(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2009-72196
(P2009-72196A)
(43)公開日　平成21年4月9日(2009.4.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C12N 9/04	(2006.01)	C12N	9/04	Z	4B024
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B050
C12Q 1/26	(2006.01)	C12Q	1/26		4B063
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065

審査請求 有　請求項の数 7　ＯＬ　（全 12 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-265916 (P2008-265916)
(22)出願日　平成20年10月15日 (2008.10.15)
(62)分割の表示　特願2002-329428 (P2002-329428)の分割
原出願日　平成14年11月13日 (2002.11.13)

(71)出願人　000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜２丁目２番８号
(72)発明者　岸本　高英
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者　曽我部　敦
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者　岡　正則
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

Ｆターム(参考)　2G045 AA25 DA42 DA43 FB01
4B024 AA11 BA08 CA02 DA06 EA04 HA01

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改変型ザルコシンオキシダーゼ

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、プロリンに対する作用性が低減したザルコシンオキシダーゼ、その製造法および用途を提供する。
【解決手段】特定のアミノ酸配列の特定の位置のリジンがアルギニンに置換されており、プロリンに対する作用性が低減した改変型ザルコシンオキシダーゼと、その製造方法。また、該酵素を利用したクレアチン、クレアチニン測定用試薬。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の３２２位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。
【請求項２】
請求項１に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。
【請求項３】
請求項２に記載の遺伝子を含むベクター。
【請求項４】
請求項３に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
【請求項５】
請求項４に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。
【請求項６】
請求項１に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。
【請求項７】
請求項１に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、プロリンに対する作用性が低減したザルコシンオキシダーゼ、その製造法および用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
ザルコシンオキシダーゼ（ＥＣ　１．５．３．１）は、臨床的に筋疾患，腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン，クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。ザルコシンオキシダーゼは基質であるザルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。
【０００３】
このようなザルコシンオキシダーゼは、バチルス属、コリネバクテリウム属、シリンドロカルポン属、シュードモナス属、アースロバクター属等の細菌が生産することが知られている（例えば、特許文献１～５および非特許文献１参照。）。また、これら生産菌のザルコシンオキシダーゼ遺伝子を、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の宿主を用いた大量生産する技術についても報告されている（例えば、特許文献６～８参照。）。
【特許文献１】特開昭５４－５２７８９号公報
【特許文献２】特開昭６１－１６２１７４号公報
【特許文献３】特開昭５６－９２７９０号公報
【特許文献４】特開昭６０－４３３７９号公報
【特許文献５】特開平２－２６５４７８号公報
【特許文献６】特開平５－１１５２８１号公報
【特許文献７】特開平６－１１３８４０号公報
【特許文献８】特開平８－２３８０８７号公報
【非特許文献１】「Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．」，１９８１年，　８９巻，　ｐ．５９９
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
しかしながら、従来のザルコシンオキシダーゼは血中に存在するアミノ酸の１種であるプロリンに対しても作用することが知られており、クレアチニン、クレアチンの測定の際

に正誤差を生じる原因となり得ることが指摘されている（例えば、非特許文献２～３参照。）。この問題を解消するために、我々のグループは野生型ザルコシンオキシダーゼを蛋白質工学的に改変し、プロリンに対する作用性を低下させたザルコシンオキシダーゼを報告した（例えば、特許文献９参照。）が、本来の基質であるザルコシンに対する作用性等については不明であり、更なる改良が望まれていた。

本発明は、プロリンに対する作用性が低下したザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

【特許文献９】特開平１０－２４８５７２号公報
【非特許文献２】「臨床化学」，１９９１年，　２０巻，ｐ．１４４－１５２
【非特許文献３】「生物試料分析」，１９９４年，１７巻，ｐ．３３２－３３７

【課題を解決するための手段】
【０００５】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、ザルコシンに対する作用性を損なわずに、プロリンに対する作用性が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼを造成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【０００６】

すなわち、本発明は以下のような構成から成る。

［項１］配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の３２２位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。
［項２］項１に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。
［項３］項２に記載の遺伝子を含むベクター。
［項４］項３に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
［項５］項４に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。
［項６］項１に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。
［項７］項１に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

【発明の効果】
【０００７】

本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変し、プロリンに対する作用性が低減した改変型ザルコシンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、臨床的に筋疾患，腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン，クレアチニンの測定用酵素として使用することで、プロリンの影響を受けにくい、正確なクレアチン，クレアチニン測定が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】
【０００８】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、臨床検査分野におけるクレアチン、クレアチニンの分析に有用である。

【０００９】

本願発明の一実施態様は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも１個のアミノ酸を付加、欠失挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、且つＬ－プロリンに対する作用性が変換前に比べて低下していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【００１０】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対する反応性が改変前に比べて低下していることを特徴とする。ここでプロリンに対する反応性とは、本来の基質であるザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比を意味する。そして、プロリンに対する反応性が低下していれば、ザルコシンを基質とした際の比活性は、変化していても本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼに包含される。また、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼのザルコシンに対するＫｍ値は変化す

ることがあっても良いが、クレアチニンやクレアチンの測定試薬に適応する場合、反応性の低下を引き起こす原因となるので、好ましくは改変前の３倍以内、更に好ましくは１．５倍以内である。

【００１１】

本発明の改変に使用するザルコシンオキシダーゼは特に限定されるものではなく、例えば公知のバチルス属やシュードモナス属、コリネバクテリウム属等に由来するザルコシンオキシダーゼを用いることができる。

【００１２】

本発明では一例として、アースロバクター・エスピーＴＥ１８２６（微工研菌寄第１０６３７号）のザルコシンオキシダーゼを用いた（例えば、特許文献１０参照。）。本発明者らのグループは、既に、アースロバクター・エスピーＴＥ１８２６より抽出した染色体ＤＮＡよりザルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのＤＮＡの全構造を決定し（例えば、非特許文献４参照。）、本ザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なザルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている（例えば、特許文献１１参照。）。アースロバクター・エスピーＴＥ１８２６のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列表の配列番号１に示す。また、これらのアミノ配列をコードするＤＮＡ配列を、配列表の配列番号２に示す。但し、本発明は配列配列番号１に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼを改変したものに限定されるものでなく、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を改変したものであってもよい。他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質の好適な例として、配列配列番号１に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼと立体構造が類似したザルコシンオキシダーゼ、具体的にはアミノ酸配列の相同性が５０％以上である、更に好ましくはアミノ酸配列の相同性が８０％以上である、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が挙げられる。これはアミノ酸配列において５０％若しくは８０％以上の相同性を有し、同じ触媒活性を示す酵素蛋白質の場合、基質特異性に関与するアミノ酸残基や反応メカニズムが同じである場合が多いことを根拠とする。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、酵素活性が損なわれない範囲で、更に少なくとも１つのアミノ酸を付加、欠失、挿入させたものであっても良い。具体例には、ザルコシンオキシダーゼの精製を簡素化するためにアミノ酸配列のＮ末端側、又はＣ末端側にヒスチジンタグを付加したものが例示される（例えば、非特許文献５参照）。

【００１３】

【特許文献１０】特開平２－２６５４７８号公報

【特許文献１１】特開平６－１１３８４０号公報

【非特許文献４】「Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｆｅｒｍｅｎｔａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ」，１９９３年，７５巻４号，ｐ．２３９－２４４

【非特許文献５】「実験医学」，２００２年，２０巻，ｐ４７９－４８２

【００１４】

本願発明の別の実施態様は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列を有する改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【００１５】

本願発明の別の実施態様は、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメイン、および触媒ドメインとＦＡＤ結合ドメインの連結部位を構成する領域の少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列と相同性を有し、Ｘ線結晶解析により立体構造が明らかにされているザルコシンオキシダーゼより、配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の８２位～１５２位、２１６位～３２８位がザルコシンオキシダーゼの触媒ドメイン、および触媒ドメインとＦＡＤ結合ドメインの連結部位を構成すると推察される（例えば、非特許文献６参照）。

【００１６】

好ましくは、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインとＦＡＤ結合ドメインの連結部位

、およびこれに近接する触媒ドメインのβシート構造を構成する領域の少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてされている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の８２位～９７位、３１３位～３２８位がザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインとＦＡＤ結合ドメインの連結部位、およびこれに近接する触媒ドメインのβシート構造を構成すると推察される（例えば、非特許文献６参照）。

【００１７】

【非特許文献６】「Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ」，１９９９年，　７巻３号，ｐ．３３１－３４５

【００１８】

本願発明の別の実施態様は、配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の８９位、９４位、３２２位からなる群より選ばれる少なくとも１つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【００１９】

中でも好ましくは、配列表の配列番号１に記載されるアミノ酸配列の８９位のリジンがアルギニンに、９４位のバリンがグリシンに、あるいは、３２２位のリジンがアルギニンに置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

【００２０】

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、さらには、該形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法である。

【００２１】

本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼの製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するＤＮＡの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するＤＮＡが作成される。ＤＮＡ中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット（ＴｒａｎｓｆｏｒｍｅｒＭｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ；Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ製，ＥＸＯＩＩＩ／Ｍｕｎｇ　Ｂｅａｎ　Ｄｅｌｅｔｉｏｎ　Ｋｉｔ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製，ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　Ｓｉｔｅ　Ｄｉｒｅｃｔｅｄ　Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　Ｋｉｔ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製など）の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ）の利用が挙げられる。

【００２２】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するＤＮＡは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリー（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）を宿主微生物とする場合にはｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ，ｐＵＣ１８などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリー　Ｗ３１１０、エシェリヒア・コリーＣ６００、エシェリヒア・コリーＪＭ１０９、エシェリヒア・コリーＤＨ５αなどが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えＤＮＡの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル（例えば、コンピテントハイＪＭ１０９；東洋紡績製）を用いても良い。

【００２３】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行

うが、工業的には通気撹拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。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、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。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。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは２０～４２℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は６～４８時間程度である。培地ｐＨは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはｐＨ６．０～９．０程度である。

【００２４】

培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、濾過，遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてＥＤＴＡ等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【００２５】

この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、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により、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【００２６】

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬である。本願発明のクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬は、Ｌ－プロリンに対する作用を低下させた改変型ザルコシンオキシダーゼを用いることにより、プロリンの影響度が７％未満、好ましくは５％未満に抑えられている。

【００２７】

本発明のクレアチン測定試薬は、上記プロリンに対する反応が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。また、クレアチニン測定試薬は、上記プロリンに対する反応が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。過酸化水素検出試薬とは、改変型ザルコシンオキシダーゼにより生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で、生成色素として測定する試薬であり、酸化系発色試薬及び必要に応じて４－アミノアンチピリンや３－メチル－２－ベンゾチアゾリノンなどのカップラーである。本発明の過酸化水素測定試薬は、各種の市販のものなどを用いることができるが、特に限定されるものではない。更に上記のクレアチンまたはクレアチニン測定試薬は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖類、有機酸などを安定化剤として使用することもできる。試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加してもよい。また通常、適当な緩衝液と共に使用される。緩衝液の種類、濃度およびｐＨは、各試薬成分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数が選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時のｐＨとしては５．０～１０．０の範囲で使用されることが好ましい。

【００２８】
本発明において、ザルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下の条件で行う。
＜試薬＞
１００ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）（２００ｍＭ ザルコシンおよび０．１％トリトンＸ－１００を含む）
０．１％ ４－アミノアンチピリン
０．１％ フェノール
２５Ｕ／ｍｌ ペルオキシダーゼ
＜測定条件＞
上記トリス塩酸緩衝液、４－アミノアンチピリン溶液、フェノール溶液、ペルオキシダーゼ溶液を５：１：２：２の比率で混合し反応混液を調製する。反応混液１ｍｌを試験管に採り、３７℃で約５分間中予備加温した後、酵素溶液０．０５ｍｌを添加し、反応を開始させる。３７℃で正確に１０分間反応させた後、０．２５％ＳＤＳ水溶液２．０ｍｌを加えて反応を停止させ、この液の５００ｎｍの吸光度を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様の操作で吸光度を測定する。上記条件下で１分間に１マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を１単位とする。また、プロリンに対する反応性は、上記試薬中のザルコシンを同じ濃度のＬ－プロリンに置き換えた場合の活性の相対比として測定した。
【実施例】
【００２９】
以下、本発明を実施例により具体的に説明する。
しかし、本発明はこれらに限定されるものではない。たとえば、後述の実施例３で示された９種類の改変型ザルコシンオキシダーゼのうち、ＳＡＯＭ１は、配列表・配列番号１に記載されたアミノ酸配列の８９位のリジンがアルギニンに置換された変異体であるが、該変異体の性能に実質的な影響を与えない範囲で、さらに、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ていてもさしつかえない。ＳＡＯＭ１以外の変異体についても同様である。
実施例１ ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミドの構築
アースロバクター・エスピーＴＥ１８２６由来ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミドｐＳＡＯＥＰ３は、特開平７－１６３３４１記載の方法に従って構築した。本発現プラスミドは、ＰＵＣ１８のマルチクローニングサイトに、ＴＥ１８２６のザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子を含む約１．７Ｋｂｐの挿入ＤＮＡ断片を含む。その塩基配列を配列表の配列番号２に、また該塩基配列から推定されるザルコシンオキシダーゼアミノ酸配列を配列表の配列番号１に示す。
【００３０】
実施例２ 改変型ザルコシンオキシダーゼ遺伝子の作製
ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む発現プラスミドｐＳＡＯＥＰ３と、配列表の配列番号３記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅＴＭ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ製）を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ１）を取得した。
ｐＳＡＯＥＰ３と、配列表の配列番号４記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅＴＭ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ製）を用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の９４番目のバリンがグリシンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ２）を取得した。

ｐＳＡＯＥＰ３と、配列表の配列番号５記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の３２２番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ３）を取得した。

ｐＳＡＯＭ２と、配列表の配列番号６記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の９４番目のバリンがグリシン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ４）を取得した。

ｐＳＡＯＭ４と、配列表の配列番号３記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニン、９４番目のバリンがグリシン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ５）を取得した。

ｐＳＡＯＭ５と、配列表の配列番号７記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニン、９４番目のバリンがグリシン、２１３番目のセリンがプロリン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ６）を取得した。

ｐＳＡＯＭ６と、配列表の配列番号８記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニン、９４番目のバリンがグリシン、２０４番目のメチオニンがアラニン、２１３番目のセリンがプロリン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ７）を取得した。

ｐＳＡＯＭ７と、配列表の配列番号９記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニン、９４番目のバリンがグリシン、１６６番目のアスパラギンがリジン、２０４番目のメチオニンがアラニン、２１３番目のセリンがプロリン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ８）を取得した。

ｐＳＡＯＭ８と、配列表の配列番号５記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号１記載のアミノ酸配列の８９番目のリジンがアルギニン、９４番目のバリンがグリシン、１６６番目のアスパラギンがリジン、２０４番目のメチオニンがアラニン、２１３番目のセリンがプロリン、２５０番目のグルタミン酸がグルタミン、３２２番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド（ｐＳＡＯＭ９）を取得した。

【００３１】

実施例３　改変型ザルコシンオキシダーゼの作製

ｐＳＡＯＭ１、ｐＳＡＯＭ２、ｐＳＡＯＭ３、ｐＳＡＯＭ４、ｐＳＡＯＭ５、ｐＳＡＯＭ６、ｐＳＡＯＭ７、ｐＳＡＯＭ８、ｐＳＡＯＭ９の各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーＪＭ１０９のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

４００ｍｌのＴｅｒｒｉｆｉｃ　ｂｒｏｔｈを２Ｌ容坂口フラスコに分注し、１２１℃、２０分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを１００μｌ／ｍｌになるように添加した。この培地に１００μｌ／ｍｌのアンピシリンを含むＬＢ培地で予め３０℃、１６時間培養したエシェリヒアコリーＪＭ１０９（ｐＳＡＯＭ１）の培養液を５ｍｌ接種し、３０℃で２０時間通気攪拌培養した。培養終了時のザルコシンオキシダーゼ活性は、前記活性測定において、培養液１ｍｌ当たり約９．５Ｕ／ｍｌであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁した後、超音波処理により破砕し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸および硫安分画を行い、２０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）で透析した後、ＤＥＡＥセファロースＣＬ－６Ｂ（アマシャムバイオサイエンス製）、更に熱処理により分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ的にほぼ単一なバンドを示した。また、この変異体をＳＡＯＭ１と命名した。

ｐＳＡＯＭ２、ｐＳＡＯＭ３、ｐＳＡＯＭ４、ｐＳＡＯＭ５、ｐＳＡＯＭ６、ｐＳＡＯＭ７、ｐＳＡＯＭ８、ｐＳＡＯＭ９の各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーＪＭ１０９形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれＳＡＯＭ２、ＳＡＯＭ３、ＳＡＯＭ４、ＳＡＯＭ５、ＳＡＯＭ６、ＳＡＯＭ７、ＳＡＯＭ８、ＳＡＯＭ９と命名した。

【００３２】

比較例１　野生型ザルコシンオキシダーゼの作製

比較例として、ｐＳＡＯＥＰ３によるエシェリヒアコリーＪＭ１０９形質転換体について、上記方法と同様にして、改変前の精製酵素標品を取得した。

【００３３】

実施例４　改変型ザルコシンオキシダーゼの評価

実施例３および比較例１で取得した各種ザルコシンオキシダーゼについて評価を実施した。

プロリン作用性は、上記活性測定法により、ザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、Ｌ－プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比（％）より求めた。また、ザルコシンおよびＬ－プロリンに対するＫｍ値は、上記活性測定法の基質濃度を変化させて測定した。その結果を表１に示す。表１から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性が、改変前に比べて低下していることが確認された。また、改変型ザルコシンオキシダーゼのザルコシンに対するＫｍ値は、改変前のザルコシンオキシダーゼのＫｍ値と比べてほぼ同程度、若しくは１．５倍以内であった。

【００３４】

【表１】

改変体	変異	プロリン作用性	Ｋｍ値（ザルコシン）
ｐＳＡＯＭ１	Ｋ８９Ｒ	０．７０％	３．４ｍＭ
ｐＳＡＯＭ２	Ｖ９４Ｇ	０．４５％	４．１ｍＭ
ＰＳＡＯＭ３	Ｋ３２２Ｒ	０．４２％	４．７ｍＭ
ｐＳＡＯＭ４	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ	０．５８％	３．４ｍＭ
ｐＳＡＯＭ５	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ８９Ｒ	０．５５％	３．３ｍＭ
ｐＳＡＯＭ６	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	０．５４％	３．５ｍＭ
ｐＳＡＯＭ７	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	０．４１％	３．４ｍＭ
ｐＳＡＯＭ８	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	０．４１％	３．４ｍＭ
ｐＳＡＯＭ９	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ３２２Ｒ	０．２８％	４．４ｍＭ
改変前（コントロール）	－	０．８５％	３．４ｍＭ

【００３５】
実施例６　クレアチニンの測定試薬におけるプロリンの影響
　実施例３および比較例１で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。１０Ｕ／ｍｌザルコシンオキシダーゼ（実施例３および比較例１で調整したもの）、１ｍＭエチレンジアミン四酢酸ニ水素ニナトリウム、５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．１％（Ｗ／Ｖ）トリトンＸ－１００、０．０２％（Ｗ／Ｖ）４－アミノアンチピリン、０．０２％（Ｗ／Ｖ）ＴＯＯＳ（同仁化学研究所製）、１００Ｕ／ｍｌクレアチニンアミドヒドロラーゼ（東洋紡製；ＣＮＨ－２１１）、５０Ｕ／ｍｌクレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡製；ＣＲＨ－２２１）、１０Ｕ／ｍｌペルオキシダーゼ（東洋紡製；ＰＥＯ－３０１）を含む５０ｍＭＰＩＰＥＳ－ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ７．５）３００μｌに、５ｍｇ／ｄｌクレアチニン水溶液１０μｌを加えて、３７℃で５分間反応させ、５４６ｎｍの吸光度変化をＨＩＴＡＣＨＩ７０６０型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチニン水溶液の代わりに１００ｍｇ／ｄｌＬ－プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測定した。プロリンの影響度は、クレアチニンを基質にした際に生じる反応５分間の吸光度増加に対する、Ｌ－プロリンを基質にした際に生じる反応５分間の吸光度増加の相対比（％）より求めた。その結果を表２に示す。表２から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に用いることで、該試薬のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

【００３６】
【表２】

改変体	変異	プロリン影響度
ｐＳＡＯＭ１	Ｋ８９Ｒ	５．７％
ｐＳＡＯＭ２	Ｖ９４Ｇ	３．６％
ＰＳＡＯＭ３	Ｋ３２２Ｒ	３．５％
ｐＳＡＯＭ４	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ	３．８％
ｐＳＡＯＭ５	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ８９Ｒ	３．５％
ｐＳＡＯＭ６	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	３．４％
ｐＳＡＯＭ７	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	３．２％
ｐＳＡＯＭ８	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	３．３％
ｐＳＡＯＭ９	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ３２２Ｒ	１．９％
改変前（コントロール）	－	７．２％

【００３７】
実施例７　クレアチンの測定試薬におけるプロリンの影響
　実施例３および比較例１で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。１０Ｕ／ｍｌザルコシンオキシダーゼ（実施例３および比較例１で調整したもの）、１ｍＭエチレンジアミン四酢酸ニ水素ニナトリウム、５０ｍＭ塩化ナトリウム、０．１％（Ｗ／Ｖ）トリトンＸ－１００、０．０２％

（Ｗ／Ｖ）４－アミノアンチピリン、０．０２％（Ｗ／Ｖ）ＴＯＯＳ（同仁化学研究所製）、５０Ｕ／ｍｌクレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡製；ＣＲＨ－２２１）、１０Ｕ／ｍｌペルオキシダーゼ（東洋紡製；ＰＥＯ－３０１）を含む５０ｍＭＰＩＰＥＳ－ＮａＯＨ緩衝液（ｐＨ７．５）３００μｌに、５ｍｇ／ｄｌクレアチン水溶液１０μｌを加えて、３７℃で５分間反応させ、５４６ｎｍの吸光度変化をＨＩＴＡＣＨＩ７０６０型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチン水溶液の代わりに１００ｍｇ／ｄｌＬ－プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測定した。プロリンの影響度は、クレアチンを基質にした際に生じる反応５分間の吸光度増加に対する、Ｌ－プロリンを基質にした際に生じる反応５分間の吸光度増加の相対比（％）より求めた。その結果を表３に示す。表３から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチン測定試薬に用いることで、該試薬のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

【００３８】
【表３】

改変体	変異	プロリン影響度
ｐＳＡＯＭ１	Ｋ８９Ｒ	５．３％
ｐＳＡＯＭ２	Ｖ９４Ｇ	３．１％
ＰＳＡＯＭ３	Ｋ３２２Ｒ	３．２％
ｐＳＡＯＭ４	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ	３．０％
ｐＳＡＯＭ５	Ｖ９４Ｇ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ８９Ｒ	３．４％
ｐＳＡＯＭ６	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	３．１％
ｐＳＡＯＭ７	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	２．９％
ｐＳＡＯＭ８	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ	３．１％
ｐＳＡＯＭ９	Ｋ８９Ｒ，Ｖ９４Ｇ，Ｎ１６６Ｋ，Ｍ２０４Ａ，Ｓ２１３Ｐ，Ｅ２５０Ｑ，Ｋ３２２Ｒ	１．９％
改変前（コントロール）	－	７．０％

【産業上の利用可能性】
【００３９】
本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変し、プロリンに対する作用性が低減した改変型ザルコシンオキシダーゼを供給することが可能となった。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、臨床的に筋疾患，腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン，クレアチニンの測定用酵素として使用することで、プロリンの影響を受けにくい、正確なクレアチン，クレアチニン測定が可能である。
【配列表】
2009072196000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	A	
G01N	*33/70*	*(2006.01)*	G01N	33/70		

Fターム(参考) 4B050 CC04 DD02 LL05
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ84 QR03 QS28
4B065 AA13Y AA26X AB01 AC14 BA02 CA16