

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 1 年 6 月 27 日 (2019.6.27)

【公開番号】特開 2018-186837 (P2018-186837A)

【公開日】平成 30 年 11 月 29 日 (2018.11.29)

【年通号数】公開・登録公報 2018-046

【出願番号】特願 2018-166687 (P2018-166687)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 15/53 (2006.01)

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/26 (2006.01)

C 1 2 N 9/06 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 9/02 Z N A

C 1 2 N 15/53

C 1 2 N 15/31

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 Q 1/26

C 1 2 N 9/06 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 5 月 22 日 (2019.5.22)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の以下 (a) から (h) よりなる群から選択されるアミノ酸の位置に対応する位置で当該アマドリアーゼのアミノ酸配列が 1 つまたはそれ以上のアミノ酸残基の置換を有し、かつ置換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、  
 - フルクトシルヘキサペプチドに対する反応性の割合が向上している改変アマドリアーゼ。

(g) 配列番号 1 の 3 5 5 位

(e) 配列番号 1 の 1 1 0 位

- (d) 配列番号 1 の 1 0 6 位
- (b) 配列番号 1 の 6 3 位
- (c) 配列番号 1 の 1 0 2 位
- (f) 配列番号 1 の 1 1 3 位
- (h) 配列番号 1 の 4 1 9 位
- (a) 配列番号 1 の 6 2 位

【請求項 2】

アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号 1 に記載のアミノ酸の以下 (a) から (h) よりなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸が、以下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、置換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、-フルクトシルヘキサペプチドに対する反応性の割合が向上している改変アマドリアーゼ。

(g) 配列番号 1 の 3 5 5 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、又はプロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、又はリジンに置換されている。

(e) 配列番号 1 の 1 1 0 位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、又はプロリン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン、グリシン、アラニン、又はフェニルアラニンに置換されている。

(d) 配列番号 1 の 1 0 6 位に対応する位置のアミノ酸がリジン、アルギニン、アラニン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(b) 配列番号 1 の 6 3 位に対応する位置のアミノ酸がアラニン、ヒスチジン又はグリシン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、プロリン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、又はトリプトファンに置換されている。

(c) 配列番号 1 の 1 0 2 位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、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(f) 配列番号 1 の 1 1 3 位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンに置換されている。

(h) 配列番号 1 の 4 1 9 位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニン、ヒスチジン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸又はグルタミン酸に置換されている。

(a) 配列番号 1 の 6 2 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン、アスパラギン酸、アラニン、セリン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換されている。

【請求項 3】

アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号 1 に記載のアミノ酸の以下 (a) から (h) よりなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の位置のアミノ酸に対応する位置のアミノ酸が、以下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、置換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、        -フルクトシルヘキサペプチドに対する反応性の割合が向上している改変アマドリアーゼ。

(g) 配列番号 1 の 3 5 5 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、又はプロリンに置換されている。

(e) 配列番号 1 の 1 1 0 位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、又はプロリンに置換されている。

(d) 配列番号 1 の 1 0 6 位に対応する位置のアミノ酸がリジン、アルギニン、アラニン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(b) 配列番号 1 の 6 3 位に対応する位置のアミノ酸がアラニン、ヒスチジン又はグリシンに置換されている。

(c) 配列番号 1 の 1 0 2 位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、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(f) 配列番号 1 の 1 1 3 位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニンに置換されている。

(h) 配列番号 1 の 4 1 9 位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニンに置換されている。

(a) 配列番号 1 の 6 2 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換されている。

#### 【請求項 4】

以下からなる群より選択される改変アマドリアーゼ、

(i) アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号 1 記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 3 5 5 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、又はプロリンであり、かつ         -フルクトシルヘキサペプチド (         F 6 P ) に対する活性を有する改変アマドリアーゼ、

(ii) 前記(i)のアマドリアーゼにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 3 5 5 位に対応する位置以外の位置における 1 又は数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ         F 6 P に対する活性を有する改変アマドリアーゼ、

(iii) 前記(i)のアマドリアーゼにおいて、配列番号 1 に示すアミノ酸配列における 3 5 5 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、又はプロリンであり、かつ当該アマドリアーゼの全長アミノ酸配列が配列番号 1 のアミノ酸配列と 7 0 % 以上の配列同一性を有し、配列番号 1 の第 1 0 位 ~ 3 2 位、3 6 ~ 4 1 位、4 9 ~ 5 2 位、5 4 ~ 5 8 位、6 3 ~ 6 5 位、7 3 ~ 7 5 位、8 4 ~ 8 6 位、8 8 ~ 9 0 位、1 2 0 ~ 1 2 2 位、1 4 5 ~ 1 5 0 位、1 5 6 ~ 1 6 2 位、1 6 4 ~ 1 7 0 位、1 8 0 ~ 1 8 2 位、2 0 2 ~ 2 0 5 位、2 0 7 ~ 2 1 1 位、2 1 4 ~ 2 2 4 位、2 2 7 ~ 2 3 0 位、2 3 6 ~ 2 4 1 位、2 4 3 ~ 2 4 8 位、2 5 8 ~ 2 6 1 位、2 6 6 ~ 2 6 8 位、2 7 0 ~ 2 7 3 位、2 7 5 ~ 2 8 7 位、2 9 5 ~ 2 9 7 位、3 0 6 ~ 3 0 8 位、3 1 0 ~ 3 1 6 位、3 2 4 ~ 3 2 9 位、3 3 2 ~ 3 3 4 位、3 4 1 ~ 3 4 4 位、3 4 6 ~ 3 5 5 位、3 5 7 ~ 3 6 3 位、3 7 0 ~ 3 8 3 位、3 8 5 ~ 3 8 7 位、3 8 9 ~ 3 9 4 位、4 0 5 ~ 4 1 0 位及び 4 2 3 ~ 4 3 1 位のアミノ酸配列からなる相

同姓領域におけるアミノ酸配列と当該アマドリアーゼの対応する位置の相同性領域におけるアミノ酸配列とが90%以上の配列同一性を有し、F6Pに対する活性を有する改変アマドリアーゼ、

(iv) 前記(i)のアマドリアーゼにおいて、配列番号1に示すアミノ酸配列における355位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、又はプロリンであり、かつ当該アマドリアーゼの全長アミノ酸配列が配列番号119のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、F6Pに対する活性を有する改変アマドリアーゼ。

【請求項5】

(i)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における110位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、ロイシン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン又はプロリンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

(ii)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における106位に対応する位置のアミノ酸がリジン、アルギニン、アラニン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

(iii)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における113位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

(iv)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における63位に対応する位置のアミノ酸がアラニン、ヒスチジン又はグリシンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

(v)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における102位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、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

(vi)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における419位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニンであり、かつF6Pに対する活性を有する、或いは

(vii)アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、さらに配列番号1に示すアミノ酸配列における62位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、アラニン、アスパラギン、セリン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンであり、かつF6Pに対する活性を有する、

請求項1～4のいずれか1項に記載の改変アマドリアーゼ。

【請求項6】

配列番号119、配列番号1、配列番号38、配列番号40、配列番号54、配列番号62、配列番号89、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号121、又は配列番号123に示すアミノ酸配列を有し、前記請求項1～5のいずれかに規定したアミノ酸置換を有し、かつF6Pに対する活性を有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の改変アマドリアーゼ。

【請求項7】

前記アマドリアーゼが、エメリセラ(Emericella)属、コニオカエタ(Coniochaeta)属、

ユーペニシリウム(*Eupenicillium*)属、ピレノケータ(*Pyrenochaeta*)属、アルスリニウム(*Arthrinium*)属、カーブラリア(*Curvularia*)属、ネオコスモスポラ(*Neocosmospora*)属、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)属、フェオスフェリア(*Phaeosphaeria*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、ウロクラディウム(*Ulocladium*)属、ペニシリウム(*Penicillium*)属、フザリウム(*Fusarium*)属、アカエトミエラ(*Achaetomiella*)属、アカエトミウム(*Achaetomium*)属、シエラビア(*Thielavia*)属、カエトミウム(*Chaetomium*)属、ゲラシノスポラ(*Gelasinospora*)属、ミクロアスカス(*Microascus*)属、レプトスフェリア(*Leptosphaeria*)属、オフィオボラス(*Ophiobolus*)属、プレオスポラ(*Pleospora*)属、コニオケチジウム(*Coniochaetidium*)属、ピチア(*Pichia*)属、デバリオマイセス(*Debaryomyces*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)属、又はアルスロバクター(*Arthrobacter*)属由来である、請求項1～6のいずれか1項に記載の改変アマドリアーゼ。

【請求項8】

改変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、  
-フルクトシルヘキサペプチドに対する反応性の割合が向上している、請求項1～7のいずれか1項に記載の改変アマドリアーゼ。

【請求項9】

配列番号119に記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、90%以上の全長アミノ酸配列同一性を有するアマドリアーゼであって、該アマドリアーゼのアミノ酸配列を、配列番号1に記載のアミノ酸配列とアライメントしたときに、以下に記載したアミノ酸残基の置換を有し、置換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、  
-フルクトシルヘキサペプチドに対する反応性の割合が向上している改変アマドリアーゼ。

(i) 配列番号1の355位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換されている。

(ii) 配列番号1の355位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号1の110位に対応する位置のアミノ酸がロイシン、アルギニン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、プロリン又はフェニルアラニンに置換されている。

(iii) 配列番号1の355位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号1の110位に対応する位置のアミノ酸がロイシン、アルギニン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、プロリン又はフェニルアラニンに置換され、配列番号1の106位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、アラニン、リジン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(iv) 配列番号1の355位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号1の110位に対応する位置のアミノ酸がロイシン、アルギニン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、プロリン又はフェニルアラニンに置換され、配列番号1の106位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、アラニン、リジン、ヒスチジン

(vii) 配列番号 1 の 3 5 5 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 1 1 0 位に対応する位置のアミノ酸がロイシン、アルギニン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、プロリン又はフェニルアラニンに置換され、配列番号 1 の 1 0 6 位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、アラニン、リジン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 6 2 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、アラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換され、配列番号 1 の 6 3 位に対応する位置のアミノ酸がヒスチジン、グリシン又はアラニンに置換され、配列番号 1 の 1 1 3 位に対応する位置のアミノ酸がリジンに置換され、配列番号 1 の 1 0 2 位に対

応する位置のアミノ酸が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換されている。

(viii) 配列番号 1 の 355 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 110 位に対応する位置のアミノ酸がロイシン、アルギニン、チロシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、システイン、トリプトファン、プロリン又はフェニルアラニンに置換され、配列番号 1 の 106 位に対応する位置のアミノ酸がアルギニン、アラニン、リジン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 62 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、アラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換され、配列番号 1 の 63 位に対応する位置のアミノ酸がヒスチジン、グリシン又はアラニンに置換され、配列番号 1 の 113 位に対応する位置のアミノ酸がリジンに置換され、配列番号 1 の 102 位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、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 419 位に対応する位置のアミノ酸がリジン又はアルギニンに置換されている。

(ix) 配列番号 1 の 355 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 62 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、アラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換されている。

(x) 配列番号 1 の 62 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、アラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換され、配列番号 1 の 63 位に対応する位置のアミノ酸がヒスチジン、グリシン又はアラニンに置換されている。

(xi) 配列番号 1 の 355 位に対応する位置のアミノ酸がセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン、又はプロリンに置換され、配列番号 1 の 62 位に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸、セリン、アスパラギン、アラニン、スレオニン、グルタミン、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、グリシン、プロリン、ヒスチジン、又はリジンに置換され、配列番号 1 の 63 位に対応する位置のアミノ酸がヒスチジン、グリシン又はアラニンに置換されている。

#### 【請求項 10】

(i) 配列番号 139 のアミノ酸配列を有するアマドリアーゼ、或いは

(ii) 配列番号 139 のアミノ酸配列において、1 又は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し、かつ

F 6 P に対する活性を有するアマドリアーゼ。

【請求項 1 1】

全長アミノ酸配列が配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列と 7 5 % 以上の配列同一性を有し、  
配列番号 1 の第 1 0 位 ~ 3 2 位、3 6 ~ 4 1 位、4 9 ~ 5 2 位、5 4 ~ 5 8 位、6 3 ~ 6  
5 位、7 3 ~ 7 5 位、8 4 ~ 8 6 位、8 8 ~ 9 0 位、1 2 0 ~ 1 2 2 位、1 4 5 ~ 1 5 0  
位、1 5 6 ~ 1 6 2 位、1 6 4 ~ 1 7 0 位、1 8 0 ~ 1 8 2 位、2 0 2 ~ 2 0 5 位、2 0  
7 ~ 2 1 1 位、2 1 4 ~ 2 2 4 位、2 2 7 ~ 2 3 0 位、2 3 6 ~ 2 4 1 位、2 4 3 ~ 2 4  
8 位、2 5 8 ~ 2 6 1 位、2 6 6 ~ 2 6 8 位、2 7 0 ~ 2 7 3 位、2 7 5 ~ 2 8 7 位、2  
9 5 ~ 2 9 7 位、3 0 6 ~ 3 0 8 位、3 1 0 ~ 3 1 6 位、3 2 4 ~ 3 2 9 位、3 3 2 ~ 3  
3 4 位、3 4 1 ~ 3 4 4 位、3 4 6 ~ 3 5 5 位、3 5 7 ~ 3 6 3 位、3 7 0 ~ 3 8 3 位、  
3 8 5 ~ 3 8 7 位、3 8 9 ~ 3 9 4 位、4 0 5 ~ 4 1 0 位及び 4 2 3 ~ 4 3 1 位のアミノ  
酸配列からなる相同性領域におけるアミノ酸配列と当該アマドリアーゼの対応する位置の  
相同性領域におけるアミノ酸配列とが 9 0 % 以上の配列同一性を有し、 F 6 P に対する  
活性を有するアマドリアーゼ。

【請求項 1 2】

(i) 配列番号 1 4 0 に示す塩基配列によりコードされ、かつ F 6 P に対する活性を有  
するアマドリアーゼ、或いは

(ii) 配列番号 1 4 0 に示す塩基配列に相補的な配列と、ストリンジェントな条件下でハ  
イブリダイズする塩基配列によりコードされ、かつ F 6 P に対する活性を有するアマド  
リアーゼ。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の改変アマドリアーゼをコードするアマドリアー  
ゼ遺伝子。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に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 1 5】

請求項 1 4 に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 6】

以下の工程を含む、アマドリアーゼの製造方法、

(i) 請求項 1 5 に記載の宿主細胞を、アマドリアーゼタンパク質を発現しうる条件下で  
培養する工程、及び

(ii) 培養物又は培養液からアマドリアーゼを単離する工程。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のアマドリアーゼを含む、H b A 1 c の測定に用  
いるためのキット。

【請求項 1 8】

H b A 1 c 由来の -フルクトシルヘキサペプチド ( F 6 P ) を含む試料に請求項 1  
~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の改変アマドリアーゼを作用させ、該アマドリアーゼの H b  
A 1 c 由来 F 6 P に対する作用による生成物又は消費物を測定することを特徴とする  
F 6 P の測定方法。

【請求項 1 9】

試料中の H b A 1 c 由来 F 6 P を定量する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

以下の工程を含む、H b A 1 c の測定方法、

(i) H b A 1 c を含む試料をプロテアーゼ及び / 又はペプチダーゼで処理し、H b A 1 c  
の鎖アミノ末端より F 6 P を遊離させる工程、及び

(ii) 遊離した H b A 1 c 由来 F 6 P に請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の改変アマ  
ドリアーゼを作用させ、該アマドリアーゼの H b A 1 c 由来 F 6 P に対する作用による  
生成物又は消費物を測定する工程。

【請求項 2 1】



試料中の H b A 1 c を定量する、請求項 2 0 に記載の方法。