

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6504390号
(P6504390)

(45) 発行日 平成31年4月24日(2019.4.24)

(24) 登録日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
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	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 9 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-33801 (P2015-33801)	(73) 特許権者	000210067
(22) 出願日	平成27年2月24日 (2015. 2. 24)		池田食研株式会社
(65) 公開番号	特開2015-171359 (P2015-171359A)		広島県福山市箕沖町95番地7
(43) 公開日	平成27年10月1日 (2015. 10. 1)	(72) 発明者	荒木 俊雄
審査請求日	平成30年1月23日 (2018. 1. 23)		広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2014-32522 (P2014-32522)	(72) 発明者	中柄 朋子
(32) 優先日	平成26年2月24日 (2014. 2. 24)		広島県福山市箕沖町95番地7 池田食研株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
		審査官	高山 敏充

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変型ピラノース酸化酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号2で示されるアミノ酸配列、配列番号2で示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、又は配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列のP147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つのアミノ酸残基がアラニンに置換され、
蛋白量あたりのピラノース脱水素酵素活性(PDH比活性)と蛋白量あたりのピラノース酸化酵素活性(POD比活性)との比(PDH/POD)が、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する酵素のPDH/PODを1倍とした場合に、少なくとも2倍である、改変型ピラノース酸化酵素。

【請求項2】

P147に対応する位置のアミノ酸がプロリンであり、L214に対応する位置のアミノ酸がロイシン又はイソロイシンであり、L216に対応する位置のアミノ酸がロイシンであり、Q421に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、H423に対応する位置のアミノ酸がヒスチジンであり、又はF447に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、請求項1記載の改変型ピラノース酸化酵素。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の改変型ピラノース酸化酵素をコードするポリヌクレオチド。

10

20

【請求項 4】

請求項 3 記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項 5】

請求項 4 記載のベクターで形質転換された形質転換細胞。

【請求項 6】

請求項 5 の形質転換細胞を培養し、得られた培養物から改変型ピラノース酸化酵素を採取することを特徴とする、改変型ピラノース酸化酵素の製造方法。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の改変型ピラノース酸化酵素を使用するピラノース測定方法。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の改変型ピラノース酸化酵素を含むピラノース測定試薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載の改変型ピラノース酸化酵素を含むピラノース測定用バイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変型ピラノース酸化酵素、該酵素をコードするポリヌクレオチド、該酵素の製造方法、該酵素を用いたピラノースの測定方法、測定試薬組成物及びバイオセンサに関する。

【背景技術】

【0002】

ピラノース酸化酵素は、グルコースや他のピラノースを酸化し、酸素に電子を供与して過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である（特許文献 1 及び特許文献 2）。該酵素は、糖尿病のマーカーである 1, 5 - アンヒドログルシトール（1, 5 - A G）を基質とするため、糖尿病の診断薬に利用されている。

【0003】

1, 5 - A G は、食事等による影響を受けにくい糖尿病診断マーカーとして重要であり、更に、糖尿病予備軍である食後高血糖の診断マーカーとしても注目されている。1, 5 - A G の測定法の中には、基質の電子を酵素がメディエータへ供与する工程を含む、メディエータが介在した測定法がある。ピラノース酸化酵素は、メディエータだけでなく、酸素へも電子を供与してしまうため、血中の溶存酸素により測定誤差が生じるという問題があった。このため、血中の溶存酸素の影響を受けにくい酵素が求められていた。

【0004】

ピラノース酸化酵素は種々の由来酵素が知られており、アミノ酸配列も開示されている（特許文献 3 及び非特許文献 1 ~ 5）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開平 0 2 - 4 2 9 8 0 号公報

【特許文献 2】特開 2 0 0 7 - 3 0 0 8 1 8 号公報

【特許文献 3】U S 6 1 4 6 8 6 5 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】M i c r o b i a l C e l l F a c t o r i e s 9 : 5 7 (2 0 1 0)

【非特許文献 2】A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 7 0 : 5 7 9 4 5 8 0 0 (2 0 0 4)

【非特許文献 3】A p p l . M i c r o b i o l . B i o t e c h n o l . 6 7 : 6 5 4 6 6 3 (2 0 0 5)

10

20

30

40

50

【非特許文献4】J. Biotechnol. 52: 11 20 (1996)

【非特許文献5】Biotechnol. Lett. 31, 1223 1228 (2009)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、酸素の影響を受けにくい改変型ピラノース酸化酵素及びその製造方法を提供する。更に、該酵素によるピラノースの測定方法、測定試薬組成物及びセンサを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ピラノース酸化酵素(POD)のアミノ酸を置換することで、酸素の影響を受けにくいという優れた特性を有する改変型ピラノース酸化酵素を取得できることを見出した。更に、該酵素をコードするポリヌクレオチドを用いて該酵素を効率的に製造できるということ、及び該酵素を用いて酸素の影響を受けにくいピラノース測定が可能なことを見出し、本発明に至った。

【0009】

すなわち、本発明は、以下の[1]~[9]に関する。

[態様1]

ピラノース酸化酵素のアミノ酸配列において、
配列番号2で示されるアミノ酸配列のP147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つのアミノ酸残基における置換を含み、
改変前のピラノース酸化酵素に比べて、蛋白量あたりのピラノース脱水素酵素活性(PDH比活性)と蛋白量あたりのピラノース酸化酵素活性(POD比活性)との比(PDH/POD)が大きくなっている、改変型ピラノース酸化酵素。

[態様2]

ピラノース酸化酵素活性を有するタンパク質のアミノ酸配列であって、配列番号2、9、10、11、12、13もしくは14で示されるアミノ酸配列、配列番号2、9、10、11、12、13もしくは14で示されるアミノ酸配列と少なくとも95%の類似性を有するアミノ酸配列、又は配列番号2、9、10、11、12、13もしくは14で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列において、

配列番号2で示されるアミノ酸配列のP147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つのアミノ酸残基における置換を含む、

態様1記載の改変型ピラノース酸化酵素。

[態様3]

P147に対応する位置のアミノ酸がプロリンであり、L214に対応する位置のアミノ酸がロイシン又はイソロイシンであり、L216に対応する位置のアミノ酸がロイシンであり、Q421に対応する位置のアミノ酸がグルタミンであり、H423に対応する位置のアミノ酸がヒスチジンであり、及びF447に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、態様1又は2記載の改変型ピラノース酸化酵素。

[態様4]

P147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置の少なくとも1つのアミノ酸残基がアラニンに置換された、態様1~3の何れか1項に記載の改変型ピラノース酸化酵素。

[態様5]

配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する酵素のPDH/PODを1倍とした場合に、PDH/PODが少なくとも2倍である、態様1~4の何れか1項に記載の改変型ピラ

10

20

30

40

50

ノース酸化酵素。

[態様 6]

態様 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の改変型ピラノース酸化酵素をコードするポリヌクレオチド。

[態様 7]

態様 6 記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

[態様 8]

態様 7 記載のベクターで形質転換された形質転換細胞。

[態様 9]

態様 8 の形質転換細胞を培養し、得られた培養物から改変型ピラノース酸化酵素を採取することを特徴とする、改変型ピラノース酸化酵素の製造方法。

10

[態様 10]

態様 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の改変型ピラノース酸化酵素を使用するピラノース測定方法。

[態様 11]

態様 1 ~ 5 の何れかに 1 項記載の改変型ピラノース酸化酵素を含むピラノース測定試薬組成物。

[態様 12]

態様 1 ~ 5 の何れかに 1 項記載の改変型ピラノース酸化酵素を含むピラノース測定用バイオセンサ。

20

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明により、酸素の影響を受けにくいという優れた特性を有する改変型ピラノース酸化酵素を利用することが可能になった。更に、本発明の改変型ピラノース酸化酵素を効率的に製造できるようになり、酸素が存在する試料においても、該酵素を用いてより正確なピラノース測定が可能になった。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】本発明の改変型ピラノース酸化酵素の評価結果を示す図である。各酵素の P O D 比活性（蛋白量あたりの P O D 活性）を白い棒、各酵素の P D H 比活性（蛋白量あたりの P D H 活性）をストライプの棒で示した。三角及び数値は、W T の改変率（倍）を 1 倍としたときの、各改変型酵素の改変率（倍）を示した。

30

【図 2】本発明の改変型ピラノース酸化酵素による 1 , 5 - A G の測定結果を示す図である。

【図 3】本発明の改変型ピラノース酸化酵素によるグルコースの測定結果を示す図である。

【図 4】配列番号 2、9、10、11、12、13 及び 14 を U n i P r o t の A l i g n で、R u n A l i g n した結果に、改変位置を四角で囲んで示した図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

40

本明細書の“改変型酵素”とは、ピラノース酸化酵素を構成する一部のアミノ酸を別のアミノ酸に置換した酵素である。

本明細書の“酸素への電子供与能”とは、酵素が、基質であるピラノースから受け取った電子を酸素に供与する能力である。本発明では、後述のピラノース酸化酵素活性測定法により測定した。

本明細書の“メディエータへの電子供与能”とは、酵素が、基質であるピラノースから受け取った電子をメディエータに供与する能力である。本発明では、後述のピラノース脱水素酵素活性測定法により測定した。

本発明の“改変率（倍）”とは、各酵素の蛋白量あたりのピラノース脱水素酵素活性（P D H 比活性）と蛋白量あたりのピラノース酸化酵素活性（P O D 比活性）との比（P D

50

H / P O D) を算出し、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する酵素 (W T) の P D H / P O D を 1 倍とした場合の、各改変型酵素の P D H / P O D の倍率である。尚、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する酵素 (W T) の P D H / P O D は、0 . 6 3 である。

【 0 0 1 3 】

本明細書ではアミノ酸残基を 1 文字表記で表現することがあり、アラニンは A、ロイシンは L、イソロイシンは I、フェニルアラニンは F、グルタミンは Q、ヒスチジンは H、プロリンは P で表す。

【 0 0 1 4 】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、
ピラノース酸化酵素のアミノ酸配列において、
配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の P 1 4 7、L 2 1 4、L 2 1 6、Q 4 2 1、H 4 2 3 又は F 4 4 7 に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基における置換を含む。尚、該改変型ピラノース酸化酵素は改変前のピラノース酸化酵素に比べて、P D H / P O D が大きくなっている。

10

【 0 0 1 5 】

改変前のピラノース酸化酵素のアミノ酸配列は、ピラノース酸化酵素活性を有するタンパク質のアミノ酸配列であれば特に限定されず、公知のピラノース酸化酵素配列を利用できる。例えば、UniProt の P 5 9 0 9 7、Q 7 5 Z P 8、Q 6 Q W R 1、Q 6 U G 0 2、P 7 9 0 7 6 及び B 9 V 8 M 9 の配列が例示できる。好ましくは、配列番号 2、9、10、11、12、13 又は 14 で示されるアミノ酸配列であり、該配列と相同性を有する配列でも良い。更に、該配列を有するタンパク質は、ピラノース酸化酵素活性を有する。

20

【 0 0 1 6 】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、
(a) 配列番号 2、9、10、11、12、13 もしくは 14 で示されるアミノ酸配列、
(b) 配列番号 2、9、10、11、12、13 もしくは 14 で示されるアミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列、又は
(c) 配列番号 2、9、10、11、12、13 もしくは 14 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列
において、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の P 1 4 7、L 2 1 4、L 2 1 6、Q 4 2 1、H 4 2 3 又は F 4 4 7 に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも 1 つのアミノ酸残基における置換を含むアミノ酸配列を有するタンパク質である。尚、改変前のタンパク質である、前記 (a)、(b) 及び (c) に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質は、何れもピラノース酸化酵素活性を有する。

30

【 0 0 1 7 】

相同性を有するとは、類似性が好ましくは少なくとも 9 0 %、又は 9 5 %、より好ましくは少なくとも 9 6 %、9 7 % 又は 9 8 % のアミノ酸配列である。又は同一性が好ましくは少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 % 又は 9 5 % のアミノ酸配列である。

40

【 0 0 1 8 】

類似性は、GENETYX (株式会社ゼネティックス製) のアミノ酸配列同士のホモロジー解析により算出された Similarity の値に基づく。

同一性は、GENETYX (株式会社ゼネティックス製) の塩基配列同士又はアミノ酸配列同士のホモロジー解析により算出された identity の値に基づく。

【 0 0 1 9 】

1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたとは、好ましくは多くとも 6 0 個、より好ましくは多くとも 5 5 個、5 0 個、4 0 個、3 0 個、2 0 個、1 0 個又は 5 個のアミノ酸の欠失、置換及び / 又は付加である。

【 0 0 2 0 】

50

ピラノース酸化酵素のアミノ酸配列において「配列番号2で示されるアミノ酸配列のP147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置」という表現は、配列番号2で示されるアミノ酸配列の開始アミノ酸であるメチオニン(M)を1番目とした場合の147番目のプロリン、214番目のロイシン、216番目のロイシン、421番目のグルタミン、423番目のヒスチジン又は447番目のフェニルアラニンに対応するアミノ酸を意味し、配列番号2との配列アライメントにより特定できる。例えば図4に示したように対応する位置を特定できる。

【0021】

対応する位置のアミノ酸は、P147に対応するのはプロリンであることが好ましく、L214に対応するのはロイシンであることが好ましく、L216に対応するのはロイシン又はイソロイシンであることが好ましく、ロイシンであることがより好ましく、Q421に対応するのはグルタミンであることが好ましく、H423に対応するのはヒスチジンであることが好ましく、F447に対応するのはフェニルアラニンであることが好ましい。

10

【0022】

また、置換するアミノ酸について、アラニンであることが好ましい。つまり、P147、L214、L216、Q421、H423又はF447に対応する位置の少なくとも1つのアミノ酸残基がアラニンに置換されることが好ましい。

【0023】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、ピラノース脱水素酵素(PDH)比活性とピラノース酸化酵素(POD)比活性との比(PDH/POD)が改変前のピラノース酸化酵素より大きく、好ましくは少なくとも1.0であり、より好ましくは少なくとも1.2、1.5又は2.0であって、改変前のピラノース酸化酵素に比べ、酸素の影響を受けにくい。更に、本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する酵素のPOD比活性を100%とした場合に、POD比活性が好ましくは多くとも90%、80%、70%又は60%である。

20

【0024】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する酵素のPDH比活性とPOD比活性との比(PDH/POD)を1倍とした場合に、PDH/PODが好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも2.5倍、3倍、4倍又は5倍である。つまり、改変率(倍)が好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも2.5倍、3倍、4倍又は5倍である。

30

【0025】

本発明のポリヌクレオチドは、態様1~5の何れかに記載の改変型ピラノース酸化酵素をコードするポリヌクレオチドである。該ポリヌクレオチドは、イントロンを含む配列であっても良く、cDNAでも良い。例えば、配列番号2、9、10、11、12、13又は14で示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列と相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドが例示できる。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドは、公知の方法で容易に調製することができる。例えば、前記の本発明のポリヌクレオチドを鋳型とし、適切なプライマーセットを用いた公知の各種PCR法を利用して、変異を導入することにより調製することができる。又は、人工的に合成しても良い。形質転換細胞に応じてコドンユースを最適化したポリヌクレオチドでも良い。

40

【0027】

鋳型となるポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の配列を合成しても良い。又は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を用いて、公開配列に対して例えばBLAST(blastp又はtblastn)等のホモロジー検索を行って、ヒットした類似性及び/又は同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子配列も利用できる。公開配列からプライマーをデザインし、該遺伝子配列の由来株のDNA又はRNAを鋳型としてPCR又はRT-

50

PCRにより増幅して得ることができる。公開配列の由来株と同種又は同属の株から得ることができる。又は、公開配列情報から人工的に合成できる。類似性は、好ましくは少なくとも90%、95%、97%又は98%である。同一性は、好ましくは少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%又は95%である。尚、配列番号1に記載の配列は野生型のピラノース酸化酵素のアミノ酸配列である配列番号2の配列をコードする塩基配列である。

【0028】

本発明の組換えベクターは、クローニングベクター又は発現ベクターであり、ベクターは適宜選択し、インサートとして本発明のポリヌクレオチドを含む。インサートは、宿主が真核細胞の場合、イントロンを含んでも良い。発現ベクターとしては、原核細胞発現用ベクター又は真核細胞発現用ベクターの何れでも良く、pUC系、pBlue-script II、pET発現システム、pGEX発現システム、pCold発現システム等が例示できるが、タンパク質の大量発現が可能なベクターが好ましい。尚、必要に応じて、シャペロンやリゾチーム等の発現に寄与するポリヌクレオチドを、本発明のポリヌクレオチドと同一及び/又は別のベクターに導入することも可能である。

【0029】

本発明の形質転換細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、真菌（酵母、アスペルギルス属等の子嚢菌、担子菌等）、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞等を使用することができ、本発明のベクターで形質転換させて得ることができる。

【0030】

本発明の形質転換細胞を培養して得られた培養物から改変型ピラノース酸化酵素を採取することによって、組換え改変型ピラノース酸化酵素を製造することができる。

【0031】

本発明で使用される改変型ピラノース酸化酵素生産菌の培養には、通常の微生物培養用培地が使用できる。例えば、炭素源、窒素源、ビタミン類、無機物、その他使用する微生物が必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地の何れでも使用可能である。炭素源としては、グルコース、スクロース、デキストリン、澱粉、グリセリン、糖蜜等が使用できる。窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機塩類、DL-アラニン、L-グルタミン酸等のアミノ酸類、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー等の窒素含有天然物が使用できる。ビタミン類としては、リボフラビン、ピリドキシン、ナイアシン（ニコチン酸）、チアミン等が使用できる。無機物としては、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第二鉄等が使用できる。更に、タンパク質の発現の調整に必要な化合物を適宜添加しても良い。

【0032】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素を得るための培養は、通常、振盪培養や通気攪拌等の方法により行うのが良い。改変型ピラノース酸化酵素生産菌の特性を踏まえて、改変型ピラノース酸化酵素の生産に適した培養条件に設定すれば良い。例えば、培養温度は10から45、且つpH4からpH10の範囲で行うのが好ましく、生産性を考慮して培養中にpH調整をしても良い。培養期間は回分培養であれば、1日から6日の範囲が好ましいが、流加培養や連続培養による生産量増大を行うのであれば、生産性が最適と判断される範囲で期間を延ばすことができる。

【0033】

培養物中から改変型ピラノース酸化酵素を得る方法は、通常のタンパク質の製造方法が利用できる。例えば、最初に改変型ピラノース酸化酵素生産菌を培養後、遠心分離により培養上清液を得る。又は培養菌体を得、適当な方法で該培養微生物を破碎し、破碎液から遠心分離等によって上清液を得る。次に、これらの上清液中に含まれる改変型ピラノース酸化酵素を、通常のタンパク質の精製方法で精製し、精製酵素を得ることができる。例えば、限外ろ過、塩析、溶媒沈殿、熱処理、透析、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性

10

20

30

40

50

クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー等の精製操作を組み合わせることによって精製できる。

【0034】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素を用いて、ピラノースを測定することができる。本発明のピラノース測定方法は、ピラノースを含む被検試料と本発明の改変型ピラノース酸化酵素とを接触させる工程を備えることにより、被検試料中のピラノースを定量できる。測定対象は、本発明の酵素が作用するピラノースであれば特に限定されない。例えば、グルコース測定用、キシロース測定用、ガラクトース測定用又は1,5-AG測定用として有用である。本発明の酵素は酸素の影響を受けにくいため、溶存酸素の影響を受ける測定系であっても、本発明の酵素を用いることで正確な測定値が得られる。本発明の測定対象は特に限定されないが、例えば生体試料が例示でき、具体例として血液試料が例示できる。更に、本発明の測定法は、被検試料中に存在する、測定に影響を与える夾雑物質を消去、分離又は除去するステップと組み合わせることができる。例えば、1,5-AGを測定対象とする場合は、グルコースを消去、分離又は除去する工程と組み合わせることができる。

10

【0035】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素を用いて、ピラノース測定試薬組成物を製造することができ、該酵素を含むピラノース測定試薬組成物を簡便に製造することが可能となった。本発明の試薬組成物は、酵素として本発明の改変型ピラノース酸化酵素を含む試薬組成物であれば良い。該組成物中の酵素量は、測定対象を測定できれば特に限定されないが、0.0001から50U程度が好ましく、0.001から20U程度がより好ましい。更に、任意のメディエータ(電子受容体)を含ませることができ、例えば、フェリシアン化合物、キノン系化合物、オスmium系化合物、フェナジン系化合物、フェノチアジン系化合物等が例示できる。また、該組成物は、安定化剤又は緩衝剤等の当業者に公知の他の任意成分を適宜含有させ、該酵素や試薬成分の熱安定性や保存安定性を高めることができる。牛血清アルブミン(BSA)若しくは卵白アルブミン、該酵素と作用性のない糖類若しくは糖アルコール類、カルボキシル基含有化合物、アルカリ土類金属化合物、アンモニウム塩、硫酸塩又はタンパク質等が例示できる。更に、被検試料中に存在する、測定に影響を与える夾雑物質の影響を抑える公知の物質を、該測定試薬に含ませることができる。

20

【0036】

本発明の改変型ピラノース酸化酵素を使用したバイオセンサを製造できる。本発明のバイオセンサは、酵素として本発明の改変型ピラノース酸化酵素を反応層に含むセンサであれば良い。例えば、該バイオセンサは、絶縁性基板上にスクリーン印刷や蒸着等の方法を利用して電極系を形成し、更に該酵素とメディエータとを備えることによって作製される。この他に、発色強度又はpH変化等を検知する方式のバイオセンサも構築可能である。酸素の影響を受けにくい、グルコースセンサ、キシロースセンサ、ガラクトースセンサ又は1,5-AGセンサ等を作製することができる。

30

【0037】

更に本発明の改変型ピラノース酸化酵素は、バイオ電池に用いることができる。本発明のバイオ電池は、酸化反応を行うアノード極及び還元反応を行うカソード極から構成され、必要に応じてアノードとカソードを隔離する電解質層を含んで構成される。上記の電子メディエータ及び改変型ピラノース酸化酵素を含む酵素電極をアノード電極に使用し、基質を酸化することによって生じた電子を電極に取り出すと共に、プロトンを生産させる。一方、カソード側には、一般的にカソード電極に使用される酵素を使用すれば良く、例えばラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ又はピリルビンオキシダーゼを使用し、アノード側で発生させたプロトンと反応させることによって水を生成させる。電極としては、カーボン、金、白金等、一般的にバイオ電池に使用される電極を用いることができる。

40

【実施例】

【0038】

50

以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。又、本明細書中に引用される文献に記載された内容は、本明細書の一部として本明細書の開示内容を構成するものである。

【0039】

[実施例1]

(変異導入遺伝子の取得)

変異導入用プライマーを用いてPCRにより変異導入を行った。具体的には、テンプレートのアンチセンス鎖に、5'側をリン酸化させたプライマーをアニールさせ、ポリメラーゼで伸長させた。伸長したDNA断片を同反応液中でDNAリガーゼを用いてつなぎ、変異導入された部分以外が鋳型と相補的なものを得るという手法で行った。

10

【0040】

(1) 変異導入用プライマー

ピラノース酸化酵素(POD)遺伝子に部位特異的変異を導入するために、下記のようなプライマーをデザインし、合成した。

配列番号2のアミノ酸配列の147番目のプロリン(P)をアラニン(A)に置換させる(P147A)のためのプライマーをPROD-P147A(配列番号3)とした。同様に、その他のアミノ酸置換用のプライマーを、PROD-L214A、PROD-L216A、PROD-Q421A、PROD-H423A及びPROD-F447A(配列番号4~8)とした。

PROD-P147A : 5' TGGACCTGCGCTACAGCGGAGTTCTTCAAGGAA 3' (配列番号3)

PROD-L214A : 5' CGCGGTATCAAACCTGCCCGCTCGCATGTCAT 3' (配列番号4)

PROD-L216A : 5' ATCAAACCTCTCCCGGCCGCATGTCATCGTCTT 3' (配列番号5)

PROD-Q421A : 5' TTCCTTGGCAGCGCAGCGATTCATCGCGACGCG 3' (配列番号6)

PROD-H423A : 5' TGGCAGCGCAGATTGCTCGCGACGCGTTTCAGC 3' (配列番号7)

PROD-F447A : 5' GTCGACCTAAGGTTTCGCTGCTCGTCAGGCCAGA 3' (配列番号8)

20

【0041】

(2) プライマーの5'リン酸化

100 μM プライマー 2 μl、10x T4 polynucleotide kinase buffer 5 μl、0.1M ATP 1.0 μl、滅菌水 41 μl及び10 U/μl T4 polynucleotide kinase 1 μlを混合し、37で60分間インキュベートした。これにより、5'側リン酸化プライマーを調製した。

30

【0042】

(3) 変異導入用PCR

未変異のPOD遺伝子をプラスミドpET21a(+)のマルチクローニングサイトにあるNdeI-EcoRI部位に挿入した、プラスミドpET21a(+)/PODを変異導入PCRのテンプレートとした。尚、該POD遺伝子配列は、配列番号1に記載の塩基配列である。

【0043】

5'リン酸化プライマー 4 μl、テンプレート(pET21a(+)/POD) 100 ng、10x polymerase buffer 2.5 μl、10x DNA ligase buffer 2.5 μl、2.5mM dNTPs 1 μl、2.5 U/μl polymerase (pfu) 1 μl及び40 U/μl Taq DNA ligase 0.5 μlに滅菌水を加え、50 μlのPCR反応液とした。各プライマーについてPCR反応液を調製し、下記反応条件でPCRを行った。

40

【0044】

(反応条件)

1) 65 5分

2) 95 2分

3) 95 30秒

4) 50 30秒

50

5) 65 10分

上記の3)~5)を30サイクル繰り返す

6) 75 10分

【0045】

(4) DpnI処理

各PCR産物にDpnIを1μl加えて37℃で1時間インキュベートすることで、テンプレートプラスミドを分解した。

【0046】

(5) 変異導入遺伝子の取得

DpnI処理後の各サンプルで、各大腸菌JM109を形質転換した。培養した各大腸菌からプラスミド抽出を行った。抽出した各プラスミドベクターの挿入部分の塩基配列を解析した結果、挿入部分のPOD遺伝子には何れも目的の変異が導入されていたことが確認できた。変異導入遺伝子を含む各プラスミドベクターを、pET21a(+)/P147A、pET21a(+)/L214A、pET21a(+)/L216A、pET21a(+)/Q421A、pET21a(+)/H423A及びpET21a(+)/F447Aとした。

10

【0047】

[実施例2]

(改変型酵素の活性評価)

(1) 変異株の取得

実施例1で得られた変異導入遺伝子を含む各プラスミドベクターで、各大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。変異導入遺伝子を含む各形質転換大腸菌を、変異株とした。各変異株を、液体培地で培養後、遠心分離により集菌した。尚、液体培地は、アンピシリンを終濃度100μg/mL、IPTGを終濃度0.1mM含む。

20

【0048】

(2) 改変型酵素の取得

集菌した各変異株を、DNaseIを終濃度2.5μg/mL、リゾチームを終濃度0.1mg/mLになるように添加した50mMリン酸緩衝液(KPB)(pH7.5)に懸濁した。該懸濁液を、各々96ディープウェルに0.4mLずつ分注し、37℃で15分インキュベートした。次に、Tween20(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート、和光純薬製)を終濃度1%になるように添加し、37℃で15分インキュベートした。更に、該液を-80℃で凍結させ、37℃で融解させた。続いて、遠心分離して各々沈殿を除去し、上清(CFE)を回収した。回収した各CFEを、改変型酵素液とした。各改変型酵素を、P147A、L214A、L216A、Q421A、H423A及びF447Aとした。

30

【0049】

(3) ピラノース酸化酵素活性測定法

水2.1mL、10mM KPB(pH7.0)0.1mL、50U/mL ベルオキシダーゼ0.2mL、12.4mM 4-アミノアンチピリン0.2mL、210mM フェノール0.2mL及び1M D-グルコース0.1mLを混合し、37℃で10分間インキュベートした。次いで、これに酵素試料0.1mLを加えて、500nmにおけるOD/minを測定し、初速度法により次式を用いて活性を算出した。

40

ピラノース酸化酵素(POD)活性(U/mL) = (OD/min × 3.0(mL) × 酵素の希釈倍率) / (10.66 × 1/2 × 1.0 × 酵素添加量(mL))

10.66 : 500nmにおけるキノニン色素の分子吸光係数

1.0 : 光路長(cm)

本法により、酸素への電子供与能を測定した。

【0050】

(4) ピラノース脱水素酵素活性測定法

水0.61mL、100mM KPB(pH7.0)1mL、3mM DCIP 0.

50

1.4 mL、3 mM 1-m-PMSO、2 mL、1 M D-グルコース1 mLを混合し、37 で10分間インキュベートした。次いで、これに酵素試料0.05 mLを加えて、600 nmにおける OD/minを測定し、初速度法により次式を用いて活性を算出した。

ピラノース脱水素酵素 (PDH) 活性 (U/mL) = (OD/min × 3.0 (mL) × 酵素の希釈倍率) / (16.3 × 1.0 × 酵素添加量 (mL))

16.3 : 600 nmにおけるDCIPの分子吸光係数

1.0 : 光路長 (cm)

本法により、メディエータへの電子供与能を測定した。

【0051】

(5) 蛋白濃度測定

蛋白濃度測定は、BIO-RADプロテインアッセイキットを用いたブラッドフォード法によって測定した。測定値は比活性の算出に使用した。

【0052】

(6) 各改変型酵素の評価

(2) で得た各改変型酵素について、前記の方法でPOD活性、PDH活性及び蛋白濃度を測定した。尚、実施例1でPCRのテンプレートに使用したPOD構造遺伝子を含む形質転換大腸菌を未変異株とした。改変型酵素液と同様に、未変異株からCFEを調製し、未変異型酵素液 (WT) とした。

【0053】

各測定値から各サンプルのPOD比活性 (U/mg) 及びPDH比活性 (U/mg) を算出した。更に、WTのPOD比活性を100%として、各サンプルのPOD比活性の相対値 (%) を算出した。表1に結果を示した。

全ての改変型酵素において、POD比活性が低下しており、アミノ酸置換P147A、L214A、L216A、Q421A、H423A又はF447Aによって、WTに比べて改変型酵素の酸素への電子供与能が60%以下に低下したことが分かった。

【0054】

更に、PDH比活性とPOD比活性との比 (PDH/POD) を算出し、表1に示した。

WTのPDH/PODは0.629だった。これは、WTが、メディエータへの電子供与能より、酸素への電子供与能の方が高いことを意味する。これに対し、得られた改変型酵素P147A、L214A、L216A、Q421A、H423A又はF447Aは、PDH/PODが1.46、4.39、3.14、5.33、44.4又は23.1と、何れも改変前のピラノース酸化酵素 (WT) に比べてPDH/PODが大きくなっており、具体的には何れもPDH/PODが1.0以上だった。

【0055】

更に、WTのPDH/PODを1倍とした場合の各改変型酵素のPDH/PODを、改変率 (倍) として算出し、表1に示した。

得られた改変型酵素P147A、L214A、L216A、Q421A、H423A又はF447Aは、改変率 (倍) が2.3、7.0、5.0、8.5、7.1又は3.7と、何れも2倍以上だった。

このことから、本願で得られた改変型酵素は全て、酸素よりもメディエータへ電子を供与する能力が、WTに比べて2倍以上高くなったことが分かった。

【0056】

以上より、酸素の影響を受けにくい改変型ピラノース酸化酵素が得られたことが分かった。

【0057】

10

20

30

40

【表 1】

酵素	POD (U/mg)	PDH (U/mg)	PDH/POD	改変率(倍)
WT	3.37 (100%)	2.12	0.629	1.0
P147A	1.49 (44%)	2.17	1.46	2.3
L214A	0.608 (18%)	2.67	4.39	7.0
L216A	1.89 (56%)	5.94	3.14	5.0
Q421A	0.270 (8.0%)	1.44	5.33	8.5
H423A	0.0797 (2.4%)	3.54	44.4	71
F447A	0.0636 (1.9%)	1.47	23.1	37

10

【 0 0 5 8 】

[実施例 3]

(改変型酵素の精製)

p E T 2 1 a (+) / H 4 2 3 A で形質転換した変異株の培養菌体をリン酸緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。続いて、遠心分離して沈殿を除去し、上清 (C F E) を回収した。回収した C F E を、熱処理した後、硫酸分画処理した。処理後のサンプルを脱塩し、最終的に陰イオン交換樹脂 (商品名 : D E A E セルロファイブ A 5 0 0 m 、東ソー製) カラムで夾雑蛋白を除去し、精製酵素を得た。該精製酵素を S D S - ポリアクリルアミド電気泳動に供したところ、約 7 0 k D a の単一バンドを示すことを確認した。

【 0 0 5 9 】

20

[実施例 4]

(改変型酵素を用いた 1 , 5 - A G の測定)

実施例 3 で得た精製酵素を使用し、実施例 2 (4) の P D H 活性測定法に基づき、分光光度計を用いて 1 , 5 - A G の定量を行った。基質として、終濃度が 0 . 0 1 、 0 . 0 5 、 0 . 1 、 1 . 0 、 1 0 、 2 0 、 5 0 m M となるように 1 , 5 - A G を添加した。測定結果から酵素活性を算出し、1 , 5 - A G 濃度 (0 . 0 1 、 0 . 0 5 、 0 . 1 、 1 . 0 、 1 0 、 2 0 、 5 0 m M) に対して相対値 (%) でプロットした結果を、図 2 に示した。

図 2 に示したように、本発明の改変型ピラノース酸化酵素を用いて、少なくとも 0 . 0 1 ~ 5 0 m M の濃度範囲で 1 , 5 - A G の定量が可能であることが分かった。

【 0 0 6 0 】

30

[実施例 5]

(改変型酵素を用いたグルコースの測定)

実施例 3 で得た精製酵素を使用し、実施例 2 (4) の P D H 活性測定法に基づき、分光光度計を用いてグルコースの定量を行った。基質として、終濃度が 1 . 0 、 3 . 0 、 1 0 、 2 0 、 5 5 m M となるようにグルコースを添加した。測定結果から酵素活性を算出し、グルコース濃度 (1 . 0 、 3 . 0 、 1 0 、 2 0 、 5 5 m M) に対して相対値 (%) でプロットした結果を、図 3 に示した。

図 3 に示したように、本発明の改変型ピラノース酸化酵素を用いて、少なくとも 1 . 0 ~ 5 5 m M の濃度範囲でグルコースの定量が可能であることが分かった。

【配列表】

0006504390000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
C 1 2 Q 1/26 (2006.01) C 1 2 Q 1/26
C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 M 1/34 E

(56) 参考文献 特開 2007-300818 (JP, A)
国際公開第 2011/068050 (WO, A1)
国際公開第 2013/035080 (WO, A1)
国際公開第 2013/026575 (WO, A1)

(58) 調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00 - 15/90
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)
UniProt/GeneSeq