酸が糖化された糖化タンパク質から何らかの手段、例えば、プロテアーゼによる限定分解などにより遊離させて形成される。例えば、対象の糖化タンパク質がヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）である場合、該当するα－糖化ペプチドは、Ｎ末端が糖化されているＨｂＡ１ｃのβ鎖から切り出される糖化されたペプチドを指す。１４６残基のアミノ酸により構成されているＨｂＡ１ｃのβ鎖もまたα－糖化ペプチドに該当する（αＦ１４６Ｐ）。

【００２１】

ある実施形態において本発明のアマドリアーゼが作用する測定物質（基質）は、ＨｂＡ１ｃ、より具体的にはＨｂＡ１ｃのβ鎖である。別の実施形態において本発明のアマドリアーゼが作用する測定物質はＨｂＡ１ｃのβ鎖から切り出されるα－糖化ペプチド、例えばαＦＶ～αＦ１２８Ｐ、αＦＶ～αＦ６４Ｐ、αＦＶ～αＦ３２Ｐ、αＦＶ～αＦ１６Ｐ、例えばαＦ６Ｐ（α－フルクトシルバリルヒスチジルロイシルスレオニルプロリルグルタミン酸）である。別の実施形態において本発明のアマドリアーゼが作用する測定物質はαＦＶＨ（α－フルクトシルバリルヒスチジン）又はαＦＶ（α－フルクトシルバリン）である。

【００２２】

（アマドリアーゼ）

アマドリアーゼは、ケトアミンオキシダーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、フルクトシルアミンオキシダーゼ等とも称され、酸素の存在下で、イミノ２酢酸又はその誘導体（アマドリ化合物）を酸化して、グリオキシル酸又はα－ケトアルデヒド、アミノ酸又はペプチド及び過酸化水素を生成する反応を触媒

する酵素のことをいう。本明細書ではこの酵素活性をアマドリアーゼ活性、糖化基質に対する活性又は糖化ペプチドに対する酸化活性とよぶことがある。アマドリアーゼは、自然界に広く分布しており、微生物や、動物又は植物起源の酵素を探索することにより、得ることができる。微生物においては、例えば、糸状菌、酵母又は細菌等から得ることができる。

【００２３】

本発明のアマドリアーゼの一態様は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有するConiochaeta属由来のアマドリアーゼ又は配列番号６に示されるアミノ酸配列を有するCurvularia clavata由来のアマドリアーゼに基づき作製された、グッド緩衝液の存在下で安定なアマドリアーゼの変異体、特にグッド緩衝液の存在下で熱安定性の高いアマドリアーゼ変異体である。別の実施形態では、本発明のアマドリアーゼは、配列番号９に示されるアミノ酸配列を有するPhaeosphaeria nodorum由来のケトアミンオキシダーゼ(PnFX) に基づき作製される。このような変異体の例としては、配列番号１、６又は９と高い配列同一性（例えば、７０％以上、好ましくは、７５％以上、好ましくは、８０％以上、より好ましくは８５％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上、最も好ましくは９９％以上）を有するアミノ酸配列を有するアマドリアーゼ及び配列番号１のアミノ酸配列において、１から数個のアミノ酸が改変若しくは変異、又は、欠失、置換、付加及び／若しくは挿入されたアミノ酸配列を有するアマドリアーゼを挙げることができる。

【００２４】

なお、本発明のアマドリアーゼは例えば、Eupenicillium属、Pyrenochaeta属、Arthrinium属、Curvularia属、Neocosmospora属、Cryptococcus属、Phaeosphaeria属、Aspergillus属、Emericella属、Ulocladium属、Penicillium属、Fusarium属、Achaetomiella属、Achaetomium属、Thielavia属、Chaetomium属、Gelasinospora属、Microascus属、Leptosphaeria属、Ophiobolus属、Pleospora属、Coniochaetidium属、Pichia属、Corynebacterium属、Agrobacterium属、Arthrobacter属などの生物種に由来するアマドリアーゼに基づき作製されたものでもよい。これらの中でもグッド緩衝液の存在下で安定であり、かつ／又はアミノ酸配列が上記のように配列番号１と高い配列同一性を有するものが好ましい。

【００２５】

グッド緩衝液の存在下で安定なアマドリアーゼの変異体（改変体）は、アマドリアーゼのアミノ酸配列において少なくとも１つのアミノ酸残基を置換する、付加する、又は欠失させることによって得ることができる。

【００２６】

グッド緩衝液の存在下での安定性の向上をもたらすアミノ酸の置換として、配列番号１に示すアミノ酸配列における以下の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸の置換が挙げられる。

【００２７】

（１）２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、アスパラギン、アラニン、又はグルタミンへの置換。

（２）２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、グルタミンへの置換。

（３）３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、グルタミン、アラニン又はアスパラギンへの置換。

【００２８】

グッド緩衝液の存在下での安定性が向上したアマドリアーゼの変異体は、上記アミノ酸置換を少なくとも１つ有していればよく、複数のアミノ酸置換を有していてもよい。例えば、上記アミノ酸置換の１、２、又は３つを有している。

【００２９】

その中でも、以下のアミノ酸の位置に対応するアミノ酸の置換を有している変異体が好ましい。

【００３０】
（１）－（２）　２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸の置換、及び２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギン、アラニン、又はグルタミンへの置換及び２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換を有する変異体。
【００３１】
（１）－（３）　２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸の置換、及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギン、アラニン、又はグルタミンへの置換及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミン、アスパラギン、又はアラニンへの置換を有する変異体。
【００３２】
（２）－（３）　２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミン、アスパラギン、又はアラニンへの置換を有する変異体。
【００３３】
（１）－（２）－（３）　２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸の置換、２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸の置換、例えば、２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギン、アラニン、又はグルタミンへの置換、２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換及び３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸のグルタミン、アスパラギン、又はアラニンへの置換を有する変異体。
【００３４】
本発明のグッド緩衝液の存在下で安定性の優れたアマドリアーゼ変異体は、上記のアミノ酸置換を、配列番号１のアミノ酸配列における位置に対応する位置において有し得る。また、本発明のグッド緩衝液の存在下での安定性の向上したアマドリアーゼ変異体は、それらの置換アミノ酸以外の位置で、さらに１又は数個（例えば１～１５個、例えば１～１０個、例えば１～５個、例えば１～３個、例えば１個）のアミノ酸が欠失、挿入、付加及び／又は置換されていてもよい。さらに本発明は、上記のグッド緩衝液の存在下での安定性の向上をもたらすアミノ酸の置換の他に、基質特異性、界面活性剤耐性、デヒドロゲナーゼ活性等の他の性質を変化又は向上させるアミノ酸の置換変異を有し、配列番号１に示すアミノ酸配列における前記置換したアミノ酸以外のアミノ酸を除いた部分のアミノ酸配列に対して、７０％以上、７５％以上、８０％以上、９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上、特に好ましくは９９％以上のアミノ酸配列同一性を有し、アマドリアーゼ活性を有し、グッド緩衝液の存在下での安定性の向上したアマドリアーゼ変異体を包含する。
【００３５】
なお、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有するアマドリアーゼは、国際公開2007/125779号においてpKK223-3-CFP-T7と称する組換え体プラスミド（寄託番号：FERM BP-10593）を保持する大腸菌が生産するConiochaeta属由来のアマドリアーゼ（CFP-T7）であり、先に出願人が見出した熱安定性の優れた改変型アマドリアーゼである。このCFP-T7は、天然型のConiochaeta属由来のアマドリアーゼに対し、２７２位、３０２位及び３８８位に人為的な変異を順次導入することにより獲得した３重変異体である。
【００３６】
上記のアミノ酸置換において、アミノ酸の位置は配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列における位置を表しているが、他の生物種由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列においては、配列番号１に示されるアミノ酸配列における位置に対応する位置のアミノ酸が置換されている。「対応する位置」の意味については後述する。

【００３７】
（さらなる置換）
（アマドリアーゼの基質特異性を変化させるアミノ酸置換について）
本発明者は、アマドリアーゼのアミノ酸残基を置換することによりその基質特異性を変化させることができることを以前に報告した（例えば国際公開2013/162035号を参照のこと。参照によりその全内容を本明細書に組み入れる）。本発明のアマドリアーゼは、場合により、さらにこのようなアミノ酸置換を有してもよい。
【００３８】
アマドリアーゼの基質特異性を変化させるアミノ酸の置換として、配列番号１に示すアミノ酸配列における以下の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸の置換が挙げられる。
（ａ）６２位のアルギニン
（ｂ）６３位のロイシン
（ｃ）１０２位のグルタミン酸
（ｄ）１０６位のアスパラギン酸
（ｅ）１１０位のグルタミン
（ｆ）１１３位のアラニン
（ｇ）３５５位のアラニン
（ｈ）４１９位のアラニン
（ｉ）６８位のアスパラギン酸
（ｊ）３５６位のアラニン
【００３９】
場合により６２位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸は、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、システイン、セリン、スレオニン、プロリンへと置換されてもよい。場合により６３位のロイシンに対応する位置のアミノ酸は、ヒスチジン又はアラニンへと置換されてもよい。場合により１０２位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸は、リシンへと置換されてもよい。場合により１０６位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸は、アラニン、リシン、又はアルギニンへと置換されてもよい。場合により１１０位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸はロイシン又はチロシンへと置換されてもよい。場合により１１３位のアラニンに対応する位置のアミノ酸はリシン又はアルギニンへと置換されてもよい。場合により３５５位のアラニンに対応する位置のアミノ酸はセリンへと置換されてもよい。場合により４１９位のアラニンに対応する位置のアミノ酸はリシンへと置換されてもよい。場合により６８位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸はアスパラギンへと置換されてもよい。場合により３５６位のアラニンに対応する位置のアミノ酸はスレオニンへと置換されてもよい。
【００４０】
本明細書では、これらの位置（62/63/68/102/106/110/113/355/419/356）への置換をアマドリアーゼの基質特異性を変化させるアミノ酸置換と呼ぶことがある。
【００４１】
（アマドリアーゼのカチオン性界面活性剤耐性を向上させるアミノ酸置換について）
本発明者らは、アマドリアーゼのアミノ酸残基を置換することによりそのカチオン性界面活性剤耐性を向上させることができることを確認している（特願2013-221515号及びPCT/JP2014/071036号明細書参照、これらは参照によりその全内容を本明細書に組み入れるものとする）。
【００４２】
アマドリアーゼのカチオン性界面活性剤耐性を向上させるアミノ酸の置換として、配列番号１に示すアミノ酸配列における以下の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸の置換が挙げられる。
（ｉ）２６２位のアスパラギン、

（ii）２５７位のバリン、
（iii）２４９位のグルタミン酸
（iv）２５３位のグルタミン酸、
（v）３３７位のグルタミン、
（vi）３４０位のグルタミン酸、
（vii）２３２位のアスパラギン酸、
（viii）１２９位のアスパラギン酸、
（ix）１３２位のアスパラギン酸、
（x）１３３位のグルタミン酸、
（xi）４４位のグルタミン酸、
（xii）２５６位のグリシン、
（xiii）２３１位のグルタミン酸、及び
（xiv）８１位のグルタミン酸

【００４３】

場合により２６２位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸はヒスチジンへと置換されてもよい。場合により２５７位のバリンに対応する位置のアミノ酸はシステイン、セリン、スレオニンへと置換されてもよい。場合により２４９位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により２５３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により３３７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により３４０位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はプロリンへと置換されてもよい。場合により２３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により１２９位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により１３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により１３３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はアラニン、メチオニン、リシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により４４位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はプロリンへと置換されてもよい。場合により２５６位のグリシンに対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により２３１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。場合により８１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸はリシン、アルギニンへと置換されてもよい。

【００４４】

本明細書では、これらの位置（262/257/249/253/337/340/232/129/132/133/44/256/231/81）への置換をアマドリアーゼのカチオン性界面活性剤耐性を向上させるアミノ酸置換と呼ぶことがある。

【００４５】

（アマドリアーゼのデヒドロゲナーゼ活性の向上／オキシダーゼ活性の低減をもたらす置換）

本発明者らは、アマドリアーゼのアミノ酸残基を置換することによりそのデヒドロゲナーゼ活性を向上及び／又はオキシダーゼ活性を低減させることができることを確認している。例えば特願2014-217405号明細書を参照のこと（参照によりその全内容を本明細書に組み入れるものとする）。

【００４６】

アマドリアーゼのデヒドロゲナーゼ活性の向上及び／又はオキシダーゼ活性の低減をもたらすアミノ酸の置換として、配列番号１に示すアミノ酸配列における以下の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸の置換が挙げられる。

（１）２８０位のシステインの置換、例えば、グルタミン、セリン、スレオニン及びアスパラギンからなる群より選択される極性アミノ酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン及びヒスチジンからなる群より選択される荷電アミノ酸、又はメチオニン

、プロリン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸への置換。
（２）２６７位のフェニルアラニンの置換、例えばチロシンへの置換。
（３）２６９位のフェニルアラニンの置換、例えばチロシンへの置換。
（４）５４位のアスパラギン酸の置換、例えばアスパラギン、アラニン、グルタミン、ヒスチジン、グリシン又はバリンへの置換。
（５）２４１位のチロシンの置換、例えばグルタミン、リシン、グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、アルギニン又はヒスチジンへの置換。
【００４７】
本明細書においてこれらの位置（280/267/269/54/241）への置換をアマドリアーゼのデヒドロゲナーゼ活性の向上及び／又はオキシダーゼ活性の低減をもたらすアミノ酸の置換と呼ぶことがある。
【００４８】
（アマドリアーゼのアニオン性界面活性剤耐性を向上させるアミノ酸置換について）
本発明者らは、アマドリアーゼのアミノ酸残基を置換することによりそのアニオン性界面活性剤耐性を向上させることができることを確認している。例えば特願2014-227548号明細書を参照のこと。この文献は参照によりその全内容を本明細書に組み入れるものとする。
【００４９】
アマドリアーゼのアニオン性界面活性剤耐性の向上をもたらすアミノ酸の置換として、配列番号１に示すアミノ酸配列における以下の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸の置換が挙げられる。本明細書では、これらの位置への置換を、アマドリアーゼのアニオン性界面活性剤に対する耐性を向上させるアミノ酸置換と呼ぶことがある。
（１）８０位のリシン、
（２）７１位のメチオニン、
（３）１７５位のグルタミン酸、
（４）１７２位のフェニルアラニン、
（５）２７９位のバリン、
（６）１２位のバリン、
（７）９位のアルギニン、
（８）７７位のグルタミン、
（９）３０位のセリン、
（１０）２８位のバリン、
（１１）１３位のバリン、
（１２）３位のセリン、
（１３）４位のアスパラギン
【００５０】
場合により８０位のリシンに対応する位置のアミノ酸は、アルギニン若しくはヒスチジンへと置換されていてもよい。場合により７１位のメチオニンに対応する位置のアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、アラニン、グリシン、バリン若しくはシステインへと置換されていてもよい。場合により１７５位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン若しくはリシンへと置換されていてもよい。場合により１７２位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸は、グルタミン酸若しくはアスパラギン酸へと置換されていてもよい。場合により２７９位のバリンに対応する位置のアミノ酸は、イソロイシン若しくはシステインへと置換されていてもよい。場合により１２位のバリンに対応する位置のアミノ酸は、例えばイソロイシン、ロイシン、システイン若しくはメチオニンへと置換されていてもよい。場合により９位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸は、スレオニン、セリン、アスパラギン若しくはグルタミンへと置換されていてもよい。場合により７７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸は、アスパラギン酸、若しくはグルタミン酸へと置換されていてもよい。場合により３０位のセリンに対応する位置のア

ミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン若しくはイソロイシンへと置換されていてもよい。場合により２８位のバリンに対応する位置のアミノ酸は、ロイシン、イソロイシン、アラニン若しくはシステインへと置換されていてもよい。場合により１３位のバリンに対応する位置のアミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、システイン若しくはメチオニンへと置換されていてもよい。場合により３位のセリンに対応する位置のアミノ酸は、スレオニンへと置換されていてもよい。場合により４位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸は、プロリンへと置換されていてもよい。

【００５１】

本明細書においてこれらの位置（80/71/175/172/279/12/9/77/30/28/13/3/4）への置換をアマドリアーゼのアマドリアーゼのアニオン性界面活性剤耐性を向上させるアミノ酸置換と呼ぶことがある。

【００５２】

（アマドリアーゼをコードする遺伝子の取得）

これらのアマドリアーゼをコードする本発明の遺伝子（以下、単に「アマドリアーゼ遺伝子」ともいう。）を得るには、通常一般的に用いられている遺伝子のクローニング方法が用いられる。例えば、アマドリアーゼ生産能を有する微生物菌体や種々の細胞から常法、例えば、Current Protocols in Molecular Biology(WILEY Interscience,1989)記載の方法により、染色体DNA又はmRNAを抽出することができる。さらにmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。このようにして得られた染色体DNA又はcDNAを用いて、染色体DNA又はcDNAのライブラリーを作製することができる。

【００５３】

次いで、上記アマドリアーゼのアミノ酸配列に基づき、適当なプローブDNAを合成して、これを用いて染色体DNA又はcDNAのライブラリーからアマドリアーゼ遺伝子を選抜する方法、あるいは、上記アミノ酸配列に基づき、適当なプライマーDNAを作製して、5’RACE法や3’RACE法などの適当なポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）により、アマドリアーゼをコードする目的の遺伝子断片を含むDNAを増幅させ、これらのDNA断片を連結させて、目的のアマドリアーゼ遺伝子の全長を含むDNAを得ることができる。

【００５４】

このようにして得られたアマドリアーゼをコードする遺伝子の好ましい一例として、Coniochaeta属由来のアマドリアーゼ遺伝子（特開2003-235585号公報）の例などが挙げられる。

【００５５】

これらのアマドリアーゼ遺伝子は、常法通り各種ベクターに連結されていることが、取扱い上好ましい。例えば、Coniochaeta sp. NISL 9330株由来のアマドリアーゼ遺伝子をコードするDNAがpKK223-3 Vector（GEヘルスケア社製）に挿入された組換え体プラスミドpKK223-3-CFP（特開2003-235585号公報）が挙げられる。

【００５６】

（ベクター）

本発明において用いることのできるベクターとしては、上記プラスミドに限定されることなくそれ以外の、例えば、バクテリオファージ、コスミド等の当業者に公知の任意のベクターを用いることができる。具体的には、例えば、pBluescriptII SK+(STRATAGENE社製）等が好ましい。

【００５７】

（アマドリアーゼ遺伝子の変異処理）

アマドリアーゼ遺伝子の変異処理は、企図する変異形態に応じた、公知の任意の方法で行うことができる。すなわち、アマドリアーゼ遺伝子あるいは当該遺伝子の組み込まれた組換え体ＤＮＡと変異原となる薬剤とを接触・作用させる方法；紫外線照射法；遺伝子工学的手法；又はタンパク質工学的手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

【００５８】

上記変異処理に用いられる変異原となる薬剤としては、例えば、ヒドロキシルアミン、

Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジン、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン、蟻酸又は５－ブロモウラシル等を挙げることができる。

【００５９】

上記接触・作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件をとることが可能であり、現実に所望の変異をアマドリアーゼ遺伝子において惹起することができる限り特に限定されない。通常、好ましくは０．５～１２Ｍの上記薬剤濃度において、２０～８０℃の反応温度下で１０分間以上、好ましくは１０～１８０分間接触・作用させることで、所望の変異を惹起可能である。紫外線照射を行う場合においても、上記の通り常法に従い行うことができる（現代化学、p24～30、1989年6月号）。

【００６０】

タンパク質工学的手法を駆使する方法としては、一般的に、Site-Specific Mutagenesisとして知られる手法を用いることができる。例えば、Kramer法(Nucleic Acids Res.,12,9441(1984):Methods Enzymol.,154,350(1987):Gene,37,73(1985))、Eckstein法(Nucleic Acids Res.,13,8749(1985):Nucleic Acids Res.,13,8765(1985):Nucleic Acids Res,14,9679(1986))、Kunkel法(Proc. Natl. Acid. Sci. U.S.A.,82,488(1985):Methods Enzymol.,154,367(1987))等が挙げられる。DNA中の塩基配列を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit;Clonetech社， EXOIII/Mung Bean Deletion Kit;Stratagene製， Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit;Stratagene製など）の利用が挙げられる。

【００６１】

また、一般的なPCR法（ポリメラーゼチェインリアクション、Polymerase Chain Reaction）として知られる手法を用いることもできる（Technique,1,11(1989)）。なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法又は酵素合成法により、直接所望の改変アマドリアーゼ遺伝子を合成することもできる。

【００６２】

上記方法により得られるアマドリアーゼ遺伝子のDNA塩基配列の決定若しくは確認を行う場合には、例えば、マルチキャピラリーDNA解析システムCEQ2000（ベックマン・コールター社製）等を用いることにより行うことができる。

【００６３】

（形質転換・形質導入）

上述の如くして得られたアマドリアーゼ遺伝子を、常法により、バクテリオファージ、コスミド、又は原核細胞若しくは真核細胞の形質転換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各々のベクターに対応する宿主を常法により、形質転換又は形質導入をすることができる。例えば、得られた組換え体DNAを用いて、任意の宿主、例えば、エッシェリシア属に属する微生物、具体例としては大腸菌K-12株、好ましくは大腸菌JM109株、大腸菌DH5α株（ともにタカラバイオ社製）や大腸菌Ｂ株、好ましくは大腸菌BL21株（ニッポンジーン社製）等を形質転換又はそれらに形質導入してそれぞれの菌株を得ることができる。

【００６４】

（アミノ酸配列の同一性）

アミノ酸配列の同一性又は類似性は、GENETYX Ver.11（ゼネティックス社製）のマキシマムマッチングやサーチホモロジー等のプログラム又はDNASIS Pro（日立ソリューションズ社製）のマキシマムマッチングやマルチプルアライメント等のプログラムにより計算することができる。アミノ酸配列同一性を計算するために、２以上のアマドリアーゼをアライメントしたときに、該２以上のアマドリアーゼにおいて同一であるアミノ酸の位置を調べることができる。こうした情報を基に、アミノ酸配列中の同一領域を決定できる。

【００６５】

また、２以上のアマドリアーゼにおいて類似であるアミノ酸の位置を調べることもできる。例えばCLUSTALWを用いて複数のアミノ酸配列をアライメントすることができ、この場合、アルゴリズムとしてBlosum62を使用し、複数のアミノ酸配列をアライメントしたとき

に類似と判断されるアミノ酸を類似アミノ酸と呼ぶことがある。本発明の変異体において、アミノ酸置換はこのような類似アミノ酸の間の置換によるものであり得る。こうしたアライメントにより、複数のアミノ酸配列について、アミノ酸配列が同一である領域及び類似アミノ酸によって占められる位置を調べることができる。こうした情報を基に、アミノ酸配列中の相同性領域（保存領域）を決定できる。

【００６６】

本明細書において「相同性領域」とは、２以上のアマドリアーゼをアライメントしたときに、ある基準となるアマドリアーゼと比較対象のアマドリアーゼの対応する位置におけるアミノ酸が同一であるか又は類似アミノ酸からなる領域であって、連続する３以上、４以上、５以上、６以上、７以上、８以上、９以上又は１０以上のアミノ酸からなる領域をいう。例えば、図１では全長アミノ酸配列の配列同一性が７４％以上であるアマドリアーゼをアライメントした。このうち、配列番号１で示されるConiochaeta sp.アマドリアーゼを基準として第１０位～３２位は同一又は類似アミノ酸からなり、よって相同性領域に該当する。同様に、配列番号１で示されるConiochaeta sp.アマドリアーゼを基準として３６～４１位、４９～５２位、５４～５８位、６３～６５位、７３～７５位、８４～８６位、８８～９０位、１２０～１２２位、１４５～１５０位、１５６～１６２位、１６４～１７０位、１８０～１８２位、２０２～２０５位、２０７～２１１位、２１４～２２４位、２２７～２３０位、２３６～２４１位、２４３～２４８位、２５８～２６１位、２６６～２６８位、２７０～２７３位、２７５～２８７位、２９５～２９７位、３０６～３０８位、３１０～３１６位、３２４～３２９位、３３２～３３４位、３４１～３４４位、３４６～３５５位、３５７～３６３位、３７０～３８３位、３８５～３８７位、３８９～３９４位、４０５～４１０位及び４２３～４３１位は相同性領域に該当しうる。

【００６７】

好ましくは、アマドリアーゼの相同性領域は、配列番号１で示されるConiochaeta sp.アマドリアーゼを基準として、第１１位～３２位、３６～４１位、５０～５２位、５４～５８位、８４～８６位、８８～９０位、１４５～１５０位、１５７～１６８位、２０２～２０５位、２０７～２１２位、２１５～２２５位、２３６～２４８位、２５８～２６１位、２６６～２６８位、２７０～２７３位、２７５～２８７位、３４７～３５４位、３５７～３６３位、３７０～３８３位、３８５～３８７位、及び４０５～４１０位のアミノ酸配列からなる領域である。

【００６８】

さらに好ましくは、アマドリアーゼの相同性領域は、配列番号１で示されるConiochaeta sp.アマドリアーゼを基準として第１１～１８位、２０～３２位、５０～５２位、５４～５８位、２６６～２６８位、２７０～２７３位、２７７～２８６位、及び３７０～３８３位のアミノ酸配列からなる領域である。

【００６９】

本発明のアマドリアーゼ変異体は、配列番号１に示されるアミノ酸配列を有するアマドリアーゼとアライメントしたときに５０％以上、好ましくは６０％以上、好ましくは７０％以上、好ましくは７５％以上、好ましくは８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上の全長アミノ酸配列同一性を有し、グッド緩衝剤の存在下で熱安定性を有する。さらに、本発明のアマドリアーゼ変異体の相同性領域におけるアミノ酸配列は、配列番号１における相同性領域のアミノ酸配列と８０％、好ましくは８５％、好ましくは９０％、好ましくは９５％、好ましくは９８％、さらに好ましくは９９％以上の配列同一性を有する。図１では全長アミノ酸配列の配列同一性が７４％以上であるアマドリアーゼをアライメントしたが、このうち、配列番号１で示されるConiochaeta sp.アマドリアーゼを基準として比較すると図１に示す他のアマドリアーゼとの相同性領域におけるアミノ酸配列同一性は９０％以上である。

【００７０】

（アミノ酸配列における対応する位置の特定）

本明細書において、ある基準となるアミノ酸配列中の特定の位置のアミノ酸が別の類似するアミノ酸配列中の特定の位置のアミノ酸と対応する場合、これを対応するアミノ酸といい、そのアミノ酸の位置を対応する位置という。本明細書では便宜上、配列番号１に示すConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列を基準として説明する。この場合、アミノ酸配列における「対応する位置」とは、配列番号１に示すConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列の特定の位置に対応する他の生物種由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列における位置をいう。

【００７１】

アミノ酸配列における「対応する位置」を特定する方法としては、例えばリップマン－パーソン法等の公知のアルゴリズムを用いてアミノ酸配列を比較し、各アマドリアーゼのアミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の同一性を与えることにより行うことができる。アマドリアーゼのアミノ酸配列をこのような方法で整列させることにより、アミノ酸配列中にある挿入、欠失にかかわらず、相同アミノ酸残基の各アマドリアーゼ配列における配列中の位置を決めることが可能である。相同位置は、三次元構造中で同位置に存在すると考えられ、対象となるアマドリアーゼの特異的機能に関して類似した効果を有することが推定できる。

【００７２】

図１に種々の公知の生物種由来のアマドリアーゼの配列を例示する。配列番号１で示されるアミノ酸配列を最上段に示す。図１に示される各種配列は、いずれも配列番号１の配列と７０％以上の同一性を有し、公知のアルゴリズムを用いて整列させた。図中に、本発明の変異体における変異点を示す。図１からConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列の特定の位置のアミノ酸に対応する他の生物種由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列における位置を知ることができる。図１には、Coniochaeta属由来のアマドリアーゼ（配列番号１）、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ（配列番号３）、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ（配列番号４）、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ（配列番号５）、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ（配列番号６）、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ（配列番号７）、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（配列番号８）、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ（配列番号９）、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（配列番号１０）、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ（配列番号１１）、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（配列番号１２）及びPenicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（配列番号１３）のアミノ酸配列を示してある。

【００７３】

（置換箇所に対応する位置のアミノ酸）

本発明において「配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２８８位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。これは上記の「アミノ酸配列における対応する位置」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させた図１より特定することができる。

【００７４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２８８位のアルギニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８６位のアルギニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８８位のアルギニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２８６位のアルギニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２８８位のアルギニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８８位のアルギニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２８４位のアルギニン、Aspergillus nidula

ns由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８８位のヒスチジン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２８８位のヒスチジン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８６位のアルギニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８８位のアルギニンである。

【００７５】

本発明において「配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２９０位のリシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。これは上記の「アミノ酸配列における対応する位置」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させた図１より特定することができる。

【００７６】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２９０位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８８位のリシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２９１位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２８８位のリシン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２９０位のリシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２９０位のリシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２８６位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２９０位のリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２９０位のリシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８８位のリシン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２９０位のリシンである。

【００７７】

本発明において「配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３１１位のリシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させた図１より特定することができる。

【００７８】

すなわちEupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３１１位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３０９位のリシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３１２位のリシン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３０９位のリシン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３１１位のリシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３１１位のリシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３０７位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３１１位のリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３１１位のリシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３０９位のリシン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３１１位のリシンである。

【００７９】

（アニオン性界面活性剤耐性向上変異の対応位置）

なお、「配列番号１記載のアミノ酸配列の８０位のリシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの８０位のリシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００８０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは８０位のグルタミン、Py

renochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは８０位のアルギニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは８０位のシステイン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは８０位のアルギニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは８０位のアルギニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８０位のアルギニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは８０位のアスパラギン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７９位のリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは７９位のリシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８０位のスレオニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８０位のリシンである。

【００８１】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の７１位のメチオニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの７１位のメチオニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００８２】

すなわち、「配列番号１記載のアミノ酸配列の７１位のメチオニンに対応する位置のアミノ酸」は、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７１位のロイシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びEmericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは７０位のロイシンである。

【００８３】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１７５位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１７５位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００８４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１７５位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１７５位のリシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１７５位のアルギニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１７５位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１７５位のアルギニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７５位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１７３位のアスパラギン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７４位のグルタミン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１７４位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７５位のアスパラギン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７５位のセリンである。

【００８５】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１７２位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１７２位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００８６】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１７２位のフェニルアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１７２位のチロシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１７２位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１７２位のチロシン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１７２位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７２位のバリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１７０位のチロシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７１位のフェニルアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１７１位のフェニルアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７２位のフェニルアラニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１７２位のフェニルアラニンである。

【００８７】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２７９位のバリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２７９位のバリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００８８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２７９位のバリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２７７位のバリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２７９位のバリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２７７位のバリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２７９位のバリン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７９位のバリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２７５位のバリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７９位のバリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２７９位のバリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７７位のバリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７９位のバリンである。

【００８９】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１２位のバリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１２位のバリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００９０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１２位のバリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１２位のバリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１２位のバリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１２位のバリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１２位のイソロイシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２位のバリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１２位のバリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１位のバリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１１位のバリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２位のバリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２位のイソロイシンである。

【００９１】

なお、「配列番号１記載のアミノ酸配列の９位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼ

の９位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【００９２】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは９位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは９位のスレオニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは９位のリシン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは９位のセリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは９位のスレオニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは９位のリシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは９位のセリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８位のリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは８位のリシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは９位のセリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは９位のリシンである。
【００９３】
さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の７７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの７７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【００９４】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは７７位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは７７位のグルタミン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは７７位のアスパラギン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは７７位のグルタミン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは７７位のアスパラギン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７７位のアスパラギン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは７７位のグルタミン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７６位のアスパラギン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは７６位のアスパラギン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７７位のグルタミン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは７７位のアスパラギン酸である。
【００９５】
さらに「配列番号１記載のアミノ酸配列の３０位のセリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の３０位のセリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【００９６】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３０位のセリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３０位のセリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３０位のセリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３０位のセリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３０位のアラニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３０位のアラニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３０位のセリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２９位のアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２９位のアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３０位のセリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３０位のセリンである。
【００９７】
さらに「配列番号１記載のアミノ酸配列の２８位のバリンに対応する位置のアミノ酸」

とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８位のバリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【００９８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２８位のイソロイシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８位のロイシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８位のロイシン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２８位のバリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２８位のロイシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８位のロイシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２８位のバリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７位のロイシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２７位のロイシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８位のバリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８位のイソロイシンである。

【００９９】

さらに「配列番号１記載のアミノ酸配列の３位のセリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３位のセリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１００】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３位のヒスチジン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３位のアラニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３位のプロリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３位のスレオニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３位のプロリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３位のプロリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３位のプロリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３位のプロリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３位のプロリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３位のヒスチジンである。

【０１０１】

さらに「配列番号１記載のアミノ酸配列の４位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの４位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１０２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは４位のセリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは４位のセリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは４位のセリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは４位のセリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは４位のプロリン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４位のセリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは４位のセリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４位のアスパラギン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４位のセリンである。なお、図１より、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びEmericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは、配列番号１のアマドリアーゼの４位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸が欠失している。しかしながら、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びEmeric

ella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼにおいて、配列番号１のアマドリアーゼの４位のアスパラギンに対応する位置（欠失位置）にアミノ酸を挿入することは可能である。本明細書では便宜上、配列番号１のアマドリアーゼの４位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸が欠失している場合、当該欠失位置へのアミノ酸の挿入も、配列番号１のアマドリアーゼの４位のアスパラギンに対応する位置へのアミノ酸置換に含めるものとする。

【０１０３】

さらに「配列番号１記載のアミノ酸配列の１３位のバリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１３位のバリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１０４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１３位のバリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３位のバリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３位のバリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１３位のバリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１３位のイソロイシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３位のイソロイシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１３位のバリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２位のバリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１２位のバリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３位のバリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３位のバリンである。

【０１０５】

（デヒドロゲナーゼ活性向上／オキシダーゼ活性低減変異の対応位置）

なお、本明細書において「配列番号１記載のアミノ酸配列の２８０位のシステインに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２８０位のシステインに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１０６】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２８０位のシステイン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２７８位のシステイン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２８０位のシステイン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２７８位のシステイン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２８０位のシステイン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８０位のシステイン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２７６位のシステイン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８０位のシステイン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２８０位のシステイン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２７８位のシステイン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２８０位のシステインである。

【０１０７】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２６７位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２６７位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１０８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６５位のフェニルアラニン

、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２６５位のフェニルアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２６３位のフェニルアラニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６５位のフェニルアラニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニンである。

【０１０９】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２６９位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の２６９位のフェニルアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１１０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２６９位のフェニルアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６９位のフェニルアラニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２６９位のフェニルアラニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６９位のフェニルアラニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２６５位のフェニルアラニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６９位のフェニルアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２６９位のイソロイシン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６７位のフェニルアラニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６９位のフェニルアラニンである。

【０１１１】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の５４位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の５４位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１１２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは５４位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは５３位のアスパラギン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは５３位のアスパラギン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは５４位のアスパラギン酸である。

【０１１３】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２４１位のチロシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリア

ーゼの２４１位のチロシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１１４】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２４１位のフェニルアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２３９位のチロシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２４１位のチロシン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２３９位のチロシン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２４１位のチロシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４１位のチロシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２３７位のチロシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４１位のフェニルアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２４１位のフェニルアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３９位のチロシン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４１位のフェニルアラニンである。
【０１１５】
（基質特異性改変変異の対応位置）
本明細書において「配列番号１記載のアミノ酸配列の６２位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの６２位のアルギニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１１６】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６２位のアルギニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは６２位のセリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは６１位のアルギニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６１位のアルギニンである。
【０１１７】
また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の６３位のロイシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの６３位のロイシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１１８】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６３位のロイシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６３位のイソロイシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは６２位のロイシンである。
【０１１９】
また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１０２位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１０２位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１２０】
すなわちEupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０２位のグルタミン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０２位のリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０１位のグルタミン酸である。

【０１２１】
また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１０６位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１０６位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１２２】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１０６位のアスパラギン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０６位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１０６位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１０６位のグリシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０６位のセリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１０５位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１０５位のグリシンである。

【０１２３】
また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１１０位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１１０位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１２４】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１０位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１０位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１１０位のグルタミン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１１０位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１０位のセリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１１０位のグリシン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１０９位のアルギニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは、１０９位のリシンである。

【０１２５】
また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１１３位のアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１１３位のアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１２６】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１１３位のス

レオニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１３位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１１３位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１１２位のセリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１１３位のアスパラギン酸である。

【０１２７】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の３５５位のアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３５５位のアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１２８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５５位のアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５３位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３５６位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３５５位のセリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３５１位のアラニンである。

【０１２９】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の４１９位のアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの４１９位のアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１３０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは４１９位のグリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４１８位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは４２１位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは４２０位のアラニン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは４１６位のセリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４１９位のセリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４２０位のアラニンである。

【０１３１】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の６８位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの６８位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１３２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Phaeospha

eria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６８位のアスパラギン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ及びAspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは６７位のアスパラギン酸である。

【０１３３】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の３５６位のアラニンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるコニオカエタ属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３５６位のアラニンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１３４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３５６位のアスパラギン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３５４位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３５７位のアラニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３５４位のアラニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３５６位のアラニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５６位のアスパラギン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３５２位のアラニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５６位のアスパラギン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３５６位のアスパラギン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５４位のアラニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３５６位のアスパラギンである。

【０１３５】

（カチオン性界面活性剤耐性向上変異の対応位置）

なお、本明細書において、「配列番号１記載のアミノ酸配列の４４位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの４４位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸残基」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させた図１により特定することができる。

【０１３６】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは４４位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは４４位のプロリン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは４４位のプロリン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは４４位のプロリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは４４位のプロリン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４４位のロイシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは４４位のプロリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４３位のプロリン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは４３位のプロリン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４４位のプロリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは４４位のプロリンである。

【０１３７】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の８１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの８１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１３８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは８１位のアスパラギン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは８１位のグルタミン酸、Arthrinium

sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは８１位のヒスチジン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは８１位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは８１位のアスパラギン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８１位のアスパラギン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは８１位のグルタミン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８０位のアスパラギン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは８０位のアスパラギン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８１位のグルタミン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは８１位のアスパラギンである。

【０１３９】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１３３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の１３３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１４０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１３３位のグルタミン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３３位のグルタミン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３３位のアラニン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１３３位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１３３位のアラニン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３３位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１３１位のグルタミン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３２位のグルタミン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１３２位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３３位のリシン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３３位のアスパラギン酸である。

【０１４１】

また、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２５３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１記載のアミノ酸配列の２５３位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１４２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２５３位のアラニン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５１位のアラニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５３位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２５１位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２５３位のバリン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５３位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２４９位のアルギニン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５３位のアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５３位のアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５１位のグルタミン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５３位のグルタミンである。

【０１４３】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２５６位のグリシンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２５６位のグリシンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１４４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２５６位のアスパラギン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５４位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５６位のグリシン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２５４位のアスパラギン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２５６位のグリシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５６位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５２位のアスパラギン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５６位のアスパラギン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５６位のアスパラギン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５４位のアスパラギン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５６位のアスパラギン酸である。

【０１４５】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２５７位のバリンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２５７位のバリンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１４６】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２５７位のバリン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５５位のスレオニン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２５７位のシステイン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２５５位のバリン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２５７位のシステイン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５７位のシステイン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５３位のセリン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５７位のスレオニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５７位のスレオニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５５位のバリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２５７位のバリンである。

【０１４７】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２６２位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２６２位のアスパラギンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１４８】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２６２位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６０位のアスパラギン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２６２位のヒスチジン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２６０位のアスパラギン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２６２位のヒスチジン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６２位のアスパラギン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２５８位のアスパラギン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６２位のアスパラギン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２６２位のアスパラギン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６０位のアスパラギン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２６２位のアスパラギン酸である。

【０１４９】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の３３７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConioc

haeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３３７位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１５０】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３３７位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３３５位のリシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３３８位のグルタミン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３３５位のスレオニン、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３３７位のリシン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３３７位のリシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３３３位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３３７位のアスパラギン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３３７位のアスパラギン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３３５位のスレオニン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３３７位のリシンである。

【０１５１】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の３４０位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの３４０位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１５２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは３４０位のグルタミン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３３８位のグルタミン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは３４１位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは３３８位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは３４０位のプロリン、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３４０位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３３６位のリシン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３４０位のグルタミン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは３４０位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３３８位のグルタミン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは３４０位のグルタミン酸である。

【０１５３】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１２９位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１２９位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１５４】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１２９位のグルタミン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１２９位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１２９位のアスパラギン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１２９位のアスパラギン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１２９位のアスパラギン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２９位のセリン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１２７位のアスパラギン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２８位のグルタミン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１２８位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２９位のアスパラギン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１２９位のグルタミン酸である。

【０１５５】
さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の１３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの１３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１５６】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは１３２位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１３０位のアスパラギン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３１位のアスパラギン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは１３１位のアスパラギン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは１３２位のアスパラギン酸である。
【０１５７】
さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２３１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２３１位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１５８】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２３１位のグルタミン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２２９位のグルタミン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２２９位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２２７位のヒスチジン、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２２９位のグルタミン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３１位のグルタミン酸である。
【０１５９】
さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２３２位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。
【０１６０】
すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２３２位のアスパラギン酸、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２３０位のアスパラギン酸、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２３２位のグルタミン酸、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２３０位のアスパラギン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２３２位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３２位のグリシン、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２２８位のグルタミン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３２位のグルタミン酸

、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２３２位のグルタミン酸、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３０位のアスパラギン酸、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２３２位のアスパラギン酸である。

【０１６１】

さらに、「配列番号１記載のアミノ酸配列の２４９位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸」とは、確定したアマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号１に示されるConiochaeta属由来のアマドリアーゼのアミノ酸配列と比較した場合に、配列番号１のアマドリアーゼの２４９位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸を意味する。

【０１６２】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは２４９位のリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２４７位のリシン、Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは２４９位のヒスチジン、Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼでは２４７位のグルタミン酸、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼでは２４９位のグルタミン酸、Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４９位のグルタミン酸、Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２４５位のグルタミン酸、Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４９位のアラニン、Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは２４９位のアラニン、Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４７位のセリン、Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは２４９位のグルタミンである。

【０１６３】

これらは、上記の方法でアミノ酸配列を整列させた図１より特定することができる。

【０１６４】

（本発明のアマドリアーゼの生産）

上記のようにして得られたグッド緩衝剤の存在下での熱安定性の優れたアマドリアーゼの生産能を有する菌株を用いて、当該アマドリアーゼを生産するには、この菌株を通常の固体培養法で培養してもよいが、可能な限り液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

【０１６５】

また、上記菌株を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカー又は大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の１種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第１カリウム、リン酸第２カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第２鉄、硫酸第２鉄又は硫酸マンガン等の無機塩類の１種以上を添加し、さらに必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

【０１６６】

なお、培地の初発ｐＨは、ｐＨ７～９に調整するのが適当である。

【０１６７】

また、培養は任意の条件を用いることができるが、例えば、２０～４２℃の培養温度、好ましくは３０℃前後の培養温度で４～２４時間、さらに好ましくは３０℃前後の培養温度で８～１６時間、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施することができる。

【０１６８】

培養終了後、該培養物よりアマドリアーゼを採取するには、通常の酵素採取手段を用いて得ることができる。例えば、常法により菌体を、超音波破壊処理、磨砕処理等するか、又はリゾチーム等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、又はトルエン等の存在下で振盪若しくは放置して溶菌を行わせ、本酵素を菌体外に排出させることができる。そして、この溶液を濾過、遠心分離等して固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸塩、プロタミン硫酸塩又は硫酸マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫安、アル

コール、アセトン等を添加して分画し、沈澱物を採取し、アマドリアーゼの粗酵素を得る。

【０１６９】

上記アマドリアーゼの粗酵素よりさらにアマドリアーゼ精製酵素標品を得るには、例えば、セファデックス、スーパーデックス若しくはウルトロゲル等を用いるゲル濾過法；イオン交換体を用いる吸着溶出法；ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法；ヒドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法；蔗糖密度勾配遠心法等の沈降法；アフィニティクロマトグラフィー法；分子ふるい膜若しくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択し、又はこれらを組み合わせて実施することにより、精製されたアマドリアーゼ酵素標品を得ることができる。このようにして、所望のグッド緩衝剤の存在下での熱安定性が向上したアマドリアーゼを得ることができる。

【０１７０】

（本発明のアマドリアーゼを含むキット）

本発明はアマドリアーゼ及び緩衝剤を含む糖化ヘモグロビン測定用キットを提供する。アマドリアーゼと緩衝剤とは、キット中に同一又は別個の成分として含まれ得る。一般に、同一の成分としてアマドリアーゼと緩衝剤とがキット中に含まれる場合、緩衝剤はアマドリアーゼを失活させない濃度で含まれるのが好ましい。別個の成分としてアマドリアーゼと緩衝剤とがキット中に含まれる場合、緩衝剤は測定時における終濃度よりも高濃度のストック溶液を用いてもよい。このストック溶液を適宜希釈して、測定に用いる溶液を調製する。

【０１７１】

本発明のアマドリアーゼ及び緩衝剤を含むキットは、さらにαＦＶＨ測定用試薬、αＦＶＨを切り出すためのプロテアーゼ又はペプチダーゼ、その他公知の安定化剤や界面活性剤を含み得る。αＦＶＨを測定するための各種キットに用いられている技術を、本発明のアマドリアーゼ及び緩衝剤を含むキットの製造に適宜用いることができる。すなわち本発明は、適当なアマドリアーゼ及び緩衝剤を用意するステップを含む、アマドリアーゼ及び緩衝剤を含むキットの製造方法を提供する。

【０１７２】

本発明のキットに含まれる変異体アマドリアーゼは好ましくは、緩衝剤の存在下で５３～５８℃、１０分間の熱処理後の残存活性（％）が、本発明の変異を導入していないアマドリアーゼの緩衝剤存在下での前記熱処理後の残存活性（％）と比較して1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、110倍以上、120倍以上、例えば130倍以上である。残存活性については下記に説明する。

【０１７３】

本発明のキットに含まれるアマドリアーゼは、好ましくは測定時における終濃度として、１１０μｇ／ｍｌ以下、例えば１００μｇ／ｍｌ以下、７０μｇ／ｍｌ以下、又は５０μｇ／ｍｌ以下である。

【０１７４】

本発明のキットに含まれるアマドリアーゼは、配列番号１、６又は９に示されるアミノ酸配列を有するアマドリアーゼ又はこれに基づき作製された、グッド緩衝剤の存在下での安定性が向上した変異体であり得る。該変異体は、配列番号１、６又は９と例えば、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、又は９９％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するか、或いは配列番号１、６又は９のアミノ酸配列において、１から数個のアミノ酸が改変若しくは変異、又は、欠失、置換、付加及び／若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し得る。

【０１７５】

また本発明の組成物又はキットに含まれるアマドリアーゼは、例えばEupenicillium属、Pyrenochaeta属、Arthrinium属、Curvularia属、Neocosmospora属、Cryptococcus属、Phaeosphaeria属、Aspergillus属、Emericella属、Ulocladium属、Penicillium属、Fusari

um属、Achaetomiella属、Achaetomium属、Thielavia属、Chaetomium属、Gelasinospora属、Microascus属、Leptosphaeria属、Ophiobolus属、Pleospora属、Coniochaetidium属、Pichia属、Corynebacterium属、Agrobacterium属、Arthrobacter属などのの生物種に由来するアマドリアーゼに基づき作製されたものでもよい。これらの中でもグッド緩衝剤の存在下で安定、特に熱安定であり、かつ／又はアミノ酸配列が上記のように配列番号１、６又は９と高い配列同一性を有するものが好ましい。こうした変異体は、場合により配列番号１に示すアミノ酸配列の２８８位のアルギニン、２９０位のリシン、及び３１１位のリシンよりなる群から選択されるアミノ酸に対応する位置で１又はそれ以上のアミノ酸置換を有しうる。当業者であれば、本明細書の記載及び後述する試験法等により、あるアマドリアーゼ又はその変異体が本発明のキットに使用可能か、すなわち所望の安定性を有するか調べることができる。

【０１７６】

（緩衝剤）

本発明のキット又は組成物には、アマドリアーゼの活性が失活しない範囲であるｐＨ５．０～ｐＨ１０．０、好ましくはｐＨ６．０～ｐＨ８．０の範囲で緩衝能を有する緩衝剤又は緩衝液を適宜加えてよい。本明細書において緩衝剤というとき、特に断らない限り、この用語は１以上の緩衝剤を包含するものとする。緩衝液とは溶液のpHを一定範囲に保つ緩衝作用（緩衝能）のある溶液のことをいい、緩衝剤とは溶液に緩衝作用を付与する物質をいう。緩衝剤は、弱酸を例にとると、弱酸とその塩から構成され、この場合、当該塩を共役塩と呼ぶ。ある緩衝剤についての濃度は、当該緩衝剤のベースとなる化合物の単独形態とその共役塩の形態とを合計したベース化合物についての濃度をいう。例えば100mMのグッド緩衝剤というとき、これは終濃度として溶液に含まれるグッド緩衝剤化合物及びその共役塩を合計したグッド緩衝剤化合物濃度が100mMであることをいう。

【０１７７】

本発明のキット又は組成物に用いることのできる緩衝剤としては、例えば、グッド緩衝剤、リン酸及び／又はその塩を含むリン酸緩衝剤、例えばリン酸カリウム緩衝剤又はリン酸ナトリウム緩衝剤、有機酸緩衝剤及び／又はその塩を含む有機酸緩衝剤、例えばトリカルボン酸緩衝剤及び／又はその塩を含むトリカルボン酸緩衝剤、例えばクエン酸及び／又はその塩を含むクエン酸緩衝剤、ホウ酸及び／又はその塩を含むホウ酸緩衝剤、モノカルボン酸緩衝剤及び／又はその塩を含むモノカルボン酸緩衝剤、例えば酢酸緩衝剤及び／又はその塩を含む酢酸緩衝剤等の緩衝剤、並びにそれらの混合物が挙げられる。

【０１７８】

グッド緩衝剤（グッドバッファーともいう）は、一般にはNorman Goodらによって提唱された生化学実験に適した種々の緩衝剤等を指す。Goodらは1966年に12種類の緩衝剤を提唱した（Goodら、(1966)、Biochemistry 5 (2): 467-477）。その後、他にも緩衝剤が追加され、以下の20種が提唱されている：アセトアミドグリシン、ＡＣＥＳ（N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸）、ＡＤＡ（N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸、ＢＥＳ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸）、Ｂｉｃｉｎ（N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン）、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ（ビス(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン）、コラミン塩酸、ＥＰＰＳ（4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸）、ＨＥＰＰＳと呼ぶこともある）、グリシンアミド、ＨＥＰＥＳ（4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸）、ＨＥＰＰＳＯ（N-(ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＭＥＳ（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）、ＭＯＰＳ（3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸）、ＭＯＰＳＯ（2-ヒドロキシ-3-モルホリノプロパンスルホン酸）、ＰＩＰＥＳ（ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)）、ＰＯＰＳＯ（ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)）、ＴＡＰＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＴＡＰＳＯ（3-[N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＴＥＳ（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸）、及びトリシン（N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン）（Go

odら, (1972) Methods Enzymol. 24: 53-68；Goodら(1980) Anal. Biochem. 104 (2): 300-310）。上記の他にも、必ずしもGoodらによって提唱されたものではないが、ＡＭＰＳＯ（N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、ＣＡＢＳ（4-(シクロヘキシルアミノ)-1-ブタンスルホン酸）、ＣＡＰＳ（N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）、ＣＨＥＳ（N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸）、ＣＡＰＳＯ（N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシル-3-アミノプロパンスルホン酸）、及びＤＩＰＳＯ（3-(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）などの化合物もpKa等が評価され、いわゆるグッド緩衝剤として一般に受け入れられている。本明細書においてグッド緩衝剤というとき、この用語は、アセトアミドグリシン、ＡＣＥＳ、ＡＤＡ、ＢＥＳ、Ｂｉｃｉｎ、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、コラミン塩酸、ＥＰＰＳ、グリシンアミド、ＨＥＰＥＳ、ＨＥＰＰＳＯ、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、ＰＩＰＥＳ、ＰＯＰＳＯ、ＴＡＰＳ、ＴＡＰＳＯ、ＴＥＳ、トリシン、ＡＭＰＳＯ、ＣＡＢＳ、ＣＡＰＳ、ＣＨＥＳ、ＣＡＰＳＯ、ＤＩＰＳＯ及びこれらの混合物を包含するものとする。

【０１７９】

塩としてはベース化合物のナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩及びアンモニウム塩が挙げられるがこれに限らない。

【０１８０】

本発明の緩衝剤は、適当な濃度で本発明のキット又は組成物に用いることができる。通常、本発明のキット又は組成物に添加する本発明の緩衝剤の量は、測定溶液での終濃度に基づいて算出することができる。ある実施形態において測定溶液における本発明の緩衝剤の終濃度は、好ましくは当該測定溶液に生じうるpH変化を緩衝するのに十分な濃度である。本発明の緩衝剤の終濃度は、例えば1mM以上、5mM以上、10mM以上、20mM以上、例えば50mM以上、1M以下、500mM以下、400mM以下、300mM以下、200mM以下、100mM以下、例えば1mM～1M、5mM～500mM、10mM～300mM、例えば50mM～100mMであり得る。

【０１８１】

本発明の緩衝剤としてHEPES緩衝剤又はTES緩衝剤を用いる場合、その濃度は10mM～500mM、例えば20mM～300mM、例えば50mM～200mMであり得る。本発明の緩衝剤はそのpKaを考慮し、目的のpHを達成するために複数を適宜組み合わせてよい。組み合わせはHEPES緩衝剤とTES緩衝剤との組み合わせのようにグッド緩衝剤同士の態様に限られず、グッド緩衝剤と他の緩衝剤とを組み合わせてもよい。

【０１８２】

（界面活性剤）

本発明の組成物は界面活性剤を含み得る。界面活性剤としては、本発明のＨｂＡ１ｃの測定方法を可能とする界面活性剤であれば特に制限は無く、非イオン性界面活性剤やイオン性の界面活性剤、例えば、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤等が挙げられるが、特にカチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤が好ましい。本明細書において界面活性剤というとき、特に断らない限り、この表現は１以上の界面活性剤を包含するものとする。

【０１８３】

非イオン界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、脂肪酸ソルビタンエステル、アルキルポリグルコシド、脂肪酸ジエタノールアミド、アルキルモノグリセリルエーテルなどが挙げられる。

【０１８４】

カチオン性界面活性剤としてはアルキルトリメチルアンモニウム塩、ジアルキルジメチルアンモニウム塩、アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩、ピリジニウム塩、ホスホニウム塩、イミダゾリウム塩、イソキノニウム塩などが挙げられるがこれに限らない。カチオン性界面活性剤としては、第四級アンモニウム塩、ピリジニウム塩やホスホニウム塩が挙げられるがこれに限らない。

【０１８５】

カチオン性界面活性剤の対となる陰イオンZ^-は例えばCl^-、Br^-、I^-等でありうる。

【０１８６】

アニオン性界面活性剤としては、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩、アルキル硫酸塩、例えばドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、アルファーオレフィンスルホン酸塩、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、α－スルホ脂肪酸エステル塩及び天然脂肪酸のアルカリ金属塩などが挙げられるがこれに限らない。

【０１８７】

両性界面活性剤としては、例えば、アルキルジメチルアミンオキシド、アルキルカルボキシベタインなどが挙げられる。

【０１８８】

（本発明のアマドリアーゼの緩衝剤の存在下での安定性の向上）

上記のような手段で得られる本発明のアマドリアーゼは、遺伝子改変等により、そのアミノ酸配列に変異を生じた結果、改変前のものと比較して緩衝剤の存在下での安定性が向上していることを特徴とする。具体的には、改変前のアマドリアーゼの活性と比較して、改変アマドリアーゼは、本明細書中に記載の活性測定方法及び緩衝剤の存在下での安定性評価方法に記載した反応条件下で、所定の緩衝剤を添加してから、５３℃、１０分の熱処理後の残存活性が、向上していることを特徴とする。ここで、残存活性（％）とは、熱処理前の活性を１００とした場合の熱処理後の活性の割合をパーセンテージ（％）で表したものである。

【０１８９】

本発明の改変アマドリアーゼの残存活性の向上度合は限定されないが、例えば、本発明の変異を導入する前のアマドリアーゼの緩衝剤存在下での５３℃、１０分の熱処理後の残存活性を基準として（1倍として）、本発明の変異を導入したアマドリアーゼについて緩衝剤存在下での５３℃、１０分の熱処理後の残存活性が好ましくは１．５倍以上、２倍以上、３倍以上、４倍以上、５倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、110倍以上、120倍以上、例えば130倍以上である改変アマドリアーゼが本発明に包含される。熱処理温度は上記に代えて５０～６０℃、例えば５３～５８℃、例えば５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、又は５８℃であり得る。

【０１９０】

例えば、本発明に包含される、大腸菌JM109（pKK223-3-CFP-T7-R288N）株が生産する本発明のアマドリアーゼを、0.1M HEPES緩衝剤の存在下で、５３℃、１０分間の熱処理に供すると、本発明の変異を導入する前のアマドリアーゼであるCFP-T7の残存活性が０．６％であるのに対し、本発明の変異導入後のアマドリアーゼは残存活性が約２４．７％である。これは４１倍以上の残存活性の向上に当たる。このように緩衝剤存在下での安定性が向上したアマドリアーゼは、該酵素含有製品等における保存性が著しく向上し、また、測定反応を広範な条件で可能とし、産業上非常に有利である。

【０１９１】

（アマドリアーゼ活性の測定方法）

アマドリアーゼの活性の測定方法としては、種々の方法を用いることができるが、一例として、以下に、本発明で用いるアマドリアーゼ活性の測定方法について説明する。

【０１９２】

（本発明におけるアマドリアーゼ活性の測定方法）

本発明におけるアマドリアーゼの酵素活性の測定方法としては、酵素の反応により生成する過酸化水素量を測定する方法や酵素反応により消費する酸素量を測定する方法などが主な測定方法として挙げられる。以下に、一例として、過酸化水素量を測定する方法について示す。

【０１９３】

以下、本発明におけるアマドリアーゼの活性測定には、断りのない限り、フルクトシルバリンを基質として用いる。なお、酵素力価は、フルクトシルバリンを基質として測定し

たとき、１分間に１μｍｏｌの過酸化水素を生成する酵素量を１Ｕと定義する。フルクトシルバリン等の糖化アミノ酸、及びフルクトシルバリルヒスチジン等の糖化ペプチドは、阪上らの方法に基づき合成、精製することができる（特開2001-95598号参照）。

【０１９４】

Ａ．試薬の調製

（１）試薬１：ＰＯＤ－４－ＡＡ溶液

４．０ｋＵのパーオキシダーゼ（キッコーマン社製）、１００ｍｇの４－アミノアンチピリン（東京化成工業社製）を０．１Ｍのリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０）に溶解し、１Ｌに定容する。

（２）試薬２：ＴＯＯＳ溶液

５００ｍｇのＴＯＯＳ（N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンナトリウム、同仁化学社製）をイオン交換水に溶解し、１００ｍｌに定容する。

（３）試薬３：基質溶液（１５０ｍＭ；終濃度　５ｍＭ）

フルクトシルバリン４１７ｍｇをイオン交換水に溶解して１０ｍｌに定容する。

【０１９５】

Ｂ．測定法

２．７ｍｌの試薬１，１００μｌの試薬２、及び１００μｌの試薬３を混和し、３７℃で５分間予備加温する。その後、酵素液を１００μｌ加えてよく混ぜた後、分光光度計（Ｕ－３９００、日立ハイテクノロジーズ社製）により、５５５ｎｍにおける吸光度を測定する。測定値は、５５５ｎｍにおける１分後から３分後の１分間あたりの吸光度変化とする。なお対照液は、１００μｌの試薬３の代わりに１００μｌのイオン交換水を加える以外は前記と同様に調製する。３７℃、１分当たりに生成される過酸化水素のマイクロモル数を酵素液中の活性単位（Ｕ）とし、下記の式に従って算出する。

【０１９６】

活性（Ｕ／ｍｌ）＝　｛（ΔＡｓ－ΔＡ$_0$）×３．０×ｄｆ｝÷（３９．２×０．５×０．１）

ΔＡｓ　：　反応液の１分間あたりの吸光度変化

ΔＡ$_0$　：　対照液の１分間あたりの吸光度変化

３９．２：　反応により生成されるキノンイミン色素のミリモル吸光係数（ｍＭ$^{-1}$・ｃｍ$^{-1}$）

０．５　：　１ｍｏｌの過酸化水素による生成されるキノンイミン色素のｍｏｌ数

ｄｆ　：　希釈係数

【０１９７】

（緩衝剤存在下での熱安定性評価方法）

上記の活性測定方法において、種々の緩衝剤の存在下で熱処理を行った後のアマドリアーゼの残存活性測定を行うことで、緩衝剤存在下でのアマドリアーゼの熱安定性を評価することができる。例えば、アマドリアーゼ粗酵素液を約0.5U/mlとなるように、0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)、ＴＥＳ緩衝液(pH7.0)、又はリン酸緩衝液(pH7.0)で希釈し、５３℃にて１０分間加温する。上記の活性測定方法を用いて加熱前と加熱後のサンプルの酵素活性を測定し、加熱前の活性を１００とした場合の加熱後の活性の割合、すなわち、残存活性（％）を求めることにより、緩衝剤存在下での熱安定性を評価する。

【０１９８】

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明の技術的範囲は、それらの例により何ら限定されるものではない。

【０１９９】

［実施例１］

（緩衝剤存在下での熱安定性向上型変異について）

（１）組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAの調製

CFP-T7遺伝子（配列番号２）を含む組換え体プラスミドを有する大腸菌JM109(pKK223-3-CFP-T7)株（国際公開2007/125779号参照）を、LB-amp培地[1%(W/V) バクトトリプトン、

0.5%(W/V) ペプトン、0.5%(W/V) NaCl、50μｇ/ml Ampicilin]2.5mlに接種して、３７℃で２０時間振とう培養し、培養物を得た。

【０２００】

この培養物を7,000rpmで、５分間遠心分離することにより集菌して菌体を得た。次いで、この菌体よりQIAGEN tip-100（キアゲン社製）を用いて組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7を抽出して精製し、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7のDNA2.5μｇを得た。

【０２０１】

（２）組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAの部位特異的改変操作

得られた組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号１５、１９の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、以下の条件でＰＣＲ反応を行った。

【０２０２】

すなわち、10×KOD-Plus-緩衝液を5μl、dNTPが各2mMになるよう調製されたdNTPs混合溶液を5μl、25mMの$MgSO_4$溶液を2μl、鋳型となるpKK223-3-CFP-T7 DNAを50ng、上記合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ15pmol、KOD-Plus-を1Unit加えて、滅菌水により全量を50μlとした。調製した反応液をサーマルサイクラー（エッペンドルフ社製）を用いて、94℃で２分間インキュベートし、続いて、「94℃、15秒」－「50℃、30秒」－「68℃、６分」のサイクルを30回繰り返した。

【０２０３】

反応液の一部を1.0%アガロースゲルで電気泳動し、約6,000bpのDNAが特異的に増幅されていることを確認した。こうして得られたDNAを制限酵素DpnI(NEW ENGLAND BIOLABS社製）で処理し、残存している鋳型DNAを切断した後、大腸菌JM109を形質転換し、LB-amp寒天培地に展開した。生育したコロニーをLB-amp培地に接種して振とう培養し、上記（１）と同様の方法でプラスミドDNAを単離した。該プラスミド中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列を、マルチキャピラリーDNA解析システムApplied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザ（Life Technologies社製）を用いて決定し、その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンがアスパラギンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-R288N）を得た。

【０２０４】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンをアスパラギン酸に置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号１６、１９の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンがアスパラギン酸に置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-R288D）を得た。

【０２０５】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンをアラニンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号１７、１９の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンがアラニンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-R288A）を得た。

【０２０６】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のアルギニンをグルタミンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号１８、１９の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２８８位のア

ルギニンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-R288Q）を得た。

【０２０７】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンをグルタミンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２０、２３の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K290Q）を得た。

【０２０８】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンをアスパラギンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２１、２３の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンがアスパラギンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K290N）を得た。

【０２０９】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンをアラニンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２２、２３の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の２９０位のリシンがアラニンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K290A）を得た。

【０２１０】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンをグルタミンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２４、２７の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K311Q）を得た。

【０２１１】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンをアラニンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２５、２７の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンがアラニンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K311A）を得た。

【０２１２】

続いて、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンをアスパラギンに置換するために、組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、配列番号２６、２７の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号１記載のアミノ酸配列の３１１位のリシンがアスパラギンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド（pKK223-3-CFP-T7-K311N）を得た。

【０２１３】
（３）各種改変型アマドリアーゼの生産
上記の手順により得られた上記組換え体プラスミドを保持するそれぞれの大腸菌JM109株を、0.1mMのIPTGを添加したLB-amp培地3mlにおいて、30℃で16時間培養した。その後、各菌体をpH7.0の0.01Mリン酸緩衝液で洗浄、超音波破砕、15,000rpmで10分間遠心分離し、各粗酵素液1.5mlを調製した。
【０２１４】
（４）各種改変型アマドリアーゼの緩衝剤存在下での熱安定性評価
このようにして調製した各粗酵素液をサンプルとし、上記の緩衝剤存在下での熱安定性評価方法に従って、各種改変型アマドリアーゼの熱安定性評価を行った。緩衝液として、0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)又はリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。結果を表１に示す。
【０２１５】
表１において、CFP-T7は、大腸菌JM109(pKK223-3-CFP-T7)株由来のアマドリアーゼを示す。なお、本実施例ではCFP-T7を変異元酵素としたため、表中に記載の「アミノ酸変異」の記載には、CFP-T7に既に導入済みの各種変異点は含めていない。
【０２１６】
【表１】

酵素	アミノ酸変異	0.1M リン酸下における残存活性(%)	0.1M HEPES 下における残存活性(%)
CFP-T7	変異無し	15.1	0.6
CFP-T7/R288N	R288N	8.6	24.7
CFP-T7/R288D	R288D	0.0	0.7
CFP-T7/R288A	R288A	1.4	1.3
CFP-T7/R288Q	R288Q	1.9	2.2
CFP-T7/K290Q	K290Q	10.0	9.6
CFP-T7/K290N	K290N	0.0	0.6
CFP-T7/K290A	K290A	1.2	0.6
CFP-T7/K311Q	K311Q	26.7	18.9
CFP-T7/K311A	K311A	13.0	7.1
CFP-T7/K311N	K311N	1.9	2.0

【０２１７】
表１に示す通り、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下での熱処理後のCFP-T7の残存活性は０．６％となった。これに対し、部位特異的変異導入により得られた変異体では、残存活性が有意に向上し、顕著なものでは変異導入前のCFP-T7の残存活性と比較して40倍以上の残存活性の向上が見られた。したがって、配列番号１における２８８位、２９０位及び３１１位が、緩衝剤存在下でのアマドリアーゼの熱安定性を向上させる変異点であることが確認された。
【０２１８】
また、上記の条件で、ただし緩衝剤として0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)の代わりにＴＥＳ緩衝液(pH7.0)を使用した場合も、変異なしのCFP-T7が7.2%の残存活性まで低減したのに対して、CFP-T7/R288N変異体は39.5％の活性が残存し、CFP-T7/K290Q変異体は14.3％の活性が残存し、CFP-T7/K311Q変異体は24.9％の活性が残存し、CFP-T7/K311A変異体は14.7％の活性が残存した。したがって、配列番号１における２８８位、２９０位及び３１１位が、TES緩衝剤存在下においても、アマドリアーゼの熱安定性を向上させる変異点であることが確認された。グッド緩衝液であるHEPES緩衝剤とTES緩衝剤において、熱安定性向上効果が示されたこれらの変異体は、その他のグッド緩衝剤においても、さらには複数種

の緩衝剤を混合した緩衝剤を用いた場合においても、同様に熱安定性向上効果を示すと考えられる。

【０２１９】

［実施例２］

（安定性向上型変異の蓄積）

実施例１で見出された安定性向上変異の知見に基づき、これらを組み合わせて変異を蓄積させることにより、さらにグッド緩衝剤存在下での熱安定性を高めたアマドリアーゼを取得することを目的として、２重変異体及び３重変異体を作製した。

【０２２０】

実施例１と同様にして、pKK223-3-CFP-T7-R288N DNAを鋳型とし、配列番号２３、２８の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２８８位のアルギニンがアスパラギンに、及び２９０位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-CFP-T7-R288N/K290Q)を得た。

【０２２１】

実施例１と同様にして、pKK223-3-CFP-T7-R288N DNAを鋳型とし、配列番号２４、２７の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２８８位のアルギニンがアスパラギンに、及び３１１位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-CFP-T7-R288N/K311Q)を得た。

【０２２２】

実施例１と同様にして、pKK223-3-CFP-T7-K290Q DNAを鋳型とし、配列番号２４、２７の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２９０位のリシンがグルタミンに、及び３１１位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-CFP-T7-K290Q/K311Q)を得た。

【０２２３】

さらに上記と同様にして、pKK223-3-CFP-T7-R288N/K290Q DNAを鋳型とし、配列番号２４、２７の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２８８位のアルギニンがアスパラギンに、２９０位のリシンがグルタミンに、及び３１１位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-CFP-T7-R288N/K290Q/K311Q)を得た。

【０２２４】

これらのプラスミドで大腸菌を形質転換し、得られた改変型アマドリアーゼ生産能を有する大腸菌JM109（pKK223-3-CFP-T7）株、JM109（pKK223-3-CFP-T7-R288N/K290Q）株、JM109（pKK223-3-CFP-T7-R288N/K311Q）株、JM109（pKK223-3-CFP-T7-K290Q/K311Q）株、JM109（pKK223-3-CFP-T7-R288N/K290Q/K311Q）株を、上記の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液を調製した。得られた各粗酵素液をサンプルとし、上記の緩衝剤存在下での熱安定性評価方法に従って、各種改変型アマドリアーゼの熱安定性評価を行った。緩衝液として、0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)、ＴＥＳ緩衝液(pH7.0)、又はリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。結果を表２に示す。

【０２２５】

【表２】

酵素	アミノ酸変異	0.1M リン酸下における残存活性(%)	0.1M HEPES 下における残存活性(%)	0.1M TES 下における残存活性(%)
CFP-T7	変異無し	15.1	0.6	7.2
CFP-T7/R288N/K290Q	R288N/K290Q	19.6	58.8	71.2
CFP-T7/R288N/K311Q	R288N/K311Q	15.4	51.0	67.9
CFP-T7/K290Q/K311Q	K290Q/K311Q	4.1	26.8	38.9
CFP-T7/R288N/K290Q/K311Q	R288N/K290Q/K311Q	25.2	79.3	82.8

【０２２６】

表２に示すとおり、作製した二重変異体及び三重変異体はいずれも、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下で、及び0.1MのＴＥＳ存在下での熱処理後の残存活性が有意に向上した。特に三重変異体CFP-T7-R288N/K290Q/K311Qでは、変異導入前のCFP-T7と比較して130倍以上の残存活性の向上が見られた。よって実施例１で確認された本発明の変異点を適宜組み合わせる

ことによって、一層優れたグッド緩衝剤存在下での熱安定性を有するアマドリアーゼが作出され得ることが明らかとなった。

【０２２７】

[実施例３]

(Curvularia clavata由来ケトアミンオキシダーゼについて)

配列番号６はCurvularia clavata由来ケトアミンオキシダーゼ（以降CcFXと称する）のアミノ酸配列である（国際公開第2004/104203号）。配列番号６のアミノ酸配列をコードする遺伝子（配列番号１４）を定法である遺伝子断片のPCRによる全合成によりｃＤＮＡを全合成することで取得した（終止コドンTAAを含む）。このとき、配列番号１４の５′末端、３′末端にはそれぞれEcoRIサイトとHindIIIサイトを付加した。また、クローニングした遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列全長は図１のCcFXの配列と一致していることを確認した。続いて、取得した配列番号１４の遺伝子を大腸菌で発現させるために、以下の手順を行った。まず、上記で全合成した遺伝子をEcoRIサイトとHindIIIサイトの２種類の制限酵素（タカラバイオ社製）で処理し、pKK-223-3 Vector（GEヘルスケア社製）のEcoRI-HindIIIサイトに挿入することで、組換え体プラスミドpKK223-3-CcFXを取得し、上記と同様の条件で大腸菌JM109株を形質転換し、大腸菌JM109（pKK223-3-CcFX）株を得た。

【０２２８】

次に、CcFXに、グッド緩衝剤存在下での熱安定性を向上させる変異を導入した。具体的にはConiochaeta属由来アマドリアーゼ（CFP-T7）における２８８位及び２９０位にそれぞれ対応する位置であるCcFXの２８６位及び２８８位に変異を導入した。

【０２２９】

具体的にはpKK223-3ベクターにCcFX遺伝子が挿入されたプラスミドDNAを鋳型として、グッド緩衝剤存在下での熱安定性向上型変異の蓄積を行った。CFP-T7遺伝子の代わりにCcFX遺伝子を用いた以外は、手順は上記と同様に行った。合成オリゴヌクレオチド（配列番号２９、３０、３１）、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、実施例１（２）と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109株の形質転換及び生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のアマドリアーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。

【０２３０】

これにより、２８６位のアルギニンがアスパラギンに置換された変異体pKK223-3-CcFX-R286N及び２８６位のアルギニンがアスパラギンに置換され、２８８位のリシンがグルタミンに置換された変異体pKK223-3-CcFX-R286N/K288Qを得た。

【０２３１】

次に実施例１（３）に記載の手順で改変型アマドリアーゼを生産した。続いて、上記の緩衝剤存在下での熱安定性評価方法に従って、各種改変型アマドリアーゼの熱安定性評価を行った。緩衝液として、0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)、ＴＥＳ緩衝液(pH7.0)、又はリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。ただし、熱処理条件に関しては、５３℃の代わりに５８℃にて１０分間、アマドリアーゼを熱処理し、緩衝液として0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)、ＴＥＳ緩衝液(pH7.0)、又はリン酸緩衝液(pH7.0)を用いた。結果を表３に示す。

【０２３２】

【表３】

酵素	アミノ酸変異	0.1M リン酸下における残存活性(%)	0.1M HEPES 下における残存活性(%)	0.1M TES 下における残存活性(%)
CcFX	変異無し	11.9	37.5	20.8
CcFX/R286N	R286N	2.9	68.9	52.1
CcFX/R286N/K288Q	R286N/K288Q	38.5	83.6	71.3

【０２３３】

表３に示す通り、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下での熱処理後のCcFXの残存活性は３７．５％となった。これに対し、部位特異的変異導入により得られた変異体では、残存活性が有意に向上し、CcFX-R286N変異体では６８．９％の残存活性が見られた。CcFX-R286N/K288Q変異体では８３．６％の残存活性が見られた。また0.1MのＴＥＳ存在下での熱処理後のCcFXの残存活性は２０．８％となった。これに対し、CcFX-R286N変異体では５２．１％の残存活性が見られた。またCcFX-R286N/K288Q変異体では７１．３％の残存活性が見られた。

【０２３４】

このように、CFP-T7についてグッド緩衝剤での熱安定性向上が確認された変異を、CcFXの対応する位置に導入したところ、上記のとおり同様のグッド緩衝剤での熱安定性向上が確認された。したがって、この変異導入の効果は特定の種に由来するアマドリアーゼに限

定されるものではなく、対応する位置に変異を導入することで各種のアマドリアーゼについてもグッド緩衝剤存在下での熱安定性を向上させる効果がある。また変異の累積的効果も示された。

【０２３５】

なおConiochaeta属由来アマドリアーゼとCurvularia clavata由来ケトアミンオキシダーゼは約８０％のアミノ酸配列同一性を有する。よってConiochaeta属由来アマドリアーゼ又はCurvularia clavata由来ケトアミンオキシダーゼと８０％以上のアミノ酸配列同一性を有する他の種由来のアマドリアーゼについても、上記位置に対応する位置に変異を導入することでグッド緩衝剤での熱安定性を向上させることができると考えられる。

【０２３６】

また、CFP-T7の２８８位ではアスパラギン、アラニン又はグルタミンへの置換によりグッド緩衝剤存在下での熱安定性の向上が見られ、ＣｃFXの２８６位ではアスパラギンへの置換によりグッド緩衝剤存在下での熱安定性の向上が見られた。このことから、ＣｃFXについても、２８６位をアラニン又はグルタミンに置換することによりグッド緩衝剤での熱安定性が向上すると考えられる。他の各種のアマドリアーゼについても同様である。

【０２３７】

[実施例４]

(Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼについて)

配列番号９はPhaeosphaeria nodorum由来フルクトシルペプチドオキシダーゼ（以降PnFXと称する）のアミノ酸配列である（Biotechnology and Bioengineering, 106, 358-366, 2010）。配列番号９のアミノ酸配列をコードする遺伝子（配列番号３２）を定法である遺伝子断片のPCRによる全合成によりcDNAを全合成することで取得した（終止コドンTAAを含む）。このとき、配列番号３２の５′末端、３′末端にはそれぞれEcoRIサイトとHindIIIサイトを付加した。また、クローニングした遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列全長は図１のPnFXの配列と一致していることを確認した。続いて、取得した配列番号３２の遺伝子を大腸菌で発現させるために、以下の手順を行った。まず、上記で全合成した遺伝子をEcoRIサイトとHindIIIサイトの２種類の制限酵素で処理し、pKK-223-3 VectorのEcoRI-HindIIIサイトに挿入することで、組換え体プラスミドpKK223-3-PnFXを取得し、上記と同様の条件で大腸菌JM109株を形質転換し、大腸菌JM109（pKK223-3-PnFX）株を得た。

【０２３８】

次に、PnFXにグッド緩衝剤存在下で熱安定性を向上させる変異を導入した。具体的にはConiochaeta属由来アマドリアーゼ（CFP-T7）における２８８位及び２９０位に対応する位置であるPnFXの２８４位及び２８６位に変異を導入した。

【０２３９】

具体的には実施例１と同様にして、pKK223-3-PnFX DNAを鋳型とし、配列番号３３、３５の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２８４位のアルギニンがアスパラギンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-PnFX-R284N)を得た。

【０２４０】

実施例１と同様にして、pKK223-3-PnFX-R284N DNAを鋳型とし、配列番号３４、３５の合成オリゴヌクレオチドを使用して、２８４位のアルギニンがアスパラギンに、及び２８６位のリシンがグルタミンに置換された改変型アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pKK223-3-PnFX-R284N/K286Q)を得た。

【０２４１】

次に実施例１（３）に記載の手順で改変型アマドリアーゼを生産した。続いて、上記の緩衝剤存在下での熱安定性評価方法に従って、各種改変型アマドリアーゼの熱安定性評価を行った。緩衝液として、0.1M ＨＥＰＥＳ緩衝液(pH7.0)又はリン酸緩衝液(pH7.0)を用い、熱処理条件に関しては、５３℃の代わりに５５℃にて１０分間、アマドリアーゼを熱処理し改変型アマドリアーゼの熱安定性評価を行った。結果を表４に示す。

【０２４２】

【表４】

酵素	アミノ酸変異	0.1M リン酸下における残存活性(%)	0.1M HEPES 下における残存活性(%)
PnFX	変異無し	12.7	0.0
PnFX/R284N	R284N	0.7	0.7
PnFX/R284N/K286Q	R284N/K286Q	0.0	4.7

【０２４３】
表４に示す通り、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下での熱処理後のPnFXの残存活性は０．０％となった。すなわちPnFXはＨＥＰＥＳの存在下で安定性が低いことを見いだした。これに対し、部位特異的変異導入により得られた変異体では、残存活性が有意に向上し、PnFX-R284N変異体では０．７％の残存活性が見られた。この熱処理条件下での未変異PnFXの残存活性が0.1%であったとするならばPnFX-R284N変異体では残存活性は７倍向上したこととなる。したがって、PnFX-R284N変異体は、本発明の変異を導入していないPnFXと比較して、少なくとも７倍以上、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下での熱処理後の残存活性が向上したこととなる。また、PnFX-R284N/K286Q変異体は、本発明の変異を導入していないPnFXと比較して、少なくとも４７倍以上、0.1MのＨＥＰＥＳ存在下での熱処理後の残存活性が向上したこととなる。

【０２４４】
このように、CFP-T7についてグッド緩衝剤での熱安定性向上が確認された変異を、PnFXの対応する位置に導入したところ、上記のとおり同様のグッド緩衝剤での熱安定性向上が確認された。したがって、この変異導入の効果は特定の種に由来するアマドリアーゼに限定されるものではなく、対応する位置に変異を導入することで各種のアマドリアーゼについてもグッド緩衝剤での熱安定性を向上させる効果がある。また変異の累積的効果も示された。

【０２４５】
なおConiochaeta属由来アマドリアーゼとPhaeosphaeria nodorum由来フルクトシルペプチドオキシダーゼは約７５％のアミノ酸配列同一性を有する。よってConiochaeta属由来アマドリアーゼ又はPhaeosphaeria nodorum由来フルクトシルペプチドオキシダーゼと７５％以上のアミノ酸配列同一性を有する他の種由来のアマドリアーゼについても、上記位置に対応する位置に変異を導入することでグッド緩衝剤での熱安定性を向上させることができると考えられる。

【０２４６】
また、CFP-T7の２８８位ではアスパラギン、アラニン又はグルタミンへの置換によりグッド緩衝剤存在下での熱安定性の向上が見られ、PnFXの２８４位ではアスパラギンへの置換によりグッド緩衝剤存在下での熱安定性の向上が見られた。このことから、PnFXについても、２８４位をアラニン又はグルタミンに置換することによりグッド緩衝剤での熱安定性が向上すると考えられる。他の各種のアマドリアーゼについても同様である。

【０２４７】
本発明のこれらの変異点は、単独変異及び累積的変異として有効であるのみならず、既に知られている各種公知の変異と組み合わせ、また、本発明の変異同士を組み合わせることによって、実用上の利点を有する変異体を創出することに貢献することが期待される。

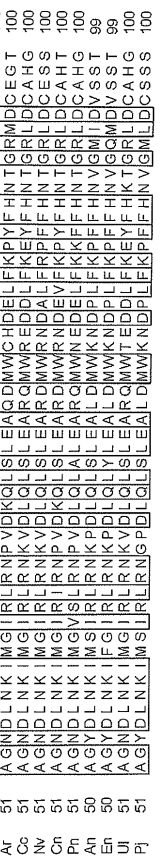
【０２４８】
「配列の簡単な説明」
配列番号１　CFP-T7のアミノ酸配列
配列番号２　CFP-T7の遺伝子配列
配列番号３　Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ
配列番号４　Pyrenochaeta sp.由来のケトアミンオキシダーゼ
配列番号５　Arthrinium sp.由来のケトアミンオキシダーゼ

配列番号６　Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼ
配列番号７　Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミンオキシダーゼ
配列番号８　Cryptococcus neoformans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ
配列番号９　Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ
配列番号１０　Aspergillus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ
配列番号１１　Emericella nidulans由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼ
配列番号１２　Ulocladium sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ
配列番号１３　Penicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ
配列番号１４　Curvularia clavata由来のケトアミンオキシダーゼの遺伝子配列
配列番号１５　R288N-Fw
配列番号１６　R288D-Fw
配列番号１７　R288A-Fw
配列番号１８　R288Q-Fw
配列番号１９　R288X-Rv
配列番号２０　K290Q-Fw
配列番号２１　K290N-Fw
配列番号２２　K290A-Fw
配列番号２３　K290X-Rv
配列番号２４　K311Q-Fw
配列番号２５　K311A-Fw
配列番号２６　K311N-Fw
配列番号２７　K311X-Rv
配列番号２８　R288N/K290Q-Fw
配列番号２９　CcR286N-Fw
配列番号３０　CcR286N/K288Q-Fw
配列番号３１　CcK288Q-Rv
配列番号３２　Phaeosphaeria nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼの遺伝子配列
配列番号３３　PnR284N-Fw
配列番号３４　PnR284N/K286Q-Fw
配列番号３５　PnK286Q-Rv

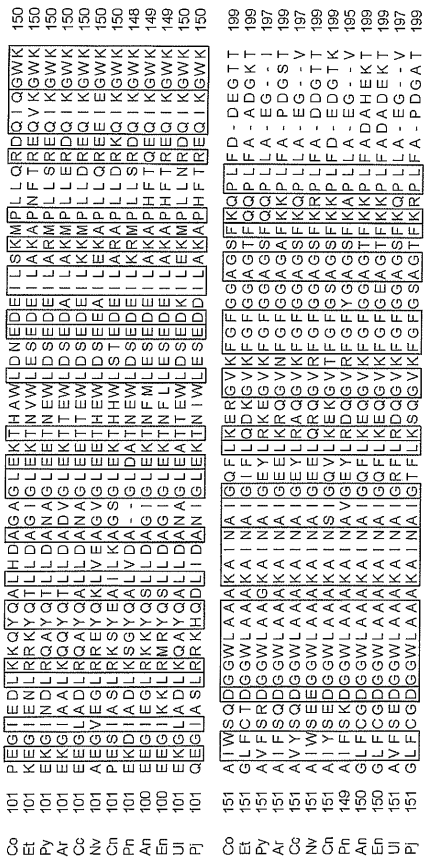
【０２４９】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

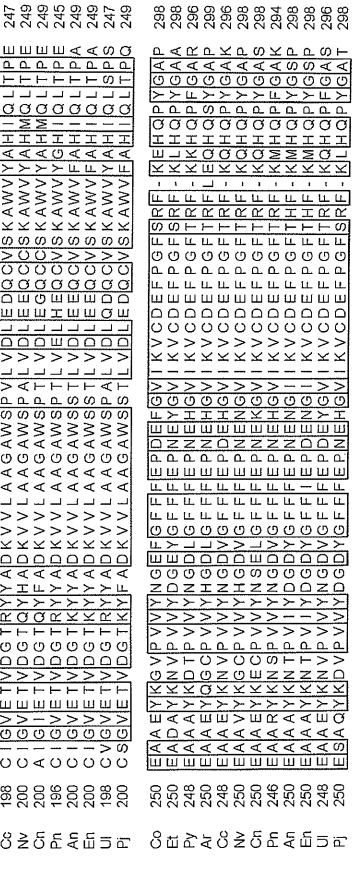
【図１－１】



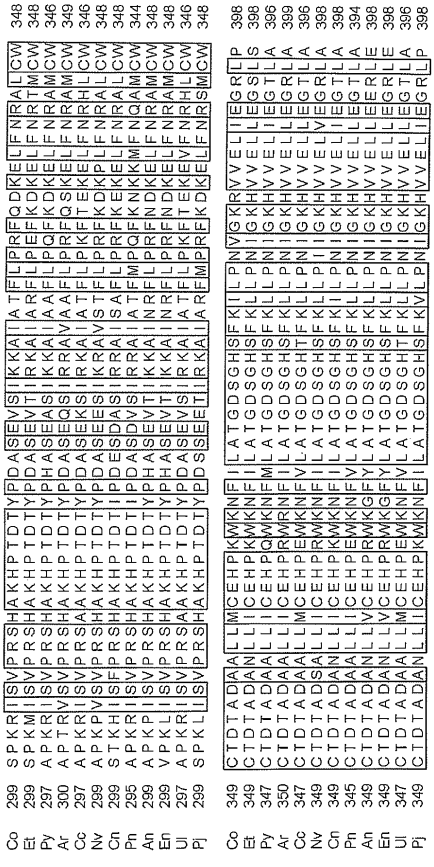
【図１－２】



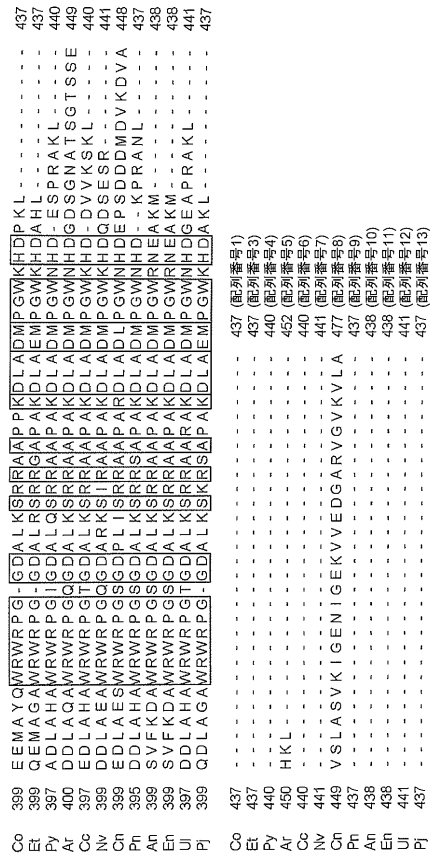
【図１－３】



【図１－４】



【図１－５】



【配列表】

2016123302000001.app

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 BA08 CA03 CA06 DA06 EA04 GA11 HA01 HA06 HA11
4B029 AA07 BB16 BB20 CC01 FA12
4B050 CC04 DD01 EE10 FF01 FF03E LL03
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ23 QQ61 QR03 QR41 QR72 QS02