

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5992902号
(P5992902)

(45) 発行日 平成28年9月14日 (2016. 9. 14)

(24) 登録日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/24 (2006. 01)

C 1 2 N 9/24

C 1 2 P 19/16 (2006. 01)

C 1 2 P 19/16

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 20 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-504659 (P2013-504659)

(86) (22) 出願日 平成24年3月5日 (2012. 3. 5)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/055558

(87) 国際公開番号 W02012/124520

(87) 国際公開日 平成24年9月20日 (2012. 9. 20)

審査請求日 平成27年2月9日 (2015. 2. 9)

(31) 優先権主張番号 特願2011-57386 (P2011-57386)

(32) 優先日 平成23年3月16日 (2011. 3. 16)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000216162

天野エンザイム株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(74) 代理人 100114362

弁理士 萩野 幹治

(72) 発明者 石原 聡

岐阜県各務原市テクノプラザ一丁目6番

天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内

審査官 福澤 洋光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変型 α -グルコシダーゼ及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列において、以下の (A) ~ (F) のいずれかのアミノ酸置換が行われたアミノ酸配列からなる、改変型 α -グルコシダーゼ：

(A) 置換されるアミノ酸が343位アミノ酸のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がシステイン、アスパラギン酸、メチオニン、ヒスチジン、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、スレオニン、グルタミン酸、バリン、グルタミン、アスパラギン又はイソロイシンである、

(B) 置換されるアミノ酸が452位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸がグリシン、アスパラギン酸又はグルタミン酸である

(C) 置換されるアミノ酸が496位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸がバリン、アスパラギン又はグルタミンである、

(D) 置換されるアミノ酸が343位アミノ酸及び452位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸が、343位アミノ酸についてはアスパラギン酸であり、452位アミノ酸についてはアラニン又はグリシンである、

(E) 置換されるアミノ酸が343位アミノ酸及び496位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸が、343位アミノ酸についてはアスパラギン酸又はメチオニンであり、496位アミノ酸についてはイソロイシン、アルギニン、システイン又はスレオニンである、

(F) 置換されるアミノ酸が498位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸がロイシン又はセリンである。

【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列において、以下のアミノ酸置換が行われたアミノ酸配列からなる、改変型 α - グルコシダーゼ：

置換されるアミノ酸が495位アミノ酸であり、置換後のアミノ酸がグリシン、プロリン又はバリンである。

【請求項 3】

配列番号 1 8 ~ 4 2 及び 7 7 ~ 7 8 のいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

【請求項 4】

配列番号 7 4 ~ 7 6 のいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項 2 に記載の改変型 α -

10

【請求項 5】

請求項 1 に記載の改変型 α - グルコシダーゼとの間でアミノ酸配列の同一性が90%以上であり（但し、アミノ酸配列の相違は前記アミノ酸置換が施された位置以外の位置で生じている）、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる α - グルコシダーゼよりも糖転移活性が向上している、又は加水分解活性が低下していることを特徴とする、改変型 α - グルコシダーゼ。

【請求項 6】

アミノ酸配列の同一性が95%以上である、請求項 5 に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

20

【請求項 7】

アミノ酸配列の同一性が98%以上である、請求項 5 に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の改変型 α - グルコシダーゼとの間でアミノ酸配列の同一性が90%以上であり（但し、アミノ酸配列の相違は前記アミノ酸置換が施された位置以外の位置で生じている）、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる α - グルコシダーゼよりも糖転移活性が向上している、又は加水分解活性が低下していることを特徴とする、改変型 α - グルコシダーゼ。

【請求項 9】

アミノ酸配列の同一性が95%以上である、請求項 8 に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

30

【請求項 10】

アミノ酸配列の同一性が98%以上である、請求項 8 に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼをコードする遺伝子。

【請求項 12】

配列番号 4 3 ~ 6 7 及び 7 9 ~ 8 3 のいずれかの塩基配列を含む、請求項 11 に記載の遺伝子。

40

【請求項 13】

請求項 11 又は 12 に記載の遺伝子を含む組換えDNA。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の組換えDNAを保有する微生物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼを含む酵素剤。

【請求項 16】

α -1,4結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、請求項 1、3、5 ~ 7 のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼを作用させることを特徴とする、オリゴ糖

50

の製造方法。

【請求項 17】

α -1,6結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、請求項2、4、8～10のいずれか一項に記載の改変型 α -グルコシダーゼを作用させることを特徴とする、オリゴ糖の製造方法。

【請求項 18】

野生型酵素を併用することを特徴とする、請求項16又は17に記載のオリゴ糖の製造方法。

【請求項 19】

α -1,4結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、請求項2、4、8～10のいずれか一項に記載の改変型 α -グルコシダーゼと野生型酵素を作用させることを特徴とする、オリゴ糖の製造方法。

10

【請求項 20】

請求項1～10のいずれか一項に記載の改変型 α -グルコシダーゼ又は請求項15に記載の酵素剤を含有する医薬組成物、医薬部外品組成物、化粧品組成物、食品組成物又は餌組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は改変型 α -グルコシダーゼに関する。詳しくは、改変型 α -グルコシダーゼ、改変型 α -グルコシダーゼの設計法及び調製法、並びに改変型 α -グルコシダーゼの用途に関する。本出願は、2011年3月16日に提出された日本国特許出願第2011-057386号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

20

【背景技術】

【0002】

糖加水分解酵素はエステル結合を切断して分解する酵素であるが、同時に糖転移活性を持つものも多く報告されている。糖加水分解酵素の代表ともいえる α -グルコシダーゼも一般に加水分解活性（加水分解反応）と糖転移活性（縮合反応）を併せもつ。 α -グルコシダーゼは微生物から高等動物及び高等植物まで広く自然界に存在する。 α -グルコシダーゼは産業上も有用な酵素であり、糖の分解や合成などに利用されている。

30

【0003】

技術の進歩によって酵素の特性を変化（改良）することが可能になってきた。 α -グルコシダーゼについても、様々な改変の試みがなされている（例えば特許文献1～3を参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2003-88365号公報

【特許文献2】特開2005-253302号公報

40

【特許文献3】特開2009-22204号公報

【特許文献4】特開2001-046096号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

α -グルコシダーゼを産業用途で使用する場合、通常は加水分解活性又は糖転移活性のいずれか一方を使用するため、使用しない方の活性は低いことが好ましい。 α -グルコシダーゼをオリゴ糖の製造に使用する場合には、加水分解活性が妨げとなり、オリゴ糖の生成効率が低下する。そこで本発明は、オリゴ糖の製造に適する、糖転移活性が優位な α -グルコシダーゼを提供することを課題とする。また、その用途などを提供することも課題

50

とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、オリゴ糖生成能が向上した新規酵素を設計することを目的として、既存の α -グルコシダーゼを分子レベルで構造改変することを試みた。具体的には、ヒト小腸由来 α -グルコシダーゼ(ヒト・マルターゼ-グルコアミラーゼ)のX線結晶構造解析結果を利用し、コンピュータシミュレーション及び4種類のホモログとのアライメント比較を行った。その結果、酵素の基質ポケットを構成する3箇所のアミノ酸が同定された。次に、当該アミノ酸に相当するアミノ酸を、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼのアミノ酸配列上で特定した上で、それらに変異を導入した。得られた改変体の特性を調べた結果、酵素の特性(特に加水分解活性と糖転移活性のバランス)が大幅に変化していることが確認された。改変体の中には α -1,4結合及び α -1,6結合に対する加水分解活性を示さないものや、 α -1,6結合に対する加水分解活性が顕著に低下するもの、 α -1,3結合と α -1,6結合に対する加水分解活性が大幅に低下するもの等を認めた。特に注目すべきことは、野生型は主に α -1,6位に糖転移したオリゴ糖を生成するのに対し、改変体(W343M型及びW343M/S496T型)は、 α -1,4位に糖転移したオリゴ糖のみを生成した。これらの事実は、オリゴ糖の製造等に適する α -グルコシダーゼ(即ち、糖転移活性が優位な α -グルコシダーゼ)を取得する目的で構造改変をする際には、変異を加える位置として、同定に成功した上記アミノ酸位置が有効であることを意味する。また、当該アミノ酸位置は、 α -1,4位特異的な糖転移活性を示すという、ユニークな特性の α -グルコシダーゼを取得するための変異位置として特に有効であるといえる。一方、取得に成功した改変型 α -グルコシダーゼはそれ自体が産業上の大きな価値を有する。

【0007】

本発明者らは更に研究を進め、新しい手法で変異導入点を検討することにした。具体的には、まず、別のコンピューターシミュレーションソフトを使用し、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼとアスペルギルス・ニドランズの α -グルコシダーゼについて立体構造モデルを構築した。続いてドッキングシミュレーション解析を行い、基質ポケットの予測を行った。そして、予測結果に基づき、活性中心となるアミノ酸を検索し、各立体構造モデル上での位置を特定した。次に、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼとアスペルギルス・ニドランズの α -グルコシダーゼの間でアミノ酸配列を比較し、基質ポケットを構成するアミノ酸の中で一致しないアミノ酸を、変位導入に適したアミノ酸として特定した。続いて、これらのアミノ酸が変位導入に適したものであるか否か(換言すれば、構造改変に有益なものであるか否か)を確認するために、二つのアミノ酸について実際に変異を導入して改変体を得た。得られた各改変体の特性を調べた結果、 α 1,6位特異的な転移活性を示す改変体や、 α 1,4位特異的な転移活性を示す改変体を認めた。この事実は、特定に成功したアミノ酸位置が構造改変に有効であることを裏付ける。一方で、取得に成功した改変型 α -グルコシダーゼはそれ自体が産業上の大きな価値を有する。

【0008】

一方、更なる検討の結果、取得に成功した改変体がオリゴ糖の生成ないし製造に有用であることが確認された。注目すべきことに、 α 1,6位特異的な転移活性を示す改変体については、野生型 α -グルコシダーゼと併用することによって、 α 1,4結合を有する基質からもオリゴ糖を生成することが可能であった。

【0009】

ところで、効果的な二つのアミノ酸置換を組み合わせることによって相加的又は相乗的效果が生まれる可能性が高いことは多く経験するところである。従って、特定に成功した3箇所の変異位置は単独に限らず、その組合せについても特性の変化(特に糖転移活性の向上)に有効といえる。実際、2箇所のアミノ酸置換を組み合わせた場合にも糖転移活性が向上した(後述の実施例)。

【0010】

また、同種の酵素については構造(一次構造、立体構造)の類似性が高く、同様の変異

10

20

30

40

50

が同様の効果を生む蓋然性が高いという技術常識に鑑みれば、後述の実施例に示したアスペルギルス・ニガー由来の α -グルコシダーゼに限らず、他の生物由来の α -グルコシダーゼについても、本発明者らが見出した変異手法を適用可能といえる。

【0011】

以下に示す本発明は、上記の成果及び考察に基づく。

[1] α -グルコシダーゼのアミノ酸配列において、以下の(1)～(14)からなる群より選択される一又は二以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなる改変型 α -グルコシダーゼ：

- (1) 配列番号1に示すアミノ酸配列の385位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (2) 配列番号1に示すアミノ酸配列の491位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (3) 配列番号1に示すアミノ酸配列の535位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (4) 配列番号1に示すアミノ酸配列の450位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (5) 配列番号1に示すアミノ酸配列の534位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (6) 配列番号1に示すアミノ酸配列の537位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (7) 配列番号1に示すアミノ酸配列の538位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (8) 配列番号1に示すアミノ酸配列の554位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (9) 配列番号1に示すアミノ酸配列の556位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (10) 配列番号2に示すアミノ酸配列の579位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (11) 配列番号2に示すアミノ酸配列の585位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (12) 配列番号1に示すアミノ酸配列の630位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (13) 配列番号1に示すアミノ酸配列の683位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (14) 配列番号1に示すアミノ酸配列の689位アミノ酸に相当するアミノ酸。

10

20

[2] α -グルコシダーゼが、ヒト・マルターゼ-グルコアミラーゼ (Human Maltase-glucoamylase)、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ (Aspergillus niger alpha-glucosidase)、ヒト・ニュートラル α -グルコシダーゼC (Human Neutral alpha-glucosidase C)、マウス・リソソーム α -グルコシダーゼ (Mouse Lysosomal alpha-glucosidase)、酵母の α -グルコシダーゼ (Yeast GLU2A)、アスペルギルス・ニドランズの α -グルコシダーゼA (Aspergillus nidulans Alpha-glucosidase AgdA)、アスペルギルス・ニドランズの α -グルコシダーゼB (Aspergillus nidulans Alpha-glucosidase AgdB)、ムコール・ヤバニカスの α -グルコシダーゼ (Mucor javanicus alpha-glucosidase)、アスペルギルス・オリゼの α -グルコシダーゼ (Aspergillus oryzae alpha-glucosidase)、Mortierella alliaceaの α -グルコシダーゼ (Mortierella alliacea alpha-glucosidase)、シゾサッカロミセス・ポンベの α -グルコシダーゼ (Schizosaccharomyces pombe alpha-glucosidase)、デバリオミセス・オクシデンタリスの α -グルコシダーゼ (Debaryomyces occidentalis alpha-glucosidase)、大麦の α -グルコシダーゼ (Hordeum vulgare subsp. vulgare alpha-glucosidase)、シロイロナズナの α -グルコシダーゼ (Arabidopsis thaliana alpha-glucosidase)、ほうれん草の α -グルコシダーゼ (Spinacia oleracea alpha-glucosidase)、砂糖大根の α -グルコシダーゼ (Beta vulgaris alpha-glucosidase) 又はジャガイモの α -グルコシダーゼ (Solanum tuberosum alpha-glucosidase) がある、[1]に記載の改変型 α -グルコシダーゼ。

30

40

[3] α -グルコシダーゼのアミノ酸配列が、配列番号2のアミノ酸配列であり、

(1)のアミノ酸が該アミノ酸配列の343位アミノ酸、(2)のアミノ酸が該アミノ酸配列の452位アミノ酸、(3)のアミノ酸が該アミノ酸配列の496位アミノ酸、(4)のアミノ酸が該アミノ酸配列の410位アミノ酸、(5)のアミノ酸が該アミノ酸配列の495位アミノ酸、(6)のアミノ酸が該アミノ酸配列の498位アミノ酸、(7)のアミノ酸が該アミノ酸配列の499位アミノ酸、(8)のアミノ酸が該アミノ酸配列の531位アミノ酸、(9)のアミノ酸が該アミノ酸配列の533位アミノ酸、(12)のアミノ酸が該アミノ酸配列の662位アミノ酸、(13)のアミノ酸が該アミノ酸配列の715位アミノ酸、(14)のアミノ酸が該アミノ酸配列の721位アミノ酸となる、[1]に記載の改変型 α -グルコシダーゼ。

[4] 置換されるアミノ酸が(1)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がシステイン、

50

アスパラギン酸、メチオニン、ヒスチジン、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、スレオニン、グルタミン酸、バリン、グルタミン、アスパラギン又はイソロイシンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[5] 置換されるアミノ酸が(2)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がグリシン、アスパラギン酸又はグルタミン酸である、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[6] 置換されるアミノ酸が(3)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン又はバリンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[7] 置換されるアミノ酸が(1)のアミノ酸及び(2)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸が、(1)のアミノ酸についてはアスパラギン酸であり、(2)のアミノ酸についてはアラニン又はグリシンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[8] 置換されるアミノ酸が(1)のアミノ酸及び(3)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸が、(1)のアミノ酸についてはアスパラギン酸又はメチオニンであり、(3)のアミノ酸についてはイソロイシン、アルギニン、システイン又はスレオニンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[9] 置換されるアミノ酸が(5)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がグリシン、プロリン又はバリンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[10] 置換されるアミノ酸が(6)のアミノ酸であり、置換後のアミノ酸がロイシン又はセリンである、[3] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[11] 配列番号 18 ~ 42 及び 77 ~ 78 のいずれかのアミノ酸配列からなる、[1] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[12] 配列番号 74 ~ 76 のいずれかのアミノ酸配列からなる、[1] に記載の改変型 α - グルコシダーゼ。

[13] [1] ~ [12] のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼをコードする遺伝子。

[14] 配列番号 43 ~ 67 及び 79 ~ 83 のいずれかの塩基配列を含む、[13] に記載の遺伝子。

[15] [13] 又は [14] に記載の遺伝子を含む組換えDNA。

[16] [15] に記載の組換えDNAを保有する微生物。

[17] [1] ~ [12] のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼを含む酵素剤。

[18] α -1,4結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、[1] ~ [8]、[10] 及び [11] のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼを作用させることを特徴とする、オリゴ糖の製造方法。

[19] α -1,6結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、[9] 又は [12] に記載の改変型 α - グルコシダーゼを作用させることを特徴とする、オリゴ糖の製造方法。

[20] 野生型酵素を併用することを特徴とする、[18] 又は [19] に記載のオリゴ糖の製造方法。

[21] α -1,4結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖に対して、[9] 又は [12] に記載の改変型 α - グルコシダーゼと野生型酵素を作用させることを特徴とする、オリゴ糖の製造方法。

[22] [1] ~ [12] のいずれか一項に記載の改変型 α - グルコシダーゼ又は [17] に記載の酵素剤を含有する医薬組成物、医薬部外品組成物、化粧品組成物、食品組成物又は飼料組成物。

[23] 以下のステップ(i)及び(ii)を含む、改変型 α - グルコシダーゼの設計法：

(i)変異対象酵素である α - グルコシダーゼのアミノ酸配列において、以下の(1) ~ (14)からなる群より選択される一又は二以上のアミノ酸を特定するステップ：

- (1)配列番号 1 に示すアミノ酸配列の385位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (2)配列番号 1 に示すアミノ酸配列の491位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (3)配列番号 1 に示すアミノ酸配列の535位アミノ酸に相当するアミノ酸；

10

20

30

40

50

- (4) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の450位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (5) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の534位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (6) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の537位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (7) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の538位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (8) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の554位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (9) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の556位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (10) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列の579位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (11) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列の585位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (12) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の630位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (13) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の683位アミノ酸に相当するアミノ酸；
- (14) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列の689位アミノ酸に相当するアミノ酸；

10

(ii) 変異対象酵素のアミノ酸配列を基にして、ステップ(i)で特定されたアミノ酸配列が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を構築するステップ。

[2 4] α - グルコシダーゼが、ヒト・マルターゼ - グルコアミラーゼ (Human Maltase-glucosidase)、アスペルギルス・ニガーの α - グルコシダーゼ (Aspergillus niger α -glucosidase)、ヒト・ニュートラル α - グルコシダーゼC (Human Neutral α -glucosidase C)、マウス・リソソーム α - グルコシダーゼ (Mouse Lysosomal α -glucosidase)、酵母の α - グルコシダーゼ (Yeast GLU2A)、アスペルギルス・ニドランスの α - グルコシダーゼA (Aspergillus nidulans α -glucosidase AgdA)、アスペルギルス・ニドランスの α - グルコシダーゼB (Aspergillus nidulans α -glucosidase AgdB)、ムコール・ヤバニカスの α - グルコシダーゼ (Mucor javanicus α -glucosidase)、アスペルギルス・オリゼの α - グルコシダーゼ (Aspergillus oryzae α -glucosidase)、Mortierella alliaceaの α - グルコシダーゼ (Mortierella alliacea α -glucosidase)、シゾサッカロミセス・ポンベの α - グルコシダーゼ (Schizosaccharomyces pombe α -glucosidase)、デバリオミセス・オクシデンタリスの α - グルコシダーゼ (Debaryomyces occidentalis α -glucosidase)、大麦の α - グルコシダーゼ (Hordeum vulgare subsp. vulgare α -glucosidase)、シロイロナズナの α - グルコシダーゼ (Arabidopsis thaliana α -glucosidase)、ほうれん草の α - グルコシダーゼ (Spinacia oleracea α -glucosidase)、砂糖大根の α - グルコシダーゼ (Beta vulgaris α -glucosidase) 又はジャガイモの α - グルコシダーゼ (Solanum tuberosum α -glucosidase) である、[2 3] に記載の設計法。

20

30

[2 5] α - グルコシダーゼが、配列番号 1 ~ 1 7 のいずれかのアミノ酸配列を含む、[2 3] に記載の設計法。

[2 6] α - グルコシダーゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、ステップ(i)において置換されるアミノ酸が、(1) ~ (14)の中から選択される一つのアミノ酸、(1) ~ (14)の中から選択される二つのアミノ酸又は(1) ~ (14)の中から選択される三つのアミノ酸である、[2 3] に記載の設計法。

[2 7] 以下のステップ(I) ~ (III)を含む、改変型 α - グルコシダーゼの調製法：

(I) 配列番号 1 8 ~ 4 2 及び 7 4 ~ 7 8 のいずれかのアミノ酸配列、又は [2 3] ~ [2 6] のいずれか一項に記載の設計法によって構築されたアミノ酸配列をコードする核酸を用意するステップ；

40

(II) 前記核酸を発現させるステップ、及び

(III) 発現産物を回収するステップ。

[2 8] α 1,4位特異的又は α 1,6位特異的な転移活性を有する α - グルコシダーゼ。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】ヒト α - グルコシダーゼにおける変異導入点の位置 (A)、アライメント比較 (B)、アスペルギルス・ニガーのアミノ酸配列における、変異導入点に対応するアミノ酸位置 (C)。

【図 2】酵母を用いた構造改変TG (トランスグルコシダーゼ) スクリーニング系の概要。

50

【図 3】HPLCによるオリゴ糖合成活性の比較。WT（野生型）（A）と構造改変TG（W343M（B）、V452G（C）、S496V（D））のオリゴ糖合成活性を比較した。

【図 4】3糖以上のオリゴ糖の合成量の比較。

【図 5】3糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（上）及び4糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（下）。置換後のアミノ酸（グラフの下に表示）が異なる構造改変TGの間で、生成するオリゴ糖の量を比較した。

【図 6】3糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（左）及び4糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（右）。置換後のアミノ酸（グラフの下に表示）が異なる構造改変TGの間で、生成するオリゴ糖の量を比較した。

【図 7】加水分解活性に関する基質特異性の比較。

【図 8】2アミノ酸置換による構造改変TGの加水分解活性。

【図 9】2アミノ酸置換による構造改変TGのオリゴ糖合成活性。WT（野生型）（A）と構造改変TG（W343M（B）、W343M/S496T（C）、W343D/V452G（D））のオリゴ糖合成活性を比較した。

【図 10】3糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（左）及び4糖以上のオリゴ糖の合成量の比較（右）。置換後のアミノ酸（グラフの下に表示）が異なる構造改変TGの間で、生成するオリゴ糖の量を比較した。

【図 11】2アミノ酸置換による構造改変TGの基質特異性。

【図 12】スタート基質をマルトペンタオースとしたときに生成するオリゴ糖の比較。

【図 13】スタート基質をマルトースとイソマルトースの混合物にしたときに生成するオリゴ糖の比較。

【図 14】コンピューターシミュレーションした α -グルコシダーゼの立体構造モデル。左：アスペルギルス・ニガーのTG、右：アスペルギルス・ニドランスのTG。

【図 15】コンピューターシミュレーションに基づく変異導入点の検討スキーム。

【図 16】構造改変TG（S495X）のオリゴ糖合成活性の比較。基質にはマルトースを使用した。3糖以上のオリゴ糖の合成量（上）と4糖以上のオリゴ糖の合成量（下）を比較した。

【図 17】構造改変TG（S495X）のオリゴ糖合成活性の比較。基質にはイソマルトースを使用した。3糖以上のオリゴ糖の合成量（上）と4糖以上のオリゴ糖の合成量（下）を比較した。

【図 18】構造改変TG（S495X）の加水分解活性。

【図 19】構造改変TGのオリゴ糖合成活性の比較。基質にはマルトペンタオースを使用した。(a)WT（野生型）のHPLCチャート。(b)構造改変TG（S495V）のHPLCチャート。(c)生成したオリゴ糖の比率。

【図 20】構造改変TG（C498X）のオリゴ糖合成活性の比較。基質にはマルトースを使用した。

【図 21】構造改変TG（C498X）の加水分解活性。

【図 22】オリゴ糖合成能の比較。(a)TGを添加しない場合、(b)WT（野生型）のTGを添加した場合、(c)構造改変TG（W343M）を添加した場合、(d)3糖以上のエリア面積の比較。

【図 23】おかゆから生成したオリゴ糖のHPLCチャート（反応開始90分後）。

【図 24】オリゴ糖合成活性の比較。構造改変TG（S495P）単独の場合とWT型を併用した場合について、3糖以上のオリゴ糖の合成量（上）と4糖以上のオリゴ糖の合成量（下）を比較した。基質にはマルトースを使用した。

【図 25】マルトース（基質）から生成したオリゴ糖のHPLCチャート（反応開始48時間後）。

【図 26】オリゴ糖合成能の比較。(a)WT（野生型）のTGを添加した場合、(b)構造改変TG（S495P）を添加した場合、(c)WT（野生型）と構造改変TG（S495P）を併用した場合、(d)3糖以上のエリア面積の比較。

【図 27】おかゆから生成したオリゴ糖のHPLCチャート（反応開始90分後）。

【発明を実施するための形態】

【0013】

10

20

30

40

50

説明の便宜上、本発明に関して使用する用語の一部について以下で定義する。

(用語)

α - グルコシダーゼはトランスグルコシダーゼとも呼ばれる。本明細書では用語「 α - グルコシダーゼ」と用語「トランスグルコシダーゼ」を交換可能に使用する。用語「改変型 α - グルコシダーゼ」とは、本明細書が開示する手法によって、「基になる α - グルコシダーゼ」を改変ないし変異して得られる酵素である。本明細書において用語「改変型 α - グルコシダーゼ」、用語「構造改変 α - グルコシダーゼ」、用語「改変型酵素」及び用語「構造改変酵素」は交換可能に用いられる。基になる α - グルコシダーゼは典型的には野生型 α - グルコシダーゼである。但し、既に人為的操作が施されている α - グルコシダーゼを「基になる α - グルコシダーゼ」として本発明に適用することを妨げるものではない。「基になる α - グルコシダーゼ」のことを本明細書では「変異対象 α - グルコシダーゼ」又は「変異対象酵素」とも呼ぶ。本明細書では、変異導入点のアミノ酸を、アミノ酸の種類を表す1文字とアミノ酸の位置を表す数字との組合せで表現する。例えば、343位のトリプトファンが変異導入点であれば「W343」と表現される。

10

【0014】

(改変型 α - グルコシダーゼ)

本発明の第1の局面は改変型 α - グルコシダーゼ(改変型酵素)に関する。本発明の改変型酵素は、変異対象酵素のアミノ酸配列において、以下の(1)~(14)からなる群より選択される一又は二以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する。

- (1)配列番号1に示すアミノ酸配列の385位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (2)配列番号1に示すアミノ酸配列の491位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (3)配列番号1に示すアミノ酸配列の535位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (4)配列番号1に示すアミノ酸配列の450位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (5)配列番号1に示すアミノ酸配列の534位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (6)配列番号1に示すアミノ酸配列の537位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (7)配列番号1に示すアミノ酸配列の538位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (8)配列番号1に示すアミノ酸配列の554位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (9)配列番号1に示すアミノ酸配列の556位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (10)配列番号2に示すアミノ酸配列の579位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (11)配列番号2に示すアミノ酸配列の585位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (12)配列番号1に示すアミノ酸配列の630位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (13)配列番号1に示すアミノ酸配列の683位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (14)配列番号1に示すアミノ酸配列の689位アミノ酸に相当するアミノ酸

20

30

【0015】

後述の実施例に示す通り、上記385位アミノ酸、491位アミノ酸及び535位アミノ酸は、ヒト・マルターゼ - グルコアミラーゼ(配列番号1)の立体構造解析及び機能予測、更にはホモログとのアライメント比較などの手法を駆使した結果、酵素の機能に重要であると予測されたアミノ酸である。本発明の一態様では、これらのアミノ酸に相当するアミノ酸を変異させることによって酵素の構造を改変し、 α - グルコシダーゼの特性を変化させる。ここでの「特性」は糖転移活性及び加水分解活性である。本発明の改変型酵素では、糖転移活性と加水分解活性のバランスが、改変前を基準として、糖転移活性が優位になる方向にシフトしている。典型的には、改変の結果として、糖転移活性の向上又は加水分解活性の低下或いはこれらの両者が生じ、効率的な糖転移が可能な酵素となっている。

40

【0016】

一方、上記(4)~(14)に示したアミノ酸は、アスペルギルス・ニガーの α - グルコシダーゼとアスペルギルス・ニドランスの α - グルコシダーゼの立体構造の比較やアミノ酸配列の比較などを駆使した結果、構造改変に有効であると予測されたアミノ酸である。本発明の他の一態様では、これらのアミノ酸に相当するアミノ酸を変異させることによって酵素の構造を改変し、 α - グルコシダーゼの特性を変化させる。

【0017】

50

ここで、本明細書においてアミノ酸残基について使用する場合の用語「相当する」とは、比較されるタンパク質（酵素）間においてその機能の発揮に同等の貢献をしていることを意味する。例えば、基準のアミノ酸配列（即ち配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号2のアミノ酸配列）に対して比較対象のアミノ酸配列を、一次構造（アミノ酸配列）の部分的な相同性を考慮しつつ、最適な比較ができるように並べたときに（このときに必要に応じてギャップを導入し、アライメントを最適化してもよい）、基準のアミノ酸配列中の特定のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸を「相当するアミノ酸」として特定することができる。一次構造同士の比較に代えて、又はこれに加えて立体構造（三次元構造）同士の比較によって「相当するアミノ酸」を特定することもできる。立体構造情報を利用することによって信頼性の高い比較結果が得られる。この場合は、複数の酵素の立体構造の原子座標を比較しながらアライメントを行っていく手法を採用できる。変異対象酵素の立体構造情報は例えばProtein Data Bank (http://www.pdbj.org/index_j.html) より取得することができる。

10

【0018】

X線結晶構造解析によるタンパク質立体構造の決定方法の一例を以下に示す。

（1）タンパク質を結晶化する。結晶化は、立体構造決定のためには欠かせないが、それ以外にも、タンパク質の高純度の精製法、高密度で安定な保存法として産業上の有用性もある。この場合、リガンドとして基質もしくはそのアナログ化合物を結合したタンパク質を結晶化すると良い。

（2）作製した結晶にX線を照射して回折データを収集する。なお、タンパク質結晶はX線照射によりダメージを受け回折能が劣化するケースが多々ある。その場合、結晶を急激に-173℃程度に冷却し、その状態で回折データを収集する低温測定技術が最近普及してきた。なお、最終的に、構造決定に利用する高分解能データを収集するために、輝度の高いシンクロトロン放射光が利用される。

20

（3）結晶構造解析を行うには、回折データに加えて、位相情報が必要になる。目的のタンパク質に対して、類縁のタンパク質の結晶構造が未知の場合、分子置換法で構造決定することは不可能であり、重原子同型置換法により位相問題が解決されなくてはならない。重原子同型置換法は、水銀や白金等原子番号が大きな金属原子を結晶に導入し、金属原子の大きなX線散乱能のX線回折データへの寄与を利用して位相情報を得る方法である。決定された位相は、結晶中の溶媒領域の電子密度を平滑化することにより改善することが可能である。溶媒領域の水分子は揺らぎが大きいため電子密度がほとんど観測されないの

で、この領域の電子密度を0に近似することにより、真の電子密度に近づくことができ、ひいては位相が改善されるのである。また、非対称単位に複数の分子が含まれている場合、これらの分子の電子密度を平均化することにより位相が更に大幅に改善される。このようにして改善された位相を用いて計算した電子密度図にタンパク質のモデルをフィットさせる。このプロセスは、コンピューターグラフィックス上で、MSI社（アメリカ）のQUANTA等のプログラムを用いて行われる。この後、MSI社のX-PLOR等のプログラムを用いて、構造精密化を行い、構造解析は完了する。目的のタンパク質に対して、類縁のタンパク質の結晶構造が既知の場合は、既知タンパク質の原子座標を用いて分子置換法により決定できる。分子置換と構造精密化はプログラム CNS_SOLVE ver.11などを用いて行うことができる。

30

40

【0019】

本発明における変異対象酵素の例はヒト・マルターゼ - グルコアミラーゼ (Human Maltase-glucosylase)、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ (Aspergillus niger α -glucosidase)、ヒト・ニュートラル α -グルコシダーゼC (Human Neutral α -glucosidase C)、マウス・リソソーム α -グルコシダーゼ (Mouse Lysosomal α -glucosidase)、酵母の α -グルコシダーゼ (Yeast GLU2A)、アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼA (Aspergillus nidulans α -glucosidase AgdA)、アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼB (Aspergillus nidulans α -glucosidase AgdB)、ムコール・ヤバニカスの α -グルコシダーゼ (Mucor javanicus α -glucosidase)

50

ase)、アスペルギルス・オリゼの α -グルコシダーゼ(Aspergillus oryzae alpha-glucosidase)、Mortierella alliaceaの α -グルコシダーゼ(Mortierella alliacea alpha-glucosidase)、シゾサッカロミセス・ポンベの α -グルコシダーゼ(Schizosaccharomyces pombe alpha-glucosidase)、デバリオミセス・オクシデンタリスの α -グルコシダーゼ(Debaryomyces occidentalis alpha-glucosidase)、大麦の α -グルコシダーゼ(Hordeum vulgare subsp. vulgare alpha-glucosidase)、シロイロナズナの α -グルコシダーゼ(Arabidopsis thaliana alpha-glucosidase)、ほうれん草の α -グルコシダーゼ(Spinacia oleracea alpha-glucosidase)、砂糖大根の α -グルコシダーゼ(Beta vulgaris alpha-glucosidase)、ジャガイモの α -グルコシダーゼ(Solanum tuberosum alpha-glucosidase)である。公共のデータベースに登録されている、これらの α -グルコシダーゼのアミノ酸配列を以下に示す。

10

ヒト・マルターゼ-グルコアミラーゼ(Human Maltase-glucoamylase):配列番号1

アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ(Aspergillus niger alpha-glucosidase):配列番号2

ヒト・ニュートラル α -グルコシダーゼC(Human Neutral alpha-glucosidase C):配列番号3

マウス・リソソーム α -グルコシダーゼ(Mouse Lysosomal alpha-glucosidase):配列番号4

酵母の α -グルコシダーゼ(Yeast GLU2A):配列番号5

アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼA(Aspergillus nidulans Alpha-glucosidase AgdA):配列番号6

20

アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼB(Aspergillus nidulans Alpha-glucosidase AgdB):配列番号7

ムコール・ヤバニカスの α -グルコシダーゼ(Mucor javanicus alpha-glucosidase):配列番号8

アスペルギルス・オリゼの α -グルコシダーゼ(Aspergillus oryzae alpha-glucosidase):配列番号9

Mortierella alliaceaの α -グルコシダーゼ(Mortierella alliacea alpha-glucosidase):配列番号10

シゾサッカロミセス・ポンベの α -グルコシダーゼ(Schizosaccharomyces pombe alpha-glucosidase):配列番号11

30

デバリオミセス・オクシデンタリスの α -グルコシダーゼ(Debaryomyces occidentalis alpha-glucosidase):配列番号12

大麦の α -グルコシダーゼ(Hordeum vulgare subsp. vulgare alpha-glucosidase):配列番号13

シロイロナズナの α -グルコシダーゼ(Arabidopsis thaliana alpha-glucosidase):配列番号14

ほうれん草の α -グルコシダーゼ(Spinacia oleracea alpha-glucosidase):配列番号15

砂糖大根の α -グルコシダーゼ(Beta vulgaris alpha-glucosidase):配列番号16

40

ジャガイモの α -グルコシダーゼ(Solanum tuberosum alpha-glucosidase):配列番号17

【0020】

ここで、配列番号2のアミノ酸配列を有するアスペルギルス・ニガー由来 α -グルコシダーゼを変異対象酵素としたとき、上記(1)のアミノ酸は配列番号2の343位アミノ酸となり、上記(2)のアミノ酸は配列番号2の452位アミノ酸となり、上記(3)のアミノ酸は配列番号2の496位アミノ酸となり、上記(4)のアミノ酸は配列番号2の410位アミノ酸となり、上記(5)のアミノ酸は配列番号2の495位アミノ酸となり、上記(6)のアミノ酸は配列番号2の498位アミノ酸となり、上記(7)のアミノ酸は配列番号2の499位アミノ酸となり、上記(8)のアミノ酸は配列番号2の531位アミノ酸となり、上記(9)のアミノ酸は配列番号

50

2の533位アミノ酸となり、上記(10)のアミノ酸は配列番号2の579位アミノ酸となり、上記(11)のアミノ酸は配列番号2の585位アミノ酸となり、上記(12)のアミノ酸は配列番号2の662位アミノ酸となり、上記(13)のアミノ酸は配列番号2の715位アミノ酸となり、上記(14)のアミノ酸は配列番号2の721位アミノ酸となる。

【0021】

置換後のアミノ酸の種類は特に限定されない。従って、保存的アミノ酸置換であっても非保存的アミノ酸置換であってもよい。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は典型的には同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

【0022】

配列番号2のアミノ酸配列を有するアスペルギルス・ニガー由来α-グルコシダーゼを変異対象酵素としたときの置換後のアミノ酸の例を挙げると、(1)のアミノ酸についてはシステイン、アスパラギン酸、メチオニン、ヒスチジン、アラニン、フェニルアラニン、グリシン、スレオニン、グルタミン酸、バリン、グルタミン、アスパラギン又はイソロイシンであり、(2)のアミノ酸についてはグリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はアラニンであり、(3)のアミノ酸についてはバリン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、アルギニン、システイン又はスレオニンであり、(5)のアミノ酸についてはグリシン、プロリン又はバリンであり、(6)のアミノ酸についてはロイシン又はセリンである。

【0023】

上記(1)～(14)のアミノ酸の内、二つ以上のアミノ酸が置換されていてもよい。置換されるアミノ酸の組合せとして、(1)と(2)の組合せ及び(1)と(3)の組合せを例示することができる。これらの組合せは、後述の実施例で取得した構造改変酵素に相当する。

【0024】

ここで、改変型酵素のアミノ酸配列の例を配列番号18～42、74～78に示す。これらの配列はアスペルギルス・ニガーのα-グルコシダーゼに対して1アミノ酸置換（(1)～(3)、(5)及び(6)のいずれかのアミノ酸に対して）、2アミノ酸置換（(1)と(2)のアミノ酸に対して、(1)と(3)のアミノ酸に対して、又は(2)と(3)のアミノ酸に対して）、又は3アミノ酸置換（(1)と(2)と(3)のアミノ酸に対して）を施すことによって得られる改変型酵素のアミノ酸配列である。配列番号とアミノ酸置換の対応関係は次の通りである。尚、アスペルギルス・ニガーのα-グルコシダーゼのアミノ酸配列（配列番号2）において343位のトリプトファン（W343）が(1)のアミノ酸に相当し、同452位のバリン（V452）が(2)のアミノ酸に相当し、同496位のセリン（S496）が(3)のアミノ酸に相当し、同410位のイソロイシン（I410）が(4)のアミノ酸に相当し、同499位のバリン（V499）が(7)のアミノ酸に相当し、同531位のグルタミン酸（E531）が(8)のアミノ酸に相当し、同533位のフェニルアラニン（F533）が(9)のアミノ酸に相当し、同579位のヒスチジン（H579）が(10)のアミノ酸に相当し、同585位のアスパラギン（N585）が(11)のアミノ酸に相当し、同662位のチロシン（Y662）が(12)のアミノ酸に相当し、同715位のチロシン（Y715）が(13)のアミノ酸に相当し、同721位のロイシン（L721）が(14)のアミノ酸に相当しする。また、アスペルギルス・ニドランスのα-グルコシダーゼBのアミノ酸配列（配列番号7）において296位のチロシン（Y296）が(1)のアミノ酸に相当し、456位のアスパラギン（N456）が(3)のアミノ酸に相当し、363位のメチオニン（M363）が(4)のアミノ酸に相当し、455位のアラニン（A455）が(5)のアミノ酸に相当し、458位のチロシン（Y458）が(6)のアミノ酸に相当し、459位のアスパラギン（N459）が(7)のアミノ酸に相当し、488位のアスパラギン酸（D488）が(8)のアミ

ノ酸に相当し、490位のロイシン(L490)が(9)のアミノ酸に相当し、565位のアルギニン(R565)が(10)のアミノ酸に相当し、571位のグルタミン(Q571)が(11)のアミノ酸に相当し、646位のイソロイシン(I646)が(12)のアミノ酸に相当し、700位のフェニルアラニン(F700)が(13)のアミノ酸に相当し、706位のイソロイシン(I706)が(14)のアミノ酸に相当する。

アミノ酸配列		アミノ酸置換	
A.	配列番号 1 8	: W343C	
B.	配列番号 1 9	: W343D	
C.	配列番号 2 0	: W343M	
D.	配列番号 2 1	: W343H	
E.	配列番号 2 2	: W343A	10
F.	配列番号 2 3	: W343F	
G.	配列番号 2 4	: W343G	
H.	配列番号 2 5	: W343T	
I.	配列番号 2 6	: W343E	
J.	配列番号 2 7	: W343V	
K.	配列番号 2 8	: W343Q	
L.	配列番号 2 9	: W343N	
M.	配列番号 3 0	: W343I	
N.	配列番号 3 1	: V452G	
O.	配列番号 3 2	: V452D	20
P.	配列番号 3 3	: V452E	
Q.	配列番号 3 4	: S496V	
R.	配列番号 3 5	: S496N	
S.	配列番号 3 6	: S496Q	
T.	配列番号 3 7	: W343DとV452A	
U.	配列番号 3 8	: W343DとV452G	
V.	配列番号 3 9	: W343DとS496I	
W.	配列番号 4 0	: W343DとS496R	
X.	配列番号 4 1	: W343MとS496C	
Y.	配列番号 4 2	: W343MとS496T	30
a.	配列番号 7 4	: S495G	
b.	配列番号 7 5	: S495P	
c.	配列番号 7 6	: S495V	
d.	配列番号 7 7	: C498L	
e.	配列番号 7 8	: C498S	

【 0 0 2 5 】

後述の実施例（アミノ酸置換の効果の確認）に示した実験結果を踏まえると、特に糖転移活性に優れる点において、A～C、O、Q～Sの改変型 α -グルコシダーゼの有用性は高い。また、加水分解活性が極めて低い点においてV及びWの有用性は高い。一方、 α -1,6結合に対する分解活性が極めて低い点においてU、X及びYの有用性は高い。Yは糖転移活性に優れる点においてもその有用性は高い。また、a～cは α 1,6位特異的な転移活性を示す点が特徴的である。d及びeについては、 α -1,4位特異的な転移活性に優れる。

【 0 0 2 6 】

ところで、一般に、あるタンパク質のアミノ酸配列の一部を変異させた場合において変異後のタンパク質が変異前のタンパク質と同等の機能を有することがある。即ちアミノ酸配列の変異がタンパク質の機能に対して実質的な影響を与えず、タンパク質の機能が変異前後において維持されることがある。この技術常識を考慮すれば、上記(1)～(14)からなる群より選択される一又は二以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列からなる改変型酵素と比較した場合に、アミノ酸配列の僅かな相違が認められるものの（但し、アミノ酸配列の相違は上記アミノ酸置換が施された位置以外の位置で生ずることとす

10

20

30

40

50

る)、特性に実質的な差が認められないものは、上記改変型酵素と実質同一の酵素とみなすことができる。ここでの「アミノ酸配列の僅かな相違」とは、典型的には、アミノ酸配列を構成する1～数個(上限は例えば3個、5個、7個、10個)のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数個(上限は例えば3個、5個、7個、10個)のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異(変化)が生じていることをいう。「実質同一の酵素」のアミノ酸配列と、基準となる上記改変型酵素のアミノ酸配列との同一性(%)は、例えば90%以上であり、好ましくは95%以上であり、より好ましくは98%以上であり、最も好ましくは99%以上である。尚、アミノ酸配列の相違は複数の位置で生じていてもよい。「アミノ酸配列の僅かな相違」は、好ましくは保存的アミノ酸置換により生じている。

10

【0027】

(改変型 α -グルコシダーゼをコードする核酸等)

本発明の第2の局面は本発明の改変型酵素に関連する核酸を提供する。即ち、改変型酵素をコードする遺伝子、改変型酵素をコードする核酸を同定するためのプローブとして用いることができる核酸、改変型酵素をコードする核酸を増幅又は突然変異等させるためのプライマーとして用いることができる核酸が提供される。

【0028】

改変型酵素をコードする遺伝子は典型的には改変型酵素の調製に利用される。改変型酵素をコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的調製法によれば、より均質な状態の改変型酵素を得ることが可能である。また、当該方法は大量の改変型酵素を調製する場合にも好適な方法といえる。尚、改変型酵素をコードする遺伝子の用途は改変型酵素の調製に限られない。例えば、改変型酵素の作用機構の解明などを目的とした実験用のツールとして、或いは酵素の更なる改変体をデザイン又は作製するためのツールとして、当該核酸を利用することもできる。

20

【0029】

本明細書において「改変型酵素をコードする遺伝子」とは、それを発現させた場合に当該改変型酵素が得られる核酸のことをいい、当該改変型酵素のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸をも含む。また、コドンの縮重も考慮される。

【0030】

改変型酵素をコードする遺伝子の配列(塩基配列)の例を配列番号43～67及び79～83に示す。これらの配列はアスペルギルス・ニガールの α -グルコシダーゼに特定のアミノ酸置換が施された改変型酵素をコードする遺伝子である。配列番号とアミノ酸置換の対応関係は次の通りである。

30

塩基配列 : アミノ酸置換

- | | | | |
|----|---------|---|-------|
| A. | 配列番号 43 | : | W343C |
| B. | 配列番号 44 | : | W343D |
| C. | 配列番号 45 | : | W343M |
| D. | 配列番号 46 | : | W343H |
| E. | 配列番号 47 | : | W343A |
| F. | 配列番号 48 | : | W343F |
| G. | 配列番号 49 | : | W343G |
| H. | 配列番号 50 | : | W343T |
| I. | 配列番号 51 | : | W343E |
| J. | 配列番号 52 | : | W343V |
| K. | 配列番号 53 | : | W343Q |
| L. | 配列番号 54 | : | W343N |
| M. | 配列番号 55 | : | W343I |
| N. | 配列番号 56 | : | V452G |
| O. | 配列番号 57 | : | V452D |

40

50

- P. 配列番号 5 8 : V452E
- Q. 配列番号 5 9 : S496V
- R. 配列番号 6 0 : S496N
- S. 配列番号 6 1 : S496Q
- T. 配列番号 6 2 : W343DとV452A
- U. 配列番号 6 3 : W343DとV452G
- V. 配列番号 6 4 : W343DとS496I
- W. 配列番号 6 5 : W343DとS496R
- X. 配列番号 6 6 : W343MとS496C
- Y. 配列番号 6 7 : W343MとS496T
- a. 配列番号 7 9 : S495G
- b. 配列番号 8 0 : S495P
- c. 配列番号 8 1 : S495V
- d. 配列番号 8 2 : C498L
- e. 配列番号 8 3 : C498S

10

【 0 0 3 1 】

本発明の核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。

【 0 0 3 2 】

20

本発明の他の態様では、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列と比較した場合にそれがコードするタンパク質の機能は同等であるものの一部において塩基配列が相違する核酸（以下、「相同核酸」ともいう。また、相同核酸を規定する塩基配列を「相同塩基配列」ともいう）が提供される。相同核酸の例として、本発明の改変型酵素をコードする核酸の塩基配列を基準として1若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、改変型酵素に特徴的な酵素活性（即ち糖転移活性）を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該核酸がコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば2～40塩基、好ましくは2～20塩基、より好ましくは2～10塩基である。

30

【 0 0 3 3 】

以上のような相同核酸は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。また、紫外線照射など他の方法によっても相同核酸を得ることができる。

【 0 0 3 4 】

本発明の他の態様は、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸に関する。本発明の更に他の態様は、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%同一な塩基配列を有する核酸を提供する。

40

【 0 0 3 5 】

本発明の更に別の態様は、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列又はその相同塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する核酸に関する。ここでの「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジントな条件は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)を参照して設

50

定することができる。ストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 µg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いて約42 ～ 約50 でインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1% SDSを用いて約65 ～ 約70 で洗浄する条件を挙げることができる。更に好ましいストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10 µg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いる条件を挙げることができる。

【0036】

10

本発明の更に他の態様は、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列の一部を有する核酸（核酸断片）を提供する。このような核酸断片は、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列を有する核酸などを検出、同定、及び/又は増幅することなどに用いることができる。核酸断片は例えば、本発明の改変型酵素をコードする遺伝子の塩基配列において連続するヌクレオチド部分（例えば約10～約100塩基長、好ましくは約20～約100塩基長、更に好ましくは約30～約100塩基長）にハイブリダイズする部分を少なくとも含むように設計される。プローブとして利用される場合には核酸断片を標識化することができる。標識化には例えば、蛍光物質、酵素、放射性同位元素を用いることができる。

【0037】

20

本発明のさらに他の局面は、本発明の遺伝子（改変型酵素をコードする遺伝子）を含む組換えDNAに関する。本発明の組換えDNAは例えばベクターの形態で提供される。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいう。

【0038】

使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。大腸菌を宿主とするベクターとしてはM13ファージ又はその改変体、λファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）等、酵母を宿主とするベクターとしてはpYepSec1、pMFa、pYES2等、昆虫細胞を宿主とするベクターとしてはpAc、pVL等、哺乳類細胞を宿主とするベクターとしてはpCDM8、pMT2PC等を例示することができる。

30

【0039】

本発明のベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

【0040】

40

本発明の核酸のベクターへの挿入、選択マーカ遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

【0041】

宿主細胞としては、取り扱いの容易さの点から、大腸菌（エシェリヒア・コリ）、出芽酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）などの微生物を用いることが好ましいが、組換えDNAが複製可能で且つ改変型酵素の遺伝子が発現可能な宿主細胞であれば利用可能である。大腸菌の例としてT7系プロモーターを利用する場合は大腸菌BL21(DE3)pLysS、そうでない場合は大腸菌JM109を挙げることができる。また、出芽酵母の例として出芽酵母SHY2、

50

出芽酵母AH22あるいは出芽酵母INVSc1（インビトロジェン社）を挙げることができる。

【0042】

本発明の他の局面は、本発明の組換えDNAを保有する微生物（即ち形質転換体）に関する。本発明の微生物は、上記本発明のベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって得ることができる。例えば、塩化カルシウム法（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー(J.Mol. Biol.)、第53巻、第159頁（1970））、ハナハン（Hanahan）法（ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー、第166巻、第557頁（1983））、SEM法（ジーン（Gene）、第96巻、第23頁（1990））、チャング（Chung）らの方法（プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ U SA、第86巻、第2172頁（1989））、リン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポレーション（Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165 (1984)）、リポフェクション（Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417 (1984)）等によって実施することができる。尚、本発明の微生物は、本発明の改変型酵素を生産することに利用することができる（後述の改変型 α -グルコシダーゼの調製法の欄を参照）。

10

【0043】

（改変型 α -グルコシダーゼを含む酵素剤）

本発明の改変型酵素は例えば酵素剤の形態で提供される。酵素剤は、有効成分（本発明の改変型酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを含有していてもよい。賦形剤としてはデンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、D-グルコース、ソルビトール、D-マンニトール、白糖、グリセロール等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはエタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

20

【0044】

（改変型 α -グルコシダーゼの用途）

本発明の更なる局面は改変型酵素の用途に関する。当該用途の一つとして、オリゴ糖の製造方法が提供される。本発明のオリゴ糖の製造方法の第1態様では、 α -1,4結合に対する特異性が高いという、本発明の改変型酵素の特徴を活かすため、 α -1,4結合を有する2糖以上のオリゴ糖又は多糖を基質として用い、当該基質に対して本発明の改変型酵素を作用させる。当該態様には、後述の実施例に示す改変型酵素W343M、W343M/S496T、C498L、C498S等、 α -1,4結合に対する特異性の高い酵素が使用される。基質の例はマルトース、マルトトリオース、パノース、ブルラン、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、マルトオクタオース、デキストリン、デンプン（馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、コースターチ、小麦澱粉、タピオカ澱粉等）などである。二種類以上のオリゴ糖又は多糖の混合物を基質にしてもよい。本発明の製造方法によれば分岐鎖が少ないオリゴ糖を特異的且つ効率的に製造可能である。反応条件は、 α -グルコシダーゼを用いたオリゴ糖の生成に通常採用されるものに準じればよい。

30

40

【0045】

本発明のオリゴ糖の製造方法の第2態様では、 α -1,6結合特異的な糖転移活性を示す改変型酵素（例えば後述の実施例に示すS495G、S495P、S495V）を使用する。この場合の基質の例は、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース、デンプン（馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、コースターチ、小麦澱粉、タピオカ澱粉等）である。当該態様によれば、典型的には、分岐鎖の多いオリゴ糖を特異的且つ効率的に製造可能である。

【0046】

目的のオリゴ糖（第1態様の場合は分岐鎖が少ないオリゴ糖であり、第2態様の場合は典型的には分岐鎖の多いオリゴ糖）の生成量を高めるために、改変型酵素に加えて野生型酵素を使用することにしてもよい。目的のオリゴ糖の生成に適したものであれば野生型酵

50

素は特に限定されない。例えば、使用する改変型酵素に対応する野生型酵素（即ち、当該改変型酵素を得るために改変を施した酵素）を採用することができる。この例とは対照的に、由来の異なる改変型酵素と野生型酵素を併用することにしてもよい。一例を示せば、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼを改変した酵素（改変型酵素）とアスペルギルス・ニドランスの野生型 α -グルコシダーゼBを併用する。

【0047】

ここで、後述の実施例に示す通り、 α -1,6結合特異的な糖転移活性を示す改変型酵素と野生型酵素を併用すれば、 α -1,4結合を有する基質からオリゴ糖を生成できることが明らかとなった。そこで、本発明の更なる態様では、 α -1,4結合を有する基質に対して、 α -1,6結合特異的な糖転移活性を示す改変型酵素（例えば後述の実施例に示すS495G、S495P、S495V）と野生型酵素を作用させてオリゴ糖を得る。

10

【0048】

本発明の改変型酵素にはその糖転移活性によりデンプンの老化防止効果、食品の風味改善効果、整腸効果等が期待できる。従って、本発明の改変型酵素の用途の例として、食品中のデンプンの老化防止、食品の風味改善、整腸を挙げることができる。これらの用途への適用を想定し、本発明は更なる局面として、改変型酵素を含有する組成物（医薬組成物、医薬部外品組成物、化粧品組成物、食品組成物又は餌組成物）を提供する。

【0049】

本発明の医薬組成物及び医薬部外品組成物の製剤化は常法に従って行うことができる。製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水など）を含有させることができる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としてはベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等と用いることができる。

20

30

【0050】

製剤化する場合の剤型も特に限定されず、例えば錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤、注射剤、外用剤、及び座剤などとして本発明の医薬組成物又は医薬部外品組成物を提供できる。

【0051】

本発明の医薬組成物には、期待される治療効果や予防効果を得るために必要な量（即ち治療上有効量）の有効成分（改変型酵素）が含有される。同様に本発明の医薬部外品組成物には、期待される改善効果や予防効果等を得るために必要な量の有効成分が含有される。本発明の医薬組成物又は医薬部外品組成物に含まれる有効成分量は一般に剤型や形態によって異なるが、所望の投与量を達成できるように有効成分量を例えば約0.1重量%～約95重量%の範囲内で設定する。

40

【0052】

本発明の医薬組成物及び医薬部外品組成物はその剤型・形態に応じて経口又は非経口（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、又は腹腔内注射、経皮、経鼻、経粘膜、塗布など）で対象に適用される。ここでの「対象」は特に限定されず、ヒト及びヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウズラ等である）を含

50

む。好ましい一態様では、適用対象はヒトである。

【0053】

本発明の医薬組成物及び医薬部外品組成物の投与量・使用量は、期待される効果が得られるように設定される。有効な投与量の設定においては一般に適用対象の症状、年齢、性別、体重などが考慮される。尚、当業者であればこれらの事項を考慮して適当な投与量を設定することが可能である。投与スケジュールとしては例えば一日一回～数回、二日に一回、或いは三日に一回などを採用できる。投与スケジュールの作成においては、適用対象の症状や有効成分の効果持続時間などを考慮することができる。

【0054】

本発明の化粧品組成物は、改変型酵素と、化粧品に通常使用される成分・基材（例えば、各種油脂、ミネラルオイル、ワセリン、スクワラン、ラノリン、ミツロウ、変性アルコール、パルミチン酸デキストリン、グリセリン、グリセリン脂肪酸エステル、エチレングリコール、パラベン、カンフル、メントール、各種ビタミン、酸化亜鉛、酸化チタン、安息香酸、エドト酸、カミツレ油、カラギーナン、キチン末、キトサン、香料、着色料など）を配合することによって得ることができる。化粧品組成物の形態として、フェイス又はボディー用の乳液、化粧水、クリーム、ローション、エッセンス、オイル、パック、シート、洗浄料などを例示できる。化粧品組成物における改変型酵素の添加量は特に限定されない。例えば0.01重量%～10重量%となるように改変型酵素を添加することができる。

【0055】

一方、本発明での「食品組成物」の例として一般食品（米飯類、パン類、穀類、野菜、食肉、各種加工食品、菓子類、牛乳、清涼飲料水、アルコール飲料等）、栄養補助食品（サプリメント、栄養ドリンク等）、食品添加物を挙げることができる。栄養補助食品又は食品添加物の場合、粉末、顆粒末、タブレット、ペースト、液体等の形状で提供することができる。

【0056】

本発明の「餌組成物」の例は、ペットフード（イヌ、ネコ、鳥、魚、爬虫類、両生類、齧歯類などの餌）、飼料（家畜、家禽、養魚などの餌）である。

【0057】

（改変型 α -グルコシダーゼの設計法）

本発明の更なる局面は改変型酵素の設計法に関する。本発明の設計法では、以下のステップ(i)及び(ii)を実施する。

ステップ(i)：変異対象酵素である α -グルコシダーゼのアミノ酸配列において、以下の(1)～(14)からなる群より選択される一又は二以上のアミノ酸を特定する。

- (1) 配列番号1に示すアミノ酸配列の385位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (2) 配列番号1に示すアミノ酸配列の491アミノ酸に相当するアミノ酸
- (3) 配列番号1に示すアミノ酸配列の535位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (4) 配列番号1に示すアミノ酸配列の450位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (5) 配列番号1に示すアミノ酸配列の534位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (6) 配列番号1に示すアミノ酸配列の537位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (7) 配列番号1に示すアミノ酸配列の538位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (8) 配列番号1に示すアミノ酸配列の554位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (9) 配列番号1に示すアミノ酸配列の556位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (10) 配列番号2に示すアミノ酸配列の579位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (11) 配列番号2に示すアミノ酸配列の585位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (12) 配列番号1に示すアミノ酸配列の630位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (13) 配列番号1に示すアミノ酸配列の683位アミノ酸に相当するアミノ酸
- (14) 配列番号1に示すアミノ酸配列の689位アミノ酸に相当するアミノ酸

【0058】

置換対象アミノ酸(1)～(14)は、酵素の特性に重要なアミノ酸として同定されたアミノ酸である。従って、これらのアミノ酸を置換すれば α -グルコシダーゼの特性に変化が生

10

20

30

40

50

ずると大いに期待できる。変化が特に期待される特性は、糖転移活性と加水分解活性である。本発明の設計法は、これら二つの活性のバランスが変化した酵素を設計する手段として特に有用である。例えば、加水分解活性を低減ないし消失させるとともに糖転移活性を高める目的の下、本発明の設計法を利用することができる。

【 0 0 5 9 】

本発明の設計法における変異対象酵素は α -グルコシダーゼである。変異対象酵素は典型的には野生型酵素（天然において見出される酵素）である。しかしながら、既に何らかの変異ないし改変が施された酵素を変位対象酵素とすることを妨げるものではない。変異対象酵素の例はヒト・マルターゼ-グルコアミラーゼ（Human Maltase-glucoamylase）、アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ（*Aspergillus niger* alpha-glucosidase）、ヒト・ニュートラル α -グルコシダーゼC（Human Neutral alpha-glucosidase C）、マウス・リソソーム α -グルコシダーゼ（Mouse Lysosomal alpha-glucosidase）、酵母の α -グルコシダーゼ（Yeast GLU2A）、アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼA（*Aspergillus nidulans* Alpha-glucosidase AgdA）、アスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼB（*Aspergillus nidulans* Alpha-glucosidase AgdB）、ムコール・ヤバニカスの α -グルコシダーゼ（*Mucor javanicus* alpha-glucosidase）、アスペルギルス・オリゼの α -グルコシダーゼ（*Aspergillus oryzae* alpha-glucosidase）、*Mortierella alliacea*の α -グルコシダーゼ（*Mortierella alliacea* alpha-glucosidase）、シゾサッカロミセス・ポンベの α -グルコシダーゼ（*Schizosaccharomyces pombe* alpha-glucosidase）、デバリオミセス・オクシデンタリスの α -グルコシダーゼ（*Debaryomyces occidentalis* alpha-glucosidase）、大麦の α -グルコシダーゼ（*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* alpha-glucosidase）、シロイロナズナの α -グルコシダーゼ（*Arabidopsis thaliana* alpha-glucosidase）、ほうれん草の α -グルコシダーゼ（*Spinacia oleracea* alpha-glucosidase）、砂糖大根の α -グルコシダーゼ（*Beta vulgaris* alpha-glucosidase）、ジャガイモの α -グルコシダーゼ（*Solanum tuberosum* alpha-glucosidase）である。上述の通り、これらの α -グルコシダーゼのアミノ酸配列は公共のデータベースに登録されている（配列番号1～17）。好ましい一態様では、これらの中のいずれかのアミノ酸配列からなる酵素を変異対象酵素とする。

【 0 0 6 0 】

本発明ではステップ(i)の後、以下のステップ(ii)を行う。

ステップ(ii)：変異対象酵素のアミノ酸配列を基にして、ステップ(i)で特定されたアミノ酸配列が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を構築する。

【 0 0 6 1 】

置換後のアミノ酸の種類は特に限定されるものではない。従って、保存的アミノ酸置換であっても非保存的アミノ酸置換であってもよい。

【 0 0 6 2 】

（改変型 α -グルコシダーゼの調製法）

本発明の更なる局面は改変型酵素の調製法に関する。本発明の調製法の一態様では、本発明者らが取得に成功した改変型酵素を遺伝子工学的手法で調製する。この態様の場合、配列番号18～42、74～78のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸を用意する（ステップ(i)）。ここで、「特定のアミノ酸配列をコードする核酸」は、それを発現させた場合に当該アミノ酸配列を有するポリペプチドが得られる核酸であり、当該アミノ酸配列に対応する塩基配列からなる核酸は勿論のこと、そのような核酸に余分な配列（アミノ酸配列をコードする配列であっても、アミノ酸配列をコードしない配列であってもよい）が付加されていてもよい。また、コドンの縮重も考慮される。「配列番号18～42、74～78のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸」は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。ここで、配列番号18～42、74～78のアミノ酸配列はいずれも、アスペルギルス・ニガー由来 α -グルコシダーゼのアミノ酸配列に変異を施したものである。従って、アスペルギルス

・ニガー由来 α -グルコシダーゼをコードする遺伝子（配列番号 73）に対して必要な変異を加えることによって、配列番号 18 ~ 42、74 ~ 78 のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸（遺伝子）を得ることができる。位置特異的塩基配列置換のための方法は当該技術分野において数多く知られており（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York を参照）、その中から適切な方法を選択して用いることができる。位置特異的変異導入法として、位置特異的アミノ酸飽和変異法を採用することができる。位置特異的アミノ酸飽和変異法は、タンパクの立体構造を基に、求める機能の関与する位置を推定し、アミノ酸飽和変異を導入する「Semi-rational, semi-random」手法である（J.Mol.Biol.331,585-592(2003)）。例えば、KOD-Plus-Mutagenesis Kit（東洋紡社）、Quick change（ストラタジーン社）等のキット、Overlap extension PCR(Nucleic Acid Res. 16,7351-7367(1988))を用いて位置特異的アミノ酸飽和変異を導入することが可能である。PCRに用いるDNAポリメラーゼはTaqポリメラーゼ等を用いることができる。但し、KOD-PLUS-（東洋紡社）、Pfu turbo（ストラタジーン社）などの精度の高いDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。

【0063】

本発明の他の一態様では本発明の設計法によって設計されたアミノ酸配列を基にして改変型酵素を調製する。この態様の場合ステップ(I)では本発明の設計法によって構築されたアミノ酸配列をコードする核酸を用意することになる。例えば、本発明の設計法によって構築されたアミノ酸配列に基づいて、改変型酵素をコードする遺伝子に対して必要な変異（即ち、発現産物であるタンパク質における、特定位置でのアミノ酸の置換）を加え、改変型酵素をコードする核酸（遺伝子）を得る。

【0064】

ステップ(I)に続いて、用意した核酸を発現させる（ステップ(II)）。例えば、まず上記核酸を挿入した発現ベクターを用意し、これを用いて宿主細胞を形質転換する。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

【0065】

次に、発現産物である改変型酵素が産生される条件下で形質転換体を培養する。形質転換体の培養は常法に従えばよい。培地に使用する炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0066】

一方、培養温度は30 ~ 40 の範囲内（好ましくは37 付近）で設定することができる。培養時間は、培養対象の形質転換体の生育特性や改変型酵素の産生特性などを考慮して設定することができる。培地のpHは、形質転換体が生育し且つ酵素が産生される範囲内に調製される。好ましくは培地のpHを6.0 ~ 9.0程度（好ましくはpH7.0付近）とする。

【0067】

続いて、発現産物（改変型酵素）を回収する（ステップ(III)）。培養後の菌体を含む培養液をそのまま、或いは濃縮、不純物の除去などを経た後に酵素溶液として利用することもできるが、一般的には培養液又は菌体より発現産物を一旦回収する。発現産物が分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後

、減圧濃縮、膜濃縮、硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを利用した塩析、メタノールやエタノール又はアセトンなどによる分別沈殿法、透析、加熱処理、等電点処理、ゲルろ過や吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー（例えば、セファデックス（Sephadex）ゲル（GEヘルスケアバイオサイエンス）などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B（GEヘルスケアバイオサイエンス）、オクチルセファロースCL-6B（GEヘルスケアバイオサイエンス）、CMセファロースCL-6B（GEヘルスケアバイオサイエンス））などを組み合わせて分離、精製を行うことにより改変型酵素の精製品を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、培養液をろ過、遠心処理等することによって菌体を採取し、次いで菌体を加圧処理、超音波処理などの機械的方法またはリゾチームなどによる酵素的方法で破壊した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより改変型酵素の精製品を得ることができる。

10

【0068】

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いはスプレードライなどにより粉末化して提供することも可能である。その際、精製酵素を予めリン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解させておいてもよい。好ましくは、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液を使用することができる。尚、ここでGOODの緩衝液としてはPIPES、MES又はMOPSが挙げられる。

【0069】

通常は、以上のように適当な宿主 - ベクター系を利用して遺伝子の発現～発現産物（改変型酵素）の回収を行うが、無細胞合成系を利用することにもよい。ここで、「無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）」とは、生細胞を用いるのではなく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞合成系では一般に、細胞破碎液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

20

30

【0070】

タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する3種類の開始因子、3種類の伸長因子、終結に関与する4種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる31種類の因子の遺伝子在大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

【0071】

用語「無細胞転写／翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系、in vitro翻訳系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではRNAが鋳型として用いられタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネータ配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

40

【実施例】

【0072】

A. 改変型 α -グルコシダーゼの取得 1

α -グルコシダーゼ（別名トランスグルコシダーゼ。以下、「TG」と略称する）をモデ

50

ルにとり、タンパク質工学を用いて、加水分解反応と脱水縮合反応を一方向化する技術（One direction technology）について検討した。TGはオリゴ糖製造に使用される酵素であり、グルコシド結合を加水分解する活性を有しているが、同時に糖転移活性も有し、マルトースからオリゴ糖類を生成する。より効率的に糖転移を行うTGの開発を目指し、研究を進めた。

【 0 0 7 3 】

（ 1 ）コンピュータプログラムを使った変異導入点の検討

TGを分子レベルで構造改変し、オリゴ糖生成能が向上した新規酵素を設計することを目的として、コンピュータシミュレーションを実施した。X線結晶構造解析が報告されているヒト小腸由来の α -グルコシダーゼ（配列番号1）に関し、TGの立体構造や進化的な知見に基づいた機能予測を基に、コンピュータシミュレーションにより変異導入点を決定した。具体的には、HotSpot Wizardプログラム（非特許文献Pavelkaら Nucleic Acids Res. 37 W376-83. (2009)）を用い、ヒト α -グルコシダーゼにおいて変異導入点になると予想されるアミノ酸を計算したところ、3点のアミノ酸（385位アミノ酸：Y385、491位アミノ酸：V491、535位アミノ酸：N535）が選ばれた。いずれも基質に接する領域にあり、基質の活性に関わると予想出来る（図1、A）。次に、 α -グルコシダーゼホモログを5種類選び、CLUSTALWを用いて上記変異導入点の近傍の配列をアライメント比較した。Y385、V491及びN535はいずれも近傍の配列の相同性が高く高度に保存されていたことから、酵素の機能に重要な領域であると予想できた。これらの変異導入点に対応するアミノ酸をアスペルギルス・ニガー（Asp. Niger）のTGで同定した（図1、C）。Y385に対応するアミノ酸はW343であり、V491に対応するアミノ酸はV452であり、N535に対応するアミノ酸はS496である。これらのアミノ酸に変異を導入するためのプライマーを設計し、ランダムプライマーを用いたインバースPCR法で変異導入を行った。大腸菌に形質転換し、ミニプレップの後にシーケンス解析を行い、変異導入を確認した。

【 0 0 7 4 】

（ 2 ）スクリーニング系の開発

作成したプラスミドを酵母INVsc1株に形質転換し培養した。培養上清を遠心処理で回収し、分泌された酵素を構造改変TGのサンプルとした。スピンカラムを用いた限外ろ過によりブロスの濃縮と脱塩を行った。その結果、およそ10～50倍に濃縮した酵素サンプルが得られた。

【 0 0 7 5 】

酵素基質であるマルトースを用い加水分解活性を測定した。基質が最終濃度1%になるように調整し、加水分解により生成するグルコースを、グルコースオキシダーゼ（GO）とペルオキシダーゼ（PO）を含むアミノアンチピリン・フェノール発色液により呈色して、OD500を測定することで定量化した。グルコース標準品により検量線（スタンダード）を作成し、吸光度から生成グルコース量を算出した。

【 0 0 7 6 】

オリゴ糖合成活性を調べるため、HPLCによる生成オリゴ糖を解析した。基質として50%マルトース水溶液を用いて、生成するオリゴ糖を決定した。HPLCの条件は以下の通りとした。

カラム：TSKGEL Amido-80（東ソー）

溶媒：MeCN/H₂O = 2/1

検出：RI

【 0 0 7 7 】

HPLCのエリア面積をグラフにすることで、それぞれが生成するオリゴ糖の糖数を推定した。以上のスクリーニング法の概要を図2に示す。

【 0 0 7 8 】

（ 3 ）1アミノ酸置換による構造改変TGの評価

アスペルギルス・ニガーの α -グルコシダーゼ（配列番号2）において、上記変異導入点（Y385、V491、N535）に対応する位置、即ち、W343、V452又はS496にPCR法でランダム

変異を導入した(1アミノ酸置換)。変異導入後、シーケンスを行い、導入した点変異を同定した。得られた3種類の構造改変TG(W343M、V452G、S496V)について解析した。尚、予備実験を行い、プラスミド由来のタンパク質が培養上清に発現していること、その酵素に加水分解活性があることを確認した。

【0079】

まず、高濃度マルトース溶液を基質として、オリゴ糖合成活性を測定した。その結果である、典型的なHPLCパターンを図3に示す。野生型(WT)TGを発現させたサンプルでは、基質のマルトースのピークが減少して、グルコース、イソマルトース、パノース、イソマルトリオースのピークが見られるようになった(図3、A)。さらに、4糖のエリアに2つに分かれたピークが見られた(図3、A)。

10

【0080】

一方、WTと比較して、構造改変TGにおいては、基質のマルトースのピークが減少して、グルコース、マルトリオース、パノースのピークが見られるようになった(図3、B~D)。さらに4糖のエリアに1つに固まったピークが見られた(図3、B~D)。構造改変TGの生成するオリゴ糖はWTと異なり、イソマルト系のオリゴ糖の生成量が大きく低下していた。

【0081】

次に、HPLCのエリア面積を定量することで、構造可変TGのオリゴ糖合成活性をWTと比較した。図4のグラフは3糖以上のエリア面積の合計を示したものである。WTでも3糖以上のオリゴ糖が生成しているが、いずれの構造改変TGにおいても、生成するオリゴ糖のエリア面積はWTよりも大きくなっている(およそ20%の増加)。

20

【0082】

置換後のアミノ酸の種類と糖転移活性の関係を調べる目的の下、変異導入点(385Y)に対応するアミノ酸W343に関して各種構造改変TGを作製し、オリゴ糖合成能を比較した。その結果、置換後のアミノ酸がシステイン(W343C)、アスパラギン酸(W343D)、メチオニン(W343M)、ヒスチジン(W343H)、アラニン(W343A)、フェニルアラニン(W343F)、グリシン(W343G)、スレオニン(W343T)、グルタミン酸(W343E)、バリン(W343V)、グルタミン(W343Q)、アスパラギン(W343N)又はイソロイシン(W343I)の場合、構造改変TGが生成する3糖以上のオリゴ糖量は、WTよりも増加した(図5、上)。4糖以上のオリゴ糖についても同様の比較をした結果、置換後のアミノ酸がメチオニン(W343M)、アスパラギン酸(W343D)、システイン(W343C)、フェニルアラニン(W343F)、グルタミン(W343Q)、ヒスチジン(W343H)、スレオニン(W343T)、グルタミン酸(W343E)、グリシン(W343G)、アスパラギン(W343N)、バリン(W343V)又はアラニン(W343A)については、構造改変TGの方がWTよりも合成能が優れていた(図5、下)。3糖以上のオリゴ糖の合成量及び4糖以上のオリゴ糖の合成量のいずれについても上位であった構造改変TG、即ち、W343C、W343D、W343Mは、オリゴ糖合成能が特に優れていると評価できる。また、4糖以上のオリゴ糖の合成量がWTよりも顕著に多い、W343M、W343D、W343C、W343F、W343Q及びW343Hは、より長鎖のオリゴ糖の合成に有利といえる。

30

【0083】

HPLCのエリア面積を定量することで、構造可変TGのオリゴ糖合成活性をWTと比較した。アミノ酸V452に関して各種構造改変TGを作製し、オリゴ糖合成能を比較した。その結果、置換後のアミノ酸がグリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸の場合は3糖以上のオリゴ糖量は、WTよりも増加した(図6)。また、4糖以上のオリゴ糖についても同様の比較をした結果、置換後のアミノ酸がアスパラギン酸(V452D)については、構造改変TGの方がWTよりも合成能が優れていた(図6)。同様に、アミノ酸S496に関して各種構造改変TGを作製し、オリゴ糖合成能を比較した。その結果、置換後のアミノ酸がバリン、アスパラギン、グルタミンの場合は3糖以上のオリゴ糖と4糖以上のオリゴ糖のどちらの場合も、構造改変TGの方がWTよりも合成能が優れていた(図6)。

40

【0084】

以上のように、構造改変TGではイソマルト系オリゴ糖の生成量が大きく低下しているこ

50

とが分かった。そこで、グルコシド結合に対する反応性が変化したのではないかと考え、各種グルコシド結合に対する加水分解活性を調べた。酵素基質として、2糖であるマルトース (α -1,4)、イソマルトース (α -1,6) の水溶液を作成した。WTは α -1,4結合と α -1,6結合の両方に基質親和性を示した (図7)。対照的に構造改変TGは、 α -1,4結合に対する加水分解活性はWT型とほぼ変わらないものの、 α -1,6結合に対する加水分解活性は1/5以下に低下していた (図7)。

【0085】

(4) 2アミノ酸置換による構造改変TGの評価

343位トリプトファンを置換した構造改変TGに、更なる変異 (トンネル構造の表面に存在する2つのアミノ酸 (V452、S496) のいずれか) を導入することによって、2アミノ酸に変異を導入した構造改変TGを作成した。得られた構造改変TGの加水分解活性測定を行った。図8に示すように、W343D/S496I (343位WをDで置換且つ496位SをIで置換)、W343D/S496R (343位WをDで置換且つ496位SをRで置換) では全く活性が検出できなかった。一方、W343D/V452G (343位WをDで置換且つ452位VをGで置換)、W343M/S496C (343位WをMで置換且つ496位SをCで置換)、W343M/S496T (343位WをMで置換且つ496位SをTで置換) の3種の構造改変TGはイソマルトースの加水分解活性が大きく低下した (およそ1/20)。

【0086】

次に、オリゴ糖合成活性を測定した。WT型TGを発現させたサンプルでは3糖に関してパノース及びイソマルトトリオースのピークが見られた (図9、A)。一方、W343Mにおいては、これまでの結果と同様に、3糖に関してマルトトリオース及びパノースのピークが見られるようになった (図9、B)。2アミノ酸置換TGであるW343M/S496TとW343D/V452Gでは3糖に関してピークが1つだけ見られるようになり、マルトトリオースと予想された (図9、C及びDの矢印)。また、4糖の領域でもHPLCで見られるピークは1つだけになり、WT型の分析パターンとは大きく異なる結果となった (図9、C及びD)。この4糖のピークは2アミノ酸置換TGでのみ見られるピークであり、生成するオリゴ糖がWT型とは異なることを示す

【0087】

HPLCのエリア面積を定量することで、構造可変TGのオリゴ糖合成活性をWTと比較した。すべての2アミノ酸置換TGは、生成するオリゴ糖のエリア面積はWTよりも大きくなっていて、3糖以上のオリゴ糖の合成量が20-50%増加していた (図10)。さらに、W343M/S496Tは4糖以上のオリゴ糖の合成量がWTよりも顕著に多くなり、70%近く増加した (図10)。

【0088】

一方、構造改変TGのグルコシド結合に対する加水分解活性を検討した。W343M/S496Tでは、マルトースとマルトトリオースに対する加水分解活性は50%になり、イソマルトースに対する加水分解活性は10%以下になった (図11)。コージビオースに対する加水分解活性についてはおよそ40%となり、ニゲロースに対する加水分解活性はおよそ10%に低下した (図11)。以上の結果から、2アミノ酸を置換した構造改変TGは加水分解活性が低下しており、特に α -1,6結合及び α -1,3結合に対する加水分解活性が大きく低下していることが明らかとなった。

【0089】

(5) 構造改変TGが生成するオリゴ糖の解析

過去の報告によれば、オリゴ糖合成時に使用する初期基質の糖数を増やすと、TGが生成するオリゴ糖における α -1,6結合の割合が増加する。そこで、5糖のマルトペンタオースを基質にしてオリゴ糖合成反応を行い、生成するオリゴ糖をWT型と構造改変TGの間で比較した。まず、スタンダードとしてグルコース (G=1)、マルトース (G=2)、マルトトリオース (G=3)、マルトペンタオース (G=5) を測定してピークの位置を確認した (図12)。WT型TGではグルコースから7糖以上のエリアまで幅広く分解と生産が起きていた (図12)。但し、5糖以下の割合が多く、オリゴ糖合成よりも加水分解が進行したと予想された。一方、の構造改変TG (W343MとW343M/S496T) では1糖、2糖まで加水分解されたものは少なく、

6糖以上の生成が多くなっていた(図12)。図12の矢印で示したエリアは、WTと構造改変TGの間に特に差が大きい。

【0090】

次に、スタート基質をマルトースとイソマルトースの混合溶液でオリゴ糖合成を行った。生成するオリゴ糖の割合には大きな変化はなかったが、生成する3糖の種類に差が現れた。WT型では α -1,6結合が2つあるイソマルトトリオースが多く生成していた(図13)。一方、構造改変TG(W343MとW343M/S496T)では α -1,4結合と α -1,6結合を有するパノースが最も多く生成した(図13、矢印)。また、構造改変TGの場合、スタート基質のイソマルトースはほとんど分解されなかった。

【0091】

以上の結果より、WT型のTGが主に α -1,6位に糖転移したオリゴ糖を生成するのとは対照的に、構造改変TGは α -1,4位に糖転移したオリゴ糖を特異的に生成することが示唆された。

【0092】

尚、今回の検討において作成した各構造改変TGのアミノ酸配列を以下に示す。

配列番号 18	:	W343C
配列番号 19	:	W343D
配列番号 20	:	W343M
配列番号 21	:	W343H
配列番号 22	:	W343A
配列番号 23	:	W343F
配列番号 24	:	W343G
配列番号 25	:	W343T
配列番号 26	:	W343E
配列番号 27	:	W343V
配列番号 28	:	W343Q
配列番号 29	:	W343N
配列番号 30	:	W343I
配列番号 31	:	V452G
配列番号 32	:	V452D
配列番号 33	:	V452E
配列番号 34	:	S496V
配列番号 35	:	S496N
配列番号 36	:	S496Q
配列番号 37	:	W343D/V452A
配列番号 38	:	W343D/V452G
配列番号 39	:	W343D/S496I
配列番号 40	:	W343D/S496R
配列番号 41	:	W343M/S496C
配列番号 42	:	W343M/S496T

【0093】

B. 改変型 α -グルコシダーゼの取得2

(1) コンピューターシミュレーションソフトMOEを使った変異導入点の検討

新しい手法で変異導入点を同定することを目的にして、コンピューターシミュレーションソフトであるMOE(Chemical Computing Group社)を使ってTGの変異導入点を検討した。この際に、類縁のこうじ菌であるアスペルギルス・ニガーとアスペルギルス・ニドランスの配列を比較することで、変異導入点に関する推察を行った。

【0094】

アスペルギルス・ニガーのTGとアスペルギルス・ニドランスのTG(α -グルコシダーゼB)のアミノ酸配列を公知の情報データベースから入手して、MOEに読み込みコンピュータ

10

20

30

40

50

ー上でタンパク質モデリングを行った。それぞれのアミノ酸配列を元に、MOEのデータベースから相同性の高い配列を探索した。その結果、どちらも同じ配列がヒットして、ヒトTGが選ばれた。次に、この立体構造をテンプレートにして、それぞれのタンパク質のモデリングを行った。力場は「AMBER99」で、中間体モデルを5個作成して、最終的に1つのモデル構造を作成した。

【0095】

次に、ドッキングシミュレーション解析を行い、基質ポケットの予測を行った。力場を「MMFF99x」に設定して、MOEのSite Finderでポケットの探索を行った。その結果、立体構造的にポケットとなる可能性のある候補領域が複数予測された。そこで、過去の論文などで報告されているTGの活性中心となるアミノ酸を検索して、それぞれのモデル上の位置を決定した。そして、活性中心である複数のアミノ酸が含まれる領域を、シミュレーションで計算された基質ポケットと決定した。

10

【0096】

モデリングに成功したそれぞれの立体構造を図14に示す。アスペルギルス・ニガーのTGとアスペルギルス・ニドランスのTGの構造を比較すると、同じヒトTGの立体構造を元にしてモデリングしたにも関わらず、それぞれの立体構造には大きな違いが見られた。シミュレーションした基質ポケットを比較すると、アスペルギルス・ニガーと比べてアスペルギルス・ニドランスの基質ポケットは小さくなっていた。アスペルギルス・ニガーでは30アミノ酸で基質ポケットが構成されるのに対して、アスペルギルス・ニドランスでは22アミノ酸で構成されていた(図14)。

20

【0097】

次に、アスペルギルス・ニガーのTGのアミノ酸配列とアスペルギルス・ニドランスのTGのアミノ酸配列をCLASTAL-Wによりアライメントした。全体のアミノ酸配列を比較すると、この2つのタンパク質の相同性は低く、アミノ酸が一致する割合は35%と計算された。しかし、基質ポケットの配列に限って比較した場合には配列の相同性が高く、アスペルギルス・ニガーの基質ポケットでは30個中19個のアミノ酸が一致していて、アスペルギルス・ニドランスでは22個中19個のアミノ酸が一致した(図15)。この結果は、活性に関わるアミノ酸は全体の配列よりも高度に保存されていることを示唆している。一方、一致しなかったアミノ酸は進化的な保存性が高くないと判断して、変異を導入できると予測した。そこで、これらのアミノ酸を変異導入候補点とした(図15)。さらに、すでに変異を導入したW343とS496が選ばれたことから、これまでに用いていたヒトTGを用いたHot spots wizardによるシミュレーションと相関性があると考えた。

30

【0098】

実際にアスペルギルス・ニガーのTGに変異導入するためにプライマーを設計し、ランダムプライマーを用いたインバースPCR(inverse PCR)法で変異導入を行った。大腸菌に形質転換し、ミニプレップ(mini-prep)した後にシーケンス解析を行い、変異導入を確認した。さらに、酵母に形質転換して、組み換え構造改変TGを発現して、解析を行った。実際に作成した中から、S495とC498の2点についての解析結果を示す。

【0099】

(2) S495改変型TGの評価

40

アスペルギルス・ニガーのTGにおいて、495番目のセリン(S495)にPCR法でランダム変異を導入した(1アミノ酸置換)。シーケンスを行い、導入した点変異を同定し、改変型TGについて解析を行った。

【0100】

これらの改変型TGについて、HPLCを用いてオリゴ糖合成活性を測定して比較した。基質として、50%マルトース水溶液、イソマルトース水溶液、及び5糖のオリゴ糖であるマルトペンタオース水溶液を用いた。反応温度を50℃として所定時間(マルトース、マルトペンタオースについては48時間、イソマルトースについては96時間)インキュベートした。

【0101】

HPLCのエリア面積を定量することで改変型TGのオリゴ糖合成活性を比較した。基質がマ

50

ルトースの場合には、3糖以上と4糖以上のエリア面積の合計は、WTと比べてS495Gでは大きくなっていたが、S495P及びS495Tでは逆に減少していた(図16)。

【0102】

基質がイソマルトースの場合には、3糖以上のエリア面積の合計は、WTと比べてS495G、S495P及びS495Vで大きくなった(図17)。また、4糖以上のエリア面積の合計は、WTと比べてS495G及びS495Pで大きくなり、オリゴ糖合成能が向上していることが示唆された(図17)。HPLCのピークを見ると、3糖ではイソマルトトリオースが増加しており、WTと同様に構造改変TGは α -1,6に糖を転移させる活性があると推測できる。以上の結果から、S495G、S495P及びS495Vの3種類は α 1,6結合のオリゴ糖を50%以上増加させることが分かった。

【0103】

そこで、構造改変TGはグルコシド結合に対する反応性が異なるのではないかと考え、各種のグルコシド結合に対する加水分解活性を検討した(図18)。基質としてマルトース水溶液とイソマルトース水溶液を用い、生成するグルコース量を定量することで加水分解活性を評価した。WTはグルコシド結合に対して α -1,4結合と α -1,6結合の両方に基質親和性があることを示している。一方、S495A、S495G、S495P、S495T及びS495Vはマルトースの加水分解活性がWTよりも低下しているが、イソマルトースの加水分解活性は相対的に上昇していた。以上の通り、S495を置換した構造改変TGは α -1,6結合に対する特異性が向上していた。

【0104】

最後に、初期基質を5糖のマルトペンタオースにしてオリゴ糖合成反応を行い、生成するオリゴ糖をWT型TGと構造改変TGの間で比較した(図19)。WT型TGではグルコースから6糖以上のエリアまで、幅広く分解と生産が起きていた。グラフにすると1糖の量が最も多く、反応中に加水分解が進行していた。構造改変TGでは、いずれもオリゴ糖の増加が見られた。特に、S495P型とS495V型の構造改変TGは、加水分解された糖類が少なくなり、6糖以上の生成が多くなっていた(図19c)。

【0105】

以上の通り、 α 1,6位特異的な転移活性を有する構造改変TGを3種類取得することに成功した。また、構造改変TGが生成するオリゴ糖は α 1,6結合を含む結合様式で重合し、オリゴ糖の生成量が増加することが分かった。

【0106】

(3) C498改変型TGの評価

アスペルギルス・ニガーのTGにおいて、498番目のシステイン(C498)にPCR法でランダム変異を導入した(1アミノ酸置換)。シーケンスを行い導入した点変異を同定して、改変型TGについて解析を行った。

【0107】

これらの構造改変TGについて、HPLCを用いてオリゴ糖合成活性を測定して比較した。其質として60%マルトース水溶液を用い、反応温度50℃で48時間インキュベートした。

【0108】

HPLCのエリア面積を定量することで、構造改変TGのオリゴ糖合成活性を比較した(図20)。3糖以上のエリア面積の合計を比較したところ、WTと比べてC498LとC498Sはエリア面積が大きくなっていた。また、4糖以上のエリア面積の合計も同様に、WTと比べてC498LとC498Sでは増大を認めた。

【0109】

これまでの検討を踏まえると、構造改変TGではグルコシド結合に対する反応性に変化が生じているのではないかと考え、加水分解活性を測定することにした。基質としてマルトース水溶液とイソマルトース水溶液を用い、生成するグルコース量を定量した。図21で示すように、WTと比べて、C498L及びC498Sはマルトースの加水分解活性が高いことがわかった。また、これらの構造改変TGでは、マルトース加水分解活性とイソマルトース加水分解活性の比率に大幅な変化がみられ、 α 1,4結合に対する特異性が向上していることもわかる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 0 】

以上の通り、C498では変異導入によりオリゴ糖合成が上昇することが示された。また、オリゴ糖の合成能が高められた構造改変TG (α 1,4位特異的な転移活性を示す)を2種類取得することに成功した。

【 0 1 1 1 】

尚、今回の検討において作成した各構造改変TGのアミノ酸配列を以下に示す。

配列番号 7 4 : S495G

配列番号 7 5 : S495P

配列番号 7 6 : S495V

配列番号 7 7 : C498L

配列番号 7 8 : C498S

10

【 0 1 1 2 】

C. 構造改変TGの食品分野への適用

健康食品分野への構造改変TGの応用可能性を評価するため、人工消化モデル系を用いた実験を行った。このモデル系では、おかゆを唾液由来のアミラーゼで分解して生じるオリゴ糖に対してTGがどのように作用するのかを評価する。市販品のおかゆに対して、胃液のpHに近い酸性領域でアミラーゼとTGを作用させ(30分~2時間、37℃で加温)、その後、サンプリングして酵素反応を停止した。そして、生成したオリゴ糖をHPLCで分析した。添加するアミラーゼ量は、唾液中のアミラーゼの量に相当する1.45 U/mlとした。また、事前の予備検討の結果を踏まえ、TG量は20 μ g/mLとした。以下、実験プロトコルの詳細を示す。

20

(プロトコール)

(i) おかゆ(味の素株式会社)をミキサーにかけて破碎し、1M NaOAcバッファー(pH5.0)を1/20量を加える。

(ii) 340 μ lの酵素液を作製する(タンパク濃度:20 μ g/mL)。

(iii) ガラス試験管に、(i)のおかゆ 0.65 g、アミラーゼ 1.45 U及び酵素液340 μ lを投入する。

(iv) 37℃の湯浴でインキュベートし、30分ごとに200 μ lをマイクロテストチューブにサンプリングする。

(v) 5分間ボイルして酵素反応を停止させる。

30

(vi) 12000rpmで遠心処理した後、上清を新しいチューブに移す。

(vii) 120 μ lを分取し、MilliQ(登録商標)水で3倍に希釈する。

(viii) 以下の条件でHPLC解析する。

(カラム条件)

カラム; TSKGEL Amido-80

溶媒; MeCN/H₂O = 2/1

検出器; RI

流速; 1 ml/分

【 0 1 1 3 】

生成したオリゴ糖をHPLCで解析した結果を図2.2に示す。アミラーゼの添加によって、全体の糖のうち40~50%がマルトースになる(図2.2(a))。また、3糖のマルトトリオース及び4糖のマルトテトラオースが生成する。グルコースはほとんど生成せず、2糖からは分解が進まなくなる。野生型(WT)TGを添加した場合は、グルコースの生成量が経時的に増加し、反応開始60分後からはイソマルトースの生成を認め、時間経過とともに3糖以上のオリゴ糖は減少した(図2.2(b)、(d))。 α 1,4位特異的な構造改変TGであるW343Mを添加した場合は、野生型TGの場合と同様にマルトースが分解されて糖転移反応が進む。反応開始30分後では、野生型TGとの間で、生成するオリゴ糖に大きな違いはなく、マルトトリオース、マルトース、グルコースのピークが見られる(図2.2(c))。その一方で、W343Mはグルコースの生成を抑えながら、マルトースを3糖以上のオリゴ糖に転移していく(図2.2(c))。野生型TGとは対照的に、W343Mを添加した場合には3糖以上のオ

40

50

リゴ糖の減少は少なく、最終的に生成されたオリゴ糖の量は格段に多い(図22(d))。実際のHPLCパターン(反応開始後90分後)を見ると、W343Mを添加した場合には、イソマルトースのピークは認められず、サイズの大きなオリゴ糖のピークが見られた(図23)。

【0114】

以上の通り、構造改変TGであるW343Mを使用すると、野生型TGを使用した場合に比較してイソマルトースの生成量が減少する一方で、マルトトリオースのような鎖長の長い $\alpha 1,4$ 結合のオリゴ糖の生成量が増加した。反応開始90分後で比較すると、構造改変TGのグルコース生成量は野生型TGに比べて19.2%の減少であり、3糖以上のオリゴ糖の生成量は同42.7%の増加であった。このように、人工消化モデル系においても、オリゴ糖の生成に適する

10

【0115】

D. 野生型(WT)TGと構造改変TGの併用

(1) マルトースを基質としたオリゴ糖合成

$\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する構造改変TGを用い、 $\alpha 1,4$ 結合の2糖であるマルトースを基質にしてオリゴ糖合成反応を試みたところ、オリゴ糖合成が進まなかった。その理由は、 $\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する構造改変TGは $\alpha 1,4$ 結合に対する反応性が低く、マルトースを基質にしてもオリゴ糖合成反応が十分に進まないことにあると思われた。そこで、イソマルトースを供給する酵素と併用すれば、マルトースを基質にした場合であってもオリゴ糖合成反応を進められるのではないかと考え、マルトースをイソマルトースに変換する酵素活性を持つWT型TGと構造改変TG(S495P)を併用してオリゴ糖合成を行った。生成するオリゴ糖はHPLCで解析した。尚、基質として50%マルトース水溶液を用い、50

20

【0116】

S495P単独の場合と、WT型とS495Pを混合した場合(混合比2:1、1:1又は1:2)についてオリゴ糖合成を行い、生成したオリゴ糖をHPLCで解析した。S495P単独の場合、3糖であるパノースは生成するが4糖以上のオリゴ糖の生成は非常に少ない。即ち、4糖以上の反応が進まない(図24のS495P、図25のS495P)。一方、WT型とS495Pを併用した場合には、いずれの割合で混合しても、3糖以上のオリゴ糖量と4糖以上のオリゴ糖量のどちらも増加した(図24のWT:S495=2:1、WT:S495=1:1、WT:S495=1:2)。特に注目すべきは、S495P単独の場合は生成するオリゴ糖がほとんどパノースであるのに対して、WT型とS495Pを併用した場合にはパノースとイソマルトトリオースの生成を認め(図25、矢印で示したピーク)、更には4糖以上のオリゴ糖の生成も認められた。以上の通り、WT型と $\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する構造改変TGの併用は効果があり、 $\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する構造改変TG単独使用では反応が進まない $\alpha 1,4$ 結合の糖類からもオリゴ糖を生成することが可能であった。

30

【0117】

(2) 構造改変TGの食品分野への適用

$\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する構造改変TGについて、人工消化モデル系を用いた実験を行った。プロトコールは上記C.の場合と同様である。

40

【0118】

おかゆにアミラーゼのみを添加した場合、生成する糖類は40~50%がマルトースとなる。また、3糖のマルトトリオース及び4糖のマルトテトラオースが生成する。これらはすべて $\alpha 1,4$ 結合の糖類であることから、 $\alpha 1,6$ 位特異的な転移活性を有する改変型 α -グルコシダーゼの単独使用では反応が進まないと思われた。そこで、Dの(1)と同様に、WT型TGと構造改変TG(S495P)を併用してオリゴ糖合成を試みた。

【0119】

まず、おかゆにアミラーゼとWT型を添加した場合は、30分後から反応が進み、グルコースの生成量が次第に増加した(図26(a))。また、反応開始60分後からイソマルトースが生成し、3糖以上のオリゴ糖については次第に減少した。一方、おかゆにアミラーゼ

50

とS495Pを添加した場合はアミラーゼによる糖類の生成しか起こらず、反応開始120分後でも、ほとんどがマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースのままであった(図26(b))。対照的に、アミラーゼ、WT型及びS495Pの3種類の酵素を併用した場合には(WT型とS495Pの混合比は1:2)、マルトースの分解が生じて糖転移反応が進行した。反応開始60分後以降において、WT型単独と比べて3糖以上のオリゴ糖が増加した(図26(d))。3種類の酵素を併用した場合はマルトースの減少と3糖以上のオリゴ糖の割合の増加が認められ(図26(c))、オリゴ糖合成が進んだと考えられる。実際のHPLCパターンを見ると、3種類の酵素を併用した場合には、アミラーゼによって生成したマルトースとマルトトリオースのピークが減少する一方、パノースや4糖のオリゴ糖のピークが見られた(図27右下、矢印)。また、アミラーゼにWT型のみを併用した場合(図27左下)と比べると、3糖以上のオリゴ糖がほとんど減少しないことがわかり、3種類の酵素(アミラーゼ、WT型及びS495P)の併用がオリゴ糖の生成に効果的であるといえる。

【0120】

以上の通り、オリゴ糖を生成する上で、WT型と α 1,6位特異的な転移活性を有する構造改変TGの併用が極めて効果的であることが示された。

【産業上の利用可能性】

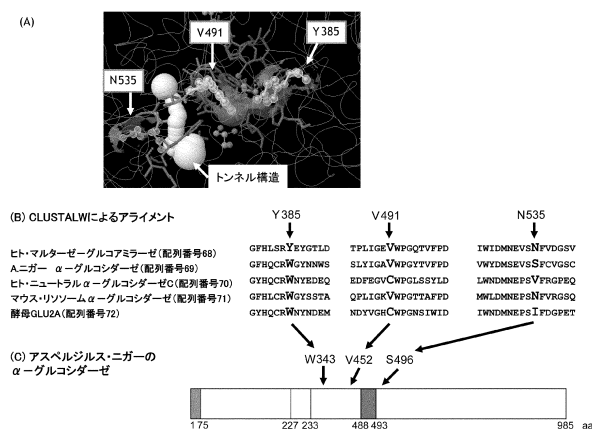
【0121】

本発明の改変型 α -グルコシダーゼは糖転移活性が高い。この特性を活かし、オリゴ糖の製造(合成)への利用が期待される。また、本発明の設計法は野生型酵素などの糖転移活性を高める手段として有用であり、各種 α -グルコシダーゼの改変に利用され得る。

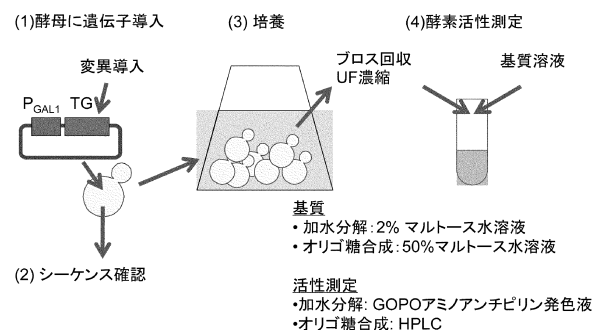
【0122】

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

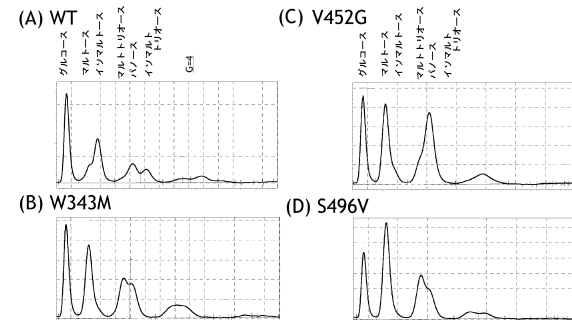
【図1】



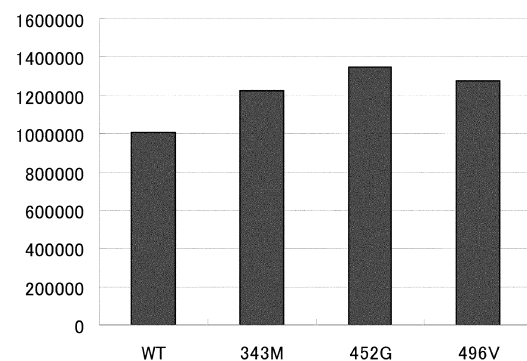
【図2】



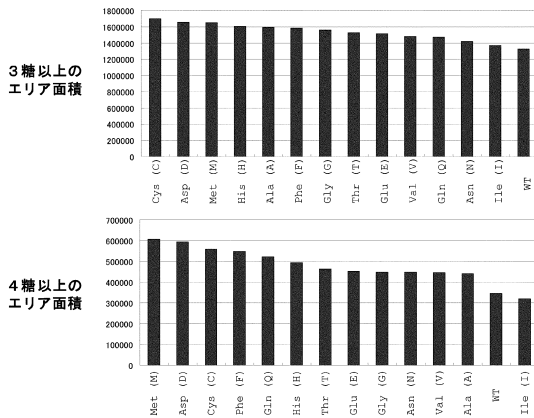
【図3】



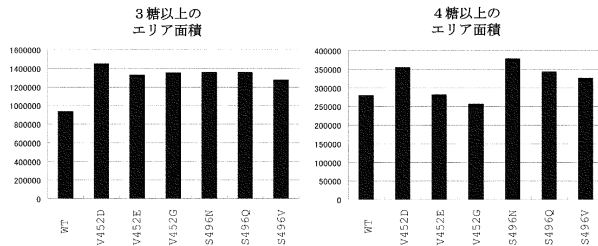
【図4】



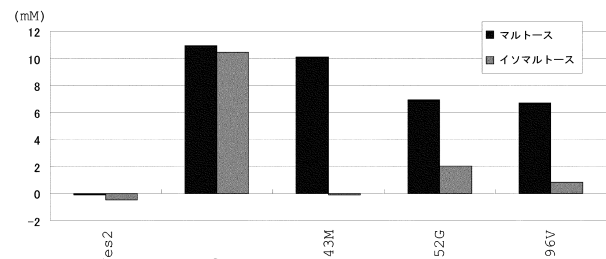
【図 5】



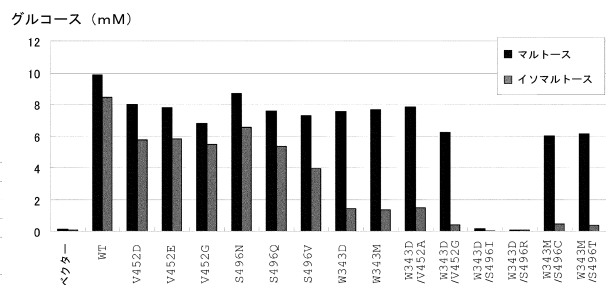
【図 6】



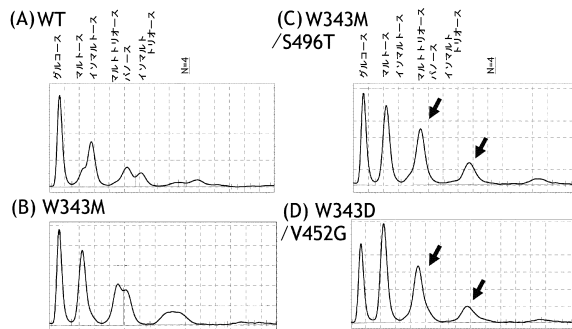
【図 7】



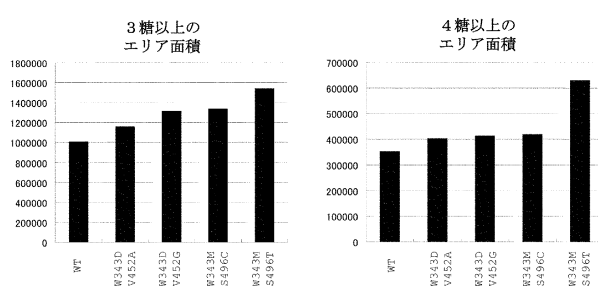
【図 8】



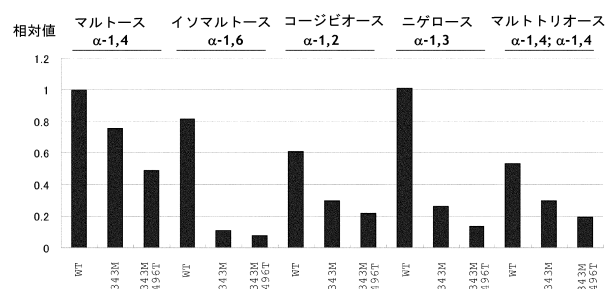
【図 9】



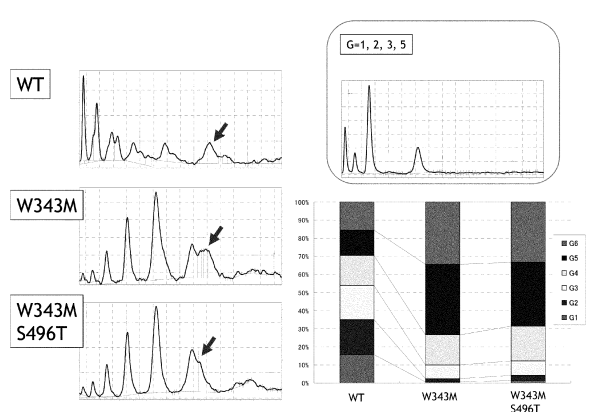
【図 10】



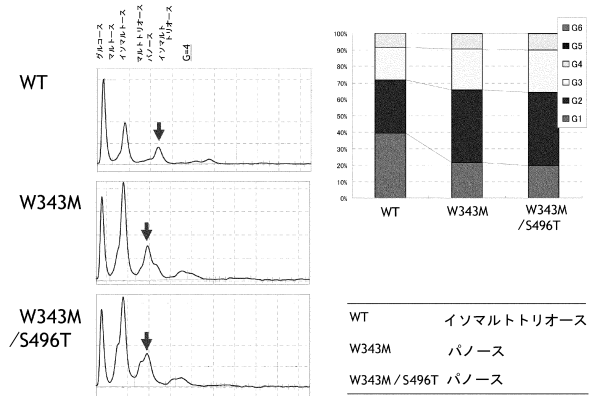
【図 11】



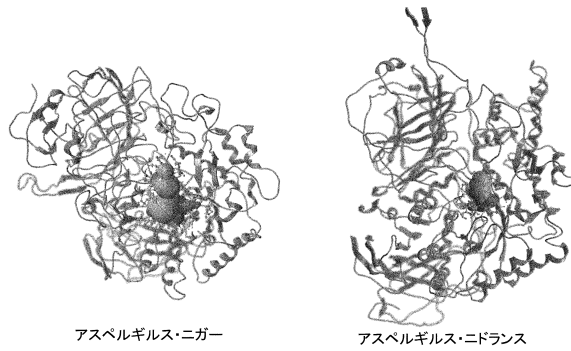
【図 12】



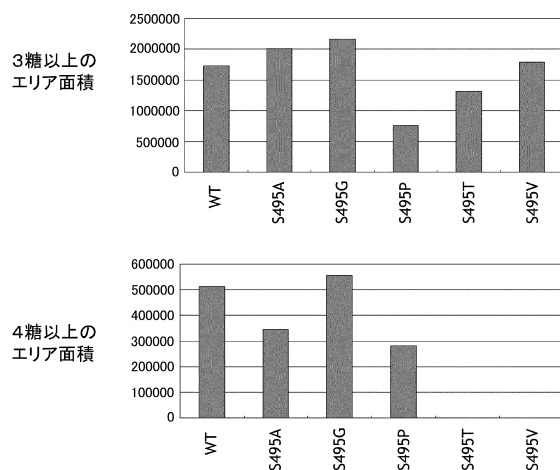
【図 13】



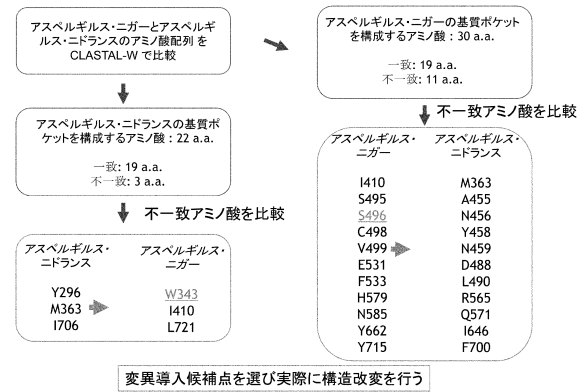
【図 14】



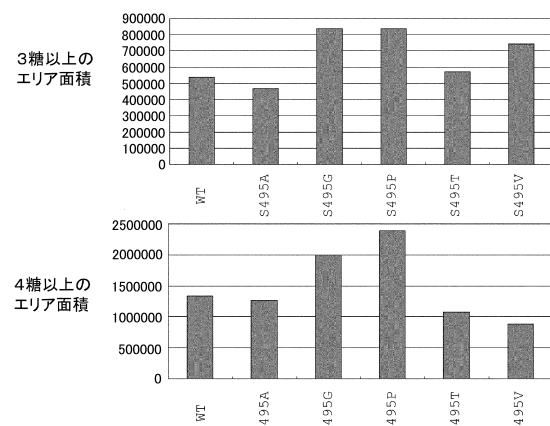
【図 16】



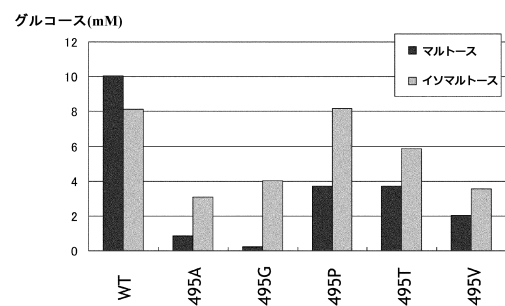
【図 15】



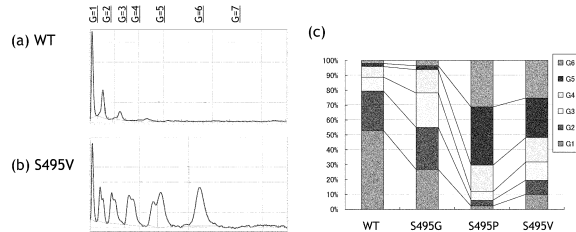
【図 17】



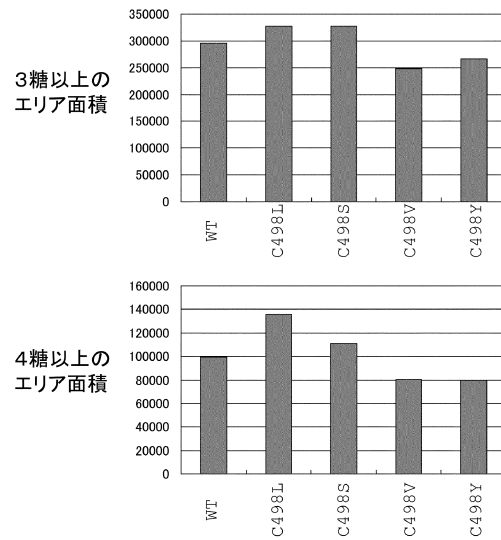
【図 18】



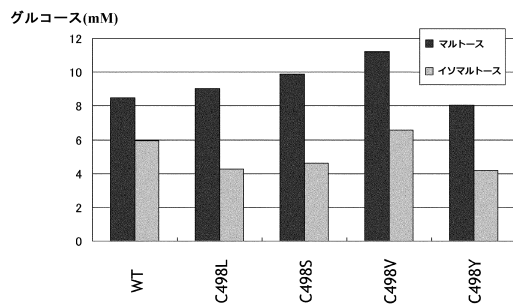
【図 19】



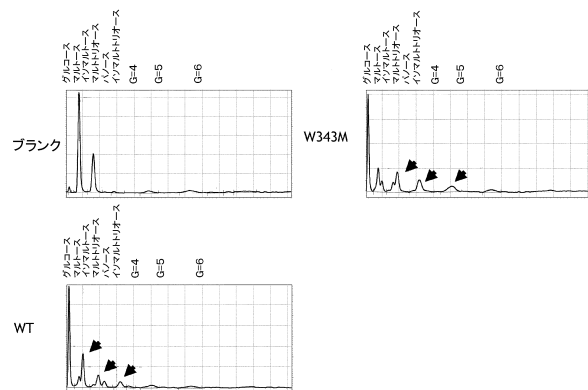
【図 20】



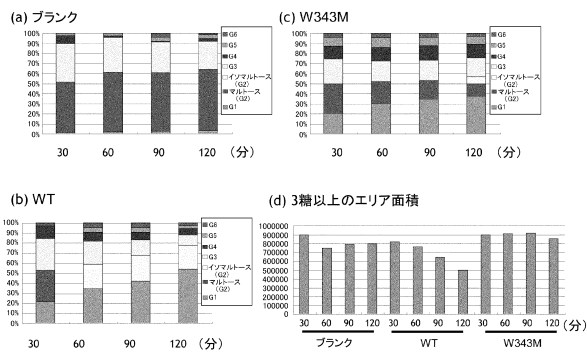
【図 21】



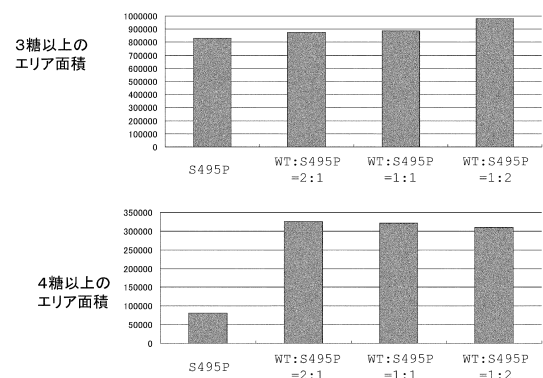
【図 23】



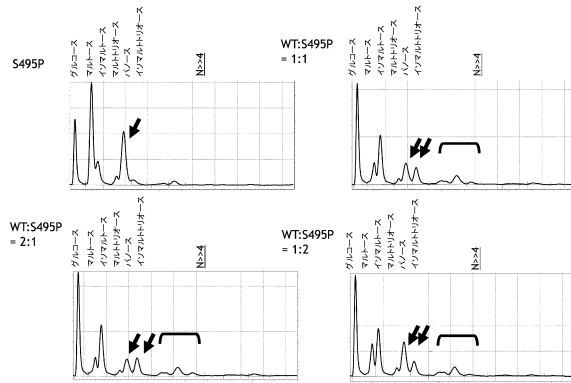
【図 22】



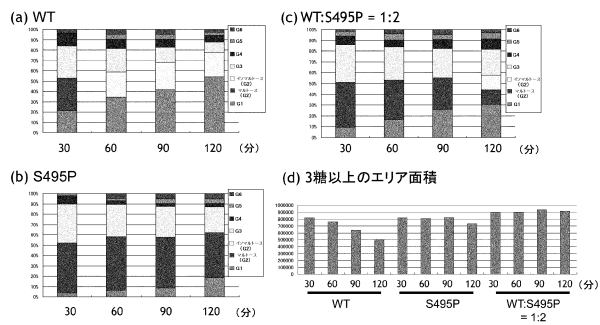
【図 24】



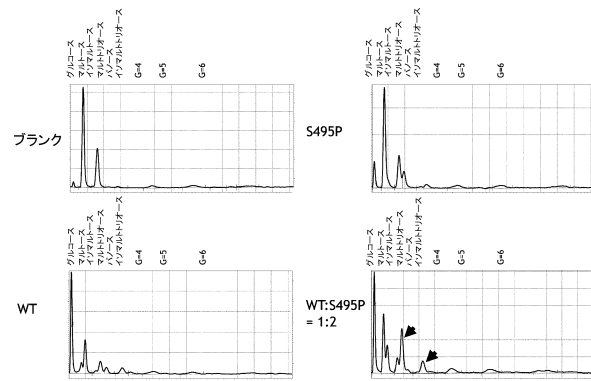
【図 25】



【図 26】



【図 27】



【配列表】

0005992902000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/00
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10

- (56)参考文献 特開2001-302440(JP,A)
 特開2009-022267(JP,A)
 特表2002-531581(JP,A)
 国際公開第2010/010463(WO,A1)
 特表2004-501446(JP,A)
 西村 茉莉子,他3名, Schwanniomyces occidentalis由来GH31 α -glucosidaseへの変異導入によるグルコシド結合選択性の変換, 日本農芸化学会2008年度(平成20年度)大会講演要旨集, 2008, p. 33, 2A09a13
 奥山 正幸, 加水分解活性を失ったグリコシダーゼがオリゴ糖合成を触媒する, グリコシンターゼによる効率的なオリゴ糖合, 化学と生物, 2003, 41(7), p. 422-5
 本同宏成, 他5名, Dextran glucosidaseの加水分解および糖転移反応における基質特異性の変換, J. Appl. Glycosci., 2008, 55(Suppl), p. 62, S-6
 SATO F. et al., Glucoamylase originating from Schwanniomyces occidentalis is a typical alpha-glucosidase., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005 Oct, 69(10), p. 1905-13

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)
 Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed