

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6176922号
(P6176922)

(45) 発行日 平成29年8月9日 (2017.8.9)

(24) 登録日 平成29年7月21日 (2017.7.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02 Z N A

C 1 2 Q 1/26 (2006.01)

C 1 2 Q 1/26

請求項の数 10 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2012-527775 (P2012-527775)	(73) 特許権者	000004477
(86) (22) 出願日	平成23年8月4日 (2011.8.4)		キッコーマン株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/067898		千葉県野田市野田250番地
(87) 国際公開番号	W02012/018094	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成24年2月9日 (2012.2.9)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成26年7月17日 (2014.7.17)	(74) 代理人	100118773
審判番号	不服2016-7163 (P2016-7163/J1)		弁理士 藤田 節
審判請求日	平成28年5月16日 (2016.5.16)	(74) 代理人	100111741
(31) 優先権主張番号	特願2010-213070 (P2010-213070)		弁理士 田中 夏夫
(32) 優先日	平成22年9月24日 (2010.9.24)	(74) 代理人	100182992
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 江島 孝毅
(31) 優先権主張番号	特願2010-176967 (P2010-176967)	(72) 発明者	一柳 敦
(32) 優先日	平成22年8月6日 (2010.8.6)		千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 基質特異性が改変されたアマドリアーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 90% 以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むアマドリアーゼであって、

当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の以下の (t)、(u)、(v) 及び (a g) よりなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸が、以下の (t)、(u)、(v) 及び (a g) の各々に記載される置換後のアミノ酸残基へと置換されており、

(t) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸が、プロリン以外のアミノ酸、すなわちグルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンに置換されている；

(u) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸が、アラニン、システイン、またはセリンに置換されている；

(v) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸が、グリシン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、またはシステインに置換されている；

(a g) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 1 0 位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、リジン、またはアルギニンに置換されている；

かつ以下の (a) および / または (b) の性質を有する改変アマドリアーゼ：

(a) 前記 (t)、(u)、(v) 及び (a g) に記載の置換を有しない改変前の親アマドリアーゼと比較して、当該 (t)、(u)、(v) 及び / または (a g) に記載の置換を有することにより - フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減している；

(b) 前記 (t)、(u)、(v) 及び (a g) に記載の置換を有しない改変前の親アマドリアーゼと比較して、当該 (t)、(u)、(v) 及び / または (a g) に記載の置換を有することにより - フルクトシルバリンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減している。

10

【請求項 2】

改変前の親アマドリアーゼと比較して、さらに、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の以下の (w)、(x)、(y)、(z)、(a a)、(a b)、(a c)、(a d)、(a e)、(a f)、(a h)、(a i)、及び (a j) よりなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸が、以下の (w)、(x)、(y)、(z)、(a a)、(a b)、(a c)、(a d)、(a e)、(a f)、(a h)、(a i)、及び (a j) の各々に記載される置換後のアミノ酸残基へと置換されている、請求項 1 に記載の改変アマドリアーゼ：

20

(w) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 2 5 位のヒスチジンに対応する位置のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、またはアルギニンに置換されている；

(x) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 2 6 1 位のチロシンに対応する位置のアミノ酸が、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはリジンに置換されている；

(y) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 2 6 3 位のグリシンに対応する位置のアミノ酸が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸に置換されている；

30

(z) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 0 6 位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸が、アスパラギン酸よりも分子量の小さいアミノ酸、すなわちグリシン、アラニン、セリン、バリン、スレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、またはアスパラギンに置換されている；

(a a) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 1 0 3 位のグリシンに対応する位置のアミノ酸が、リジン、アルギニン、またはヒスチジンに置換されている；

(a b) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 3 5 5 位のアラニンに対応する位置のアミノ酸が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸に置換されている；

40

(a c) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 9 6 位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸が、アラニン、アスパラギン、ヒスチジン、またはセリンに置換されている；

(a d) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 6 6 位のリジンに対応する位置のアミノ酸が、グリシンにまたは / および 6 7 位のバリンがプロリンに置換されている；

(a e) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 7 0 位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸が、プロリンに置換されている；

(a f) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列

50

の 100 位のスレオニンに対応する位置のアミノ酸が、アルギニンに置換されている；

(a h) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 113 位のアラニンに対応する位置のアミノ酸が、グルタミン酸、またはリジンに置換されている；

(a i) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 114 位のロイシンに対応する位置のアミノ酸が、リジン、またはアルギニンに置換されている；

(a j) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 156 位のアスパラギン酸に対応する位置のアミノ酸が、アスパラギンに置換されている。

10

【請求項 3】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列と 90 % 以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、さらに、以下の (ba) から (be) よりなる群から選択されるアミノ酸残基の置換を含む、請求項 1 又は 2 に記載の改変アマドリアーゼ：

(ba) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

20

(bb) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換；

(bc) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換；

(bd) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

30

(be) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 110 位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換。

【請求項 4】

配列番号 272 に示すアミノ酸配列を含むアマドリアーゼであって、

40

当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有し、

前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有しない改変前の親アマ

50

ドリアーゼと比較して、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有することにより - フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減しており、かつ

前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および前記配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有しない改変前の親アマドリアーゼと比較して、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 154 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、当該配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有することにより - フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とする改変アマドリアーゼ。

【請求項 5】

配列番号 241 に示すアミノ酸配列を含み、以下の (ca) から (cc) よりなる群から選択されるアミノ酸残基の置換を有し、前記 (ca) から (cc) に記載の置換を有しない改変前の親アマドリアーゼと比較して、当該 (ca) から (cc) に記載の置換を有することにより - フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減しており、かつ前記 (ca) から (cc) に記載の置換を有しない改変前の親アマドリアーゼと比較して、当該 (ca) から (cc) に記載の置換を有することにより - フルクトシルバリンに対する反応性に対する - フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とする改変アマドリアーゼ：

(ca) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 110 位のリジンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

(cb) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 98 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

(cc) 当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 110 位のリジンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および当該アマドリアーゼのアミノ酸配列中における、配列番号 1 に示すアミノ酸配列の 259 位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換。

【請求項 6】

請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の改変アマドリアーゼ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 7】

請求項 6 記載のアマドリアーゼ遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

アマドリアーゼを製造する方法であり、以下の工程を含む方法：

(a k) 請求項 8 記載の宿主細胞を培養する工程；

(a l) 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；および

(a m) 培養物から改変アマドリアーゼを単離する工程。

【請求項 10】

請求項 1 から請求項 5 のいずれかに記載の改変アマドリアーゼを含む、糖化ヘモグロビンの測定に用いるためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、基質特異性が改変されたアマドリアーゼ、その遺伝子および組換え体 DNA、並びに基質特異性が改変されたアマドリアーゼの製造法に関する。

【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およびその誘導体）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 アミノ基、タンパク質中のリジン残基側鎖の 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。

20

【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な方法、すなわち、HbA1c をプロテアーゼ等で分解し、その 鎖アミノ末端より遊離させた -フルクトシルバリルヒスチジン（以降 FVH と表す）、若しくは -フルクトシルバリン（以降 FV 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 1～6 参照。）。実際には、HbA1c から FV を切り出す方法では、夾雑物等による影響が大きいと考えられ、特に現在では FVH を測る方法が主流となっている。

30

【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」とも言う）を酸化して、グリオキシル酸若しくは -ケトアルデヒド、アミノ酸若しくはペプチド、およ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、 FVH および / または FV 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（*Eu penicillium*）属、アルスリニウム（*Arthrini um*）属、カーブラリア（*Curvularia*）属、レプトスフェリア（*Leptosphaeria*）属、ネオコスモスポラ（*Neocosmospora*）属、オフィオボラス（*Ophiobolus*）属、プレオスポラ（*Pleospora*）属、ピレノケータ（*Pyrenochaeta*）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、ウロクラディウム（*Urocladium*）属、ペニシリウム（*Penicillium*）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、7～11、非特許文献 1

40

50

～ 4 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ノ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、フルクトシルアミノオキシダーゼ等の表現で記載されている場合もある。

【 0 0 0 7 】

酵素的方法による H b A 1 c の測定においては、アマドリアーゼの性質として厳密な基質特異性が要求される。例えば、先述の様に、遊離された F V H を定量することにより H b A 1 c の測定を実施する場合には、検体中に遊離状態で存在する、および/または、プロテアーゼ等を用いた H b A 1 c の処理工程において遊離される、F V H 以外の糖化アミノ酸や糖化ペプチドには作用しにくいアマドリアーゼを用いることが望ましい。特に、ヘモグロビン分子中に含まれるリジン残基側鎖の 1 位のアミノ基は糖化を受けることが知られており、この糖化を受けたリジン残基に由来する、1 位のアミノ基が糖化された - フルクトシルリジン (以降 F K と表す) が、プロテアーゼ処理等によって遊離されることが示唆されている (例えば、非特許文献 5 参照。)。そのため、測定誤差の原因物質となり得る F K に対し作用しにくい、基質特異性の高いアマドリアーゼが強く望まれている。一方で、従来知られたアマドリアーゼのほとんどは、F K への反応性が十分に低いものであるとはいえない。

10

【 0 0 0 8 】

一般的な技術として、酵素の基質特異性を改変するためには、酵素をコードする DNA に変異を加え、酵素のアミノ酸に置換を導入し、目的とする基質特異性を備えた酵素を選抜する方法が知られている。また、相同性の高い酵素において、アミノ酸置換によって基質特異性を高めたという例が既に知られている場合には、その情報をもとに基質特異性の向上を予想することが可能である。

20

【 0 0 0 9 】

実際、カーブラリア・クラベータ (*Curvularia clavata*) Y H 9 2 3 由来のケトアミノオキシダーゼおよびネオコスモスポラ・ヴァシンフェクタ (*Neocosmospora vasinfecta*) 4 7 4 由来のケトアミノオキシダーゼについては、数個のアミノ酸を置換することによって、F V H に対する基質特異性が向上した改変型ケトアミノオキシダーゼが示されている (特許文献 1 参照。)。例えば、カーブラリア・クラベータ Y H 9 2 3 由来のケトアミノオキシダーゼにおいては、5 8 位のイソロイシンをバリンに、6 2 位のアルギニンをヒスチジンに、3 3 0 位のフェニルアラニン ROI シンに置換することにより、- フルクトシル - (- ベンジルオキシカルボニルリジン) (以降 F Z K と表す) に対する酵素活性を F V H に対する酵素活性で割って導いた活性比である F Z K / F V H が 0 . 9 5 から 0 . 0 2 5 へと低減することが示されている。

30

【 0 0 1 0 】

しかし、上記文献において改変型ケトアミノオキシダーゼの基質特異性の評価に用いられている F Z K は、糖化ヘモグロビンをプロテアーゼで処理する工程において実際に生じる F K とは、分子量や構造の点でも相当に異なる化合物である。そのため、F Z K に対する反応性が低減していることをもって、実際の測定誤差の原因物質となり得る F K に対する反応性が低減したとはいえない。また、上記文献中の改変型ケトアミノオキシダーゼを用いて F K に対する反応性の低減を確認している旨の記載もない。

40

【 0 0 1 1 】

その他にも、アスペルギルス・ニードランス (*Aspergillus nidulans*) A 8 9 由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼにアミノ酸置換を導入し、基質特異性を改変することにより、F V H に対する反応性を新たに付与した改変型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが報告されている (例えば、特許文献 1 0 参照。)。例えば、アスペルギルス・ニードランス A 8 9 由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの、5 9 位のセリンをグリシンに、かつ 6 5 位のリジンをグリシンに置換することにより、または 1 0 9 位のリジンをグルタミンに置換することにより、新たに F V H に対する酵素活性が付与されることが示されている。しかしながら、当該アミノ酸置換が F K に対する反応性の低減に寄与するとの記載は無い。

50

【 0 0 1 2 】

また、他にも、アスペルギルス・ニードランス A 8 9 由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼにアミノ酸置換を導入し、基質特異性を改変することにより、F K に対する酵素活性を F V に対する酵素活性で割って導いた活性比である $F K / F V$ を低減させた改変型フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが報告されている（例えば、特許文献 1 2 参照。）。しかしながら、この改変酵素の F V H に対する酵素活性については何ら言及されていない。

【 0 0 1 3 】

すなわち、天然型もしくは変異型アマドリアーゼを含め、F K に対する酵素活性を F V H に対する酵素活性で割って導いた活性比である $F K / F V H$ が低い、および / または $F K / F V$ が低いアマドリアーゼの例は、これまでにごく僅か報告されているにすぎず、精度の高い H b A 1 c の測定を実現し得る、F K に対する反応性が十分に低いアマドリアーゼが依然として求められている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 4 】

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 4 2 0 3 号

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 5 / 4 9 8 5 7 号

【特許文献 3】特開 2 0 0 1 - 9 5 5 9 8 号公報

【特許文献 4】特公平 0 5 - 3 3 9 9 7 号公報

20

【特許文献 5】特開平 1 1 - 1 2 7 8 9 5 号公報

【特許文献 6】国際公開第 9 7 / 1 3 8 7 2 号

【特許文献 7】特開 2 0 0 3 - 2 3 5 5 8 5 号公報

【特許文献 8】特開 2 0 0 4 - 2 7 5 0 1 3 号公報

【特許文献 9】特開 2 0 0 4 - 2 7 5 0 6 3 号公報

【特許文献 1 0】特開 2 0 1 0 - 3 5 4 6 9 号公報

【特許文献 1 1】特開 2 0 1 0 - 5 7 4 7 4 号公報

【特許文献 1 2】特開 2 0 1 0 - 1 0 4 2 7 8 号公報

【非特許文献】

【 0 0 1 5 】

30

【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】J. Biol. Chem. 279, 27613 - 20, 2004

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 6 】

本発明が解決しようとする課題は、F K に対する反応性、具体的には、 $F K / F V H$ が低い、および / または $F K / F V$ が低いアマドリアーゼを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 7 】

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、一例として、コニオカエタ属由来のアマドリアーゼにおける特定のアミノ酸残基を特定のアミノ酸残基に置換する

50

ことにより、上記課題を解決し得ることを見出し、これを一実施形態として包含する本発明を完成した。

【 0 0 1 8 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

【 0 0 1 9 】

(1) 以下の (a) および / または (b) の性質を有するアマドリアーゼ :

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列に 1 または数個のアミノ酸の欠失、挿入、付加、および / または置換がなされたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減している。

10

【 0 0 2 0 】

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列に 1 または数個のアミノ酸の欠失、挿入、付加、および / または置換がなされたアミノ酸配列を有し、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減している。

【 0 0 2 1 】

(2) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の以下 (c) から (s) 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 つまたはそれ以上のアミノ酸残基の置換を有し、前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減しているか、および / または前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とするアマドリアーゼ。

20

【 0 0 2 2 】

(c) 9 8 位のグルタミン酸

(d) 2 5 9 位のバリン

(e) 1 5 4 位のセリン

(f) 1 2 5 位のヒスチジン

(g) 2 6 1 位のチロシン

(h) 2 6 3 位のグリシン

(i) 1 0 6 位のアスパラギン酸

(j) 1 0 3 位のグリシン

(k) 3 5 5 位のアラニン

(l) 9 6 位のアスパラギン酸

(s) 6 6 位のリジンまたは / および 6 7 位のバリン

(m) 7 0 位のグルタミン

(o) 1 0 0 位のスレオニン

(p) 1 1 0 位のグルタミン

(q) 1 1 3 位のアラニン

(r) 1 1 4 位のロイシン

(s) 1 5 6 位のアスパラギン酸

30

(3) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列のアミノ酸の以下 (t) から (a j) よりなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸が、以下 (t) から (a j) の各々に記載される置換後のアミノ酸残基へと置換されており、前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減しているか、および / または前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、
- フルクトシルバリンに対する反応性に対する
- フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とするアマドリアーゼ :

40

(t) 9 8 位のグルタミン酸がプロリン以外のアミノ酸、すなわちグルタミン、ヒスチジ

50

ン、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンに置換されている；

(u) 259位のバリンがアラニン、システイン、セリンに置換されている；

(v) 154位のセリンがグリシン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、システインに置換されている；

(w) 125位のヒスチジンがアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、アルギニンに置換されている；

(x) 261位のチロシンがアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジンに置換されている；

10

(y) 263位のグリシンがリジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換されている；

(z) 106位のアスパラギン酸が、アスパラギン酸よりも分子量の小さいアミノ酸、すなわちグリシン、アラニン、セリン、バリン、スレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギンに置換されている；

(aa) 103位のグリシンがリジン、アルギニン、ヒスチジンに置換されている；

(ab) 355位のアラニンがリジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換されている；

(ac) 96位のアスパラギン酸がアラニン、アスパラギン、ヒスチジン、セリンに置換されている；

20

(ad) 66位のリジンがグリシンまたはノおよび67位のバリンがプロリンに置換されている；

(ae) 70位のグルタミンがプロリンに置換されている；

(af) 100位のスレオニンがアルギニンに置換されている；

(ag) 110位のグルタミンがアラニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニンに置換されている；

(ah) 113位のアラニンがグルタミン酸、リジンに置換されている；

(ai) 114位のロイシンがリジン、アルギニンに置換されている；

(aj) 156位のアスパラギン酸がアスパラギンに置換されている。

【0023】

30

(4) 配列番号1に示すアミノ酸配列において、以下の(ba)から(be)よりなる群から選択されるアミノ酸残基の置換を有する、上記(3)記載のアマドリアーゼ；

(ba) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

(bb) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換；

(bc) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換；

(bd) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

40

(be) 110位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換、154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換。

【0024】

(5) 配列番号272に示すアミノ酸配列において、98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換を有し、前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、
-フルクトシルバリルヒスチジンに対する反応性に対する
-フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減して

50

おり、かつ前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、 α -フルクトシルバリンに対する反応性に対する α -フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とするアマドリアーゼ。

【0025】

(6) 配列番号241に示すアミノ酸配列において、以下の(ca)から(cc)よりなる群から選択されるアミノ酸残基の置換を有し、前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、 α -フルクトシルバリンヒスチジンに対する反応性に対する α -フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減しており、かつ前記置換を行う前のアマドリアーゼと比較して、 α -フルクトシルバリンに対する反応性に対する α -フルクトシルリジンに対する反応性の割合が低減していることを特徴とするアマドリアーゼ；

10

(ca) 98位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、110位のリジンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

(cb) 98位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換；

(cc) 110位のリジンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換。

【0026】

(7) 上記(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。

20

【0027】

(8) 上記(7)記載のアマドリアーゼ遺伝子を含む組換えベクター。

【0028】

(9) 上記(8)記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【0029】

(10) アマドリアーゼを製造する方法であり、以下の工程を含む方法；

(ak) 上記(6)記載の宿主細胞を培養する工程；

(al) 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；および

(am) 培養物からアマドリアーゼを単離する工程。

【0030】

30

(11) 上記(1)～(6)のいずれかに記載のアマドリアーゼを含む、糖化ヘモグロビンの測定に用いるためのキット。

【0031】

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-176967号および2010-213070号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0032】

本発明によれば、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基質特異性の優れたアマドリアーゼ、具体的には、FK/FVHが低い、および/またはFK/FVが低いアマドリアーゼを提供することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】各種公知のアマドリアーゼのアミノ酸配列における相同性を例示する図である。

【図2】本発明のアマドリアーゼによるFK/FVHの定量性を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0034】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0035】

(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

50

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ともいい、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）を酸化して、グリオキシル酸若しくは - ケトアルデヒド、アミノ酸若しくはペプチド、およ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。アマドリアーゼは、自然界に広く分布しており、微生物や、動物若しく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、若しくは細菌等から得ることができる。

【0036】

ある実施形態において、本発明のアマドリアーゼは、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するコニオカエタ属由来のアマドリアーゼに基づき作製された、基質特異性が改変されたアマドリアーゼの改変体である。このような変異体の例としては、配列番号1と高い配列同一性（例えば、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、および、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、または、欠失、置換、付加および/また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。なお、請求の範囲に記載された、基質特異性および/またはアミノ酸配列に関する条件を満たす限り、例えば、ユーベニシリウム属、アルスリニウム属、カーブラリア属、レプトスフェリア属、ネオコスモスポラ属、オフィオボラス属、プレオスポラ属、ピレノケータ属、アスペルギルス属、クリプトコッカス属、フェオスフェリア属、ウロクラディウム属、若しくはペニシリウム属のような、他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良い。

【0037】

基質特異性が改変されたアマドリアーゼの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ことによって得ることができる。

【0038】

基質特異性の改変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。

【0039】

(1) 98位のグルタミン酸の置換、例えば、プロリン以外のアミノ酸、すなわちグルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンへの置換。

【0040】

(2) 259位のバリンの置換、例えば、アラニン、システイン、セリンへの置換。

【0041】

(3) 154位のセリンの置換、例えば、グリシン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、システインへの置換。

【0042】

(4) 125位のヒスチジンの置換、例えば、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、グルタミン酸、リジン、アルギニンへの置換。

【0043】

(5) 261位のチロシンの置換、例えば、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジンへの置換。

【0044】

(6) 263位のグリシンの置換、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸への置換。

【0045】

(7) 106位のアスパラギン酸の置換、例えば、アスパラギン酸よりも分子量の小さいアミノ酸、すなわちグリシン、アラニン、セリン、バリン、スレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギンへの置換。

【 0 0 4 6 】

(8) 1 0 3 位のグリシンの置換、例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンへの置換。

【 0 0 4 7 】

(9) 3 5 5 位のアラニンの置換、例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸への置換。

【 0 0 4 8 】

(1 0) 9 6 位のアスパラギン酸への置換、例えば、アラニン、アスパラギン、ヒスチジン、セリンへの置換。

【 0 0 4 9 】

(1 1) 6 6 位のリジンの置換、例えば、グリシンへの置換。

【 0 0 5 0 】

(1 2) 6 7 位のバリンの置換、例えば、プロリンへの置換。

【 0 0 5 1 】

(1 3) 7 0 位のグルタミンの置換、例えば、プロリンへの置換。

【 0 0 5 2 】

(1 4) 1 0 0 位のスレオニンの置換、例えば、アルギニンへの置換。

【 0 0 5 3 】

(1 5) 1 1 0 位のグルタミンの置換、例えば、アラニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニンへの置換。

【 0 0 5 4 】

(1 6) 1 1 3 位のアラニンの置換、例えば、グルタミン酸、リジンへの置換。

【 0 0 5 5 】

(1 7) 1 1 4 位のロイシンの置換、例えば、リジン、アルギニンへの置換。

【 0 0 5 6 】

(1 8) 1 5 6 位のアスパラギン酸の置換、例えば、アスパラギンへの置換。

【 0 0 5 7 】

基質特異性が改変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、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18を有している。

【 0 0 5 8 】

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。本発明において、例えば、第110位のグルタミン(Q)がアルギニン(R)へ置換された変異をQ110Rと表す。

【 0 0 5 9 】

66位のリジンおよび67位のバリンの置換、例えば、K66GおよびV67Pを有する変異体。

【 0 0 6 0 】

66位のリジン、67位のバリンおよび98位のグルタミン酸の置換、例えば、K66G、V67PおよびE98Aを有する変異体。

【 0 0 6 1 】

66位のリジン、67位のバリンおよび110位のグルタミンの置換、例えば、K66G、V67PおよびQ110Rを有する変異体。

【 0 0 6 2 】

98位のグルタミン酸および110位のグルタミンの置換、例えば、E98AおよびQ110Rを有する変異体。

【 0 0 6 3 】

110位のグルタミンおよび125位のヒスチジンの置換、例えば、Q110RおよびH125Q

10

20

30

40

50

を有する変異体。

【 0 0 6 4 】

1 1 0 位のグルタミンおよび 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、Q110RおよびS154G若しくはS154Nを有する変異体。

【 0 0 6 5 】

1 1 0 位のグルタミンおよび 3 5 5 位のアラニンの置換、例えばQ110RおよびA355Kを有する変異体。

【 0 0 6 6 】

9 8 位のグルタミン酸および 1 0 3 位のグリシンの置換、例えば、E98AおよびG103Rを有する変異体。

10

【 0 0 6 7 】

9 8 位のグルタミン酸および 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、E98A若しくはE98RおよびS154Nを有する変異体。

【 0 0 6 8 】

1 1 0 位のグルタミンおよび 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、Q110RおよびS154Cを有する変異体。

【 0 0 6 9 】

9 8 位のグルタミン酸、1 0 6 位のアスパラギン酸および 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、E98A、D106SおよびS154Nを有する変異体。

【 0 0 7 0 】

20

9 8 位のグルタミン酸、1 1 0 位のグルタミンおよび 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、E98A、Q110RおよびS154Nを有する変異体。

【 0 0 7 1 】

1 1 0 位のグルタミン、1 2 5 位のヒスチジンおよび 1 5 4 位のセリンの置換、例えば、Q110R、H125QおよびS154Nを有する変異体。

【 0 0 7 2 】

9 8 位のグルタミン酸および 2 5 9 位のバリンの置換、例えば、E98QおよびV259A、E98QおよびV259C、E98HおよびV259A、E98HおよびV259C、E98RおよびV259C、E98AおよびV259Cを有する変異体。

【 0 0 7 3 】

30

9 8 位のグルタミン酸および 2 6 3 位のグリシンの置換、例えば、E98AおよびG263Rを有する変異体。

【 0 0 7 4 】

1 1 0 位のグルタミンおよび 2 5 9 位のバリンの置換、例えば、Q110RおよびV259Aを有する変異体。

【 0 0 7 5 】

1 5 4 位のセリンおよび 2 5 9 位のバリンの置換、例えば、S154DおよびV259Aを有する変異体。

【 0 0 7 6 】

9 8 位のグルタミン酸、1 5 4 位のセリンおよび 2 5 9 位のバリンの置換、例えば、E98A、S154NおよびV259Cを有する変異体。

40

【 0 0 7 7 】

1 1 0 位のグルタミン、1 5 4 位のセリンおよび 2 5 9 位のバリンの置換、例えば、Q110R、S154NおよびV259Aを有する変異体。

【 0 0 7 8 】

これらのアミノ酸置換の組合わせの中でも以下の (ba) ~ (be) のいずれかの組み合わせが好ましい。

【 0 0 7 9 】

(ba) 9 8 位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換、1 5 4 位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および 2 5 9 位のバリンに対応

50

する位置のアミノ酸のシステインへの置換。

【0080】

(bb) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換。

【0081】

(bc) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のグルタミンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換。

【0082】

(bd) 98位のグルタミン酸に対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のシステインへの置換。

【0083】

(be) 110位のグルタミンに対応する位置のアミノ酸のアルギニンへの置換、154位のセリンに対応する位置のアミノ酸のアスパラギンへの置換および259位のバリンに対応する位置のアミノ酸のアラニンへの置換。

【0084】

本発明の基質特異性が改変されたアマドリアーゼ変異体は、配列番号1に示すアミノ酸配列において、上記の基質特異性の改変をもたらすアミノ酸の置換を有し、それらの置換アミノ酸以外の位置で、さらに1または数個(例えば1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、特に好ましくは1個)のアミノ酸が欠失、挿入、付加および/または置換されたアミノ酸配列からなり、アマドリアーゼ活性を有し、基質特異性が改変されたアマドリアーゼ変異体を包含する。さらに、上記の基質特異性の改変をもたらすアミノ酸の置換変異、耐熱性を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の該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、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するアミノ酸配列からなり、アマドリアーゼ活性を有し、基質特異性が改変されたアマドリアーゼ変異体を包含する。

【0085】

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に示されるコニオカエタ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。

【0086】

(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または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またはcDNAを用いて、染色体DNAまたはcDNAのライブラリーを作製することができる。

【0087】

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または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(Polymerase Chain Reaction、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。

【0088】

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、コニオカエタ属由来のアマドリアーゼ遺伝子（特許文献7）が挙げられる。

【0089】

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を含む組換え体プラスミドpKK223-3-CFP（特許文献7）から、QIAGEN（キアゲン社製）を用いることにより、アマドリアーゼ遺伝子をコードするDNAを、抽出、精製して得ることができる。

【0090】

（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。

【0091】

（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；遺伝子工学的な手法；または蛋白質工学的な手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

【0092】

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、若しくは5-ブロモウラシル等を挙げることができる。

【0093】

この接触・作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件を採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、024～30、1989年6月号）。

【0094】

蛋白質工学的な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. Acad. Sci. U.S.A., 82, 488（1985）: Methods Enzymol., 154, 367（1987））等が挙げられる。

【0095】

また、一般的なPCR法として知られる手法を用いることもできる（Technique, 1, 11（1989）参照）。なお、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法また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。

【0096】

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

10

20

30

40

50

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。

【0097】

(形質転換・形質導入)

上述のように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、また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、形質転換または形質導入をすることができる。例えば、宿主として、エッシェリシア属に属する微生物、例えば得られた組換え体DNAを用いて、例えば、大腸菌K-12株、好ましくは大腸菌JM109株、大腸菌DH5株(ともにタカラバイオ社製)等を形質転換またはそれらに形質導入してそれぞれの菌株を得る。

10

【0098】

(アミノ酸配列の相同性)

アミノ酸配列の相同性は、GENETYX-Mac (Software Development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、またはDNASIS Pro(日立ソフト社製)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。

【0099】

(アミノ酸に対応する位置の特定)

「アミノ酸に対応する位置」とは、配列番号1に示すコニオカエタ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いう。

20

【0100】

「アミノ酸に対応する位置」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相同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。図1に種々の生物種由来のアマドリアーゼの配列のアラインメントを示す。図1からコニオカエタ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、コニオカエタ属由来のアマドリアーゼ、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼ、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミノオキシダーゼ、Arthrinium sp.由来のケトアミノオキシダーゼ、Curvularia clavata由来のケトアミノオキシダーゼ、Neocosmospora vasinfecta由来のケトアミノオキシダーゼ、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、Aspergillus nidulans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およびPenicillium janthinellum由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼのアミノ酸配列を示してある。

30

40

【0101】

なお、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の66位のリジンに対応する位置」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66位のリジンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0102】

すなわち、Eupenicillium terrenum由来のアマドリアーゼでは66位のグリシン、Pyrenochaeta sp.由来のケトアミノオキシダーゼでは66位のリジン、Arthrinium sp.由来の

50

ケトアミノオキシダーゼでは66位のプロリン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノオキシダーゼでは66位のリジン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは66位のリジン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは66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66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65位のリジン、*Ulocladium sp.*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは66位のリジン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは66位のグリシンである。

【0103】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の67位のバリンに対応する位置」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67位のバリンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

10

【0104】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは67位のプロリン、*Pyrenochaeta sp.*由来のケトアミノオキシダーゼでは67位のバリン、*Arthrimum sp.*由来のケトアミノオキシダーゼでは67位のバリン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノオキシダーゼでは67位のバリン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは67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67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67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66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67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67位のプロリンである。

20

【0105】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の70位のグルタミンに対応する位置」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70位のグルタミンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

30

【0106】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは70位のグルタミン、*Pyrenochaeta sp.*由来のケトアミノオキシダーゼでは70位のグルタミン、*Arthrimum sp.*由来のケトアミノオキシダーゼでは70位のグルタミン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノオキシダーゼでは70位のグルタミン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは70位のグルタミン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは70位のグルタミン、*Phaeosphaeria nodorum*由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは70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69位のグルタミン、*Ulocladium sp.*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは70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70位のグルタミンである。

40

【0107】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の96位のアスパラギン酸に対応する位置」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96位のアスパラギン酸に対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて

50

特定することができる。

【 0 1 0 8 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは96位のアスパラギン酸、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは96位のアスパラギン酸、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは96位のアスパラギン酸、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは96位のアスパラギン酸、*Neocosmospora vasinfec* ta由来のケトアミノキシダーゼでは96位のアスパラギン酸、*Cryptococcus neoforman* s由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは96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96位のアスパラギン酸、*Asperg* illus nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは95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96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96位のアスパラギン酸である。

10

【 0 1 0 9 】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の98位のグルタミン酸に対応する位置」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98位のグルタミン酸に対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定

20

【 0 1 1 0 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは98位のセリン、*Pyreno* chaeta sp.由来のケトアミノキシダーゼでは98位のアラニン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは98位のグルタミン酸、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは98位のアラニン、*Neocosmospora vasinfec* ta由来のケトアミノキシダーゼでは98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98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98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97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98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98位のセリンである。

30

【 0 1 1 1 】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の100位のスレオニンに対応する位置」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100位のスレオニンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定

【 0 1 1 2 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは100位のセリン、*Pyre* nocheta sp.由来のケトアミノキシダーゼでは100位のグリシン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは100位のスレオニン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは100位のグリシン、*Neocosmospora vasinfec* ta由来のケトアミノキシダーゼでは100位のセリン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは100位のスレオニン、*Phaeosphaeria* nodorum由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは100位のグリシン、*Aspergillus* nidulans由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは99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100位のグリシン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは100位のセリンである。

40

【 0 1 1 3 】

50

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の103位のグリシンに対応する位置」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103位のグリシンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0114】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは103位のグリシン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは103位のグリシン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは103位のグリシン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは103位のグリシン、*Neocosmospora vasinfec* 10
*ta*由来のケトアミノキシダーゼでは103位のグリシン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは103位のセリン、*Phaeosphaeria nodorum*由来のフルクトシルペプチドキシダーゼでは103位のアスパラギン酸、*Aspergillus nidulans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは102位のグリシン、*Ulocladium* sp.由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは103位のグリシン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは103位のグリシンである。

【0115】

また、本発明において、「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」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アミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0116】

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.由来のケトアミノキシダーゼでは106位のアスパラギン酸、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは106位のアラニン、*Curvularia clavata* 30
由来のケトアミノキシダーゼでは106位のアスパラギン酸、*Neocosmospora vasinfec* ta由来のケトアミノキシダーゼでは106位のグリシン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは106位のセリン、*Phaeosphaeria nodorum*由来のフルクトシルペプチドキシダーゼでは106位のアスパラギン酸、*Aspergillus nidulans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは105位のグリシン、*Ulocladium* sp.由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは106位のアスパラギン酸、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは106位のセリンである。

【0117】

また、本発明において、「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」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 40
ドリアーゼの110位のグルタミンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0118】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは110位のリジン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは110位のアラニン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは110位のグルタミン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは110位のアラニン、*Neocosmospora vasinfec* 50
*ta*由来のケトアミノキシダーゼでは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、*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110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110位のリジンである。

【0119】

また、本発明において、「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」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アミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定する

10

【0120】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは113位のスレオニン、*Pyrenochaeta* 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、*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113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113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112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113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113位のアスパラギン酸である。

20

【0121】

また、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の114位のロイシンに対応する位置」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114位のロイシンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0122】

30

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは114位のロイシン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは114位のロイシン、*Arthrinium* sp.由来のケトアミンオキシダーゼでは114位のロイシン、*Curvularia clavata*由来のケトアミンオキシダーゼでは114位のロイシン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミンオキシダーゼでは114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114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114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では113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114位のロイシン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは114位のロイシンである。

40

【0123】

また、「配列番号1記載のアミノ酸配列の125位のヒスチジンに対応する位置」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記載のアミノ酸配列の125位のヒスチジンに対応するアミノ酸を意味するものである。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させることにより特定することができる。

【0124】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは125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125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125位のスレオニン、*Curvularia clavata*

50

由来のケトアミノオキシダーゼでは125位のスレオニン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは125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125位のヒスチジン、*Phaeosphaeria nodorum*由来のフルクトシルペプチドオキシダーゼでは123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124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125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125位のアスパラギンである。

【0125】

さらに、「配列番号1記載のアミノ酸配列の154位のセリンに対応する位置」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154位のセリンに対応するアミノ酸を意味するものである。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させることにより特定することができる。

【0126】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは154位のシステイン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノオキシダーゼでは154位のセリン、*Arthrinium* sp.由来のケトアミノオキシダーゼでは154位のセリン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノオキシダーゼでは154位のセリン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは154位のセリン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは154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152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153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154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154位のシステインである。

【0127】

さらに、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の156位のアスパラギン酸に対応する位置」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156位のアスパラギン酸に対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

【0128】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは156位のアスパラギン酸、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノオキシダーゼでは156位のアスパラギン酸、*Arthrinium* sp.由来のケトアミノオキシダーゼでは156位のアスパラギン酸、*Curvularia clavata*由来のケトアミノオキシダーゼでは156位のアスパラギン酸、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノオキシダーゼでは156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156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154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155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156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156位のアスパラギン酸である。

【0129】

さらに、「配列番号1記載のアミノ酸配列の259位のバリンに対応する位置」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259位のバリンに対応するアミノ酸を意味するものである。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させることにより特定することができる。

【 0 1 3 0 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは259位のバリン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは257位のバリン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは259位のバリン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは257位のバリン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノキシダーゼでは259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259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255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259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257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259位のバリンである。

10

【 0 1 3 1 】

さらに、「配列番号1記載のアミノ酸配列の261位のチロシンに対応する位置」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261位のチロシンに対応するアミノ酸を意味するものである。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させることにより特定することができる。

【 0 1 3 2 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは261位のチロシン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは259位のチロシン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは261位のチロシン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは259位のチロシン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノキシダーゼでは261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261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257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261位のチロシン、*Ulocladium* sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは259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261位のチロシンである。

20

【 0 1 3 3 】

さらに、本発明において、「配列番号1記載のアミノ酸配列の263位のグリシンに対応する位置」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263位のグリシンに対応するアミノ酸を意味するものである。これにより、上記の「対応する位置のアミノ酸」を特定する方法でアミノ酸配列を整列させて特定することができる。

30

【 0 1 3 4 】

すなわち、*Eupenicillium terrenum*由来のアマドリアーゼでは263位のグリシン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは261位のグリシン、*Arthrini* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは263位のグリシン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは261位のグリシン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノキシダーゼでは263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263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259位のグリシン、*Aspergillus nidulans*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは263位のグリシン、*Ulocladium* sp.由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは261位のグリシン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼでは263位のグリシンである。

40

【 0 1 3 5 】

さらに、「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」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35

50

5 位のアラニンに対応するアミノ酸を意味するものである。これも上記の方法でアミノ酸配列を整列させること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355位のアラニン、*Pyrenochaeta* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは353位のアラニン、*Arthrrium* sp.由来のケトアミノキシダーゼでは356位のアラニン、*Curvularia clavata*由来のケトアミノキシダーゼでは353位のアラニン、*Neocosmospora vasinfecta*由来のケトアミノキシダーゼでは355位のセリン、*Cryptococcus neoformans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは355位のアラニン、*Phaeosphaeria nodorum*由来のフルクトシルペプチドキシダーゼでは351位のアラニン、*Aspergillus nidulans*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは355位のアラニン、*Ulocladium* sp.由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは353位のアラニン、*Penicillium janthinellum*由来のフルクトシルアミノ酸キシダーゼでは355位のアラニンである。

【0137】

(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基質特異性が改善さ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。

【0138】

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、コーンステープリカーあるい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2水素カリウム、リン酸水素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鉄あるい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。

【0139】

なお、培地の初発pHは、pH7~9に調整するのが適当である。

【0140】

培養は、20~42の培養温度、好ましくは37前後の培養温度で4~24時間、さらに好ましくは37前後の培養温度で4~8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のが好ましい。

【0141】

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、また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、また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、若しくは硫酸マンガン等により核酸を除去したのち、これに硫酸、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。

【0142】

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；アフィニティークロマトグラフィー法；分子ふるい膜若しくは中空系膜等を用いる分画法等を適宜選択し、また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、所望の基質特異性が改善されたアマドリアーゼを得ることができる。

【0143】

(本発明のアマドリアーゼにおける F K に対する反応性の低下)

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基質特異性が向上していることを特徴とする。具体的には、改変前のものと比較して、「F V H に対する反応性」に対する「F K に対する反応性」の割合、あるいは、「F V に対する反応性」に対する「F K に対する反応性」の割合が低減していることを特徴とする。または、改変前のものと比較して、「F V H に対する反応性」に対する「F K に対する反応性」の割合、および、「F V に対する反応性」に対する「F K に対する反応性」の割合がいずれも低減していることを特徴とする。

【0144】

糖化ヘモグロビンの測定において、F K に対して反応性が高いことは測定誤差の原因となり得るため、F K に対する反応性の割合は低ければ低いほど好ましい。具体的には、本発明のアマドリアーゼにおける、F V H に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合を示す F K / F V H は、改変前に対して 10 % 以上、好ましくは 20 % 以上、より好ましくは 30 % 以上、さらに好ましくは 40 % 以上低減していることが好ましい。

【0145】

また、本発明のアマドリアーゼにおける、F V に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合を示す F K / F V は、改変前に対して 10 % 以上、好ましくは 20 % 以上、より好ましくは 30 % 以上、さらに好ましくは 40 % 以下低減していることが好ましい。

【0146】

F V H に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合、あるいは、F V に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合は、公知のアマドリアーゼの測定法を用いて、任意の条件下で測定し、改変前のものと比較することができる。例えば、pH 7.0 において、5 mM の F K を添加して測定した活性を、5 mM の F V H を添加して測定した活性で割った比率として求めることにより、F V H に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合を算出し、これを改変前のものと改変後のもので比較することができる。また、例えば、pH 7.0 において、5 mM の F K を添加して測定した活性を、5 mM の F V を添加して測定した活性で割った比率として求めることにより、F V に対する反応性に対する F K に対する反応性の割合を算出し、これを改変前のものと改変後のもので比較することができる。

【0147】

改変前のものと比較して基質特異性が向上している本発明のアマドリアーゼの一例としては、例えば、大腸菌 J M 109 (p K K 223 - 3 - C F P - T 7 - Y 261 W) 株により生産されるアマドリアーゼが挙げられる。このような基質特異性が改善されたアマドリアーゼは、F K をノイズとして測り込む度合いが良好に低減され、H b A 1 c の鎖アミノ末端由来の糖化アミノ酸である F V H、若しくは H b A 1 c の鎖アミノ末端由来の糖化アミノ酸である F V のみを測定することが可能となるため、精度の高い測定を行うことができ、産業利用上非常に有利である。

【0148】

(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。

【0149】

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。

【0150】

本発明におけるアマドリアーゼの活性測定には、断りの無い限り、F V H、もしくは F K、または F V を基質として用いる。なお、酵素力価は、F V H、もしくは F K、または F V を基質として測定した時、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の過酸化水素を生成する酵素量を 1 U と定義する。

【0151】

F K 等の糖化アミノ酸、および F V H 等の糖化ペプチドは、例えば、阪上らの方法に基づき合成、精製したものをを用いることができる（特開 2001-95598 号公報参照）。

【0152】

A：試薬の調製

(1) 試薬 1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液

5.0 kU のパーオキシダーゼ（キッコーマン社製）、100 mg の 4-アミノアンチピリン（東京化成社製）を 0.1 M のリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0 または pH 7.5 もしくは pH 8.0）に溶解し、1000 ml に定容する。

【0153】

(2) 試薬 2：TOOS 溶液

500 mg の TOOS（同仁化学研究所製）をイオン交換水に溶解し、100 ml に定容する。

【0154】

(3) 試薬 3：基質溶液（150 mM；終濃度 5 mM）

F V H 625 mg、もしくは F K 462 mg または F V 419 mg をイオン交換水に溶解し、10 ml に定容する。

【0155】

B：活性測定法

2.7 ml の試薬 1、100 μl の試薬 2、および 100 μl の酵素液を混和し、37 で 5 分間予備加温する。その後、試薬 3 を 100 μl 加えて良く混ぜた後、分光光度計（U-3010A、日立ハイテクノロジーズ社製）により、555 nm における吸光度を測定する。測定値は、555 nm における 1 分後から 2 分後の 1 分間あたりの吸光度変化とする。なお、対照液は、100 μl の試薬 3 の代わりに 100 μl のイオン交換水を加える以外は前記と同様にしたものである。これを予め作製しておいた過酸化水素の標準溶液を試薬 3 の代わりに、また酵素液の代わりにイオン交換水を用い、その生成色素量との関係を調べたグラフを用意する。このグラフを用いて、37、1 分あたりに生成される過酸化水素のマイクロモル数を計算し、この数値を酵素液中の活性単位とする。

【0156】

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。

【実施例 1】

【0157】

(1) 組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA の調製

Coniochaeta 属由来アマドリアーゼ遺伝子（配列番号 2）の組換え体プラスミドを有する大腸菌 JM109（pKK223-3-CFP-T7）株（国際公開第 2007/125779 号参照）を、3 ml の 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、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン] に接種して、37 で 16 時間振とう培養し、培養物を得た。

【0158】

この培養物を 10,000 $\times g$ で、1 分間遠心分離することにより集菌して菌体を得た。この菌体より、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit（シグマアルドリッチ社製）を用いて組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を抽出して精製し、2.5 μg の組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を得た。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 9 】

(2) 組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA の部位特異的改変操作

得られた組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 、 4 の合成オリゴヌクレオチド、 K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、以下の条件で P C R 反応を行った。

【 0 1 6 0 】

すなわち、 1 0 × K O D - P l u s - 緩衝液を 5 μ l 、 d N T P が各 2 m M になるよう調製された d N T P s 混合溶液を 5 μ l 、 2 5 m M の M g S O ₄ 溶液を 2 μ l 、鋳型となる p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を 5 0 n g 、上記合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ 1 5 p m o l 、 K O D - P l u s - を 1 U n i t 加えて、滅菌水により全量を 5 0 μ l 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、 9 4 ° C で 2 分間インキュベートし、続いて、「 9 4 ° C 、 1 5 秒 」 - 「 5 0 ° C 、 3 0 秒 」 - 「 6 8 ° C 、 6 分 」のサイクルを 3 0 回繰り返した。

【 0 1 6 1 】

反応液の一部を 1 . 0 % アガロースゲルで電気泳動し、約 6 , 0 0 0 b p 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 D p n I (N e w E n g l a n d B i o l a b s 社製) で処理し、残存している鋳型 DNA を切断した後、大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、 L B - a m p 寒天培地に展開した。生育したコロニーを L B - a m p 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 C E Q 2 0 0 0 (ベックマン・コールター社製) を用いて決定し、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 6 6 位のリジンがグリシ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - K 6 6 G) を得た。

【 0 1 6 2 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 6 7 位のバリンをプロリンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 5 、 6 の合成オリゴヌクレオチド、 K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 6 7 位のバリンがプロリ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - V 6 7 P) を得た。

【 0 1 6 3 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 6 6 位のリジンをグリシンに、かつ 6 7 位のバリンをプロリンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 7 、 8 の合成オリゴヌクレオチド、 K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 6 6 位のリジンがグリシンに、かつ 6 7 位のバリンがプロリ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - K 6 6 G V 6 7 P) を得た。

【 0 1 6 4 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 7 0 位のグルタミンをプロリンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 9 、 1 0 の合成オリゴヌクレオチド、 K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 70 位のグルタミンがプロリ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - Q 7 0 P) を得た。

【 0 1 6 5 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 96 位のアスパラギン酸をアラニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 1 1、1 2 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 96 位のアスパラギン酸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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - D 9 6 A) を得た。

10

【 0 1 6 6 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸をグルタミンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 1 3、1 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 98 位のグルタミン酸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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - E 9 8 Q) を得た。

20

【 0 1 6 7 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 100 位のスレオニンをアルギニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 1 5、1 6 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 100 位のスレオニンがアルギ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - T 1 0 0 R) を得た。

30

【 0 1 6 8 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 103 位のグリシンをアルギニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 1 7、1 8 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 103 位のグリシンがアルギ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - G 1 0 3 R) を得た。

【 0 1 6 9 】

40

続いて、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をアラニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 1 9、2 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 106 位のアスパラギン酸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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - D 1 0 6 A) を得た。

【 0 1 7 0 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 110 位のグルタミンをアラニンに置換する

50

ために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 2 1、2 2 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 1 0 位のグルタミ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - Q 1 1 0 A) を得た。

【 0 1 7 1 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 1 3 位のアラニンをグルタミン酸に置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 2 3、2 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 1 3 位のアラニンがグルタミ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - A 1 1 3 E) を得た。

【 0 1 7 2 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 1 4 位のロイシンをリジンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 2 5、2 6 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 1 4 位のロイシンがリジ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - L 1 1 4 K) を得た。

【 0 1 7 3 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 2 5 位のヒスチジンをグルタミン酸に置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 2 7、2 8 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 2 5 位のヒスチジンがグルタミ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - H 1 2 5 E) を得た。

【 0 1 7 4 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 5 4 位のセリンをグルタミン酸に置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 2 9、3 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 5 4 位のセリンがグルタミ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - S 1 5 4 E) を得た。

【 0 1 7 5 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 5 6 位のアスパラギン酸をアスパラギンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 1、3 2 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 1 5 6 位のアスパラギン酸がア

10

20

30

40

50

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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - D 1 5 6 N) を得た。

【 0 1 7 6 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 5 9 位のバリンをアラニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 3、3 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 2 5 9 位のバリ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P T 7 - V 2 5 9 A) を得た。

10

【 0 1 7 7 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 6 1 位のチロシンをアラニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 5、3 6 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 2 6 1 位のチロ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - Y 2 6 1 A) を得た。

20

【 0 1 7 8 】

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 6 3 位のグリシンをアルギニンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 7、3 8 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 2 6 3 位のグリシンがアルギ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - G 2 6 3 R) を得た。

【 0 1 7 9 】

30

続いて、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 3 5 5 位のアラニンをリジンに置換するために、組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、配列番号 3 9、4 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 3 5 5 位のアラニンがリジ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 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - A 3 5 5 K) を得た。

【 0 1 8 0 】

(3) 各種改変型アマドリアーゼの生産

40

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 J M 1 0 9 株を、0 . 1 m M の I P T G を添加した L B - a m p 培地 3 m l において、3 0 で 1 6 時間培養した。得られた各培養菌体を 2 0 m M の H E P E S - N a O H 緩衝液 (p H 7 . 0) で洗浄した後、同緩衝液に懸濁して超音波破碎処理を行い、2 0 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離して、基質特異性確認のための酵素液 0 . 6 m l を調製した。

【 0 1 8 1 】

(4) F K / F V H、F K / F V の測定

上述の酵素液を用いて、上記の B : 活性測定法に示した方法により、F V H、F V および F K に対する酵素活性を測定した。また、比較のために、大腸菌 J M 1 0 9 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7) 株から生産した改変前のアマドリアーゼについても、同

50

様の測定を行った。なお、活性測定にはpH 7.0に調整した試薬1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。

【0182】

その結果、上述の酵素活性測定の結果から得られた大腸菌JM109(pKK223-3-CFP-T7)株によって生産される改変前のアマドリアーゼのFK/FVHは0.316であり、FK/FVは0.093であった。

【0183】

これに対し、部位特異的変異導入により作製した改変後の各種のアマドリアーゼのFK/FVH、FK/FV、および改変前のアマドリアーゼのFK/FVH、FK/FVの値を100%とした時の改変後のアマドリアーゼのFK/FVH、FK/FVの比率は、表1の通りとなった。

【表 1】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- K66G	K66G	3、4	0.255	81	0.080	86
pKK223-3-CFP-T7- V67P	V67P	5、6	0.239	76	0.072	77
pKK223-3-CFP-T7- K66GV67P	K66G, V67P	7、8	0.185	59	0.071	76
pKK223-3-CFP-T7- Q70P	Q70P	9、10	0.147	47	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7- D96A	D96A	11、12	0.078	25	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7- E98Q	E98Q	13、14	0.087	28	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7- T100R	T100R	15、16	0.175	55	0.069	74
pKK223-3-CFP-T7- G103R	G103R	17、18	0.110	35	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7- D106A	D106A	19、20	0.164	52	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7- Q110A	Q110A	21、22	0.248	78	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7- A113E	A113E	23、24	0.279	88	測定 せず	
pKK223-3-CFP-T7- L114K	L114K	25、26	0.095	30	0.036	39
pKK223-3-CFP-T7- H125E	H125E	27、28	0.216	68	測定 せず	
pKK223-3-CFP-T7- S154E	S154E	29、30	0.162	51	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7- D156N	D156N	31、32	0.171	54	0.074	80
pKK223-3-CFP-T7- V259A	V259A	33、34	0.080	25	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7- Y261A	Y261A	35、36	0.145	46	測定 せず	
pKK223-3-CFP-T7- G263R	G263R	37、38	0.123	39	0.055	59
pKK223-3-CFP-T7- A355K	A355K	39、40	0.177	56	0.048	52

【 0 1 8 4 】

すなわち、表 1 に示す通り、これら全ての改変型アマドリアーゼにおいては、基質特異性が改善されていることがわかった。

10

20

30

40

50

【実施例 2】

【0185】

(96位のアスパラギン酸の点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の96位のアスパラギン酸を他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表2に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号41~46)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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96位のアスパラギン酸が各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0186】

上記のようにして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株を、上記(3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0187】

このようにして調製した酵素液について上記B:活性測定法に示した方法により、FVH、FVおよびFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1:パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表2に示す。

【表2】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-D96A	D96A	11,12	0.078	25	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7-D96S	D96S	41,42	0.100	32	0.021	23
pKK223-3-CFP-T7-D96N	D96N	43,44	0.221	70	0.025	27
pKK223-3-CFP-T7-D96H	D96H	45,46	0.095	30	0.023	25

【0188】

表2に示したように、配列番号1記載のアミノ酸配列の96位のアスパラギン酸をアラニン、セリン、アスパラギン、ヒスチジンに置換した改変型のアマドリアーゼの、FK/FVHはいずれも、改変前の値である0.316より低い値となり、また、FK/FVはいずれも、改変前の値である0.093より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例 3】

【0189】

(98位のグルタミン酸の点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の98位のグルタミン酸を他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表3に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号47~82)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換および生育

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98位のグルタミン酸が各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0190】

上記のようにして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株を、上記(3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0191】

このようにして調製した酵素液について上記B：活性測定法に示した方法により、FVH、FVおよびFKに対する酵素活性を測定し、 FK / FVH および FK / FV を算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表3に示す。

【表 3】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- E98Q	E98Q	13、14	0.087	28	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7- E98H	E98H	47、48	0.107	34	0.041	44
pKK223-3-CFP-T7- E98K	E98K	49、50	0.051	16	0.021	23
pKK223-3-CFP-T7- E98R	E98R	51、52	0.039	12	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7- E98G	E98G	53、54	0.120	38	0.044	47
pKK223-3-CFP-T7- E98A	E98A	55、56	0.122	39	0.048	52
pKK223-3-CFP-T7- E98V	E98V	57、58	0.113	36	0.046	49
pKK223-3-CFP-T7- E98I	E98I	59、60	0.121	38	0.042	45
pKK223-3-CFP-T7- E98L	E98L	61、62	0.064	20	0.023	25
pKK223-3-CFP-T7- E98M	E98M	63、64	0.083	26	0.034	37
pKK223-3-CFP-T7- E98C	E98C	65、66	0.111	35	0.043	46
pKK223-3-CFP-T7- E98S	E98S	67、68	0.122	39	0.046	49
pKK223-3-CFP-T7- E98T	E98T	69、70	0.118	37	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7- E98N	E98N	71、72	0.105	33	0.039	42
pKK223-3-CFP-T7- E98D	E98D	73、74	0.207	66	0.077	83
pKK223-3-CFP-T7- E98F	E98F	75、76	0.080	25	0.039	42
pKK223-3-CFP-T7- E98Y	E98Y	77、78	0.104	33	0.045	48
pKK223-3-CFP-T7- E98W	E98W	79、80	0.082	26	0.035	38
pKK223-3-CFP-T7- E98P	E98P	81、82	測定 不可		測定 不可	

【 0 1 9 2 】

表 3 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸をプロリン以外の他のアミノ酸、すなわちグルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、グリシ

10

20

30

40

50

ン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン、アスパラギン酸、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 FK/FVH はいずれも、改変前の値である0.316より低い値となり、また、 FK/FV はいずれも、改変前の値である0.093より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。なお、配列番号1記載のアミノ酸配列の98位のグルタミン酸をプロリンに置換した場合、酵素の発現が認められなくなった。

【実施例4】

【0193】

(103位のグリシンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の103位のグリシンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表4に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号83、84、255、256)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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103位のグリシンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0194】

上記のようにして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株を、上記(3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0195】

このようにして調製した酵素液について上記B:活性測定法に示した方法により、 FK/FVH 、 FK/FV および FK に対する酵素活性を測定し、 FK/FVH および FK/FV を算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1:パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表4に示す。

【表4】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	FK/FVH	FK/FVH 比率(%)	FK/FV	FK/FV 比率(%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-G103R	G103R	17,18	0.110	35	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7-G103K	G103K	83,84	0.134	42	0.055	59
pKK223-3-CFP-T7-G103H	G103H	255,256	0.181	57	0.070	75

【0196】

表4に示したように、配列番号1記載のアミノ酸配列の103位のグリシンをアルギニン、リジン、ヒスチジンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 FK/FVH はいずれも、改変前の値である0.316より低い値となり、また、 FK/FV はいずれも、改変前の値である0.093より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例5】

【0197】

(106位のアスパラギン酸の点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の106位のアスパラギン酸を他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表5に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号85~100)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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106位のアスパラギン酸が各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

10

【0198】

上記のようにして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株を、上記(3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0199】

このようにして調製した酵素液について上記B:活性測定法に示した方法により、FVH、FVおよびFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1:パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表5に示す。

【表5】

20

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-D106A	D106A	19,20	0.164	52	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7-D106G	D106G	85,86	0.163	52	0.065	70
pKK223-3-CFP-T7-D106S	D106S	87,88	0.173	55	0.071	76
pKK223-3-CFP-T7-D106T	D106T	89,90	0.171	54	0.073	78
pKK223-3-CFP-T7-D106N	D106N	91,92	0.152	48	0.068	73
pKK223-3-CFP-T7-D106C	D106C	93,94	0.180	57	0.070	75
pKK223-3-CFP-T7-D106V	D106V	95,96	0.182	58	0.079	85
pKK223-3-CFP-T7-D106L	D106L	97,98	0.158	50	0.074	80
pKK223-3-CFP-T7-D106I	D106I	99,100	0.163	52	0.072	77

30

40

【0200】

表5に示したように、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をアスパラギン酸よりも分子量が小さいアミノ酸、すなわちグリシン、アラニン、セリン、バリン、スレオニン、システイン、ロイシン、イソロイシン、アスパラギンに置換した改変型のアマドリアーゼの、FK/FVHはいずれも、改変前の値である0.316より

50

低い値となり、また、 FK / FV はいずれも、改変前の値である0.093より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例6】

【0201】

(110位のグルタミンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の110位のグルタミンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表6に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号101~118)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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110位のグルタミンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0202】

上記のようにして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株を、上記(3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0203】

このようにして調製した酵素液について上記B:活性測定法に示した方法により、 FVH 、 FV および FK に対する酵素活性を測定し、 FK / FVH および FK / FV を算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1:パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表6に示す。

10

20

【表 6】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-Q110A	Q110A	21、22	0.248	78	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7-Q110L	Q110L	101、102	0.255	81	0.104	112
pKK223-3-CFP-T7-Q110M	Q110M	103、104	0.247	78	0.101	109
pKK223-3-CFP-T7-Q110F	Q110F	105、106	0.187	59	0.086	92
pKK223-3-CFP-T7-Q110W	Q110W	107、108	0.251	79	0.075	81
pKK223-3-CFP-T7-Q110N	Q110N	109、110	0.235	74	0.085	91
pKK223-3-CFP-T7-Q110H	Q110H	111、112	0.199	63	0.069	74
pKK223-3-CFP-T7-Q110K	Q110K	113、114	0.142	45	0.064	69
pKK223-3-CFP-T7-Q110R	Q110R	115、116	0.105	33	0.048	52
pKK223-3-CFP-T7-Q110E	Q110E	117、118	0.595	188	0.193	208

【 0 2 0 4 】

表 6 に示す通り、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 110 位のグルタミンをアラニン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニンに置換した改変型のアマドリアーゼの ϵ FK / α FVH はいずれも、改変前の値である 0.316 より低い値となり、また、110 位のグルタミンをアラニン、フェニルアラニン、トリプトファン、アスパラギン、ヒスチジン、リジン、アルギニンに置換した改変型のアマドリアーゼの ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0.093 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。一方、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 110 位のグルタミンをグルタミン酸に置換した改変型のアマドリアーゼの ϵ FK / α FVH、 ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0.316、0.093 より高くなった。

【実施例 7】

【 0 2 0 5 】

(113 位のアラニンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 113 位のアラニンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を鋳型として、表 7 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 119、120)、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 JM109 の形質転換および生

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113位のアラニンがリジンに置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0206】

こうして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株を、上記(3)記載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0.6mlを調製した。

【0207】

このようにして調製した酵素液について上記B. 活性測定法に示した方法により、FVHおよびFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHを算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表7に示す。

【表7】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH比率(%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100
pKK223-3-CFP-T7-A113E	A113E	23、24	0.279	88
pKK223-3-CFP-T7-A113K	A113K	119、120	0.279	88

【0208】

表7に示すように、配列番号1記載のアミノ酸配列の113位のアラニンをグルタミン酸、リジンに置換した改変型のアマドリアーゼの、FK/FVHはいずれも、改変前の値である0.316より低く、上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例8】

【0209】

(114位のロイシンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号1記載のアミノ酸配列の114位のロイシンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミドpKK223-3-CFP-T7 DNAを鋳型として、表8に示した合成オリゴヌクレオチド(配列番号121~124)、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記(2)と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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114位のロイシンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌JM109株を得た。

【0210】

こうして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株を、上記(3)記載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0.6mlを調製した。

【0211】

このようにして調製した酵素液について上記B. 活性測定法に示した方法により、FVH、FVおよびFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表8に示す。

【表 8】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- L114K	L114K	25、26	0.095	30	0.036	39
pKK223-3-CFP-T7- L114R	L114R	121、122	0.132	42	0.049	53
pKK223-3-CFP-T7- L114E	L114E	123、124	0.332	105	測定 せず ^{a)}	

10

【0212】

表 8 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 114 位のロイシンをリジン、アルギニンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK / α FVH はいずれも、改変前の値である 0.316 より低い値となり、また、 ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0.093 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。一方、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 114 位のロイシンをグルタミン酸に置換した改変型のアマドリアーゼの ϵ FK / α FVH は、改変前の値である 0.316 より高くなった。

20

【実施例 9】

【0213】

(125 位のヒスチジンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 125 位のヒスチジンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を鋳型として、表 9 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 125 ~ 134、257 ~ 260)、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 JM109 の形質転換およ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 125 位のヒスチジンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 JM109 株を得た。

30

【0214】

こうして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 株を、上記 (3) 記載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 0.6 ml を調製した。

【0215】

このようにして調製した酵素液について上記 B. 活性測定法に示した方法により、 ϵ FVH、 ϵ FV および ϵ FK に対する酵素活性を測定し、 ϵ FK / α FVH および ϵ FK / α FV を算出した。なお、活性測定には pH 7.0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 9 に示す。

40

【表 9】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-H125E	H125E	27、28	0.216	68	測定せず	
pKK223-3-CFP-T7-H125N	H125N	125、126	0.240	76	0.081	87
pKK223-3-CFP-T7-H125K	H125K	127、128	0.090	28	0.033	35
pKK223-3-CFP-T7-H125A	H125A	129、130	0.199	63	0.102	110
pKK223-3-CFP-T7-H125Q	H125Q	131、132	0.169	53	0.044	47
pKK223-3-CFP-T7-H125R	H125R	133、134	0.088	28	0.025	27
pKK223-3-CFP-T7-H125L	H125L	257、260	0.121	38	0.038	41
pKK223-3-CFP-T7-H125F	H125F	258、260	0.186	59	0.077	83
pKK223-3-CFP-T7-H125Y	H125Y	259、260	0.177	56	0.088	95

【0216】

表 9 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 125 位のヒスチジンをグルタミン酸、アスパラギン、リジン、アラニン、グルタミン、アルギニン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK / α FVH はいずれも、改変前の値である 0.316 より低い値となり、また、125 位のヒスチジンをアスパラギン、リジン、グルタミン、アルギニン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0.093 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例 10】

【0217】

(154 位のセリンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 154 位のセリンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を鋳型として、表 10 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 135 ~ 150)、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 JM109 の形質転換およ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 154 位のセリンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 JM109 株を得た。

【0218】

こうして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 株を、上記 (3) 記載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 0.6 ml を調製した。

【0219】

このようにして調製した酵素液について上記 B . 活性測定法に示した方法により、 F V H、 F V および F K に対する酵素活性を測定し、 F K / F V H および F K / F V を算出した。なお、活性測定には p H 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、 4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 0 に示す。

【表 1 0】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-S154E	S154E	29、30	0.162	51	0.047	51
pKK223-3-CFP-T7-S154G	S154G	135、136	0.186	59	0.054	58
pKK223-3-CFP-T7-S154Y	S154Y	137、138	0.188	59	0.058	62
pKK223-3-CFP-T7-S154N	S154N	139、140	0.146	46	0.050	54
pKK223-3-CFP-T7-S154Q	S154Q	141、142	0.150	47	0.049	53
pKK223-3-CFP-T7-S154D	S154D	143、144	0.212	67	0.066	71
pKK223-3-CFP-T7-S154H	S154H	145、146	0.127	40	0.040	43
pKK223-3-CFP-T7-S154A	S154A	147、148	0.318	101	0.098	105
pKK223-3-CFP-T7-S154C	S154C	149、150	0.151	48	0.059	63

【 0 2 2 0】

表 1 0 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 5 4 位のセリンをグルタミン酸、グリシン、チロシン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、ヒスチジン、システインに置換した改変型のアマドリアーゼの、 F K / F V H はいずれも、改変前の値である 0 . 3 1 6 より低い値となり、また、 F K / F V はいずれも、改変前の値である 0 . 0 9 3 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。一方、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 1 5 4 位のセリンをアラニンに置換した改変型のアマドリアーゼの F K / F V H は、改変前の値である 0 . 3 1 6 とほぼ同様で、低下が認められなかった。

【実施例 1 1】

【 0 2 2 1】

(2 5 9 位のバリンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 5 9 位のバリンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、表 1 1 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 1 5 1 ~ 1 5 4)、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 2 5 9 位のバリンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 J M 1 0 9 株を得た。

【 0 2 2 2 】

上記のようにして得られた改変型アマドリラーゼ生産能を有する大腸菌 J M 1 0 9 株を、上記 (3) 記載の方法で培養して、各種改変型アマドリラーゼの粗酵素液 0 . 6 m l を調製した。

【 0 2 2 3 】

このようにして調製した酵素液について上記 B : 活性測定法に示した方法により、 FVH 、 FV および FK に対する酵素活性を測定し、 FK / FVH および FK / FV を算出した。なお、活性測定には pH 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 1 に示す。

【表 1 1】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	$\epsilon FK /$ αFVH	$\epsilon FK /$ αFVH 比率 (%)	$\epsilon FK /$ αFV	$\epsilon FK /$ αFV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- V259A	V259A	33,34	0.080	25	0.029	31
pKK223-3-CFP-T7- V259C	V259C	151,152	0.099	31	0.037	40
pKK223-3-CFP-T7- V259S	V259S	153,154	0.094	30	0.033	35

【 0 2 2 4 】

表 1 1 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 5 9 位のバリンをアラニン、システイン、セリンに置換した改変型のアマドリラーゼの、 FK / FVH はいずれも、改変前の値である 0 . 3 1 6 より低い値となり、また、 FK / FV はいずれも、改変前の値である 0 . 0 9 3 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリラーゼの作製に有効な置換であった。

【実施例 1 2】

【 0 2 2 5 】

(2 6 1 位のチロシンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 6 1 位のチロシンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリラーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、表 1 2 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 1 5 5 ~ 1 6 2)、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のアマドリラーゼをコードする 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 2 6 1 位のチロシンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリラーゼを生産する大腸菌 J M 1 0 9 株を得た。

【 0 2 2 6 】

こうして得られた改変型アマドリラーゼ生産能を有する大腸菌 J M 1 0 9 株を、上記 (3) 記載の方法で培養して各種改変型アマドリラーゼの粗酵素液 0 . 6 m l を調製した。

【 0 2 2 7 】

このようにして調製した酵素液について上記 B : 活性測定法に示した方法により、 FVH 、 FV および FK に対する酵素活性を測定し、 FK / FVH および FK / FV を算出した。なお、活性測定には pH 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 2 に示す。

【表 1 2】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- Y261A	Y261A	35、36	0.145	46	測定 せず	
pKK223-3-CFP-T7- Y261L	Y261L	155、156	0.087	28	測定 せず	
pKK223-3-CFP-T7- Y261F	Y261F	157、158	0.039	12	0.032	34
pKK223-3-CFP-T7- Y261W	Y261W	159、160	0.018	6	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7- Y261K	Y261K	161、162	0.020	6	測定 せず	

10

【0228】

表 1 2 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 261 位のチロシンをアラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、リジンに置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK / α FVH はいずれも、改変前の値である 0.316 より低い値となり、また、261 位のチロシンをフェニルアラニン、トリプトファンに置換した改変型のアマドリアーゼの ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0.093 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

20

【実施例 13】

【0229】

(263 位のグリシンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 263 位のグリシンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T7 DNA を鋳型として、表 1 3 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 163、164、261 ~ 266)、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 JM109 の形質転換およ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 263 位のグリシンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 JM109 株を得た。

30

【0230】

上記のようにして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 株を、上記 (3) 記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液 0.6 ml を調製した。

40

【0231】

このようにして調製した酵素液について上記 B : 活性測定法に示した方法により、 α FVH、 α FV および ϵ FK に対する酵素活性を測定し、 ϵ FK / α FVH および ϵ FK / α FV を算出した。なお、活性測定には pH 7.0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 3 に示す。

【表 1 3】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7- G263R	G263R	37、38	0.123	39	0.055	59
pKK223-3-CFP-T7- G263K	G263K	163、164	0.107	34	0.046	49
pKK223-3-CFP-T7- G263H	G263H	261、262	0.121	38	0.056	60
pKK223-3-CFP-T7- G263D	G263D	263、264	0.195	62	0.080	86
pKK223-3-CFP-T7- G263E	G263E	265、266	0.211	67	0.074	80

10

【 0 2 3 2 】

表 1 3 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 2 6 3 位のグリシンをアルギニン、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK / α FVH はいずれも、改変前の値である 0 . 3 1 6 より低い値となり、また、 ϵ FK / α FV はいずれも、改変前の値である 0 . 0 9 3 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

20

【実施例 1 4】

【 0 2 3 3 】

(3 5 5 位のアラニンの点変異試験)

基質特異性の向上に効果の高い配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 3 5 5 位のアラニンを他のアミノ酸に置換し、基質特異性に優れた改変型アマドリアーゼの探索を試みた。組換え体プラスミド p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 DNA を鋳型として、表 1 4 に示した合成オリゴヌクレオチド (配列番号 1 6 5 ~ 1 6 8 、 2 6 7 ~ 2 7 0) 、 K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 J M 1 0 9 の形質転換およ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 3 5 5 位のアラニンが各種アミノ酸に置換された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 J M 1 0 9 株を得た。

30

【 0 2 3 4 】

こうして得られた改変型アマドリアーゼ生産能を有する大腸菌 J M 1 0 9 株を、上記 (3) 記載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 0 . 6 m l を調製した。

【 0 2 3 5 】

40

このようにして調製した酵素液について上記 B . 活性測定法に示した方法により、 α F V H 、 α F V および ϵ FK に対する酵素活性を測定し、 ϵ FK / α F V H および ϵ FK / α F V を算出した。なお、活性測定には p H 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 4 に示した。

【表 1 4】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-A355K	A355K	39、40	0.177	56	0.048	52
pKK223-3-CFP-T7-A355R	A355R	165、166	0.121	38	0.062	67
pKK223-3-CFP-T7-A355H	A355H	167、168	0.190	60	0.115	124
pKK223-3-CFP-T7-A355D	A355D	267、268	0.201	64	0.122	131
pKK223-3-CFP-T7-A355E	A355E	269、270	0.218	69	0.068	73

10

【0236】

表 1 4 に示したように、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 355 位のアラニンをリジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK/ α FVH はいずれも、改変前の値である 0.316 より低い値となり、また、355 位のアラニンをリジン、アルギニン、グルタミン酸に置換した改変型のアマドリアーゼの、 ϵ FK/ α FV はいずれも、改変前の値である 0.093 より低い値となった。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

20

【実施例 15】

【0237】

(基質特異性改善に有効な変異の蓄積)

表 1 5 に示した各種組換え体プラスミド DNA を鋳型として、合成オリゴヌクレオチド (配列番号 7、8、17、18、39、40、51、52、55、56、87、88、115、116、131、132、135、136、139、140)、KOD-Plus (東洋紡績社製) を用い、上記 (2) と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 JM109 株の形質転換およ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に表 1 5 中の「アミノ酸変異」の欄に記載した複数のアミノ酸置換が導入された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 JM109 株を得た。

30

【0238】

上記のようにして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 株を、上記 (3) 記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液 0.6 ml を調製した。

40

【0239】

このようにして調製した酵素液について上記 B : 活性測定法に示した方法により、 α FVH、 α FV および ϵ FK に対する酵素活性を測定し、 ϵ FK/ α FVH および ϵ FK/ α FV を算出した。なお、活性測定には pH 7.0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 5 に示す。

【表 15】

プラスミド	アミノ酸 変異	鑄型とした プラスミド	使用オリゴ ヌクレオチ ド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3- CFP-T7	なし	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3- CFP-T7-K66G V67P/E98A	K66G, V67P, E98A	pKK223-3- CFP-T7- K66GV67P	55,56	0.069	22	0.027	29
pKK223-3- CFP-T7-K66G V67P/Q110R	K66G, V67P, Q110R	pKK223-3- CFP-T7- Q110R	7,8	0.085	27	0.034	37
pKK223-3- CFP-T7- E98A/Q110R	E98A, Q110R		55,56	0.072	23	0.032	34
pKK223-3- CFP-T7- Q110R/H125Q	Q110R, H125Q		131,132	0.073	23	0.027	29
pKK223-3- CFP-T7- Q110R/S154G	Q110R, S154G		135,136	0.090	28	0.029	31
pKK223-3- CFP-T7- Q110R/S154N	Q110R, S154N		139,140	0.064	20	0.022	24
pKK223-3- CFP-T7- Q110R/A355K	Q110R, A355K		39,40	0.094	30	0.042	45
pKK223-3- CFP-T7- E98A/G103R	E98A, G103R	pKK223-3- CFP-T7- E98A	17,18	0.062	20	0.029	31
pKK223-3- CFP-T7- E98A/S154N	E98A, S154N	pKK223-3- CFP-T7- S154N	55,56	0.062	20	0.023	25
pKK223-3- CFP-T7- E98R/S154N	E98R, S154N	pKK223-3- CFP-T7- S154N	51,52	0.030	9	0.011	12
pKK223-3- CFP-T7- Q110RS154C	Q110R, S154C	pKK223-3- CFP-T7- S154C	115,116	0.083	26	0.032	34
pKK223-3- CFP-T7-E98A/ D106S/S154N	E98A, D106S, S154N	pKK223-3- CFP-T7- E98A/S154N	87,88	0.045	14	0.019	20
pKK223-3- CFP-T7-E98A/ Q110R/S154N	E98A, Q110R, S154N	pKK223-3- CFP-T7- Q110R/S154N	55,56	0.063	20	0.021	23
pKK223-3- CFP-T7-Q110R/ H125Q/S154N	Q110R, H125Q, S154N		131,132	0.044	14	0.019	20

【0240】

表15に示した多重アミノ酸置換が導入された改変型アマドリアーゼでは、 ϵ FK / α FVH、 ϵ FK / α FVはいずれも各アミノ酸置換を単独で導入した場合と比較して低い値となった。故に、配列番号1に示したアマドリアーゼの基質特異性改善に効果的な単一

10

20

30

40

50

変異を組み合わせることにより、更なる基質特異性の改善が見込めることが明らかとなった。

【実施例 16】

【0241】

(基質特異性改善に有効な変異の蓄積)

表 16 に示した使用プラスミド L および S を制限酵素 K p n I 及び H i n d I I I で二重消化し、使用プラスミド L から約 5 . 3 k b p の D N A 断片を、使用プラスミド S から約 0 . 8 k b p の D N A 断片をそれぞれアガロースゲル電気泳動により分離した後、N u c l e o S p i n E x t r a c t I I (マシュレ ナゲル社製) によりゲルから各 D N A 断片を抽出、精製した。続いて、両 D N A 断片を L i g a t i o n h i g h V e r . 2 (東洋紡績社製) を用いて連結し、連結したプラスミド D N A を用いて大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のアマドリアーゼをコードする D N A 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に表 16 中の「アミノ酸変異」の欄に記載した複数のアミノ酸置換が導入された改変型アマドリアーゼを生産する大腸菌 J M 1 0 9 株を得た。

10

【0242】

上記のようにして得られた改変型アマドリアーゼ生産能を有する大腸菌 J M 1 0 9 株を、上記 (3) 記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液 0 . 6 m l を調製した。

【0243】

20

このようにして調製した酵素液について上記 B : 活性測定法に示した方法により、F V H、F V および F K に対する酵素活性を測定し、F K / F V H および F K / F V を算出した。なお、活性測定には p H 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 16 に示す。

【表 16】

プラスミド	アミノ酸変異	使用プラスミド L	使用プラスミド S	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T7	なし	なし	なし	0.316	100	0.093	100
pKK223-3-CFP-T7-E98Q/V259A	E98Q, V259A	pKK223-3-CFP-T7-E98Q	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.020	6	0.009	10
pKK223-3-CFP-T7-E98Q/V259C	E98Q, V259C		pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.034	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-E98H/V259A	E98H, V259A	pKK223-3-CFP-T7-E98H	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.037	12	0.015	16
pKK223-3-CFP-T7-E98H/V259C	E98H, V259C		pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.036	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-E98R/V259C	E98R, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98R	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.022	7	0.008	9
pKK223-3-CFP-T7-E98A/V259C	E98A, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98A	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.044	14	0.018	19
pKK223-3-CFP-T7-E98A/G263R	E98A, G263R		pKK223-3-CFP-T7-G263R	0.064	20	0.030	32
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/V259A	Q110R, V259A	pKK223-3-CFP-T7-Q110R	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.035	11	0.014	15
pKK223-3-CFP-T7-S154D/V259A	S154D, V259A	pKK223-3-CFP-T7-S154D	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.054	17	0.023	25
pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N/V259C	E98A, S154N, V259C	pKK223-3-CFP-T7-E98A/S154N	pKK223-3-CFP-T7-V259C	0.016	5	0.006	6
pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N/V259A	Q110R, S154N, V259A	pKK223-3-CFP-T7-Q110R/S154N	pKK223-3-CFP-T7-V259A	0.017	5	0.007	8

【0244】

表 16 中の多重アミノ酸置換が導入された改変型アマドリアーゼでは、 ϵ FK / α FV H、 ϵ FK / α FV はいずれも各アミノ酸置換を単独で導入した場合と比較して低い値となった。故に、配列番号 1 に示したアマドリアーゼの基質特異性改善に効果的な単一変異を組み合わせることにより、更なる基質特異性の改善が見込めることが明らかとなった。

【実施例 17】

【0245】

(改変型アマドリアーゼの生産および精製)

野生型アマドリアーゼ、および上記のようにして得られた改変型アマドリアーゼを生産する形質転換体、大腸菌 JM109 (pKK223-3-CFP-T7-Q110R)、および大腸菌 JM109 (pKK223-3-CFP-T7-Q110K)、および大腸菌 JM109 (pKK223-3-CFP-T7-Y261F)、および大腸菌 JM10

10

20

30

40

50

9 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - Y 2 6 1 W)、および大腸菌 J M 1 0 9 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - E 9 8 A / V 2 5 9 C)、および大腸菌 J M 1 0 9 (p K K 2 2 3 - 3 - C F P - T 7 - E 9 8 A / S 1 5 4 N / V 2 5 9 C) を、0.1 mM の I P T G を添加した L B - a m p 培地 4 0 m l に植菌し、30 で 1 6 時間培養した。得られた各培養菌体を 2 0 m M の H E P E S - N a O H 緩衝液 (p H 7 . 0) で洗浄した後、同緩衝液に菌体を懸濁して超音波破碎処理を行い、2 0 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離し、粗酵素液 8 m l を調製した。

【 0 2 4 6 】

調製した粗酵素液を 2 0 m M H E P E S - N a O H 緩衝液 (p H 7 . 0) で平衡化した 4 m l の Q S e p h a r o s e F a s t F l o w 樹脂 (G E ヘルスケア社製) に吸着させ、次に 8 0 m l の同緩衝液で樹脂を洗浄し、続いて 1 0 0 m M N a C l を含む 2 0 m M H E P E S - N a O H 緩衝液 (p H 7 . 0) で樹脂に吸着していたタンパク質を溶出させ、アマドリアーゼ活性を示す画分を回収した。

【 0 2 4 7 】

得られたアマドリアーゼ活性を示す画分を、A m i c o n U l t r a - 1 5 , 3 0 K N M W L (ミリポア社製) で濃縮した。その後、1 5 0 m M N a C l を含む 2 0 m M H E P E S - N a O H 緩衝 (p H 7 . 0) で平衡化した H i L o a d 2 6 / 6 0 S u p e r d e x 2 0 0 p g (G E ヘルスケア社製) にアプライし、同緩衝液で溶出させ、アマドリアーゼ活性を示す画分を回収し、野生型および改変型アマドリアーゼの精製標品を得た。得られた精製標品は S D S - P A G E による分析により、単一なバンドまで精製されていることを確認した。

【 0 2 4 8 】

得られた野生型および改変型アマドリアーゼの精製標品を用いて、F V H、F K、F V を基質とした時の酵素活性を測定した。なお、活性測定には p H 7 . 0 に調整した試薬 1 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表 1 7、表 1 8 に示す。なお、比活性の算出に用いたタンパク質濃度は B r a d f o r d 法に基づく比色定量法、もしくは 280nm における吸光度を利用した紫外吸収法により測定した。各定量法により測定したタンパク質濃度から算出した比活性はそれぞれ U/mg、U/A₂₈₀ で表した。

【表 1 7】

アミノ酸 変異	比活性 (α FVH) (U/mg)	比活性 (ε FK) (U/mg)	比活性 (α FV) (U/mg)	ε FK/α FVH	ε FK/ α FVH 比率 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 比率 (%)
なし	22.6	7.0	76.2	0.310	100	0.092	100
Q110R	20.3	2.7	48.1	0.133	43	0.056	61
Q110K	21.2	3.4	37.0	0.160	52	0.092	100

【表 1 8】

アミノ酸 変異	比活性 (α FVH) (U/A ₂₈₀)	比活性 (ε FK) (U/A ₂₈₀)	比活性 (α FV) (U/A ₂₈₀)	ε FK/ α FVH	ε FK/ α FVH 比率 (%)	ε FK/ α FV	ε FK/ α FV 比率 (%)
なし	12.6	3.90	42.5	0.310	100	0.092	100
Y261F	5.80	0.305	7.08	0.053	17	0.043	47
Y261W	2.85	0.0599	3.22	0.021	7	0.019	21
E98A, V259C	12.7	0.585	31.3	0.046	15	0.019	21
E98A, S154N, V259C	11.4	0.197	26.4	0.017	5	0.007	8

【 0 2 4 9 】

表 17 に示す通り、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 110 位のグルタミンをアルギニン、リジンに置換した改変型のアマドリアーゼの、FK / FVH はいずれも、改変前の値である 0.310 より低い値を示し、また、110 位のグルタミンをアルギニンに置換した改変型のアマドリアーゼの、FK / FV は改変前の値である 0.092 より低い値を示した。また、表 18 に示す通り、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 261 位のチロシンをフェニルアラニン、またはトリプトファンに置換した改変型のアマドリアーゼ、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸をアラニンに、かつ 259 位のバリンをシステインに置換した改変型のアマドリアーゼ、及び配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸をアラニンに、かつ 154 位のセリンをアスパラギンに、かつ 259 位のバリンをシステインに置換した改変型のアマドリアーゼの FK / FVH はいずれも、改変前の値である 0.310 より低い値を示し、また、FK / FV は改変前の値である 0.092 より低い値を示した。上記アミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であった。

10

【0250】

また、野生型及び各改変型アマドリアーゼの精製標品を用いて酵素活性を測定して算出した FK / FVH、FK / FV の値は、野生型及び各改変型アマドリアーゼの粗酵素液を用いて酵素活性を測定して算出した FK / FVH、FK / FV の値との間に大きな乖離は認められなかった。従って、改変型アマドリアーゼの粗酵素液を用いて酵素活性の測定において基質特異性の改善が認められれば、改変型アマドリアーゼの精製酵素標品を用いた酵素活性の測定においても基質特異性の改善が認められると見なすことが可能である。

20

【実施例 18】

【0251】

(改変型アマドリアーゼによる FVH の定量)

次に、改変型アマドリアーゼを用いて HbA1c の鎖アミノ末端よりプロテアーゼ等により遊離される FVH を定量する際に、共存する FK が測定値に与える影響について評価した。

【0252】

C. : 試薬の調製

(4) 試薬 4 : パーオキシダーゼ、4 - アミノアンチピリン溶液

30

7.5 kU のパーオキシダーゼ (キッコーマン社製)、150 mg の 4 - アミノアンチピリン (東京化成社製) を 0.15 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、1000 ml に定容する。

【0253】

(5) 試薬 5 : TOOS 溶液

500 mg の TOOS (同仁化学研究所製) をイオン交換水に溶解し、100 ml に定容する。

【0254】

(6) 試薬 6 : アマドリアーゼ溶液

精製した配列番号 1 記載のアマドリアーゼ、及び配列番号 1 記載のアマドリアーゼの 98 位のグルタミン酸をアラニンに、かつ 154 位のセリンをアスパラギンに、かつ 259 位のバリンをシステインに置換した改変型のアマドリアーゼ (配列番号 271) を 0.01 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) で希釈し、それぞれ 1.0 U/ml、2.3 U/ml となるように調製した。

40

【0255】

(7) 試薬 7 : FVH 溶液

FVH 625 mg をイオン交換水に溶解し、10 ml に定容することにより、150 mM の FVH 溶液を調製した。続いて、150 mM の FVH 溶液をイオン交換水により希釈することで、90 μ M、180 μ M、270 μ M、360 μ M、450 μ M の FVH 溶液を調製した。

50

【 0 2 5 6 】

(8) 試薬 8 : 血液モデル試料

F K 4 6 2 m g をイオン交換水に溶解し、1 0 m l に定容することで調製した 1 5 0 m M の F K 溶液と、(7) で調製した 1 5 0 m M の F V H 溶液をイオン交換水で希釈し、以下の 4 種類の血液モデル溶液を調製した。

【 0 2 5 7 】

8 - 1 . 2 1 5 μ M F V H
8 - 2 . 2 1 5 μ M F V H、2 1 5 μ M F K
8 - 3 . 2 1 5 μ M F V H、1 0 7 5 μ M F K
8 - 4 . 2 1 5 μ M F V H、2 1 5 0 μ M F K

10

なお、ヘモグロビン濃度 1 5 g / d L、H b A 1 c 6 . 1 % (J D S 値、N G S P 値 6 . 5 % 相当、I F C C 値 4 6 . 5 m m o l / m o l 相当) の血液では、ヘモグロビンの分子量を 6 5 k D a とすると、H b A 1 c の鎖アミノ末端から遊離される F V H の濃度は 2 1 5 μ M となる。

【 0 2 5 8 】

(改変型アマドリアーゼによる F V H の定量性の確認)

1 . 8 m l の試薬 4、1 0 0 μ l の試薬 5、および 1 0 0 μ l の試薬 6 を混和し、3 7 で 5 分間予備加温する。その後、3 7 で 5 分間予備加温しておいた試薬 7 を 1 0 0 0 μ l 加えて良く混ぜた後、分光光度計 (U - 3 0 1 0 A、日立ハイテクノロジーズ社製) により、5 5 5 n m における吸光度を測定し、その 1 分間あたりの吸光度変化量 (A 5 5 5) を算出した。なお、対照液は、1 0 0 0 μ l の試薬 7 の代わりに 1 0 0 0 μ l のイオン交換水を加える以外は前記と同様にしたものである。結果を図 2 に示した。図 2 から明らかなように、F V H 濃度と吸光度変化量 (A 5 5 5) には相関関係が成立した。従って、配列番号 1 記載のアマドリアーゼ、及び配列番号 2 7 1 記載の改変型アマドリアーゼは共に、9 0 μ M から 4 5 0 μ M の範囲で F V H の定量に用いることができることを確認した。

20

【 0 2 5 9 】

(改変型アマドリアーゼによる血液モデル試料の定量)

1 . 8 m l の試薬 4、1 0 0 μ l の試薬 5、および 1 0 0 μ l の試薬 6 を混和し、3 7 で 5 分間予備加温する。その後、3 7 で 5 分間予備加温しておいた試薬 8 - 1 から 8 - 4 のいずれかを 1 0 0 0 μ l 加えて良く混ぜた後、分光光度計 (U - 3 0 1 0 A、日立ハイテクノロジーズ社製) により、5 5 5 n m における吸光度を測定し、その 1 分間あたりの吸光度変化量 (A 5 5 5) を算出した。なお、対照液は、1 0 0 0 μ l の試薬 8 - 1 から 8 - 4 の代わりに 1 0 0 0 μ l のイオン交換水を加える以外は前記と同様にしたものである。結果を表 1 9 に示した。表 1 9 から明らかなように、配列番号 1 記載のアマドリアーゼを用いた場合、F V H と同濃度の F K が共存すると、その測定値は本来の測定値と比較して 3 % 弱の乖離が認められ、F V H の 5 倍、1 0 倍濃度の F K が共存すると、その測定値は本来の測定値と比較して 8 %、1 7 % の乖離が認められた。それに対し、配列番号 2 7 1 記載の改変型アマドリアーゼを用いた場合には F V H の同濃度、5 倍濃度の F K が共存しても、本来の測定値との乖離は 1 % 弱であり、また、F V H の 1 0 倍濃度の F K が共存しても、本来の測定値との乖離は 2 % 弱である。従って、配列番号 2 7 1 記載の改変型アマドリアーゼを用いれば、F K が共存している試料でも正確に F V H のみを定量することが可能である。

30

40

【表 19】

血液 モデル 試料	配列番号 1 アマドリアーゼ				配列番号 2 7 1 アマドリアーゼ			
	ΔA555			ΔA555 比率 (%)	ΔA555			ΔA555 比率 (%)
	1 回目 測定値	2 回目 測定値	平均値		1 回 目 測定 値	2 回 目 測定 値	平均 値	
8-1	0.111	0.111	0.111	100.0	0.124	0.124	0.124	100.0
8-2	0.115	0.113	0.114	102.7	0.123	0.122	0.123	99.2
8-3	0.120	0.120	0.120	108.1	0.125	0.125	0.125	100.8
8-4	0.129	0.131	0.130	117.1	0.127	0.125	0.126	101.6

10

【実施例 19】

【0260】

(アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングおよび大腸菌での発現)

(a) アスペルギルス・ニードランス F G S C A 2 6 株からの全 RNA の抽出

アスペルギルス・ニードランス F G S C A 2 6 株を、液体培地 (0.4% イーストエキストラクト、1.0% マルツエキストラクト、0.1% トリプトン、0.1% リン酸 2 水素 1 カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、2.0% グルコース、pH 6.5) において、30 で 24 時間培養した。培養後、回収した菌体を液体窒素で粉砕し、I S O G E N (ニッポンジーン社製) を用いて付属のプロトコールに従い全 RNA を調製した。また、調製した全 RNA を D N a s e I (インビトロジェン社製) で処理することにより、DNA の混入を防いだ。

20

【0261】

(b) アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ cDNA のクローニング

得られた全 RNA 1 μg を用いて、Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ社製) により、付属のプロトコールに従って RT-PCR を行った。このとき、逆転写反応では Kit 付属の O l i g o d T P r i m e r を用い、その後の P C R 反応では配列番号 169、170 に示した合成オリゴヌクレオチドを用いた。その結果、約 1300 bp の cDNA 断片が特異的に増幅した。次に、この増幅した cDNA 断片についてシーケンス解析を行った結果、配列番号 171 に示した 1317 bp からなる塩基配列であることがわかった。また、配列番号 171 より予想されるアミノ酸配列 (配列番号 172) は図 1 のアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの配列と一致していた。

30

【0262】

(c) アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの大腸菌での発現

続いて、アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを大腸菌で発現させるために、以下の手順を行った。まず、上記でクローニングしてきた cDNA 断片は配列番号 169、170 に示した合成ヌクレオチド由来の Nde I サイトと Bam H I サイトをそれぞれ 5' 末端と 3' 末端に有しているため、クローニングしてきた cDNA 断片を Nde I と Bam H I (タカラバイオ社製) の 2 種類の制限酵素で処理し、pET-22b (+) Vector (ノバジェン社製) の Nde I - Bam H I サイトに挿入することで、組換え体プラスミド pET22b-AnFX' を取得した。

40

【0263】

次に、アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼにフルクトシルペプチドオキシダーゼ活性を付与するために、組換え体プラスミド pET22b-AnFX' を鋳型にして、配列番号 173、174 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-

50

P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 1 7 2 記載のアミノ酸配列の 5 9 位のセリンがグリシンに置換されたアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - A n F X) を取得した。そして、この得られた組換え体プラスミド p E T 2 2 b - A n F X を大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 株 (ニッポンジーン社製) に形質転換することで、アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生する大腸菌を取得した。

【 0 2 6 4 】

10

上記で得られたアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を、O v e r n i g h t E x p r e s s A u t o i n d u c t i o n S y s t e m 1 (ノバジェン社製) の試薬を加えた L B - a m p 培地において 3 0 ° で 1 8 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を 1 0 m M のリン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 5) に懸濁して超音波破碎処理を行い、2 0 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B : 活性測定法により、F V に対する酵素活性を測定したところ、2 . 2 U / m l であった。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は p H 7 . 5 に調整したものを使用した。

【 実施例 2 0 】

【 0 2 6 5 】

20

(アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子への点変異導入)

基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b A n F X を鋳型にして、配列番号 1 7 5 、 1 7 6 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 1 7 2 記載のアミノ酸配列の 1 5 3 位のシステインがアスパラギン酸に置換されたアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - A n F X - C 1 5 3 D) を得た。

30

【 0 2 6 6 】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b A n F X を鋳型にして、配列番号 1 7 7 、 1 7 8 及び 1 7 9 、 1 8 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 1 7 2 記載のアミノ酸配列の 2 5 9 位のバリンがそれぞれアラニン、システインに置換されたアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - A n F X - V 2 5 9 A 、 p E T 2 2 b - A n F X - V 2 5 9 C) を得た。

40

【 0 2 6 7 】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - A n F X を鋳型にして、配列番号 1 8 1 、 1 8 2 及び 1 8 3 、 1 8 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 1 7 2 記載のアミノ酸配列の 2 6 3 位のグリシンがそれぞれリジン、アルギニンに置換されたアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - A n F X - G 2 6 3 K 、 p E T 2 2 b - A n F X - G 2 6 3 R) を得た。

50

【実施例 21】

【0268】

(点変異を導入したアスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの基質特異性改善効果の評価)

上記で得られた組換え体プラスミド pET22b-AnFX、pET22b-AnFX-C153D、pET22b-AnFX-V259A、pET22b-AnFX-V259C、pET22b-AnFX-G263K、pET22b-AnFX-G263R をそれぞれ保持する大腸菌 BL21(DE3) を、Overnight Express Autoinduction System 1 (ノバジェン社製) の試薬を加えた LB-amp 培地において 30℃ で 18 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して超音波破碎処理を行い、20,000 × g で 10 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B: 活性測定法により、FV、FVH 及び FK に対する酵素活性を測定し、FK/FVH および FK/FV を算出した。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は pH 7.5 に調整したものを使用した。結果を表 20 に示す。

【表 20】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ F K/ α F V H 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α F V 比率 (%)
pET22b-AnFX	なし	なし	0.124	100	0.0255	100
pET22b-AnFX-C153D	C153D	175、176	0.0882	71	0.0142	56
pET22b-AnFX-V259A	V259A	177、178	0.0208	17	0.0051	20
pET22b-AnFX-V259C	V259C	179、180	0.0444	36	0.0092	36
pET22b-AnFX-G263K	G263K	181、182	0.0714	57	0.0175	69
pET22b-AnFX-G263R	G263R	183、184	0.0684	55	0.0153	60

【0269】

表 20 に示したように、配列番号 172 記載のアミノ酸配列の 153 位のシステインをアスパラギン酸に、259 位のバリンをアラニンまたはシステインに、263 位のグリシンをリジンまたはアルギニンに置換することにより、アスペルギルス・ニードランス由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの FK/FVH 及び FK/FV はいずれも置換前より低い値となった。よって、これらアミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。

【実施例 22】

【0270】

(ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子のクローニングおよび大腸菌での発現)

(a) ペニシリウム・クリソゲナム NBRC 9251 株からの全 RNA の抽出

ペニシリウム・クリソゲナム NBRC 9251 株を、液体培地 (0.4% イーストエキストラクト、1.0% マルツエキストラクト、0.1% トリプトン、0.1% リン酸 2 水素 1 カリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、2.0% グルコース、pH 6.5) において、30℃ で 24 時間培養し、上記と同様の手順で全 RNA を調製した。

【0271】

(b) ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ cDNA のクローニング

得られた全RNA 1 µgを用いて、上記と同様にしてRT-PCRを行った。このとき、逆転写反応ではKit付属のOligo dT Primerを用い、その後のPCR反応では配列番号185、186に示した合成オリゴヌクレオチドを用いた。その結果、約1300bpのcDNA断片が特異的に増幅した。次に、この増幅したcDNA断片についてシーケンス解析を行った結果、配列番号187に示した1317bpからなる塩基配列であることがわかった。また、配列番号187より予想されるアミノ酸配列（配列番号188）は、図1で記載したペニシリウム・ヤンシネラムの配列の69番目のロイシンがトリプトファンに、142番目のスレオニンがアラニンに置換されたものと一致していた。

【0272】

（c）ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの大腸菌での発現

続いて、ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを大腸菌で発現させるために、以下の手順を行った。まず、上記でクローニングしてきたcDNA断片は配列番号185、186に示した合成ヌクレオチド由来のNdeIサイトとBamHIサイトをそれぞれ5'末端と3'末端に有しているため、クローニングしてきたcDNA断片をNdeIとBamHI（タカラバイオ社製）の2種類の制限酵素で処理し、pET-22b(+)Vector（ノバジェン社製）のNdeI-BamHIサイトに挿入することで、組換え体プラスミドpET22b-PcFX'を取得した。

【0273】

次に、ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼにフルクトシルペプチドオキシダーゼ活性を付与するために、組換え体プラスミドpET22b-PcFX'を鋳型にして、配列番号189、190の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号188記載のアミノ酸配列の60位のセリンがグリシンに置換されたペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pET22b-PcFX）を取得した。そして、この得られた組換え体プラスミドpET22b-PcFXを大腸菌BL21(DE3)に形質転換することで、ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生する大腸菌を取得した。

【0274】

上記で得られたペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生する大腸菌BL21(DE3)を、Overnight Express Autoinduction System 1（ノバジェン社製）の試薬を加えたLB-amp培地において30℃で18時間振とう培養した。得られた各培養菌体をBugBuster Protein Extraction Reagent（ノバジェン社製）を用いて溶菌した後、20,000×gで10分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記のB：活性測定法により、FVに対する酵素活性を測定したところ、0.090U/mlであった。ただし、このときの活性測定の試薬1はpH7.5に調整したものを使用した。

【実施例23】

【0275】

（ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子への点変異導入）

基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-PcFXを鋳型にして、配列番号191、192の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21(DE3)の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結

10

20

30

40

50

果、配列番号 188 記載のアミノ酸配列の 110 位のリジンがアルギニンに置換されたペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (pET22b-PcFX-K110R) を得た。

【0276】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド pET22b-PcFX を鋳型にして、配列番号 193、194 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 BL21 (DE3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 188 記載のアミノ酸配列の 154 位のシステインがアスパラギン酸に置換されたペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (pET22b-PcFX-C154D) を得た。

【0277】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド pET22b-PcFX を鋳型にして、配列番号 195、196 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 BL21 (DE3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド DNA 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする DNA の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 188 記載のアミノ酸配列の 263 位のグリシンがリジンに置換されたペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (pET22b-PcFX-G263K) を得た。

【実施例 24】

【0278】

(点変異を導入したペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの特性評価)

上記で得られた組換え体プラスミド pET22b-PcFX、pET22b-PcFX-K110R、pET22b-PcFX-C154D、pET22b-PcFX-G263K をそれぞれ保持する大腸菌 BL21 (DE3) を、Overnight Express Autoinduction System 1 (ノバジェン社製) の試薬を加えた LB-amp 培地において 30℃ で 18 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を Bug Buster Protein Extraction Reagent (ノバジェン社製) を用いて溶菌した後、20,000 × g で 10 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B: 活性測定法により、FK、FVH 及び FK に対する酵素活性を測定し、FK/FVH および FK/FV を算出した。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は pH 7.5 に調整したものを使用した。結果を表 21 に示す。

【表 21】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pET22b-PcFX	なし	なし	0.0833	100	0.0085	100
pET22b-PcFX-K110R	K110R	191、192	0.0353	42	0.0051	59
pET22b-PcFX-C154D	C154D	193、194	0.0645	77	0.0079	93
pET22b-PcFX-G263K	G263K	195、196	0.0711	85	—	—

【0279】

表 21 に示したように、配列番号 188 記載のアミノ酸配列の 110 位のリジンをアルギニンに、154 位のシステインをアスパラギン酸に置換することにより、ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの FK/FVH 及び FK/FV

F Vはいずれも置換前より低い値となった。また、配列番号 1 8 8 記載のアミノ酸配列の 2 6 3 位のグリシンをリジンに置換することにより、ペニシリウム・クリソゲナム由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの F K / F V H は置換前より低い値となった。よって、これらアミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。

【実施例 2 5】

【0 2 8 0】

(クリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの大腸菌での発現)

既知のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼのアミノ酸配列をもとに、ゲノムデータベース (<http://www.genome.jp/tools/blast/>) より検索したクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (Cryptococcus neoformans B-3501A: GENE ID: 4934641 CNBB5450 hypothetical protein) について、C 末端から 3 4 アミノ酸を除いた、配列番号 1 9 7 で示す 4 4 3 アミノ酸を大腸菌で発現させることを試みた。そこで、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列をコードし、且つ大腸菌発現用にコドン最適化した、配列番号 1 9 8 で示す 1 3 3 2 b p の遺伝子 (終止コドン T G A を含む) を、定法である遺伝子断片の P C R による全合成により c D N A を全合成することで取得した。このとき、配列番号 1 の 5 ' 末端、3 ' 末端にはそれぞれ N d e I サイトと B a m H I 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は図 1 のクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの C 末端から 3 4 アミノ酸を除いた配列と一致していることを確認した。

【0 2 8 1】

続いて、取得した配列番号 1 9 8 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 N d e I と B a m H I (タカラバイオ社製) の 2 種類の制限酵素で処理し、p E T - 2 2 b (+) V e c t o r (ノバジェン社製) の N d e I - B a m H I サイトに挿入することで、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - C n F X を取得し、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に形質転換した。次に、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - C n F X を保持する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を、O v e r n i g h t E x p r e s s A u t o i n d u c t i o n S y s t e m 1 (ノバジェン社製) の試薬を加えた L B - a m p 培地において 3 0 ° C で 1 8 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を 1 0 m M のリン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 5) に懸濁して超音波破碎処理を行い、2 0 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B : 活性測定法により、F V に対する酵素活性を測定したところ、それぞれ 2 . 2 U / m l であった。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は p H 7 . 5 に調整したものを使用した。

【実施例 2 6】

【0 2 8 2】

(クリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子への点変異導入)

基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - C n F X を鋳型にして、配列番号 1 9 9 、 2 0 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする D N A の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 1 9 7 記載のアミノ酸配列の 1 0 0 位のスレオニンがアルギニンに置換されたクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - C n F X - T 1 0 0 R) を得た。

【0 2 8 3】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - C n F X を鋳型にして、配列番号 2 0 1 、 2 0 2 の合成オリゴ

ヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21（DE3）の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号197記載のアミノ酸配列の110位のセリンがアルギニンに置換されたクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pET22b-CnFX-S110R）を得た。

【0284】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-CnFXを鋳型にして、配列番号203、204の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21（DE3）の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号197記載のアミノ酸配列の154位のセリンがアスパラギンに置換されたクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pET22b-CnFX-S154N）を得た。

【0285】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-CnFXを鋳型にして、配列番号205、206及び207、208の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21（DE3）の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号197記載のアミノ酸配列の259位のバリンがそれぞれアラニン、システインに置換されたクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pET22b-CnFX-V259A、pET22b-CnFX-V259C）を得た。

【0286】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-CnFXを鋳型にして、配列番号209、210及び211、212の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21（DE3）の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号197記載のアミノ酸配列の263位のセリンがそれぞれリジン、アルギニンに置換されたクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pET22b-CnFX-S263K、pET22b-CnFX-S263R）を得た。

【実施例27】

【0287】

（点変異を導入したクリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの特性評価）

上記で得られた組換え体プラスミドpET22b-CnFX-T100R、pET22b-CnFX-S110R、pET22b-CnFX-S154N、pET22b-CnFX-V259A、pET22b-CnFX-V259C、pET22b-CnFX-S263K、pET22b-CnFX-S263Rをそれぞれ保持する大腸菌BL21（DE3）を、Overnight Express Autoinduction System 1（ノバジェン社製）の試薬を加えたLB-amp培地において30℃で18時間振とう培養した。得られた各培養菌体を10mMのリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）に懸濁して超音波破碎処理を行い、20,000×gで10分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記のB：活性測定法により、FV、FVH及びFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。ただし、このときの活性測定の試薬1はpH7.5に調整したものを使用した。結果

10

20

30

40

50

を表 2 2 に示す。

【表 2 2】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK / α FV H 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pET22b-CnFX	なし	なし	0.0647	100	0.0197	100
pET22b-CnFX-T100R	T100R	199、200	0.0584	90	0.0168	85
pET22b-CnFX-S110R	S110R	201、202	0.0468	72	0.0136	69
pET22b-CnFX-S154N	S154N	203、204	0.0552	85	0.0180	91
pET22b-CnFX-V259A	V259A	205、206	0.0353	55	0.0116	59
pET22b-CnFX-V259C	V259C	207、208	0.0284	44	0.0085	43
pET22b-CnFX-S263K	S263K	209、210	0.0583	90	0.0171	87
pET22b-CnFX-S263R	S263R	211、212	0.0543	84	0.0156	79

【0288】

表 2 2 に示したように、配列番号 1 9 7 記載のアミノ酸配列の 1 0 0 位のスレオニンをアルギニンに、1 1 0 位のセリンをアルギニンに、1 5 4 位のセリンをアスパラギンに、2 5 9 位のバリンをアラニンまたはシステインに、2 6 3 位のセリンをリジンまたはアルギニンに置換することにより、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの ϵ FK / α FVH 及び ϵ FK / α FV はいずれも置換前より低い値となった。よって、これらアミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。

【実施例 2 8】

【0289】

(ネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノオキシダーゼの大腸菌での発現)

ネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノオキシダーゼを大腸菌で発現させることを試みた。すでに明らかになっているネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノオキシダーゼのアミノ酸配列を配列番号 2 1 3 に示した(特許文献 1 参照)。この配列番号 2 1 3 で示した 4 4 1 アミノ酸をコードし、且つ大腸菌発現用にコドン最適化した、配列番号 2 1 4 で示す 1 3 2 6 b p の遺伝子(終止コドン T G A を含む)を、定法である遺伝子断片の P C R による全合成により c D N A を全合成することで取得した。このとき、配列番号 1 の 5' 末端、3' 末端にはそれぞれ N d e I サイトと B a m H I 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 のネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノオキシダーゼの配列と一致していることを確認した。

【0290】

続いて、取得した配列番号 2 1 4 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 N d e I と B a m H I (タカラバイオ社製)の 2 種類の制限酵素で処理し、p E T - 2 2 b (+) V e c t o r (ノバジェン社製)の N d e I - B a m H I サイトに挿入することで、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を取得し、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に形質転換した。次に、この組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を保持する大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を、O v e r n i g h t E x p r e s s A u t o i n d u c t i o n S y s t e m 1 (ノバジェン社製)の試薬を加えた L B - a m p 培地において 3 0 ° C で 1 8 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を 1 0 m M のリン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 5) に懸濁して超音波破碎処理を行い、2 0 , 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B : 活性測定法により、 α F V に対する酵素活性を測定したところ、1 9 .

3 U / m l であった。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は p H 7 . 5 に調整したものを使用した。

【実施例 2 9】

【0 2 9 1】

(ネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子への点変異導入)

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を鋳型にして、配列番号 2 1 5、2 1 6 及び 2 1 7、2 1 8 及び 2 1 9、2 2 0 及び 2 2 1、2 2 2 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする D N A の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 2 1 3 記載のアミノ酸配列の 9 8 位のグルタミン酸がそれぞれグルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニンに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - N v F X - E 9 8 Q、p E T 2 2 b - N v F X - E 9 8 H、p E T 2 2 b - N v F X - E 9 8 K、p E T 2 2 b - N v F X - E 9 8 R) を得た。

【0 2 9 2】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を鋳型にして、配列番号 2 2 3、2 2 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のケトアミノキシダーゼをコードする D N A の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 2 1 3 記載のアミノ酸配列の 1 0 3 位のグリシンがアルギニンに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - N v F X - G 1 0 3 R) を得た。

【0 2 9 3】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を鋳型にして、配列番号 2 2 5、2 2 6 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のケトアミノキシダーゼをコードする D N A の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 2 1 3 記載のアミノ酸配列の 1 1 0 位のグルタミン酸がアルギニンに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - N v F X - E 1 1 0 R) を得た。

【0 2 9 4】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を鋳型にして、配列番号 2 2 7、2 2 8 及び 2 2 9、2 3 0 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミド D N A 中のケトアミノキシダーゼをコードする D N A の塩基配列決定を行った。その結果、配列番号 2 1 3 記載のアミノ酸配列の 1 5 4 位のセリンがそれぞれアスパラギン、アスパラギン酸に置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (p E T 2 2 b - N v F X - S 1 5 4 N、p E T 2 2 b - N v F X - S 1 5 4 D) を得た。

【0 2 9 5】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド p E T 2 2 b - N v F X を鋳型にして、配列番号 2 3 1、2 3 2 及び 2 3 3、2 3 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) の形質転換および生育コロニーが保

10

20

30

40

50

持するプラスミドDNA中のケトアミノキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号213記載のアミノ酸配列の259位のバリンがそれぞれアラニン、システインに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pET22b-NvFX-V259A、pET22b-NvFX-V259C)を得た。

【0296】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-NvFXを鋳型にして、配列番号235、236及び237、238の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21(DE3)の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のケトアミノキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号213記載のアミノ酸配列の263位のグリシンがそれぞれリジン、アルギニンに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pET22b-NvFX-G263K、pET22b-NvFX-G263R)を得た。

【0297】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpET22b-NvFXを鋳型にして、配列番号239、240の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌BL21(DE3)の形質転換および生育コロニーが保持するプラスミドDNA中のケトアミノキシダーゼをコードするDNAの塩基配列決定を行った。その結果、配列番号213記載のアミノ酸配列の66位のリジンがグリシンに、67位のバリンがプロリンに置換されたネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pET22b-NvFX-K66GV67P)を得た。

【実施例30】

【0298】

(点変異を導入したネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミノキシダーゼの特性評価)

上記で得られた組換え体プラスミドpET22b-NvFX-E98Q、pET22b-NvFX-E98H、pET22b-NvFX-E98K、pET22b-NvFX-E98R、pET22b-NvFX-E110R、pET22b-NvFX-S154N、pET22b-NvFX-S154D、pET22b-NvFX-V259A、pET22b-NvFX-V259C、pET22b-NvFX-G263K、pET22b-NvFX-G263R、pET22b-NvFX-K66GV67Pをそれぞれ保持する大腸菌BL21(DE3)を、Overnight Express Autoinduction System 1(ノバジェン社製)の試薬を加えたLB-amp培地において30℃で18時間振とう培養した。得られた各培養菌体を10mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁して超音波破碎処理を行い、20,000×gで10分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記のB:活性測定法により、FV、FVH及びFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。ただし、このときの活性測定の試薬1はpH7.5に調整したものを使用した。結果を表23に示す。

【表 2 3】

プラスミド	アミノ酸 変異	使用オリゴ ヌクレオチ ド 配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK / α FV H 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pET22b-NvFX	なし	なし	2.32	100	0.707	100
pET22b-NvFX-E98Q	E98Q	215、216	1.45	63	0.585	83
pET22b-NvFX-E98H	E98H	217、218	1.41	61	0.601	85
pET22b-NvFX-E98K	E98K	219、220	0.691	30	0.239	34
pET22b-NvFX-E98R	E98R	221、222	0.840	36	0.237	33
pET22b-NvFX-G103R	G103R	223、224	1.65	71	0.579	82
pET22b-NvFX-E110R	E110R	225、226	0.474	20	0.178	25
pET22b-NvFX-S154N	S154N	227、228	1.32	57	0.359	51
pET22b-NvFX-S154D	S154D	229、230	1.67	72	0.494	70
pET22b-NvFX-V259A	V259A	231、232	1.33	57	0.431	61
pET22b-NvFX-V259C	V259C	233、234	1.27	55	0.474	67
pET22b-NvFX-G263K	G263K	235、236	0.974	42	0.324	46
pET22b-NvFX-G263R	G263R	237、238	0.972	42	0.315	45
pET22b-NvFX- K66GV67P	K66G, V67P	239、240	2.10	90	—	—

【0299】

表 2 3 に示したように、配列番号 2 1 3 記載のアミノ酸配列の 9 8 位のグルタミン酸をグルタミンまたはヒスチジンまたはリジンまたはアルギニンに、1 0 3 位のグリシンをアルギニンに、1 1 0 位のグルタミン酸をアルギニンに、1 5 4 位のセリンをアスパラギンまたはアスパラギン酸に、2 5 9 位のバリンをアラニンまたはシステインに、2 6 3 位のグリシンをリジンまたはアルギニンに置換することにより、ネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの ϵ FK / α FVH 及び ϵ FK / α FV はいずれも置換前より低い値となった。また、6 6 位のリジンをグリシンに、かつ 6 7 位のバリンをプロリンに置換することにより、ネオコスモスポラ・バシンフェクタ由来ケトアミンオキシダーゼの ϵ FK / α FVH は置換前より低い値となった。よって、これらアミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。

【実施例 3 1】

【0300】

(ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子への点変異導入)

配列番号 2 4 1 は熱安定性向上型変異 (G 1 8 4 D、N 2 7 2 D、H 3 8 8 Y) を導入したユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼのアミノ酸配列であり、配列番号 2 4 1 のアミノ酸配列をコードする遺伝子 (配列番号 2 4 2) を挿入した組換え体プラスミド p U T E 1 0 0 K' - E F P - T 5 を大腸菌で発現させることにより、ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼの活性が確認されている (国際公開第 2 0 0 7 / 1 2 5 7 7 9 号参照)。

【0301】

ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼに基質特異性向上型変異を導入するために、組換え体プラスミド p U T E 1 0 0 K' - E F P - T 5 を鋳型にして、配列番号 2 4 3、2 4 4 の合成オリゴヌクレオチド、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で P C R 反応、大腸菌 D H 5 の形質転換および生育コロニーが保持す

10

20

30

40

50

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241記載のアミノ酸配列の98位のセリンがアラニンに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pUTE100K'-EFP-T5-S98A)を得た。

【0302】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpUTE100K'-EFP-T5を鋳型にして、配列番号245、246の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌DH5の形質転換およ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241記載のアミノ酸配列の110位のリジンがアルギニンに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pUTE100K'-EFP-T5-K110R)を得た。

【0303】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpUTE100K'-EFP-T5を鋳型にして、配列番号249、250及び251、252の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌DH5の形質転換およ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241記載のアミノ酸配列の259位のバリンがそれぞれアラニン、システインに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼをコードする組換え体プラスミド(pUTE100K'-EFP-T5-V259A、pUTE100K'-EFP-T5-V259C)を得た。

【0304】

続いて、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミドpUTE100K'-EFP-T5を鋳型にして、配列番号253、254の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-(東洋紡績社製)を用い、上記と同様の条件でPCR反応、大腸菌DH5の形質転換およ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241記載のアミノ酸配列の263位のグリシンがリジンに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド(pUTE100K'-EFP-T5-G263K)を得た。

【実施例32】

【0305】

(点変異を導入したユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼの基質特異性改善効果の評価)

上記で得られた組換え体プラスミドpUTE100K'-EFP-T5-S98A、pUTE100K'-EFP-T5-K110R、pUTE100K'-EFP-T5-V259A、pUTE100K'-EFP-T5-V259C、pUTE100K'-EFP-T5-G263Kをそれぞれ保持する大腸菌DH5株を、0.1MのIPTGを添加したLB-amp培地において30で18時間振とう培養した。得られた各培養菌体を10mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁して超音波破碎処理を行い、20,000×gで10分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記のB:活性測定法により、FV、FVH及びFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。ただし、このときの活性測定の試薬1はpH8.0に調整したものを使用した。活性測定結果を表24に示す。

【表 2 4】

プラスミド	アミノ酸変異	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ F K/ α F VH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK / α FV 比率 (%)
pUTE100K' -EFP-T5	なし	なし	0.107	100	0.0206	100
pUTE100K' -EFP-T5-S98A	S98A	243,244	0.0825	77	0.0151	73
pUTE100K' -EFP-T5-K110R	K110R	245,246	0.0893	83	0.0204	99
pUTE100K' -EFP-T5-V259A	V259A	249,250	0.0769	72	0.0172	84
pUTE100K' -EFP-T5-V259C	V259C	251,252	0.0333	31	0.0068	33
pUTE100K' -EFP-T5-G263K	G263K	253,254	0.0909	85	0.0139	68

10

【0306】

表 2 4 に示したように、配列番号 2 4 1 記載のアミノ酸配列の 9 8 位のセリンをアラニンに、1 1 0 位のリジンをアルギニンに、2 5 9 位のバリンをアラニンまたはシステインに、2 6 3 位のグリシンをリジンに置換することにより、ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼの FK / FVH 及び FK / FV はいずれも置換前より低い値となった。よって、これらアミノ酸置換は基質特異性が改善されたアマドリアーゼの作製に有効な置換であることがわかった。

20

【実施例 3 3】

【0307】

(ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子の基質特性向上型多重変異体の作製)

ユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子の基質特異性向上型多重変異体を作製することで、FK への反応性を著しく低下させたアマドリアーゼの開発に試みた。

30

【0308】

組換え体プラスミド pUTE100K' -EFP-T5-V259C を鋳型にして、配列番号 2 4 3、2 4 4 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 DH5 の形質転換およ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 2 4 1 記載のアミノ酸配列の 9 8 位のセリンがアラニンに、2 5 9 位のバリンがシステインに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (pUTE100K' -EFP-T5-S98A/V259C) を得た。

【0309】

40

同様にして、基質特異性を向上させるための点変異を導入することを目的として、組換え体プラスミド pUTE100K' -EFP-T5-K110R を鋳型にして、配列番号 2 4 7、2 4 8 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 DH5 の形質転換およ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 2 4 1 記載のアミノ酸配列の 1 1 0 位のリジンがアルギニンに、1 5 4 位のシステインがアスパラギンに置換されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド (pUTE100K' -EFP-T5-K110R/C154N) を得た。

【0310】

50

同様にして、組換え体プラスミド pUTE100K'-EFP-T5-V259C を鋳型にして、配列番号 245、246 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 DH5 の形質転換およ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 241 記載のアミノ酸配列の 110 位のリジンがアルギニンに、259 位のバリンがシステインに置換されたユウペニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pUTE100K'-EFP-T5-K110R/V259C）を得た。

【0311】

同様にして、組換え体プラスミド pUTE100K'-EFP-T5-S98A-V259C を鋳型にして、配列番号 245、246 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus-（東洋紡績社製）を用い、上記と同様の条件で PCR 反応、大腸菌 DH5 の形質転換およ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 241 記載のアミノ酸配列の 98 位のセリンがアラニンに、110 位のリジンがアルギニンに、259 位のバリンがシステインに置換されたユウペニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子をコードする組換え体プラスミド（pUTE100K'-EFP-T5-S98A/K110R/V259C）を得た。

【実施例 34】

【0312】

（ユウペニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼ遺伝子への基質特性向上型多重変異の導入による基質特異性改善効果の評価）

上記で得られた組換え体プラスミド pUTE100K'-EFP-T5-S98A/V259C、pUTE100K'-EFP-T5-K110R/C154N、pUTE100K'-EFP-T5-K110R/V259C、pUTE100K'-EFP-T5-S98A/K110R/V259C をそれぞれ保持する大腸菌 DH5 株を、0.1M の IPTG を添加した LB-amp 培地において 30℃ で 18 時間振とう培養した。得られた各培養菌体を 10mM のリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）に懸濁して超音波破碎処理を行い、20,000×g で 10 分間遠心分離することで粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて、上記の B：活性測定法により、FV、FVH 及び FK に対する酵素活性を測定し、FK/FVH および FK/FV を算出した。ただし、このときの活性測定の試薬 1 は pH 8.0 に調整したものを使用した。活性測定結果を表 25 に示す。

10

20

30

【表 2 5】

プラスミド	アミノ酸変異	鋳型としたプラスミド	使用オリゴヌクレオチド配列番号	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pUTE100K' - EFP-T5	なし	なし	なし	0.107	100	0.0206	100
pUTE100K' - EFP-T5-S98A	S98A	pUTE100K' - EFP-T5	243,244	0.0825	77	0.0151	73
pUTE100K' - EFP-T5-K110R	K110R	pUTE100K' - EFP-T5	245,246	0.0893	83	0.0204	99
pUTE100K' - EFP-T5-V259C	V259C	pUTE100K' - EFP-T5	251,252	0.0333	31	0.0068	33
pUTE100K' - EFP-T5-S98A/V259C	S98A, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-V259C	243,244	0.0248	23	0.0058	28
pUTE100K' - EFP-T5-K110R/C154N	K110R, C154N	pUTE100K' - EFP-T5-K110R	247, 248	0.0779	73	0.0115	56
pUTE100K' - EFP-T5-K110R/V259C	K110R, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-V259C	245,246	0.0267	25	0.0060	29
pUTE100K' - EFP-T5-S98A/K110R/V259C	S98A, K110R, V259C	pUTE100K' - EFP-T5-S98A/V259C	245,246	0.0178	17	0.0047	23

【0313】

表 2 5 に示したように、多重アミノ酸置換が導入されたユウベニシリウム・テレナム由来アマドリアーゼでは、FK / FVH、FK / FV はいずれも各アミノ酸置換を単独で導入した場合と比較してさらに低い値となり、FK への反応性が著しく低下することが明らかとなった。

【実施例 3 5】

【0314】

(組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T9 DNA の調製)

配列番号 272 は熱安定性向上型変異 (G184D、F265L、N272D、H302R、H388Y) を導入した Coniochaeta 属由来アマドリアーゼのアミノ酸配列であり、配列番号 273 の遺伝子にコードされている。

【0315】

Coniochaeta 属由来アマドリアーゼ遺伝子 (配列番号 273) の組換え体プラスミドを有する大腸菌 JM109 (pKK223-3-CFP-T9) 株 (国際公開第 2007/125779 号参照) を、[実施例 1] 記載の方法と同様にして培養し、培養物を 10,000 × g で、1 分間遠心分離することにより集菌して菌体を得た。この菌体より、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit (シグマアルドリッチ社製) を用いて組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T9 を抽出して精製し、2.5 μg の組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T9 DNA を得た。

【0316】

(組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T9 DNA の部位特異的改変操作)

配列番号 272 記載のアミノ酸配列の 98 位のグルタミン酸をアラニンに、154 位のセリンをアスパラギンに、259 位のバリンをシステインに置換するために、組換え体プラスミド pKK223-3-CFP-T9 DNA を鋳型として、配列番号 55、56 の合成オリゴヌクレオチド、KOD-Plus- (東洋紡績社製) を用い、[実施例 1] に述

べた条件と同様の条件でPCR反応、大腸菌JM109の形質転換およ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、98位のグルタミン酸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-T9-E98A)を得た。

【0317】

上記と同様にして、pKK223-3-CFP-T9-E98A DNAを鋳型とし、配列番号139、140の合成オリゴヌクレオチドを使用して、98位のグルタミン酸がアラニンに、154位のセリ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-T9-E98A/S154N)を得た。

【0318】

さらに上記と同様にして、pKK223-3-CFP-T9-E98A/S154N DNAを鋳型とし、配列番号151、152の合成オリゴヌクレオチドを使用して、98位のグルタミン酸がアラニンに、154位のセリンがアスパラギンに、259位のバリンがシステイ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-T9-E98A/S154N/V259C)を得た。

【0319】

上記のようにして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株を、上記[実施例1](3)記載の方法で培養して、各種改変型アマドリアーゼの粗酵素液0.6mlを調製した。

【0320】

このようにして調製した酵素液について上記B：活性測定法に示した方法により、FVH、FVおよびFKに対する酵素活性を測定し、FK/FVHおよびFK/FVを算出した。なお、活性測定にはpH7.0に調整した試薬1：パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン溶液を用いた。結果を表26に示す。

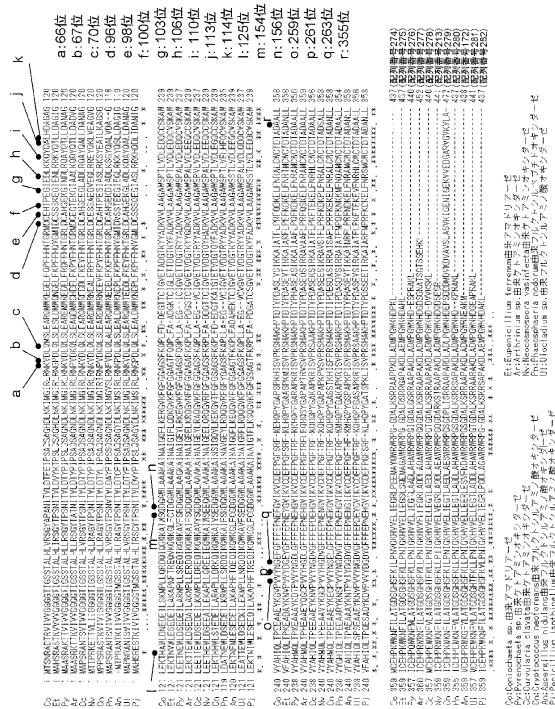
【表26】

プラスミド	アミノ酸 変異	ϵ FK/ α FVH	ϵ FK/ α FVH 比率 (%)	ϵ FK/ α FV	ϵ FK/ α FV 比率 (%)
pKK223-3-CFP-T9	なし	0.0271	100	0.081	100
pKK223-3-CFP-T9-E98A/S154N/V259C	E98A, S154N, V259C	0.017	6	0.007	8

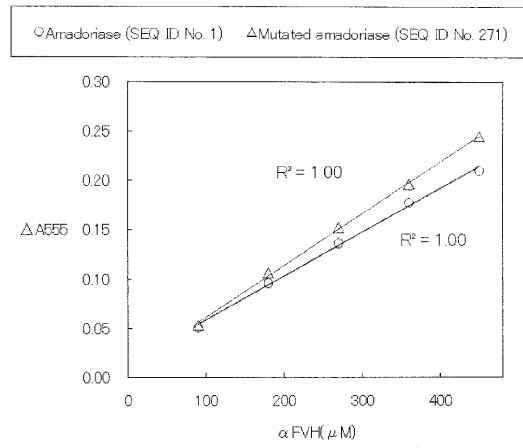
【0321】

表26中の多重アミノ酸置換が導入された改変型アマドリアーゼでは、FK/FVH、FK/FVはいずれも変異導入以前と比較して極めて低い値となった。故に、配列番号1に示したアマドリアーゼの基質特異性改善に効果的な単一変異を、配列番号272に示したアマドリアーゼに蓄積させることによって、極めて大きな基質特異性の改善が見込めることが明らかとなった。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0006176922000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 廣川 浩三
千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内
- (72)発明者 田鍋 康子
千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内
- (72)発明者 鉦 陽介
千葉県野田市野田250番地 キッコーマン株式会社内

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 松田 芳子
審判官 瀬下 浩一

- (56)参考文献 国際公開第2010/041419(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N15/00-15/90

MEDLINE/CAPLus/BIOSIS/WPIDS(STN)

UniProt/GeneSeq