

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4347062号
(P4347062)

(45) 発行日 平成21年10月21日(2009.10.21)

(24) 登録日 平成21年7月24日(2009.7.24)

(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 9/48	(2006.01)	C 1 2 N 9/48	
C 1 2 R 1/69	(2006.01)	C 1 2 N 9/48	
		C 1 2 R 1:69	

請求項の数 7 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2003-573157 (P2003-573157)	(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
(86) (22) 出願日	平成14年3月4日(2002.3.4)	(74) 代理人	100097733 弁理士 北川 治
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/001978	(72) 発明者	一島 英治 東京都世田谷区粕谷三丁目15番17-1 01号
(87) 国際公開番号	W02003/074710	(72) 発明者	李 ▲乗▼魯 東京都八王子市犬目町162番地1
(87) 国際公開日	平成15年9月12日(2003.9.12)	(72) 発明者	平野 賢一 岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内
審査請求日	平成17年1月21日(2005.1.21)		
微生物の受託番号	FERM BP-7913		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示す塩基配列を有するポリヌクレオチド。

【請求項2】

配列番号1に示す塩基配列又はこれと相補的な塩基配列を有するDNA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を有し、プロテアーゼ遺伝子として機能するポリヌクレオチド。

【請求項3】

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項4】

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドにおいて5個以下の任意のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、プロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項5】

請求項2に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項6】

アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 種に属し、請求項3~5のいずれかに記載のポリペプチドを生産する能力を持つ菌株を栄養培地に培養し、培地中に請求項3~5のいずれかに記載のポリペプチドを生成蓄積させ、これを精製採取するポリペプチドの製造方法。

【請求項 7】

前記菌株がアスペルギルス・オリゼー IAM2609 株である請求項 6 に記載のポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規なプロテアーゼの遺伝子機能を有するポリヌクレオチド、かかるプロテアーゼ活性を有するポリペプチド、及びかかるプロテアーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法に関する。

背景技術

従来、ペプチド中の塩基性アミノ酸残基に作用し、そのペプチド結合を加水分解するプロテアーゼには、アルギニン残基、リジン残基の双方に作用する動物由来のトリプシンが知られており、そのプロテアーゼとしての作用が食品分野での蛋白質分解物の製造、工業分野での皮革製造、生絹の処理等に利用されている他、その血液凝固、血圧低下、抗炎症作用は医療分野で利用されている。またアルギニン残基、リジン残基の双方に作用する微生物由来のトリプシン様のプロテアーゼも知られている（特開 2000-116377号）。

しかし、上記のアルギニン残基、リジン残基の双方に作用するプロテアーゼでは基質特異性が広く、蛋白質に作用させると該蛋白質の低分子化を生じ、蛋白質が本来有している乳化性、保水性等の機能性が消失すると言う問題があった。かかる事情から、食品業界においては、ハム、ソーセージや水産練り製品、低アレルギー性の卵製品や豆腐等の製造用途に供される大豆蛋白、小麦蛋白、卵蛋白等の分解物の乳化性、保水性、溶解性、分散性等の機能性を選択的に調節し、当該機能性の多様化を図ることができるプロテアーゼ、即ち蛋白質を極めて限定的に分解して蛋白質の機能性の改善ができる基質特異性の狭いプロテアーゼの開発が要望されている。

一方、例えばアルギニン残基に特異的に作用するプロテアーゼとして、人、猿、ハムスター等の動物細胞中に存在するプロテアーゼ（プロプロテイン・コンバーターゼ）が知られているが（Handbook of Proteolytic Enzyme, Academic Press, 1998, p349-368）、動物由来のプロテアーゼには、動物臓器の供給量に制限があると共に狂牛病等のプリオン病の懸念もあるため、量産性のある微生物に由来する新規なプロテアーゼの開発が強く要望されている。

発明の開示

本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであり、プロテアーゼとしての基質特異性が狭く、量産性のある微生物に由来する新規なポリペプチド、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びプロテアーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法を提供することを課題とする。そこで本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、アスペルギルス（Aspergillus）属由来の菌株が新規なプロテアーゼを生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、第 1 に、配列番号 1 に示す塩基配列を有するポリヌクレオチドを提供する。又、配列番号 1 に示す塩基配列又はこれと相補的な塩基配列を有する DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、プロテアーゼ遺伝子、好ましくはセリンプロテアーゼ遺伝子もしくはシステインプロテアーゼ遺伝子として機能するポリヌクレオチドをも提供する。

上記において「ポリヌクレオチド」とは 1 本鎖又は 2 本鎖の DNA 及び / 又は RNA を言う。「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」とは、公知の適宜なハイブリダイゼーション法において、以下の条件下で一方のポリヌクレオチド（DNA）又は該ポリヌクレオチドの断片に対して他方のポリヌクレオチド（DNA）がハイブリダイズできることを言う。即ち、フィルターに固定化された一方のポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドの断片に対し、0.7 ~ 1 M の NaCl の存在下、所定温度（X °C）下で他方のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ~ 2 倍程度の SSC 溶

10

20

30

40

50

液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用いてX°Cの条件下でフィルターを洗浄した場合に、他方のポリヌクレオチドを同定できることを言う。そして「X°C」とは、少なくとも50°C以上であり、より好ましくは60°C以上であり、更に好ましくは65°C以上である。

本発明は、第2に、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。又、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドにおいて5個以下の任意のアミノ酸残基が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有し、プロテアーゼ活性を示すポリペプチドをも提供する。更に、上記各種のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドをも提供する。

本発明は、第3に、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する菌株を栄養培地に培養し、培地中に上記各種のプロテアーゼ活性を有するポリペプチドを生成蓄積させ、これを精製採取するポリペプチドの製造方法を提供する。前記菌株としてはアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 種に属する菌株が特に好ましく、アスペルギルス・オリゼーIAM2609株がとりわけ好ましい。

10

発明の実施形態

先ず、本発明のポリペプチド（プロテアーゼ）の製造法について説明する。本発明のポリペプチド（以下「本酵素」ともいう。）は、アスペルギルス属に属する菌株を栄養培地で培養し、培地中に本酵素を生成蓄積させ、これを精製採取して得ることができる。アスペルギルス属に属する菌株としては、本酵素生産能を有するものであればいかなる菌株でも使用することができ、これらの菌株の変異株も使用することができる。好ましい菌株としては、アスペルギルス・オリゼー種に属する菌株及びこれらの菌株の変異株が挙げられる。本酵素生産能を有する菌株の具体例としては、例えば、アスペルギルス・オリゼーIAM2609（寄託番号FERM BP-7913として2002年2月25日に経済産業省・工業技術院・生命工学工業技術研究所・特許微生物寄託センターへ国際寄託）菌株が挙げられる。本菌株の菌学的性質は次の通りである。

20

1. 形態

分生子頭：放射状。

分生子柄：粗面、1300～2000×5～10μm。

頂のう：フラスコ形、直径11～22μm、上部1/2～3/4よりフィアライドあるいはメトレを形成。

30

フィアライド：アンプル形、9～18×4～5μm。

メトレ：形成する場合メトレ先端にフィアライドを形成、6～12×4～6μm。

分生子：球状～亜球状、滑面～不規則な粗面（光学顕微鏡下）、裂片状～編目状（走査型電子顕微鏡下）、4～8×4～6μm。

2.

生育状態

マルチエキス寒天平板培地：黄色がかった灰色～灰緑色の表面色調である。裏面は黄色がかった灰色である。

40

ツァペックイーストエキス寒天平板培地：黄色がかった灰色～白色の表面色調である。裏面は黄色がかった灰色である。

本菌株は、その集落の色調及び組織、分生子形状構造、分生子の形状及び表面構造等から、アスペルギルス・オリゼー種に分類され、アスペルギルス・オリゼーIAM2609菌株として、東京大学分子細胞生物学研究所IAMカルチャーコレクションにおいて分譲可能なように保存され、何人も容易に入手することができる。

次に、アスペルギルス属菌の培養法としては、液体培養法、固体培養法のいずれも使用することができる。固体培養法の場合、培地としては、通常は小麦ふすま培地が用いられ、水を小麦ふすま100重量部に対して40～200重量部、好ましくは60～120重量部の割合で添加する。必要ならば、その際の培地添加物として黄粉、大豆粉等の有機窒素

50

源或いは硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素源を添加することができる。培養条件としては、20～40℃、好ましくは25～37℃で、24～120時間培養を行い、培養後得られたふすま麹より水又はpH5～8の緩衝液を用いて抽出し、遠心分離、ろ過等により、本酵素（プロテアーゼ）を含む抽出液（以下「粗酵素液」ともいう。）を得る。

液体培養法の場合、培地としては、当該菌株が良好に生育し、本酵素を順調に生産するために必要な炭素源、窒素源、無機塩類、必要な栄養源等を含有する合成培地または天然培地があげられる。例えば、炭素源としては、澱粉またはその組成画分、焙焼デキストリン、加工澱粉、澱粉誘導体、物理処理澱粉及びβ-澱粉等の炭水化物が使用できる。具体例としては、可溶性澱粉、トウモロコシ澱粉、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、デキストリン、アミロペクチン、アミロース等があげられる。

10

窒素源としては、ポリペプトン、カゼイン、肉エキス、酵母エキス、コーンステーパーリカー又は大豆もしくは大豆粕などの抽出物等の有機窒素源物質、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機塩窒素化合物、グルタミン酸等のアミノ酸類が挙げられる。

そして、無機塩類としては、リン酸1カリウム、リン酸2カリウム等のリン酸塩、硫酸マグネシウム等のマグネシウム塩、塩化カルシウム等のカルシウム塩、炭酸ナトリウム等のナトリウム塩等が用いられる。

培養は振盪培養、通気攪拌培養等の好氣的条件下で培地をpH4～10、好ましくはpH5～8に調製し、20～40℃、好ましくは25～37℃で、24～96時間培養する。培養後菌体を遠心分離、ろ過等により除去し、粗酵素液を得る。

20

次に、上記の固体培養法及び液体培養法により得られた粗酵素液からの本酵素の精製には、酵素の精製に用いられる通常の方法、即ち、硫酸塩析法、アルコール分画法、各種クロマトグラフィー（イオン交換樹脂、疎水クロマト用樹脂、アフィニティクロマト用樹脂、ゲルろ過用樹脂等によるクロマトグラフィー）等による精製法を適宜組み合わせ用いることができ、該精製法により高純度の本酵素を得ることができる。

更に、本酵素は、該酵素を夾雑物として含む市販の酵素製剤から上記精製法により得ることができる。市販の酵素剤としては、アスペルギルス・オリゼー種の微生物から製造されたプロテアーゼ「アマノ」A（天野エンザイム株式会社製）、プロテアーゼ「アマノ」M（天野エンザイム株式会社製）等を用いることができる。該市販の酵素製剤からの本酵素の精製は、該市販の酵素製剤をpH4～pH7の緩衝液に溶解後、酵素の精製に用いられる通常の方法、即ち、硫酸塩析法、アルコール分画法、各種クロマトグラフィー（イオン交換樹脂、疎水クロマト用樹脂、アフィニティクロマト用樹脂、ゲル濾過用樹脂等によるクロマトグラフィー）による精製法等を適宜組み合わせることにより行うことができ、これにより高純度の本酵素を得ることができる。

30

実施例

〔実施例1：アスペルギルス・オリゼーIAM2609による本酵素の培養〕

ポテトデキストロス寒天培地（極東製薬製）に30℃、5日間培養したアスペルギルス・オリゼーIAM2609を、滅菌した8gの小麦ふすま懸濁液100mL（pH5.6）を入れた培養フラスコに接種し、30℃、40時間、140rpmの条件下振盪培養し、種培養とした。

40

これを小麦ふすま1000gに900mL（900g）の水を散水し、殺菌した培地に全量接種し、30℃にて68時間、静置培養して本酵素を産生させた。培養後、水4200mLを加え、産生した酵素を抽出し、粗酵素液3000mLを得た。

〔実施例2（実施例1の粗酵素液からの本酵素の精製）〕

実施例1で得た粗酵素液を分画分子量6000の限外ろ過膜で300mLまで濃縮し、冷エタノール1200mLを添加し粗酵素沈殿物を得た。該粗酵素沈殿物を遠心分離により分取後真空乾燥し、60gの粗酵素粉末を得た。この粗酵素粉末の本酵素活性はキログラム当たり19.1nkatであった。得られた粗酵素粉末60gを緩衝液（10mmol/Lのクエン酸緩衝液、pH5.0）200mLに溶解後、硫酸アンモニウム分画（50%飽和）を行った。沈殿物を4℃、6000×gの条件で30分間遠心分離を行い、上

50

清をフェニールトヨパール650MM(東ソー株式会社製)に添加し、吸着した蛋白を硫酸アンモニウム濃度1.4モル~0モルのリニアグラジエントで溶出した。溶出した酵素活性画分を回収し、アルギニン-セファロース4B(アマジャム・ファルマシア社製)に添加し、0.1モル~0.3モルの食塩濃度でリニアグラジエント溶出を行い、酵素活性画分を回収した。この酵素溶液をUF膜(ミリポア社製)で濃縮を行い、次いでスーパーロース6(アマジャム・ファルマシアバイオテク社製)に添加し、活性画分を回収し精製酵素液(以下「本酵素液」ともいう。)を得た。精製酵素の活性は28.8(mkat/kg蛋白質)であった。収率は0.9%であり、純度は510倍に増加した。

酵素活性測定法(Z-アルギニル-アルギニンMCA法)

50mmol/L濃度のクエン酸緩衝液(pH4.0)0.945mLに0.05mLの酵素液を加え、30で10分間加温する。これに10mmol/L濃度のZ-アルギニル-アルギニンMCA(Z-アルギニル-アルギニンと7-アミノ-4-メチルクマリントの脱水縮合体)溶液を0.005mL添加し酵素反応を開始する。蛍光光度計を用いて、本酵素による加水分解により遊離される7-アミノ-4-メチルクマリ(以下、「AMC」という。)量を励起波長360nm、蛍光波長440nmで蛍光強度の増加を経時的に測定する。上記反応条件下、1秒間あたり1モルのAMCを遊離させる本酵素量を1katal(kat)とした。

〔実施例3:市販酵素剤からの本酵素の精製〕

市販酵素剤のプロテアーゼM「アマノ」(天野エンザイム株式会社製)20gを緩衝液(10mmol/Lのクエン酸緩衝液、pH5.0)200mLに溶解後、硫酸アンモニウム分画(50%飽和)を行った。沈殿物を4、6000xgの条件で30分間遠心分離を行い、上清をフェニールトヨパール650M(東ソー株式会社製)に添加し、吸着した蛋白を硫酸アンモニウム濃度1.4モル~0モルのリニアグラジエントで溶出した。溶出した酵素活性画分を回収し、アルギニン-セファロース4B(アマジャム・ファルマシア社製)に添加し、0.1モル~0.3モルの食塩濃度でリニアグラジエント溶出を行い、酵素活性画分を回収した。この酵素溶液をUF膜(ミリポア社製)で濃縮を行い、次いでスーパーロース6(アマジャム・ファルマシア社製)に添加し、活性画分を回収し本酵素液を得た。本酵素の活性は29.8(mkat/kg蛋白質)であった。収率は0.4%であり、純度は106倍に増加した。本酵素は糖鎖が結合した糖蛋白質であるので、糖鎖をN-グリカナーゼ(ロシュ・ダイアグノスティックス製)で分解した後に、蛋白質部分のみをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、図1の(3)のように、単一なバンドであり、分子量は61300であった。

〔実施例4:本酵素の理化学的性質〕

(1)作用・基質特異性

表1に示したペプチド研究所製の各合成基質を用いて、実施例3で得られた本酵素の基質特異性を測定した。即ち、50mmol/L(pH4.0、クエン酸緩衝液)0.945mLと本酵素液0.05mLを混合後、10mmol/L濃度の各合成基質液(50mmol/L、pH4.0、クエン酸緩衝液)を0.005mL添加し、酵素反応を開始する。蛍光光度計を用いて、本酵素による加水分解により遊離されるAMC量を励起波長360nm、蛍光波長440nmで蛍光強度の増加を経時的に測定し活性を算出した。Z-アルギニル-アルギニンMCAに対する活性を100%として、相対値で表した。その結果、表1に示すように、本酵素はMCAに隣接するアミノ酸残基(以下「P1アミノ酸残基」という。)のうちで、ペプチド結合を1個有するペプチドであるArg-MCA、Lys-MCA、Leu-MCA、Phe-MCA、Ala-MCA、Met-MCA、Pyr-MCAの各P1アミノ酸残基には作用しなかった。

また、ペプチド結合を2個以上有するペプチドのうち、P1アミノ酸残基が酸性アミノ酸のアスパラギン酸残基であるAc-Tyr-Val-Ala-Asp-MCA、Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA、グルタミン酸残基であるZ-Leu-Leu-Glu-MCA、P1アミノ酸残基が中性アミノ酸のグリシン残基であるZ-Leu-Arg-Gly-Gly-MCA、チロシン残基であるSuc-Leu-Leu-Val

10

20

30

40

50

- Tyr - MCA、ロイシン残基である Z - Leu - Leu - Leu - MCA、フェニールアラニン残基である Suc - Ala - Ala - Pro - Phe - MCA、アラニン残基である Suc - Ala - Pro - Ala - MCA、Suc - Ala - Ala - Ala - MCAにも本酵素は作用しなかった。

さらに、ペプチド結合を2個以上有するペプチドのうち、P1アミノ酸残基が塩基性アミノ酸のプロリン残基である Gly - Pro - MCA、Suc - Gly - Pro - Leu - Gly - Pro - MCA、トリプトファン残基である Suc - Ile - Ile - Trp - MCAに本酵素は作用を示さなかった。また、塩基性アミノ酸残基がリジン残基である Boc - Glu - Lys - Lys - MCAについては、本酵素は、僅かな相対活性で作用を示したものの、Boc - Val - Leu - Lys - MCAについては、作用を示さなかった。

10

一方、ペプチド結合を2個以上有するペプチドのうち、P1アミノ酸残基が塩基性アミノ酸のアルギニン残基である Boc - Leu - Arg - Arg - MCA、Z - Arg - Arg - MCA、Boc - Gly - Arg - Arg - MCA、Boc - Gln - Arg - Arg - MCA、Pyr - Gly - Arg - MCA、Boc - Gly - Lys - Arg - MCA、Boc - Leu - Lys - Arg - MCA、Boc - Gln - Gly - Arg - MCA、Boc - Leu - Gly - Arg - MCA、Boc - Ile - Glu - Gly - Arg - MCA、Boc - Leu - Ser - Thr - Arg - MCA、Boc - Leu - Thr - Arg - MCA、Z - Phe - Arg - MCA、Boc - Ala - Gly - Pro - Arg - MCA、Boc - Val - Pro - Arg - MCA、Boc - Asp (OBzl) - Pro - Arg - MCA、Boc - Phe - Ser - Arg - MCA、Boc - Glu - (OBzl) - Ala - Arg - MCAについては、本酵素は幅広い相対活性で作用し、該アルギニン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解した。

20

以上のように、本酵素は、ペプチド結合を2個以上有するペプチドであってP1アミノ酸残基が塩基性アミノ酸のアルギニン残基であるペプチドに対し作用し、ペプチド結合を1個有するペプチドには作用せず、またペプチド結合を2個以上有するペプチドであってP1アミノ酸残基が中性、酸性及びアルギニン以外の塩基性アミノ酸残基であるペプチドに対しては、リジン残基に対して僅かに作用したことを除き、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、チロシン、アラニン、プロリン、ロイシン、フェニールアラニン、トリプトファンの各アミノ酸残基を切断しないことから、アルギニンに対して極めて高い加水分解特異性を有していることが明らかになった。

30

【表1】

合成基質に対する基質特異性

合成基質	相対活性 (%)
Arg-MCA	0
Boc-Leu-Arg-Arg-MCA	4
Z-Arg-Arg-MCA	5
Boc-Gly-Arg-Arg-MCA	3
Boc-Gln-Arg-Arg-MCA	3
Pyr-Gly-Arg-MCA	3
Boc-Gly-Lys-Arg-MCA	28
Boc-Leu-Lys-Arg-MCA	33
Boc-Gln-Gly-Arg-MCA	5
Boc-Leu-Gly-Arg-MCA	16
Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA	4
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA	32
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	26
Z-Phe-Arg-MCA	14
Boc-Ala-Gly-Pro-Arg-MCA	25
Boc-Val-Pro-Arg-MCA	30
Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-MCA	83
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA	100
Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-MCA	65
Lys-MCA	0
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA	2
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	0
Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-MCA	0
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA	0
Z-Leu-Leu-Glu-MCA	0
Z-Leu-Arg-Gly-Gly-MCA	0
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0
Suc-Ala-Pro-Ala-MCA	0
Suc-Ala-Ala-Ala-MCA	0
Gly-Pro-MCA	0
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	0
Leu-MCA	0
Z-Leu-Leu-Leu-MCA	0
Phe-MCA	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0
Suc-Ile-Ile-Trp-MCA	0
Ala-MCA	0
Met-MCA	0
Pyr-MCA	0

表1中の用語について、以下に説明する。

MCA : 4-メチルクマリンアミド(4-メチル-7-アミノクマリンとの脱水縮合体)

Boc : t-ブチロキシカルボニル

Z : ベンジルオキシカルボニル

Pyr : ピログルタミル

OBzl : ベンジルオキシ

10

20

30

40

50

A c : アセチル
S u c : サクシニル

(2) 至適 pH

pH 2 ~ 4 の 50 mmol / L クエン酸緩衝液、pH 5 の 50 mmol / L 酢酸緩衝液、pH 6 ~ 8 の 50 mmol / L リン酸緩衝液、pH 9 ~ 10 の 50 mmol / L トリス緩衝液のそれぞれ 0.945 mL に本酵素液の 0.05 mL を混合後、10 mmol / L 濃度の各合成基質液 (50 mmol / L、pH 4.0、クエン酸緩衝液) を 0.005 mL 添加し、酵素反応を開始する。蛍光光度計を用いて、本酵素による加水分解により遊離される AMC 量を励起波長 360 nm、蛍光波長 440 nm で蛍光強度の増加を経時的に測定し活性を算出した。最も活性の高い所を 100% として、各 pH で相対活性を算出し至適 pH を求めた。図 2 に示すように、至適 pH は pH 4 を中心に存在していることから、該至適 pH を約 4 とした。

10

(3) pH 安定性

pH 2 ~ 4 の 10 mmol / L クエン酸緩衝液、pH 5 の 10 mmol / L 酢酸緩衝液、pH 6 ~ 8 の 10 mmol / L リン酸緩衝液、pH 9 の 10 mmol / L トリス緩衝液に溶解した本酵素液を 30 に 30 分間放置後、pH を 4.0 にし酵素活性を測定した。その結果、図 3 に示すように pH 3 ~ 6 の範囲で元の活性の 90% 以上を維持していた。従って、本酵素は少なくとも pH 3 ~ 6 の範囲で安定である。

(4) 温度安定性

pH 4 の 50 mmol / L クエン酸緩衝液に溶解した本酵素液を 10 ~ 70 に 10 分間放置した後、酵素活性を測定した。その結果、図 4 に示すように、40 以下の温度において元の活性の 70% 以上を維持していた。従って、本酵素は 40 以下で安定である。

20

(5) 阻害剤

阻害剤として、シグマアルドリッチジャパン株式会社製のセリンプロテアーゼ阻害剤であるフェニルメタンスルホニルフルオリド、o-フェナンスロリン、ロイペプチン、アンチパイン、システインプロテアーゼ阻害剤である p-クロロマーキュリー安息香酸、N-エチルマレイミド、ロイペプチン、アンチパイン及び金属プロテアーゼ阻害剤であるエチレンジアミン四酢酸を用いて検討を行った。なお、阻害剤の濃度は表 2 に示した各濃度の条件下で行った。30 で 30 分間放置後に酵素活性を測定した。その結果、表 2 に示すように、ロイペプチン及びアンチパインにより、酵素活性が阻害されたことから、本酵素はセリンプロテアーゼ又はシステインプロテアーゼと示唆された。

30

【表 2】

各種阻害剤の影響

阻害剤	濃度 mmol/L	相対活性 %
無添加	0	100
フェニルメタンスルホニルフルオリド	1	100
o-フェナンスロリン	2	100
p-クロロマーキュリー安息香酸	1	73
N-エチルマレイミド	5	51
ロイペプチン	0.1	0
アンチパイン	0.01	0
エチレンジアミン四酢酸	5	100

40

(6) 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法に準じて行った。標準蛋白質 (括弧内に分子量を示す。) としては、ニューイングランドバイオラボ社製のマ

50

ルトースバインディングプロテインヒューズドベーターガラクトシダーゼ(158000)、ベーターガラクトシダーゼ(116000)、ホスフォリラーゼb(97200)、牛血清アルブミン(66400)、グルタミン酸脱水素酵素(55600)、マルトースバインディングプロテイン(42700)、乳酸脱水素酵素(36500)、トリオースホスフェートイソメラーゼ(26600)を使用し、ゲル染色は、Coomassie Brilliant Blue R-250(ファルマシアLKB製)を用いたCBB染色で行った。電気泳動図を図1に示した。その結果、本酵素は図1の(2)に示したように、約70000から100000の広い分子量を示していた。本酵素は糖鎖が結合した糖蛋白質であるので、糖鎖をN-グリカナーゼ(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)で分解した後に蛋白質部分のみを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、図1の(3)に示したように、単一なバンドであり、分子量は61300であった。

10

〔実施例5：本酵素のゲノムDNA取得〕

1) 部分アミノ酸配列決定

アミノ酸配列の決定は島津製作所(SHIMADZU)のプロテインシーケンサーPPSQ-23を用いた。本酵素のN末端配列はGLN(T)VTNTDQLITPEXIRALYKIPSAAXAAPであった。内部配列はピリジルエチル化した本酵素をリジルエンドペプチダーゼ処理により断片化した後、本酵素のペプチド断片をHPLCにより分離し、配列を決めた。内部配列はXHNPYPYXYXGAXNLであった。Xは特定されなかったアミノ酸を示す。

2) プローブ作製

N末端配列の中NTDQLITPの配列をベースにセンスプライマーao-N(5'-AA YACIGAYCARYTIATHACNCC-3')を作製した。また、内部配列NPPYPY Yをベースにアンチセンスプライマーao-C1(5'-RTARTAI GGRTAIGGNGGRTT-3')を作製した。(ここでYはTかC, Iはイノシン酸、RはAかG, HはTかCかA, NはAかCかTかGを示す)。プライマーao-N及びao-C1を用い、アスペルギルス・オリゼーIAM2609のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCR反応はTOYOBOのKOD DNAポリメラーゼを用い、95で3分間DNAを変性した後、94で0.5分間、55で0.5分間、68で2分間を25サイクル行った。その結果、1.1kbのDNA断片が増幅したので、このDNA断片をpBluescript I IKS-のEcoRV部位へサブクローニングし塩基配列を決定した。塩基配列から予想されるアミノ酸配列はao-Nプライマー配列の後に続いてN末端アミノ酸配列ECIRALYKIPSAARAAPをコードしていたので、このDNA断片は目的のものと判断し、DNAクローニングの際にプローブとして用いた。

20

30

3) ライブラリー作製

アスペルギルス・オリゼーIAM2609のゲノムDNAをSau3AIで部分分解し、約15kbのDNA断片を得た。ベクターとしてはTOYOBOのDASH I Iを用いBamHI部位へDNA断片をライゲーションした。このライゲートをGigapack I I I Gold in vitro packaging Kitによりパッケージングし、宿主大腸菌XL1-Blue MRA(P2)を用いて1回増幅した。

40

4) クローニング

ブランクハイブリダイゼーションにより陽性クローンを得た。プローブのラベルはロッシュ(Roche)社製のDIG label systemを用いた。組換えファージDNAから目的のDNA断片を含む4kb XbaI断片をpBluescript I IKS-へサブクローニングし塩基配列の決定に用いた。

5) 塩基配列決定の決定には、日立製作所(HITACHI)のSQ-5500 DNAシーケンサーを用いた。

〔実施例6：本酵素のcDNA取得等〕

1)

本鎖cDNAの作製

50

アスペルギルス・オリゼー IAM2609 の培養菌体から全 RNA を精製した (キアゲン (QIAGEN) 社製の RNeasy Mini Kit 使用)。次にアンカープライマー (5' - GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT - 3') と、AMV 逆転写酵素を用い、全 RNA から 1 本鎖 cDNA を合成した。

2) 2 本鎖 cDNA の作製

PCR 反応により cDNA の増幅を行った。鋳型としては 1 本鎖 cDNA、プライマーは Apa-Spe2 (5' - AATCTCGCATACTAGTTCCACACAATG - 3') とアンカー (5' - GACCACGCGTATCGATGTCGAC - 3') を用いた。PCR 反応は TOYOBO 社製の KOD DNA ポリメラーゼを用い、95 で 3 分間 DNA を変性した後、94 で 0.5 分間、55 で 0.5 分間、68 で 2 分間を 25 サイクル行った。その結果、2.2 kb の DNA 断片が増幅したので、この DNA 断片を pBluescript II KS- の Spe I, Cla I 部位へサブクローニングし塩基配列を決定した。

10

3) 遺伝子配列の解析

ゲノム DNA と cDNA の配列を比較することにより、プロモーター配列及びイントロンを決定した。この遺伝子は 8 個のイントロンを含んでいた。

4) 全アミノ酸配列の決定

cDNA の塩基配列から本酵素の全アミノ酸配列を推定した。この遺伝子は 652 アミノ酸残基をコードしており、成熟タンパク質は 437 アミノ酸からなっていた。

20

〔実施例 7: プラスミノーゲンの活性化〕

1)

プラスミノーゲンの精製

市販 プラスミノーゲン (ROCHE) は安定化のため多量の BSA が入っているので精製を試みた。5 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 に調整された 1 mg/ml プラスミノーゲン 200 μ l を、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Lys-Sepharose 4B (1.0 \times 10 cm) に供し、同緩衝液でよく洗浄する。0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) でさらによく洗浄し、0.2 M α -amino-n-capronic acid にて溶出した。溶出画分を 10 mM MES 緩衝液 (pH 5.4) で透析し、 α -amino-n-capronic acid を除いた。この画分について SDS-PAGE により均一性を確認した。

30

2)

プラスミノーゲンの活性化

精製した プラスミノーゲン 450 μ l に本酵素希釈液 50 μ l を加え混合し、37 で各時間反応させた後、200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 500 μ l を加えることにより本酵素の酵素反応を停止した。これに 10 mM Boc-Val-Leu-Lys-MCA 基質 5 μ l を加え活性化された プラスミンの酵素反応を開始した。基質から遊離される AMC の量を島津製作所製の RF5000 型分光蛍光光度計を用いて、励起波長 360 nm と蛍光波長 440 nm で測定した。プラスミンの活性は 37、pH 7.5 で測定した。その結果、本酵素は 10 分間反応で プラスミノーゲンの活性化を最大にした。その以上の反応では プラスミンの活性が徐々に下がっていたことから、活性化された プラスミンを分解して行くものと考えられた。

40

産業上の利用分野

本発明の新規ポリペプチドは、蛋白質中のアルギニン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を特異的に加水分解するプロテアーゼ活性を示すことから、蛋白質を極めて限定分解して、蛋白質の機能性の改善ができる。具体的には、水に対して溶解性が低い小麦や大豆の蛋白質を分解して、蛋白質の有する乳化性、保水性等の機能性を保持したまま、溶解性を向上させることが挙げられ、ハム、ソーセージや水産練り製品等の増量剤として食品用途で利用され得る。

また、アルギニン残基を活性中心に有する蛋白質を、そのアルギニン残基部位で加水分

50

解することにより、蛋白質を不活性化することができる。具体的には、大豆中の大豆トリプシンインヒビターを分解して不活性化ができ、消化性の良い大豆蛋白質を製造させうる。

さらに、アルギニン残基をアレルギー性の活性中心とする蛋白質を加水分解してアレルギー性を低減させ、低アレルギー性の卵製品、豆腐等の食品製造の用途に利用され得る。このように本発明の新規プロテアーゼは、広く食品用に利用され得る。

また、遺伝子組替えによる蛋白質の機能性の発現にも利用されうる。機能性の蛋白質は、機能性を有しないプロ蛋白質として生産されるが、この蛋白質のアルギニン残基を分解することにより、機能性を有する蛋白質に変換することができる。例えば、プラスミノーゲンをプラスミンに活性化することを例示できる。

(配列表)

S E Q U E N C E L I S T I N G

<110> Amano Enzyme Inc.

<120> ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチドの製造方法

10

<130> IPOK02-002WO

<160> 2

<210> 1

20

<211> 2119

<212> DNA

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 1

aatctcgcat atcaggtcca caca 14

30

atg cga ccc ttg tct cat ctt tct ttt ttc aac ggg ctc ctg ctc ggc 62

Met Arg Pro Leu Ser His Leu Ser Phe Phe Asn Gly Leu Leu Leu Gly

1 5 10 15

ctg tcc gct ctc tcg gct gcg act tca gtt gtc cac gag aga cgt gaa 110

40

Leu Ser Ala Leu Ser Ala Ala Thr Ser Val Val His Glu Arg Arg Glu

20 25 30

gct aca tcc tca aac tgg gtt aag cgg gcg cgt gtg aac cca tcg gac	158	
Ala Thr Ser Ser Asn Trp Val Lys Arg Ala Arg Val Asn Pro Ser Asp		
35 40 45		
aaa cat gtc gtc cgc att ggc tta acc cag agt agt ctc gag gag gct	206	
Lys His Val Val Arg Ile Gly Leu Thr Gln Ser Ser Leu Glu Glu Ala		10
50 55 60		
cat gat tta ctc atg gat gtc tca aat ccg agc tct ccc aat tat gcc	254	
His Asp Leu Leu Met Asp Val Ser Asn Pro Ser Ser Pro Asn Tyr Ala		
65 70 75 80		20
agg ttt tac tcg gca gat gaa gtc gct gca aaa ttc gcg ccg tcg aca	302	
Arg Phe Tyr Ser Ala Asp Glu Val Ala Ala Lys Phe Ala Pro Ser Thr		
85 90 95		
gaa aca gtc aac gag gtt cag aac tgg ctc acc gag aag gga att aat	350	
Glu Thr Val Asn Glu Val Gln Asn Trp Leu Thr Glu Lys Gly Ile Asn		30
100 105 110		
gcc agc cgt gtc gcg cgg acg cag aac cac ggc tgg ctt gta ttc cac	398	
Ala Ser Arg Val Ala Arg Thr Gln Asn His Gly Trp Leu Val Phe His		
115 120 125		40
gcc acg tcg aag gag atc gag aat ttg ttc gac act acg tac tat gag	446	
Ala Thr Ser Lys Glu Ile Glu Asn Leu Phe Asp Thr Thr Tyr Tyr Glu		
130 135 140		

tac cat aat agg aaa act ggc aag aaa gca att gct tgc gaa cag tac	494	
Tyr His Asn Arg Lys Thr Gly Lys Lys Ala Ile Ala Cys Glu Gln Tyr		
145	150	155 160
cat gtc ccg gct tca gtc caa aag cat atc gac tat gtg cat cct ggt	542	
His Val Pro Ala Ser Val Gln Lys His Ile Asp Tyr Val His Pro Gly		10
	165	170 175
gtc aat ctg aac cca tcc tcg ggc aaa ccc tcc agt atc cgt aga agg	590	
Val Asn Leu Asn Pro Ser Ser Gly Lys Pro Ser Ser Ile Arg Arg Arg		
	180	185 190
gca gct gcg agc aag aag acg aag ctc cct gct cgt gga cca cgg cct	638	
Ala Ala Ala Ser Lys Lys Thr Lys Leu Pro Ala Arg Gly Pro Arg Pro		
	195	200 205
att cag caa cac gat gtc aaa ggc ctc aac gtc act aac tgt gat cag	686	
Ile Gln Gln His Asp Val Lys Gly Leu Asn Val Thr Asn Cys Asp Gln		30
	210	215 220
cta atc aca cca gaa tgc att cgg gca ttg tat aag att ccc tca gcg	734	
Leu Ile Thr Pro Glu Cys Ile Arg Ala Leu Tyr Lys Ile Pro Ser Ala		
	225	230 235 240
cgt gcg gcg cct cac ccc aat aac tcg ttg gga att ttc gag gaa ggg	782	
Arg Ala Ala Pro His Pro Asn Asn Ser Leu Gly Ile Phe Glu Glu Gly		
	245	250 255
		40

gac tac tat gcg cag gag gac ctc gac ctt ttc ttc aag aca ttt gcc	830	
Asp Tyr Tyr Ala Gln Glu Asp Leu Asp Leu Phe Phe Lys Thr Phe Ala		
260 265 270		
aag gat att cct cag ggc acc cac cca atc ccc gcc ttc atc gac ggt	878	
Lys Asp Ile Pro Gln Gly Thr His Pro Ile Pro Ala Phe Ile Asp Gly		10
275 280 285		
gcg gag gct cca gtc ccc gtg act aag gcg ggt ggg gag tca gat ctc	926	
Ala Glu Ala Pro Val Pro Val Thr Lys Ala Gly Gly Glu Ser Asp Leu		
290 295 300		20
gat ttc gaa ctg gca tat cca atc gtg cat cct cag agc atc aca ttg	974	
Asp Phe Glu Leu Ala Tyr Pro Ile Val His Pro Gln Ser Ile Thr Leu		
305 310 315 320		
tac cag act gat gat gca aac tgg gcc agc aat acc acg gga ttc ctc	1022	
Tyr Gln Thr Asp Asp Ala Asn Trp Ala Ser Asn Thr Thr Gly Phe Leu		30
325 330 335		
aac act ttc ttg gac gca ctt gat ggc tct tac tgc acc tac tgc gcg	1070	
Asn Thr Phe Leu Asp Ala Leu Asp Gly Ser Tyr Cys Thr Tyr Cys Ala		
340 345 350		40
tat ggt gaa tgt ggc aac gac cct tct ctg gat ccc gtt tat cct gat	1118	
Tyr Gly Glu Cys Gly Asn Asp Pro Ser Leu Asp Pro Val Tyr Pro Asp		
355 360 365		

gac gct ggc tac gat gga cag ctc atg tgt ggc gtg ttt aag ccc act	1166	
Asp Ala Gly Tyr Asp Gly Gln Leu Met Cys Gly Val Phe Lys Pro Thr		
370	375	380
aat gtt atc agt gta tca tac ggc gaa cag gag aat gac ctt ccc gca	1214	
Asn Val Ile Ser Val Ser Tyr Gly Glu Gln Glu Asn Asp Leu Pro Ala		10
385	390	395 400
aat tac caa cag aga caa tgc atg gag ttc ctg aag ctt ggt ttg cag	1262	
Asn Tyr Gln Gln Arg Gln Cys Met Glu Phe Leu Lys Leu Gly Leu Gln		
	405	410 415
gga gtc tcg gta ctc ttt gct tct ggt gat aac ggt gtt gca gga ccc	1310	
Gly Val Ser Val Leu Phe Ala Ser Gly Asp Asn Gly Val Ala Gly Pro		
	420	425 430
cca gga gat ggt aac agc gtt aat ggc tgc ctg aac aat ggg aca gtg	1358	
Pro Gly Asp Gly Asn Ser Val Asn Gly Cys Leu Asn Asn Gly Thr Val		30
	435	440 445
ttc agc cct gca ttc cct aac agc tgc cca tac atc acc aac gtc ggc	1406	
Phe Ser Pro Ala Phe Pro Asn Ser Cys Pro Tyr Ile Thr Asn Val Gly		
	450	455 460
gcc acc aag gtc tac ccg gga tac acc gtt tcc cag ccc gag agt gcc	1454	
Ala Thr Lys Val Tyr Pro Gly Tyr Thr Val Ser Gln Pro Glu Ser Ala		
465	470	475 480
		40

gta tac gat cca gat ggt ttg tac agt tat gct tcg ggt ggt ggc ttc	1502	
Val Tyr Asp Pro Asp Gly Leu Tyr Ser Tyr Ala Ser Gly Gly Gly Phe		
485	490	495
agc aac atc tac ccc atc ccc gat tac cag gcg gaa gcc gtt gcc aca	1550	
Ser Asn Ile Tyr Pro Ile Pro Asp Tyr Gln Ala Glu Ala Val Ala Thr		10
500	505	510
tac ttc aag gac cac aac cct ccc tat cca tac tac gaa ggt gcc gaa	1598	
Tyr Phe Lys Asp His Asn Pro Pro Tyr Pro Tyr Tyr Glu Gly Ala Glu		
515	520	525
		20
aac ctc ggc aag aac ggc ggt ctt tac aat cgc ttg ggg cga gcc tat	1646	
Asn Leu Gly Lys Asn Gly Gly Leu Tyr Asn Arg Leu Gly Arg Gly Tyr		
530	535	540
cca gat gtc gcc gct aat ggc gac aac att gcc gtc ttc aat ggc ggc	1694	
Pro Asp Val Ala Ala Asn Gly Asp Asn Ile Ala Val Phe Asn Gly Gly		30
545	550	555
560		
gag ttc ggt tcg tcc ggt gga aca agt gct agt acc ccg atc ttt get	1742	
Glu Phe Gly Ser Ser Gly Gly Thr Ser Ala Ser Thr Pro Ile Phe Ala		
565	570	575
		40
tcc atc atc aac cgc att atc gac gag cgt cta gcc gtc gga aag ggt	1790	
Ser Ile Ile Asn Arg Ile Ile Asp Glu Arg Leu Ala Val Gly Lys Gly		
580	585	590

ccc gtg ggt ttt atc aac cca gtt ctc tac aag aat ccc tcc gtc ctg 1838

Pro Val Gly Phe Ile Asn Pro Val Leu Tyr Lys Asn Pro Ser Val Leu

595

600

605

aat gat atc acc aat ggt aca aat ccc ggc tgt gga acg gac ggt ttc 1886

Asn Asp Ile Thr Asn Gly Thr Asn Pro Gly Cys Gly Thr Asp Gly Phe

10

610

615

620

tca act gct cct gga tgg gac ccc gcc act ggt ttg gga aca ccg aac 1934

Ser Thr Ala Pro Gly Trp Asp Pro Ala Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asn

625

630

635

640

20

tat cct aag atg ttg aag ttg tgg ctt gat ctg cct tagg cgatttggtg 1982

Tyr Pro Lys Met Leu Lys Leu Trp Leu Asp Leu Pro

645

650

652

gacgctggcg gtaacaatgt caccagaaat acaaggataa gcggagattt gggaatggac 2042

30

cctgatacat agattgacct gtatttatgc ttctcttggt aatattgatt acttcaacga 2102

aaaaaaaaaa aaaaaaa

2119

<210> 2

<211> 3920

<212> DNA

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 2

tctagaacag gaagaccctg ggtttgttc cttgaagaat atcttcaatt ttccccatc	60	10
gaaggcggcc tggatgttat gcgccgaca ttagtagtta atattataga caattcatca	120	
tttgcgagat cagtgttaca atgcatgcta tttattagat attctccatc tccggactcc	180	
ggagcgcata gaacgtagac gtttatcgtc ccgcttcaaa cctccggagt tctcccgacg	240	
gactcggata ccatccccgg ttaatacagc acgtataara tgctgggaca ccccgttggg	300	20
caagcgtttc tcagggggaa gataatcatt tagaaacggt gatcggcccg atcggacca	360	
ggcggcacia ccaggttatg ctactagget gaatattacg cggagcttgt gcctgttaag	420	
cttgagtgcc ctagaaaaac aagctcttag tggttgaaga taggaatcca gggtttccgc	480	
gctattctat ccaagtgggg ccttgcattg tatgccacca tttatctgcc tgggatgcag	540	30
acggccaatt tatgacttcc cgtcttgac atgtattctt gcaacggcct gcaggaagga	600	
caggatacat ggatggatga taagtgtctc tgatattagt gaggcccttg tccgactgag	660	
gtatatctag tcgtagtctt tgcgccccca taacggctct gatcgtcagt aggcggtgca	720	
gacaatttta gattccaat cggacactac cctcaacacc gtctgtcgac tatagtgtaa	780	40
cgttggattt gttgatacca tcactggcca gaaggagta agcaagtcag cttctacgg	840	

ggaacatgga tcctctgcca ctgagacaaa cctcgcaagc agcgactcca caaggcggag	900	
ctccgtcggg aatagcacta aactagccgt aagatataatc gggggccaat tgttacatta	960	
ctatacacca gactaagcca tctataaaga tgtgcagccg tcacgatatt ctogatatga	1020	
ttcttcaggc ttgtctgtct gtggaaatct cgcatatcag gtccacacaa tgcgaccctt	1080	10
gtctcatctt tctttttca acgggctcct gctcggcctg tccgctctct cggctcgcac	1140	
ttcagttgtc cacgagagac gtgaagctac atcctcaaac tgggttaage gggcgcgtgt	1200	
gaacccatcg gacaaacatg togtccgcat tggcttaacc cagagtagtc tcgaggaggc	1260	
tcatgattta ctcatggatg tgtaagtga cggetattgt ttcgcttgtc aaggttatac	1320	20
tccgctctaa cgtgctgtgt gtagctcaaa tccgagctct cccaattatg ccaggtttta	1380	
ctcggcagat gaagtcgctg caaaattcgc gccgtcgaca gaaacagtca acgaggttca	1440	
gaactggctc accgagaagg gaattaatgc cagccgtgtc gcgcggacgc agaaccacgg	1500	30
ctggettgtt ttccacgcca cgtcgaagga gatcgagaat ttgttcgaca ctacgtacta	1560	
tgagtacat aataggaaaa ctggcaagaa agcaattgct tgcgaacagt gagttataca	1620	
ctctactaat ctgtcttagg actcgtgact gagaaatacg caggtacat gtcccggctt	1680	
cagtcaaaa gcatatcgac tatgtgcatc ctgggtgtcaa tctgaaccca tcctcgggca	1740	40
aaccctccag tatccgtaga agggcagctg cgagcaagaa gacgaagctc cctgctcgtg	1800	

gaccacggcc tattcagcaa cacgatgtca aaggcctcaa cgtcactaac tgtgatcagc	1860	
taatcacacc agaatgcatt cgggcattgt ataagattcc ctacagcgcgt ggggcgcctc	1920	
acccaataa ctgcttgga attttcgagg aaggggacta ctatgcgcag gaggacctcg	1980	
accttttctt caagacattt gccaaaggata ttctcaggg caccaccca atccccgct	2040	10
tcacgacgg tgcggaggct ccagtccccg tgactaagge ggtggggag tcagatctcg	2100	
atttgaact ggcatatcca atcgtgcac ctacagacat cacattgtac cagactgatg	2160	
atgcaaactg ggccagcaat accacgggat tcctcaaac tttcttgac gcacttgatg	2220	
gcgtgagttg aaactggatt atcatagtat ctgaactgta tcactaacgt cacgcaatat	2280	20
atagtcttac tgcacctact gcgcgtatgg tgaatgtggc aacgaccctt ctctggatcc	2340	
cgtttatcct gatgacgctg gctacgatgg acagctcatg tgtggcgtgt ttaagcccac	2400	
taatggtatc agtgtatcat acggcgaaca ggagaatgac cttcccgcaa attaccaaca	2460	30
gagacaatgc atggagtagg tcttcgttgc tattatccca tgcatttgcct ccattcaacg	2520	
ctaattcttt ccaggttctt gaagcttggg ttgcagggag tctcggtact ctttcttct	2580	
ggtgataacg gtgttgcagg acccccagga gatggtaaca gcgttaatgg ctgcctgaac	2640	
aatgggacag tgttcagccc tgcattcctt aacaggtgag agacgtccac tgccactcgt	2700	40
aaacttcatg cgctaatgaa tgcagctgcc catacatcac caacgtcggc gccaccaagg	2760	

tctaccoggg ataccacggt tcccagcccg agagtgccgt atacgatcca gatggtttgt	2820	
acagttatgc ttcgggtggt ggcttcagca acatctacce catccccgat taccaggcgg	2880	
aagccgttgc cacgtacgtc ttctgacce tgataataaa cctttaactg acgccgaagg	2940	
cagatacttc aaggaccaca accctccccta tccatactac gaaggtgccg aaaacctcgg	3000	10
caagaacggc ggtctttaca atcgcttggg gcgaggctat ccagatgtcg ccgctaatgg	3060	
cgacaacatt gccgtcttca atggcggcga gttcggttcg tccggtggaa caagtgctag	3120	
tatgttgact ctccacactc ctttcttaat ggatatgcaa gtctgcagct actaaccaga	3180	
tgtttgttct acaggtacce cgatctttgc ttccatcacc aaccgcatta tcgacgagcg	3240	20
tctagccgtc ggaaagggtc ccgtgggttt tatcaacca gttctctaca agaateccctc	3300	
cgctctgaat gatatcacca atggtacaaa tcccggctgt ggaacggacg gtttctcaac	3360	
tgctcctggg taagtattca ttttcgctct gtttcgtggc tagctgctga ctgcggttct	3420	30
ttcagatggg accccgccac tggtttggga acaccgaact atcctaagat gttgaagttg	3480	
tggcttgatc tgccttaggc gatttgttgg acgctggcgg taacaatgtc accagaaata	3540	
caaggataag cggagatttg ggaatggacc ctgatacata gattgacctg tatttatgct	3600	
tctcttgтта atattgatta cttcaacgcg agggcccagg aactgtaggt tcgagcggtg	3660	40
tgcttttccc tcgtggcatt tcaggttgca tgatcagact tcgtcgttgt ctttcatatg	3720	

```

ctccgagtgg gattcatcgc tgcacatctg tttccgcttg agaagtagga cagcgactag 3780

cgcgccttgt aagacaacaa agtggaatta gcaaacatga ccatatgcca gtggccatgt 3840

cgagcgcacc gtgatcgaaa cacacctegt gcacgaaagt ttattcacga tgagcggtag 3900

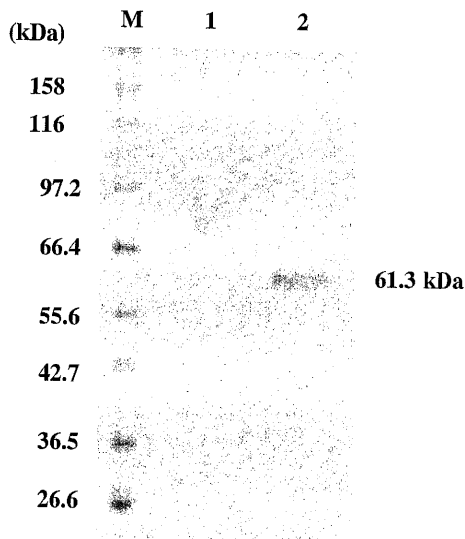
gtttaactca aggttctaga 3920

```

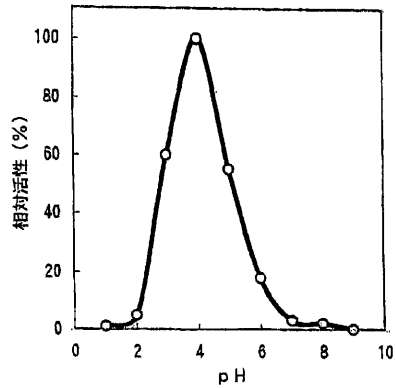
【図面の簡単な説明】

第1図は本発明に係るプロテアーゼのSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。第2図は本発明に係るプロテアーゼのpH特性を示す図である。第3図は本発明に係るプロテアーゼのpH安定性を示す図である。第4図は本発明に係るプロテアーゼの温度安定性を示す図である。

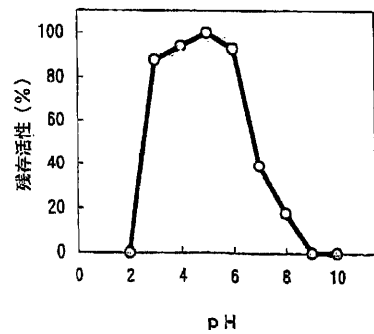
【図1】
第1図



【図2】
第2図

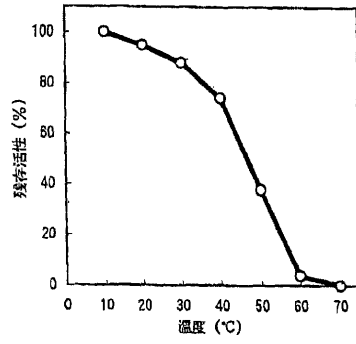


【図3】
第3図



【 図 4 】

第 4 図



フロントページの続き

(72)発明者 安藤 啓一

岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内

審査官 左海 匡子

(56)参考文献 国際公開第00/53725(WO,A1)

特開平10-210967(JP,A)

特開平2-5830(JP,A)

Agric.Biol.Chem.(1984),Vol.48,No.6,p.1533-1538

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 15/09

C12N 9/48

C12R 1/69

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

Science Direct

食品関連文献情報(食ネット)