

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6350519号  
(P6350519)

(45) 発行日 平成30年7月4日(2018.7.4)

(24) 登録日 平成30年6月15日(2018.6.15)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 1 2 N</b>	<b>9/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	9/06	Z N A B
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/26</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/26	
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/42</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	7/42	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/53</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/53	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/15	

請求項の数 19 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-508815 (P2015-508815)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月28日 (2014.3.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/059353  
 (87) 国際公開番号 W02014/157705  
 (87) 国際公開日 平成26年10月2日 (2014.10.2)  
 審査請求日 平成28年11月4日 (2016.11.4)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-73906 (P2013-73906)  
 (32) 優先日 平成25年3月29日 (2013.3.29)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000000066  
 味の素株式会社  
 東京都中央区京橋1丁目15番1号  
 (74) 代理人 100089118  
 弁理士 酒井 宏明  
 (74) 代理人 100113103  
 弁理士 香島 拓也  
 (72) 発明者 小玉 優哉  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社内  
 (72) 発明者 星野 亘  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
 素株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変グリシン酸化酵素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下(1)あるいは(2)のタンパク質である、改変酵素：

(1) 配列番号2のアミノ酸配列において、T T Sモチーフ中の第1のスレオニン、T T Sモチーフ中のセリン、H C Yモチーフ中のシステイン、L R Pモチーフ中のロイシン、G M Lモチーフ中のメチオニン、S Gモチーフ中のセリン、およびP G Tモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基が、下記(i)~(vii)に示されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、タンパク質：

(i) T T Sモチーフ中の第1のスレオニンの置換

アラニン、セリン、システイン、またはグリシン；

(ii) T T Sモチーフ中のセリンの置換

リジン；

(iii) H C Yモチーフ中のシステインの置換

アスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、またはセリン；

(iv) L R Pモチーフ中のロイシンの置換

イソロイシン、バリン、システイン、スレオニン、またはプロリン

(v) G M Lモチーフ中のメチオニンの置換

イソロイシン；

(vi) S Gモチーフ中のセリンの置換

10

20

アルギニン；

(vii) PGTモチーフ中のグリシンの置換  
チロシン、またはグルタミン。

(2) 下記(A)または(B)：

(A) 配列番号2のアミノ酸配列におけるTTSモチーフ中の第1のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基が、上記(i)～(vii)に示されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基の追加変異を有するアミノ酸配列；

(B) 配列番号2のアミノ酸配列におけるTTSモチーフ中の第1のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基が、上記(i)～(vii)に示されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列において、アミノ酸残基の追加変異を有し、かつ、配列番号2のアミノ酸配列に対して90%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列

を含み、かつ、

下記(a)および(b)からなる群より選ばれる1以上の特性が改善されている、タンパク質；

(a) グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性；および

(b) グリシン酸化酵素の熱安定性。

【請求項2】

グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性が改善され、  
変異が、

1) TTSモチーフ中の第1のスレオニンのアラニン、セリン、システイン、またはグリシンへの置換、

2) HCYモチーフ中のシステインのセリンへの置換、

3) LRPモチーフ中のロイシンのイソロイシン、バリン、システイン、またはスレオニンへの置換、

4) PGTモチーフ中のグリシンのグルタミンへの置換

からなる群より選ばれる1以上の置換を含む、請求項1記載の改変酵素。

【請求項3】

グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性が改善され、  
変異が、

1) TTSモチーフ中の第1のスレオニンのアラニン、セリン、システイン、またはグリシンへの置換、

2) HCYモチーフ中のシステインのセリンへの置換、

3) LRPモチーフ中のロイシンのイソロイシン、バリン、システイン、またはスレオニンへの置換、

からなる群より選ばれる1以上の置換を含む、請求項2記載の改変酵素。

【請求項4】

グリシン酸化酵素の熱安定性が改善され、  
変異が、

1) TTSモチーフ中の第1のスレオニンのアラニン、セリン、グリシンへの置換、

2) TTSモチーフ中のセリンのリジンへの置換、

3) HCYモチーフ中のシステインのアスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、またはセリンへの置換、

4) LRPモチーフ中のロイシンのイソロイシン、バリン、プロリン、またはシステインへの置換、

10

20

30

40

50

- 5) G M Lモチーフ中のメチオニンのイソロイシンへの置換、
- 6) S Gモチーフ中のセリンのアルギニンへの置換、
- 7) P G Tモチーフ中のグリシンのチロシン、またはグルタミンへの置換

からなる群より選ばれる1以上の置換を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の改変酵素。

【請求項5】

グリシン酸化酵素の熱安定性が改善され、  
変異が、

- 1) T T Sモチーフ中の第1のスレオニンのアラニン、セリン、グリシンへの置換、
- 2) T T Sモチーフ中のセリンのリジンへの置換、
- 3) H C Yモチーフ中のシステインのグリシン、ヒスチジン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、またはセリンへの置換、
- 4) L R Pモチーフ中のロイシンのイソロイシン、バリン、プロリン、またはシステインへの置換、

10

- 5) G M Lモチーフ中のメチオニンのイソロイシンへの置換、
- 6) S Gモチーフ中のセリンのアルギニンへの置換、
- 7) P G Tモチーフ中のグリシンのチロシン、またはグルタミンへの置換

からなる群より選ばれる1以上の置換を含む、請求項4記載の改変酵素。

【請求項6】

さらに、(c)グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性が改善され、  
変異が、

- 1) T T Sモチーフ中の第1のスレオニンのアラニン
- 2) H C Yモチーフ中のシステインのセリン
- 3) L R Pモチーフ中のロイシンのバリン

からなる群より選ばれる1以上の置換を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の改変酵素。

20

【請求項7】

グリシン酸化酵素がパチルス属に由来する、請求項1～6のいずれか一項記載の改変酵素。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項記載の改変酵素を用いて被検試料中に含まれるグリシンを測定することを含む、グリシンの分析方法。

30

【請求項9】

グリシンの測定が、請求項1～7のいずれか一項記載の改変酵素に加えて、4-アミノアンチピリンおよびフェノール、ならびにペルオキシダーゼを用いて行われる、請求項8記載の方法。

【請求項10】

請求項1～7のいずれか一項記載の改変酵素を用いてグリシンからグリオキシル酸を生成することを含む、グリオキシル酸の製造方法。

【請求項11】

請求項1～7のいずれか一項記載の改変酵素をコードするポリヌクレオチド。

40

【請求項12】

請求項11記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項13】

請求項12記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【請求項14】

グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善するようにその少なくとも1つのアミノ酸残基を変異させた改変酵素を、請求項13記載の形質転換体を用いて生成することを含む、改変酵素の製造方法。

【請求項15】

50

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の改変酵素を含む、グリシン分析用キット。

【請求項 1 6】

反応用緩衝液または緩衝塩、過酸化水素検出試薬、アンモニア検出試薬およびグリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つをさらに含む、請求項 1 5 記載のグリシン分析用キット。

【請求項 1 7】

( a ) デバイス、および ( b ) 請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の改変酵素を含む、グリシン分析用検出系。

【請求項 1 8】

( c ) 反応用緩衝液または緩衝塩、過酸化水素検出試薬、アンモニア検出試薬およびグリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つをさらに含み、かつデバイスがマイクロ流路チップである、請求項 1 7 記載のグリシン分析用検出系。

10

【請求項 1 9】

( a ) 検出用電極、および ( b ) 検出用電極に固定または配置された、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の改変酵素を含む、グリシン分析用酵素センサー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変グリシン酸化酵素、およびそれを用いるグリシンの分析方法などに関する。

20

【背景技術】

【0002】

アミノ酸は生体の構成要素として非常に重要であり、幾つかのアミノ酸が健康状態の指標となり得ることが知られている。例えば血漿中のグリシン濃度は、肥満との関連が示唆されている（非特許文献 1）。また、グリシンは種々の食品中に天然に含まれる他、例えば食品添加物としても用いられている。従って、生体研究、健康栄養、医療、食品製造など広範な分野において、アミノ酸、特にグリシンの測定は重要な意義を有する。

【0003】

グリシンを含むアミノ酸の測定方法としては、アミノ酸アナライザー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）や LC-MS などの機器を用いた方法が広く用いられているが、これらの機器は大型で高価であり、機器の維持とオペレーションに専門知識と習熟を必要とするため、導入、維持、利用に高額のコストを必要とする。また、原理上、各検体をシーケンシャルに分析する必要があるため、多検体を分析する際には長時間を必要とする。これらの問題を解決する手段として、例えば特定のアミノ酸に対する特定の反応を触媒する酵素を用いたアミノ酸の分析法が挙げられ、幾つかのアミノ酸については測定用キットが販売されている。また、酵素を利用して電気化学的または光学的に特定のアミノ酸を測定するバイオセンサーも実現されている（例えば、特許文献 1、非特許文献 2 ~ 4）。

30

【0004】

グリシンに作用する酵素としては、グリシン酸化酵素が知られている（例えば、非特許文献 5）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】国際公開第 2005/075970 号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】P. Felig, E. Marliss, G. F. Cahill Jr. (1969) N. Engl. J. Med. 281, 811 - 816.

【非特許文献 2】A. Guerrieri, T. R. I. Cataldi, R. Ciriello. (2007) Sens. Actuators B Chem. 126, 42

50

4 - 4 3 0 .

【非特許文献3】H. Olschewski, A. Erlenkotter, C. Zabrosch, G. - C. Chemnitz. (2000) Enzyme Microb. Technol. 26, 537 - 543.

【非特許文献4】H. Endo, Y. Hayashi, Y. Kitani, H. Ren, T. Hayashi, Y. Nagashima. (2008) Anal. Bioanal. Chem. 391, 1255 - 1261.

【非特許文献5】L. Caldinelli, M. Pedotti, L. Motteran, G. Molla, L. Pollegioni (2009) Biochimie 91, 1499 - 1508.

【非特許文献6】S. E. Carpenter, D. J. Merkle (2003) Anal. Biochem. 323, 242 - 246.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

前述の酵素を用いたアミノ酸測定では、アミノ酸の測定に関連する酵素の特性（例、酵素の活性、安定性、基質特異性）が優れることが望ましい。特に活性に関しては、例えば血中アミノ酸のように検体中の検出対象の濃度が低い場合、基質濃度が低い条件下において活性が高いことが求められる。グリシン含有検体の分析にはグリシン酸化酵素の利用が有望であるが、これまでに性質が知られているグリシン酸化酵素は、活性および安定性が低い（例えば、非特許文献6）点が課題であった。また、基質特異性については多種類のアミノ酸に関して調査がなされていなかった。以上のように、グリシンの測定に関し実用に供することが可能な酵素がなく、従って実用的な、酵素を用いたグリシン測定法、測定用キット、測定用バイオセンサーが実現されていなかった。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、鋭意検討した結果、グリシンの測定に関連する特性を改善した酵素を用いることにより、グリシン濃度を測定すればよいことを着想し、そして、このような特性が改善されたグリシン酸化酵素を開発することに成功し、もって本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕以下：

（a）グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性；

（b）グリシン酸化酵素の熱安定性；および

（c）グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性；

からなる群より選ばれる、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の1以上の特性を改善するようにその少なくとも1つのアミノ酸残基を変異させた、改変酵素。

〔2〕変異が、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列における（a）TTSモチーフ中の第1のスレオニンの置換、（b）TTSモチーフ中のセリンの置換、（c）HCYモチーフ中のシステインの置換、（d）LRPモチーフ中のロイシンの置換、（e）GMLモチーフ中のメチオニンの置換、（f）SGモチーフ中のセリンの置換、および（g）PGTモチーフ中のグリシンの置換からなる群より選ばれる1以上の置換である、〔1〕の改変酵素。

〔3〕TTSモチーフ中の第1のスレオニンが、アラニン、セリン、システイン、またはグリシンに置換されている、〔2〕の改変酵素。

〔4〕TTSモチーフ中のセリンが、リジンに置換されている、〔2〕または〔3〕の改変酵素。

〔5〕HCYモチーフ中のシステインが、アラニン、アスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、またはセリンに置換されている、〔2

10

20

30

40

50

〕～〔４〕のいずれかの改変酵素。

〔６〕LRPモチーフ中のロイシンが、イソロイシン、バリン、システイン、スレオニン、またはプロリンに置換されている、〔２〕～〔５〕のいずれかの改変酵素。

〔７〕GMLモチーフ中のメチオニンが、イソロイシンに置換されている、〔２〕～〔６〕のいずれかの改変酵素。

〔８〕SGモチーフ中のセリンが、アルギニンに置換されている、〔２〕～〔７〕のいずれかの改変酵素。

〔９〕PGTモチーフ中のグリシンが、チロシン、またはグルタミンに置換されている、〔２〕～〔８〕のいずれかの改変酵素。

〔１０〕グリシン酸化酵素がバチルス属に由来する、〔１〕～〔９〕のいずれかの改変酵素。 10

〔１１〕以下（１）あるいは（２）のタンパク質である、〔１〕～〔１０〕のいずれかの改変酵素：

（１）配列番号２のアミノ酸配列において、TTSモチーフ中の第１のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる１以上のアミノ酸残基が、下記（i）～（vii）に示されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、タンパク質：

（i）TTSモチーフ中の第１のスレオニンの置換  
アラニン、セリン、システイン、またはグリシン； 20

（ii）TTSモチーフ中のセリンの置換  
リジン；

（iii）HCYモチーフ中のシステインの置換  
アラニン、アスパラギン酸、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、トリプトファン、チロシン、またはセリン；

（iv）LRPモチーフ中のロイシンの置換  
イソロイシン、バリン、システイン、スレオニン、またはプロリン

（v）GMLモチーフ中のメチオニンの置換  
イソロイシン；

（vi）SGモチーフ中のセリンの置換  
アルギニン； 30

（vii）PGTモチーフ中のグリシンの置換  
チロシン、またはグルタミン。

（２）配列番号２のアミノ酸配列におけるTTSモチーフ中の第１のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる１以上のアミノ酸残基が、上記（i）～（vii）に示されるアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列において、１または数個のアミノ酸残基の追加変異を有するアミノ酸配列を含み、かつ、下記（a）～（c）からなる群より選ばれる１以上の特性が改善されている、タンパク質； 40

（a）グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性；

（b）グリシン酸化酵素の熱安定性；および

（c）グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性。

〔１２〕〔１〕～〔１１〕のいずれかの改変酵素を用いて被検試料中に含まれるグリシンを測定することを含む、グリシンの分析方法。

〔１３〕グリシンの測定が、〔１〕～〔１１〕のいずれかの改変酵素に加えて、４-アミノアンチピリンおよびフェノール、ならびにペルオキシダーゼを用いて行われる、〔１２〕の方法。

〔１４〕〔１〕～〔１１〕のいずれかの改変酵素を用いてグリシンからグリオキシル酸を生成することを含む、グリオキシル酸の製造方法。 50

〔 1 5 〕〔 1 〕～〔 1 1 〕のいずれかの改変酵素をコードするポリヌクレオチド。  
 〔 1 6 〕〔 1 5 〕のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。  
 〔 1 7 〕〔 1 6 〕の発現ベクターを含む形質転換体。  
 〔 1 8 〕グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善するようにその少なくとも1つのアミノ酸残基を変異させた改変酵素を、〔 1 7 〕の形質転換体を用いて生成することを含む、改変酵素の製造方法。  
 〔 1 9 〕〔 1 〕～〔 1 1 〕のいずれかの改変酵素を含む、グリシン分析用キット。  
 〔 2 0 〕反应用緩衝液または緩衝塩、過酸化水素検出試薬、アンモニア検出試薬およびグリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つをさらに含む、〔 1 9 〕のグリシン分析用キット

10

〔 2 1 〕( a ) デバイス、および( b )〔 1 〕～〔 1 1 〕のいずれかの改変酵素を含む、グリシン分析用検出系。  
 〔 2 2 〕( c ) 反应用緩衝液または緩衝塩、過酸化水素検出試薬、アンモニア検出試薬およびグリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つをさらに含み、かつデバイスがマイクロ流路チップである、〔 2 1 〕のグリシン分析用検出系。  
 〔 2 1 〕( a ) 検出用電極、および( b ) 検出用電極に固定または配置された、〔 1 〕～〔 1 1 〕のいずれかの改変酵素を含む、グリシン分析用酵素センサー。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明の改変酵素は、グリシンに対する活性が向上しているため、グリシンの迅速かつ高感度な測定、および/またはグリオキシル酸の製造に有用である。本発明の改変酵素はまた、水溶液中での熱安定性に優れることから、安定性に優れる。したがって、本発明の改変酵素は、特に液状試薬として有用である。本発明の改変酵素はさらに、グリシンに対する基質特異性に優れるので、グリシンを特異的に測定することができる。本発明の分析方法は、例えば、生体研究、健康栄養、医療、食品製造など広範な分野において有用である。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】図 1 は、グリシンに対する野生型グリシン酸化酵素の基質特異性を示す図である。( 1 )  $Gly : 1\text{ mM}$   $Gly$ ; ( 2 )  $25\text{ mix} : \text{標準アミノ酸 } 20\text{ 種類、シスチン、タウリン、シトルリン、オルニチンおよび } \text{-アミノ酪酸をそれぞれ } 1\text{ mM 含有する混合液}$ ; ( 3 )  $25\text{ mix} - Gly : ( 2 ) \text{ の } 25\text{ 種類の混合液から } Gly \text{ を除いたもの}$  (以下同様)。

30

【図 2】図 2 は、グリシンに対する変異型グリシン酸化酵素 ( T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V ) の基質特異性を示す図である。

【図 3】図 3 は、グリシンに対する変異型グリシン酸化酵素 ( T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q ) の基質特異性を示す図である。

【図 4】図 4 は、変異型グリシン酸化酵素 ( T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V ) を用いてエンドポイント法で得られた吸光度と、反応系中の  $Gly$  濃度との関係を示す図である

40

【図 5】図 5 は、変異型グリシン酸化酵素 ( T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q ) を用いてエンドポイント法で得られた吸光度と、反応系中の  $Gly$  濃度との関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

本発明は、改変酵素を提供する。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善するようにその少なくとも1つのアミノ酸残基を変異させたものであり得る。

【 0 0 1 3 】

アミノ酸残基の変異としては、例えば、置換、欠失、付加および挿入が挙げられるが、

50

置換が好ましい。

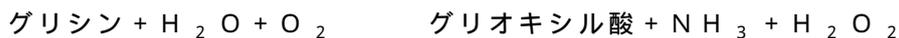
【0014】

変異されるアミノ酸残基は、天然のL-アミノ酸である、L-アラニン(A)、L-アスパラギン(N)、L-システイン(C)、L-グルタミン(Q)、L-イソロイシン(I)、L-ロイシン(L)、L-メチオニン(M)、L-フェニルアラニン(F)、L-プロリン(P)、L-セリン(S)、L-スレオニン(T)、L-トリプトファン(W)、L-チロシン(Y)、L-バリン(V)、L-アスパラギン酸(D)、L-グルタミン酸(E)、L-アルギニン(R)、L-ヒスチジン(H)、またはL-リジン(K)、あるいはグリシン(G)である。変異が置換、付加または挿入である場合、置換、付加または挿入されるアミノ酸残基は、上述した変異されるアミノ酸残基と同様である。以下、アミノ酸の表記について、Lおよびを省略することがある。

10

【0015】

グリシン酸化酵素(glyoxidase: GlyOXと表記することがある)は、以下の反応を触媒する酸化還元酵素である(EC 1.4.3.19)。



【0016】

本発明の改変酵素が由来するグリシン酸化酵素としては、例えば、任意の生物(例、細菌、放線菌および真菌等の微生物、ならびに昆虫、魚類、動物、および植物)に由来する酵素を用いることができ、例えば、バチルス(Bacillus)属に属する微生物、およびこの近縁属に属する生物に由来する酵素が挙げられる。バチルス(Bacillus)属の近縁属としては、例えば、ゲオバチルス(Geobacillus)属、パエニバチルス(Paenibacillus)属、オセアノバチルス(Oceanobacillus)属が挙げられる。バチルス属のこれらの近縁属は、バチルス属と同様に、バチラス科(Bacillaceae)に属する。

20

【0017】

バチルス(Bacillus)属およびその近縁属に属する微生物としては、例えば、バチルス・アエロフィラス(Bacillus aerophilus)、バチルス・セレウス(Bacillus cereus)、バチルス・マカウエンシス(Bacillus macauensis)、バチルス・プミルス(Bacillus pumilus)、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)、バチルス・スフェリカス(Bacillus sphaericus)、バチルス・セレウス(Bacillus cereus)、バチルス・リチエニフォルミス(Bacillus licheniformis)、バチルス・エスピー(Bacillus sp.)、ゲオバチルス・ステアロサーモフィラス(Geobacillus stearothermophilus)、ゲオバチルス・カウストフィラス(Geobacillus kaustophilus)などが挙げられる。

30

【0018】

グリシン酸化酵素において変異が導入される位置は、好ましくは、グリシン酸化酵素の活性中心付近にあるアミノ酸残基である。バチルス・サブチリス由来のグリシン酸化酵素については、立体構造の解析結果が報告されている(例、PDB ID: 1NG3、1NG4、1RYI、3IF9を参照)。当業者は、バチルス・サブチリス由来のグリシン酸化酵素のアミノ酸配列を他のグリシン酸化酵素のアミノ酸配列と整列(align)させることができるので、バチルス・サブチリス以外の生物に由来するグリシン酸化酵素についても、活性中心付近にあるアミノ酸残基を容易に特定することができる。

40

【0019】

好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のTTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の置換および/またはセリン(S)の置換である。TTSモチーフは、スレオニン(T)-スレオニン(T)-セリン(S)の連続した3つのアミノ酸残基から構成される。TTSモチーフのC末端のスレオニン残基を、第1のスレオニンということがあり、ま

50

た、TTSモチーフの中央のスレオニン残基を、第2のスレオニンということがある。野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のTTSモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のTTSモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべき第1のスレオニン(T)およびセリン(S)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、TTSモチーフは42~44位のアミノ酸領域内にあり、第1のスレオニン(T)は42位にあり、セリン(S)は44位にある(例、表1を参照)。

【0020】

【表1】

表1. グリシン酸化酵素におけるTTSモチーフ中の第1のスレオニン(Thr)の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号または配列番号
	TTSモチーフ	第1のThr	
<i>Bacillus subtilis</i>	42-44	42	配列番号2
<i>Bacillus pumilus</i>	42-44	42	ZP_03053300.1
<i>Bacillus aerophilus</i>	42-44	42	ZP_10165124.1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	42-44	42	YP_003972581.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	42-44	42	YP_005420412.1

【0021】

別の好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のHCYモチーフ中のシステイン(C)の置換である。HCYモチーフは、ヒスチジン(H)-システイン(C)-チロシン(Y)の連続した3つのアミノ酸残基から構成される。野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のHCYモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のHCYモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべきシステイン(C)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、HCYモチーフは244~252位のアミノ酸領域内にあり、システイン(C)は245~251位にある(例、表2を参照)。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異として、HCYモチーフ中のシステイン(C)の置換に加えて、TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の上記置換をさらに有していてもよい。

【0022】

【表2】

表2. グリシン酸化酵素におけるHCYモチーフ中のシステイン(Cys)の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号または配列番号
	HCYモチーフ	Cys	
<i>Bacillus subtilis</i>	244-246	245	配列番号2
<i>Bacillus pumilus</i>	245-247	246	ZP_03053300.1
<i>Bacillus aerophilus</i>	245-247	246	ZP_10165124.1
<i>Bacillus macauensis</i>	250-252	251	ZP_10322181.1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	244-246	245	YP_003972581.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	244-246	245	YP_005420412.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	244-246	245	YP_078461.1

【0023】

さらに別の好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のLRPモチーフ中のロイシン(L)の置換である。LRPモチーフは、ロイシン(L)-アルギニン(R)-プロリン(P)の連続した3つのアミノ酸残基から構成される。野生型グリシン酸化酵素のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列中のLRPモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のLRPモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべきロイシン(L)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、LRPモチーフは294~316位のアミノ酸領域内にあり、ロイシン(L)は294~314位にある(例、表3を参照)。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異として、LRPモチーフ中のロイシン(L)の置換に加えて、TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の上記置換および/またはHCYモチーフ中のシステイン(C)の上記置換をさらに有していてもよい。

【0024】

【表3】

表3. グリシン酸化酵素におけるLRPモチーフ中のロイシン(Leu)の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号 または配列番号
	LRPモチーフ	Leu	
<i>Bacillus subtilis</i>	301-303	301	配列番号2
<i>Bacillus pumilus</i>	302-304	302	ZP_03053300.1
<i>Bacillus aerophilus</i>	302-304	302	ZP_10165124.1
<i>Bacillus cereus</i>	307-309	307	ZP_04243747.1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	301-303	301	YP_003972581.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	301-303	301	YP_005420412.1
<i>Bacillus anthracis</i>	307-309	307	ZP_02899039.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	307-309	307	YP_005564450.1
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	294-296	294	ZP_04149837.1
<i>Bacillus mycooides</i>	294-296	294	ZP_04155703.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	301-303	301	YP_078461.1
<i>Kyrpidia tusciae</i>	307-309	307	YP_003588409.1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	314-316	314	YP_003947104.1
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	306-308	306	YP_005519187.1
<i>Brevibacillus brevis</i>	305-307	305	YP_002770374.1
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	313-315	313	YP_006188673.1
<i>Paenibacillus terrae</i>	314-316	314	YP_005077007.1

【0025】

さらに別の好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のGMLモチーフ中のメチオニン(M)の置換である。GMLモチーフは、グリシン(G)-メチオニン(M)-ロイシン(L)の連続した3つのアミノ酸残基から構成される。野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のGMLモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のGMLモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべきメチオニン(M)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、GMLモチーフは45~59位のアミノ酸領域内にあり、メチオニン(M)は46~58位にある(例、表4を参照)。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異として、GMLモチーフ中のメチオニン(M)の置換に加えて、TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)およびセリン(S)の上記置換および/またはHCYモチーフ中のシステイン(C)の上記置換および/またはLRPモチーフ中のロイシン(L)の上記置換をさらに有していてもよい。

【0026】

10

20

30

40

## 【表4】

表4. グリシン酸化酵素におけるGMLモチーフ中のメチオニン (M) の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号 または配列番号
	GMLモチーフ	Met	
<i>Bacillus subtilis</i>	48-50	49	配列番号2
<i>Bacillus pumilus</i>	48-50	49	ZP_03053300.1
<i>Bacillus sp.</i>	48-50	49	ZP_10165124.1
<i>Bacillus macauensis</i>	48-50	49	ZP_10322181.1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	48-50	49	YP_003972581.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	48-50	49	YP_005420412.1
<i>Bacillus licheniformis</i>	48-50	49	YP_078461.1
<i>Kyrpidia tusciae</i>	49-51	50	YP_003588409.1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	57-59	58	YP_003947104.1
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	47-49	48	YP_005519187.1
<i>Brevibacillus brevis</i>	45-47	46	YP_002770374.1
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	56-58	57	YP_006188673.1
<i>Paenibacillus terrae</i>	57-59	58	YP_005077007.1

10

## 【0027】

さらに別の好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のSGモチーフ中のセリン(S)の置換である。SGモチーフは、セリン(S)-グリシン(G)の連続した2つのアミノ酸残基から構成される。野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のSGモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のSGモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべきセリン(S)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、SGモチーフは190~204位のアミノ酸領域内にあり、セリン(S)は190~203位にある(例、表5を参照)。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異として、SGモチーフ中のセリン(S)の置換に加えて、TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)およびセリン(S)の上記置換および/またはHCYモチーフ中のシステイン(C)の上記置換および/またはLRPモチーフ中のロイシン(L)の上記置換および/またはGMLモチーフ中のメチオニン(M)の上記置換をさらに有しているもよい。

20

30

## 【0028】

## 【表5】

表5. グリシン酸化酵素におけるSGモチーフ中のセリン (S) の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号 または配列番号
	SGモチーフ	Ser	
<i>Bacillus subtilis</i>	190-191	190	配列番号2
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	203-204	203	YP_003947104.1
<i>Brevibacillus brevis</i>	194-195	194	YP_002770374.1
<i>Paenibacillus terrae</i>	203-204	203	YP_005077007.1

## 【0029】

さらに別の好ましい実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列のPGTモチーフ中のグリシン(G)の置換である。PGTモチーフは、プロリン(P)-グリシン(G)-スレオニン(T)の連続した3つのアミノ酸残基から構成される。野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のPGTモチーフの位置は酵素の由来によって異なり得るが、当業者は、野生型グリシン酸化酵素のアミノ酸配列中のPGTモチーフの位置を適宜決定できるため、置換されるべきグリシン(G)の位置を特定できる。通常、グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、PGTモチーフは303~317位のアミノ酸領域内にあり、グリシン(G)は304~316位にある(例、表6を参照)。本発明の改変酵素は、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性を改善する変異として、PGTモチーフ中のグリシン

40

50

(G)の置換に加えて、T T Sモチーフ中の第1のスレオニン(T)およびセリン(S)の上記置換および/またはH C Yモチーフ中のシステイン(C)の上記置換および/またはL R Pモチーフ中のロイシン(L)の上記置換および/またはG M Lモチーフ中のメチオニン(M)の上記置換および/またはS Gモチーフ中のセリン(S)の上記置換をさらに有していてもよい。

【0030】

【表6】

表6. グリシン酸化酵素におけるPGTモチーフ中のグリシン(G)の位置

グリシン酸化酵素	位置		アクセッション番号 または配列番号
	PGTモチーフ	Gly	
<i>Bacillus subtilis</i>	303-305	304	配列番号2
<i>Bacillus atrophaeus</i>	303-305	304	YP_003972581.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	303-305	304	YP_005420412.1
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	315-317	316	YP_006188673.1

10

【0031】

本発明の改変酵素は、上述した6つのモチーフから選ばれる1つ以上のモチーフを有する野生型酵素に対して変異を導入することにより、作製することができる。野生型酵素は、上述した6つのモチーフから選ばれる2つのモチーフを有していてもよく、3つのモチーフを有していてもよく、4つのモチーフを有していてもよく、5つのモチーフを有していてもよく、6つのモチーフを有していてもよい。

20

【0032】

グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性としては、以下が挙げられる：

- (a) グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性；
- (b) グリシン酸化酵素の熱安定性；および
- (c) グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性。

本発明の改変酵素は、上述した特性のうち1つのみを有していてもよいが、上述した特性のうち2つまたは3つの特性を併有していてもよい。

【0033】

T T Sモチーフ中の第1のスレオニン(T)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、アラニン(A)、セリン(S)、システイン(C)、またはグリシン(G)への置換が挙げられる。

30

【0034】

T T Sモチーフ中のセリン(S)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、リジン(K)への置換が挙げられる。

【0035】

H C Yモチーフ中のシステイン(C)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、アラニン(A)、アスパラギン酸(D)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、アスパラギン(N)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、またはセリン(S)への置換が挙げられる。

40

【0036】

L R Pモチーフ中のロイシン(L)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、イソロイシン(I)、バリン(V)、システイン(C)、スレオニン(T)、またはプロリン(P)への置換が挙げられる。

【0037】

G M Lモチーフ中のメチオニン(M)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例

50

えば、イソロイシン（I）への置換が挙げられる。

【0038】

SGモチーフ中のセリン（S）について、特性（a）～（c）から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異（単独の変異または他の変異との組合せ）としては、例えば、アルギニン（R）への置換が挙げられる。

【0039】

PGTモチーフ中のグリシン（G）について、特性（a）～（c）から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異（単独の変異または他の変異との組合せ）としては、例えば、チロシン（Y）、またはグルタミン（Q）への置換が挙げられる。

【0040】

－実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性として、グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性が、改善される。グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性の改善とは、グリシンに対する改変酵素の活性が、野生型酵素のものに比べてより向上することを意味する。具体的には、グリシンに対するグリシン酸化酵素の活性の改善は、所定の濃度（例、低濃度または高濃度のいずれかの濃度）におけるグリシンに対する野生型グリシン酸化酵素の活性を100としたときに、同濃度におけるグリシンに対する改変酵素の活性が100よりも大きい場合に、達成され得る。このような改変酵素は、グリシンの迅速かつ高感度な測定を可能にし、結果としてグリシンの測定に有用である。野生型酵素に対する改変酵素の活性の向上の程度は、1.3倍以上であることが好ましく、1.5倍以上であることがより好ましく、1.7倍以上であることがさらに好ましく、2倍以上であることが特に好ましい。野生型酵素に対する改変酵素の活性の向上の程度が1.3倍以上である本発明の改変酵素の変異は、例えば、1）活性の改善に好適である、TTSモチーフ中の第1のスレオニン（T）の下記アミノ酸残基への置換、HCYモチーフ中のシステイン（C）の下記アミノ酸残基への置換、またはLRPモチーフ中のロイシン（L）の下記アミノ酸残基への置換、あるいはそれらの置換の組合せであってもよい。

【0041】

- 1）活性の改善に好適である置換
- 1-1）TTSモチーフ中の第1のスレオニン（T）の置換後のアミノ酸残基  
アラニン（A）、セリン（S）、システイン（C）、またはグリシン（G）
- 1-2）TTSモチーフ中のセリン（S）の置換後のアミノ酸残基  
リジン（K）
- 1-3）HCYモチーフ中のシステイン（C）の置換後のアミノ酸残基  
セリン（S）
- 1-4）LRPモチーフ中のロイシン（L）の置換後のアミノ酸残基  
イソロイシン（I）、バリン（V）、システイン（C）、またはスレオニン（T）
- 1-5）PGTモチーフ中のグリシン（G）について、特性（a）～（c）から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異（単独の変異または他の変異との組合せ）としては、例えば、グルタミン（Q）への置換が挙げられる。

【0042】

別の実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性として、グリシン酸化酵素の熱安定性が、改善される。グリシン酸化酵素の熱安定性の改善とは、改変酵素の熱安定性が、野生型酵素のものに比べてより向上することを意味する。具体的には、グリシン酸化酵素の熱安定性の改善は、水溶液中において所定の高温（例、40、50または60のいずれかの温度）条件下で所定の時間（例、1時間）処理した場合に、改変酵素の残存活性が野生型酵素のものよりも大きい場合に、達成され得る。水溶液中におけるグリシン酸化酵素の熱安定性試験は、グリシン酸化酵素の安定性（特に液状安定性）を評価するための加速試験としての意義を有し得る。したがって、水溶液中における改変酵素の熱安定性が高い場合、改変酵素の安定性（特に液状安定性）も高い傾向がある。液状安定性が高い酵素は、液状でより長期保存することができるので、このような改変酵素は、液状試薬として、グリシンの測定に有用である。野生型酵素に対する改変酵素の熱

10

20

30

40

50

安定性の向上の程度は、1.1倍以上であることが好ましく、1.2倍以上であることがより好ましい。野生型酵素に対する改変酵素の熱安定性の向上の程度が1.1倍以上である本発明の改変酵素の変異は、例えば、2)熱安定性の改善に好適である、HCYモチーフ中のシステイン(C)の下記アミノ酸残基への置換であってもよい。

【0043】

2)熱安定性の改善に好適である置換

2-1)TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の置換後のアミノ酸残基  
アラニン(A)、セリン(S)、グリシン(G)

2-2)TTSモチーフ中のセリン(S)の置換後のアミノ酸残基  
リジン(K)

2-3)HCYモチーフ中のシステイン(C)の置換後のアミノ酸残基

アラニン(A)、アスパラギン酸(D)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、アスパラギン(N)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、またはセリン(S)

2-4)LRPモチーフ中のロイシン(L)の置換後のアミノ酸残基

イソロイシン(I)、バリン(V)、プロリン(P)、またはシステイン(C)

2-5)GMLモチーフ中のメチオニン(M)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、イソロイシン(I)への置換が挙げられる。

2-6)SGモチーフ中のセリン(S)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、アルギニン(R)への置換が挙げられる。

2-7)PGTモチーフ中のグリシン(G)について、特性(a)~(c)から選ばれる少なくとも1つの特性を改善する変異(単独の変異または他の変異との組合せ)としては、例えば、チロシン(Y)、またはグルタミン(Q)への置換が挙げられる。

【0044】

さらに別の実施形態では、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性として、グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性が、改善される。グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性の改善とは、グリシンに対する改変酵素の反応性が、野生型酵素のものに比べてより向上することを意味する。換言すれば、グリシン以外のアミノ酸に対する改変酵素の反応性が低下することを意味する。グリシン以外のアミノ酸としては、例えば、グリシン以外のL- -アミノ酸が挙げられる。具体的には、グリシン以外のL- -アミノ酸としては、例えば、タンパク質を構成する、グリシン以外の19種のL- -アミノ酸、ならびにシスチン、タウリン、シトルリン、オルニチンおよび -アミノ酪酸が挙げられる。グリシンに対するグリシン酸化酵素の基質特異性が改善された本発明の改変酵素の変異は、例えば、3)基質特異性の改善に好適である、TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の下記アミノ酸残基への置換、HCYモチーフ中のシステイン(C)の下記アミノ酸残基への置換、またはLRPモチーフ中のロイシン(L)の下記アミノ酸残基への置換、あるいはそれらの置換の組合せであってもよい。

【0045】

3)基質特異性の改善に好適である置換

3-1)TTSモチーフ中の第1のスレオニン(T)の置換後のアミノ酸残基  
アラニン(A)

3-2)HCYモチーフ中のシステイン(C)の置換後のアミノ酸残基  
セリン(S)

3-3)LRPモチーフ中のロイシン(L)の置換後のアミノ酸残基  
バリン(V)

【0046】

本発明の改変酵素はまた、C末端またはN末端に、他のペプチド成分(例、タグ部分)を有していてもよい。本発明の改変酵素に付加され得る他のペプチド成分としては、例えば、目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分(例、ヒスチジンタグ、Strept

10

20

30

40

50

- tag II等のタグ部分；グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質等の目的タンパク質の精製に汎用されるタンパク質)、目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分(例、Nus-tag)、シャペロンとして働くペプチド成分(例、トリガーファクター)、他の機能をもつタンパク質あるいはタンパク質のドメインあるいはそれらとをつなぐリンカーとしてのペプチド成分が挙げられる。

【0047】

本発明の改変酵素は、上述した特性が保持される限り、上記変異を有するグリシン酸化酵素のアミノ酸配列に対して、1または数個のアミノ酸残基の追加変異(例、置換、欠失、挿入および付加)を有していてもよい。追加変異の数は、例えば1~100個、好ましくは1~50個、より好ましくは1~40個、さらにより好ましくは1~30個、最も好ましくは1~20個または1~10個(例、1、2、3、4または5個)である。当業者は、上述した特性を保持するこのような改変酵素を適宜作製することができる。追加変異を有する本発明の改変酵素では、野生型酵素に対する改変酵素の活性の向上の程度は、1.3倍以上であることが好ましく、1.5倍以上であることがより好ましく、1.7倍以上であることがさらにより好ましく、2倍以上であることが特に好ましい。また、追加変異を有する本発明の改変酵素では、野生型酵素に対する改変酵素の熱安定性の向上の程度は、1.1倍以上であることが好ましく、1.2倍以上であることがより好ましい。

【0048】

したがって、本発明の改変酵素は、以下(i)または(ii)であってもよい：

(i)グリシン酸化酵素のアミノ酸配列において、TTSモチーフ中の第1のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基が変異(例、置換)したアミノ酸配列を含み、かつ、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の特性が改善されている、タンパク質；または

(ii)グリシン酸化酵素のアミノ酸配列におけるTTSモチーフ中の第1のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシンからなる群より選ばれる1以上のアミノ酸残基が変異(例、置換)したアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基の追加変異を有するアミノ酸配列を有し、かつ、グリシンの測定に関連するグリシン酸化酵素の改善された特性が保持されている、タンパク質。

【0049】

本発明の改変酵素は、上述した変異および追加変異の双方を有することにより、変異前の(野生型)グリシン酸化酵素のアミノ酸配列に対して少なくとも90%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むものであってもよい。アミノ酸配列の同一性パーセントは、好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、さらにより好ましくは97%以上、最も好ましくは98%以上または99%以上であってもよい。

【0050】

アミノ酸配列の同一性は、例えばKarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST(Pro.Natl.Acad.Sci.USA,90,5873(1993))、PearsonによるFASTA(MethodsEnzymol.,183,63(1990))を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTPとよばれるプログラムが開発されているので(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)、これらのプログラムをデフォルト設定で用いて、アミノ酸配列の同一性を計算してもよい。また、アミノ酸配列の同一性としては、例えば、Lipman-Pearson法を採用している株式会社ゼネティックスのソフトウェアGENETYX Ver7.0.9を使用し、ORFにコードされるポリペプチド部分全長を用いて、Unit Size to Compare = 2の設定でSimilarityをpercentage計算させた際の数値を用いてもよい。アミノ酸配

10

20

30

40

50

列の同一性として、これらの計算で導き出される値のうち、最も低い値を採用してもよい。

【0051】

アミノ酸配列において追加変異を導入され得るアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかであり、例えば、アミノ酸配列のアライメントを参考にして追加変異を導入することができる。具体的には、当業者は、1)複数のホモログのアミノ酸配列(例、配列番号2で表されるアミノ酸配列、および他のホモログのアミノ酸配列)を比較し、2)相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3)相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。また、グリシン酸化酵素については、上述したように立体構造の解析結果が報告されているので、当業者は、立体構造の解析結果に基づき、上述した特性の保持を可能にするように、追加変異を導入することができる。追加変異が導入される部位は、TTSモチーフ中の第1のスレオニン、TTSモチーフ中のセリン、HCYモチーフ中のシステイン、LRPモチーフ中のロイシン、GMLモチーフ中のメチオニン、SGモチーフ中のセリン、およびPGTモチーフ中のグリシン以外のアミノ酸残基であり、好ましくは、TTSモチーフ、TTSモチーフ、HCYモチーフ、LRPモチーフ、GMLモチーフ、SGモチーフ、およびPGTモチーフ中のアミノ酸残基以外のアミノ酸残基であってもよい。

10

【0052】

アミノ酸残基の追加変異が置換である場合、アミノ酸残基のこのような置換は、保存的置換であってもよい。用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸(例、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)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例、グリシン、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)、位分岐側鎖を有するアミノ酸(例、スレオニン、バリン、イソロイシン)、芳香族側鎖を有するアミノ酸(例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)、ヒドロキシル基(例、アルコール性、フェノール性)含有側鎖を有するアミノ酸(例、セリン、スレオニン、チロシン)、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸(例、システイン、メチオニン)が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

20

30

【0053】

本発明の改変酵素は、本発明の改変酵素を発現する本発明の形質転換体を用いて、または無細胞系等を用いて、調製することができる。本発明の形質転換体は、例えば、本発明の発現ベクターを作製し、次いで、この発現ベクターを宿主に導入することにより作製できる。

40

【0054】

本発明の発現ベクターは、本発明の改変酵素をコードする本発明のポリヌクレオチド(例、DNA、RNA)を含む。本発明の発現ベクターはまた、本発明のポリヌクレオチドに加えて、プロモーター、ターミネーターおよび薬剤(例、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン)耐性遺伝子をコードする領域等の領域をさらに含むことができる。本発明の発現ベクターは、プラスミドであっても組込み型(integrative)ベクターであってもよい。本発明の発現ベクターはまた、ウイルスベクターであっても無細胞系用ベクターであってもよい。本発明の発現

50

ベクターはさらに、本発明のポリヌクレオチドに対して3'または5'末端側に、本発明の改変酵素に付加され得る他のペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。他のペプチド成分をコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、上述したような目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分をコードするポリヌクレオチド、上述したような目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分をコードするポリヌクレオチド、シャペロンとして働くペプチド成分をコードするポリヌクレオチド、他の機能をもつタンパク質あるいはタンパク質のドメインあるいはそれらとをつなぐリンカーとしてのペプチド成分をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。他のペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含む種々の発現ベクターが利用可能である。したがって、本発明の発現ベクターの作製のため、このような発現ベクターを利用してもよい。例えば、目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター（例、pET-15b、pET-51b、pET-41a、pMAL-p5G）、目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター（例、pET-50b）、シャペロンとして働くペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター（例、pCold TF）、他の機能をもつタンパク質あるいはタンパク質のドメインあるいはそれらとをつなぐリンカーとしてのペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを利用することができる。本発明の改変酵素とそれに付加された他のペプチド成分との切断をタンパク質発現後に可能にするため、本発明の発現ベクターは、プロテアーゼによる切断部位をコードする領域を、本発明の改変酵素をコードするポリヌクレオチドと他のペプチド成分をコードするポリヌクレオチドとの間に含んでいてもよい。

#### 【0055】

本発明の改変酵素を発現させるための宿主としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属細菌、コリネバクテリウム属細菌（例、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)）、およびバチルス属細菌（例、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)）をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス属細菌（例、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)）、ピヒア属細菌（例、ピヒア・スティピティス (*Pichia stipitis*)）、アスペルギルス属細菌（例、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)）をはじめとする種々の真核細胞を用いることができる。宿主としては、所定の遺伝子を欠損する株を用いてもよい。形質転換体としては、例えば、細胞質中に発現ベクターを保有する形質転換体、およびゲノム上に目的遺伝子が導入された形質転換体が挙げられる。

#### 【0056】

本発明の形質転換体は、所定の培養装置（例、試験管、フラスコ、ジャーファーマンター）を用いて、例えば後述の組成を有する培地において培養することができる。培養条件は適宜設定することができる。具体的には、培養温度は10～37であってもよく、pHは6.5～7.5であってもよく、培養時間は1h～100hであってもよい。また、溶存酸素濃度を管理しつつ培養を行っても良い。この場合、培養液中の溶存酸素濃度（DO値）を制御の指標として用いることがある。大気中の酸素濃度を21%とした場合の相対的な溶存酸素濃度DO値が、例えば1～10%を、好ましくは3%～8%を下回らない様に、通気・攪拌条件を制御することが出来る。また、培養はバッチ培養であっても、フェドバッチ培養であっても良い。フェドバッチ培養の場合は糖源となる溶液やリン酸を含む溶液を培養液に連続的あるいは不連続的に逐次添加して、培養を継続することも出来る。

#### 【0057】

形質転換される宿主は、上述したとおりであるが、大腸菌について詳述すると、大腸菌K12株亜種のエシェリヒア コリ JM109株、DH5 株、HB101株、BL21 (DE3) 株などから選択することが出来る。形質転換を行う方法、および形質転換体

10

20

30

40

50

を選別する方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor press (2001/01/15) などにも記載されている。以下、形質転換された大腸菌を作製し、これを用いて所定の酵素を製造する方法を、一例としてより具体的に説明する。

【0058】

本発明のポリヌクレオチドを発現させるプロモーターとしては、通常E. coliにおける異種タンパク質生産に用いられるプロモーターを使用することができ、例えば、PhoA、PhoC、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのPRプロモーター、PLプロモーター、T5プロモーター等の強力なプロモーターが挙げられ、PhoA、PhoC、lacが好ましい。また、ベクターとしては、例えば、pUC(例、pUC19、pUC18)、pSTV、pBR(例、pBR322)、pHSG(例、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398)、RSF(例、RSF1010)、pACYC(例、pACYC177、pACYC184)、pMW(例、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218)、pQE(例、pQE30)、およびその誘導体等を用いてもよい。他のベクターとしては、ファージDNAのベクターを利用してもよい。さらに、プロモーターを含み、挿入DNA配列を発現させることができる発現ベクターを使用してもよい。好ましくは、ベクターは、pUC、pSTV、pMWであってもよい。

10

【0059】

また、本発明のポリヌクレオチドの下流に転写終結配列であるターミネーターを連結してもよい。このようなターミネーターとしては、例えば、T7ターミネーター、fdファージターミネーター、T4ターミネーター、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネーター、大腸菌trpA遺伝子のターミネーターが挙げられる。

20

【0060】

本発明のポリヌクレオチドを大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入および/または付加などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。

30

【0061】

また、形質転換体を選別するために、ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモーターを持つ発現ベクターが市販されている〔例、pUC系(タカラバイオ社製)、pPROK系(クローンテック製)、pKK233-2(クローンテック製)〕。

【0062】

得られた本発明の発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養することにより、本発明の改変酵素を得ることができる。

【0063】

培地としては、M9-カザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。培地は、所定の炭素源、窒素源、補酵素(例、塩酸ピリドキシン)を含有していてもよい。具体的には、ペプトン、酵母エキス、NaCl、グルコース、MgSO<sub>4</sub>、硫酸アンモニウム、リン酸2水素カリウム、硫酸第二鉄、硫酸マンガン、などを用いても良い。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカー、プロモーター、宿主菌等の種類に応じて適宜選択される。

40

【0064】

本発明の改変酵素を回収するには、以下の方法などがある。本発明の改変酵素は、本発明の形質転換体を回収した後、菌体を破碎(例、ソニケーション、ホモジナイゼーション)あるいは溶解(例、リゾチーム処理)することにより、破碎物および溶解物として得ることができる。このような破碎物および溶解物を、抽出、沈澱、濾過、カラムクロマトグ

50

ラフィー等の手法に供することにより、本発明の改変酵素を得ることができる。

【0065】

本発明は、グリシンの分析方法を提供する。本発明の分析方法は、本発明の改変酵素を用いて、被検試料中に含まれるグリシンを測定することを含み得る。

【0066】

被検試料としては、グリシンを含有すると疑われる試料である限り特に限定されず、例えば、生体由来試料（例、血液、尿、唾液、涙など）や食飲料品（例、栄養ドリンクやアミノ酸飲料など）が挙げられる。被検試料中のグリシンは、低濃度（例、 $1\ \mu\text{M}$ 以上 $1\ \text{mM}$ 未満等の $1\ \text{mM}$ 未満の濃度）であっても、高濃度（例、 $1\ \text{mM}$ 以上 $1\ \text{M}$ 未満等の $1\ \text{mM}$ 以上の濃度）であってもよい。

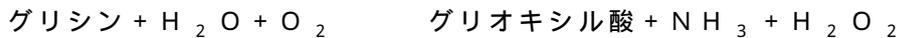
10

【0067】

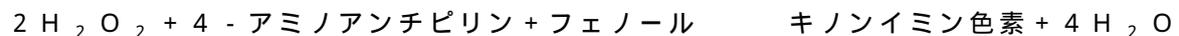
本発明の分析方法は、本発明の改変酵素を用いてグリシンを測定できる限り特に限定されず、生成したグリオキシル酸を検出してもよく、また、グリオキシル酸の生成に伴い副生する $\text{NH}_3$ または $\text{H}_2\text{O}_2$ を検出してもよい。あるいは、他の反応と共役させて、共役反応の生成物を検出してもよい。このような共役反応としては、例えば、以下の共役反応が挙げられる。

【0068】

グリシン酸化反応) グリシン酸化酵素により触媒される反応



共役反応) ペルオキシダーゼにより触媒される反応



20

【0069】

上記共役反応を利用する場合、グリシンの測定は、本発明の改変酵素に加えて、4-アミノアンチピリンおよびフェノール、ならびにペルオキシダーゼを用いて行うことができる。具体的には、水溶液（例、緩衝液）中において、被検試料を4-アミノアンチピリン（4-aminoantipyrine）およびフェノール、ならびにペルオキシダーゼと混合し、次いで、混合試料を上記の酵素反応に供し、最後に、生成したキノンイミン色素（quinoneimine dye）の吸光度（約 $500\ \text{nm}$ ）を検出することにより、グリシンが測定される。測定は、定性的または定量的に行うことができる。測定は、例えば、全ての基質が反応するまで測定を行うエンドポイント法に基づいて行われてもよいし、レート法（初速度法）に基づいて行われてもよい。なお、酸化反応において必要とされる酸素量は微量であるため、反応系中の溶存酸素により必要な酸素量が賄えることから、通常、反応系中へ酸素や酸素を含む気体を強制的に供給する必要はない。

30

【0070】

本発明の改変酵素は、グリシン以外のアミノ酸（例、L-アミノ酸）に対して反応しないか、またはそれに対する反応性が極めて低い。したがって、被検試料中に、グリシンのみならず、他のアミノ酸が含まれている場合にも、本発明の改変酵素を用いることで、被検試料中のグリシンの量を特異的に評価することができる。

【0071】

また、本発明の改変酵素を用いた過酸化水素電極を用いることで、被検試料中のグリシンの量を特異的に評価することができる。

40

【0072】

さらに、本発明は、(A)本発明の改変酵素を含む、グリシン分析用キットを包含する。

本発明のキットは、(B)反应用緩衝液または緩衝塩、(C)過酸化水素検出試薬、(D)アンモニア検出試薬および(E)グリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つをさらに含むことができる。

【0073】

(B)反应用緩衝液または緩衝塩は、反応液中のpHを目的の酵素反応に適した値に維持するために用いられる。

50

## 【 0 0 7 4 】

( C ) 過酸化水素検出用試薬は、過酸化水素の検出を例えば発色や蛍光などによって行う場合に用いる。例えば、ペルオキシダーゼとその基質となり得る発色剤の組み合わせが挙げられ、具体的には、例えば西洋わさびペルオキシダーゼと 4 アミノアンチピリンおよびフェノールの組み合わせなどが挙げられるが、この組み合わせに限定されない。

## 【 0 0 7 5 】

( D ) アンモニア検出試薬としては、例えばフェノールと次亜塩素酸を組み合わせたインドフェノール法などが挙げられる。

## 【 0 0 7 6 】

( E ) グリオキシル酸検出試薬としては、例えば非特許文献 6 に記載の試薬の組み合わせなどが挙げられる。

10

## 【 0 0 7 7 】

本発明はまた、( a ) デバイス、および( b ) 本発明の改変酵素を含む、グリシン分析用検出系を提供する。

## 【 0 0 7 8 】

本発明の改変酵素は、使用の際にデバイス中に供給され得るマイクロデバイスとは独立したユニットとして存在していてもよいが、予めデバイスに、注入、固定または配置されていてもよい。好ましくは、本発明の改変酵素は、予めデバイスに注入、固定または配置された形態で提供される。本発明の改変酵素のデバイスへの固定または配置は、直接的または間接的に行われる。デバイスとしては、例えば、流路を備えるマイクロ流路チップ等のマイクロデバイスを好適に用いることができる。

20

## 【 0 0 7 9 】

本発明のグリシン分析用検出系は、( c ) 反应用緩衝液または緩衝塩、過酸化水素検出試薬、アンモニア検出試薬およびグリオキシル酸検出試薬の少なくとも一つの構成要素をさらに含んでもよい。本発明のグリシン分析用検出系では、( c ) の構成要素の全部がデバイス中に収容された形態で提供されてもよい。あるいは、( c ) の構成要素の一部がデバイス中に収容された形態で提供され、残りのものがデバイス中に収容されない形態(例、異なる容器に収容された形態)で提供されてもよい。この場合、デバイス中に収容されない( c ) の構成要素は、標的物質の測定の際に、デバイス中に注入されることにより使用されてもよい。

30

## 【 0 0 8 0 】

デバイスとしては、例えば、1) 試料と( c ) の構成要素とを混合して混合液を調製するための第 1 区域、および調製された混合液を、本発明の改変酵素と接触させて、グリシンを検出するための第 2 区域を備えるデバイス(混合および検出の各工程が異なる区域で行われるデバイス); 2) 試料と( c ) の構成要素と本発明の改変酵素とを混合して、本発明の改変酵素によりグリシンを検出するための区域を備えるデバイス(混合および検出の各工程が同一区域で行われるデバイス); ならびに 3) 試料と( c ) の構成要素と(および必要に応じて本発明の改変酵素と)の混合を可能にする流路、および本発明の改変酵素によりグリシンを検出するための区域を備えるデバイス(デバイスの注入口に試料を注入すると、流路を介して送液されて試料等が自動的に混合され、得られた混合液中のグリシンが検出区域中で自動検出されるデバイス)が挙げられる。自動化の観点からは、3) のデバイス、特にマイクロ流路デバイスの形態である 3) のデバイスが好ましい。3) のデバイスでは、本発明の改変酵素は、流路を流れる送液中に提供されても、検出区域に固定または配置された形態で提供されてもよいが、好ましくは検出区域に固定または配置された形態で提供される。

40

## 【 0 0 8 1 】

本発明はまた、( a ) 検出用電極、および( b ) 検出用電極に固定または配置された本発明の改変酵素を含む、グリシン分析用酵素センサーを提供する。本発明の改変酵素は、電極に直接または間接的に固定または配置される。

## 【 0 0 8 2 】

50

前記の検出用電極としては、例えば、過酸化水素検出用電極を用いることが可能であり、より具体的には、酵素式過酸化水素検出用電極や隔膜式過酸化水素検出用電極などが例として挙げられる。この場合、グリシン酸化活性によりグリシンが酸化された際に生じる過酸化水素を検出することで、グリシンの分析が可能となる。それ以外の構成は、公知のセンサーで採用されている構成をそのまま、あるいは適宜改変して利用することができる。

【実施例】

【0083】

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0084】

〔実施例1〕セルフリー合成系を用いたGlyOXの合成およびGlyOXの精製

*Bacillus subtilis* 168株由来GlyOXの野生型の遺伝子または目的とする変異型の遺伝子を鋳型に用いて、2-Step PCR法で、ヒスチジンタグおよびTEVプロテアーゼ認識配列をN末端側に融合させ、かつ目的の変異が導入されたコンストラクトの直鎖状DNAを調製した。このDNAを鋳型として用いて、大腸菌由来のセルフリー合成反応系でタンパク質を合成した。1mLの反応スケールにて、透析法で6時間合成を行った産物を遠心し、その上清画分について、Ni Sepharose High Performance (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いたヒスチジンタグアフィニティ精製の溶出画分を得た。続いて、SDS-PAGEおよびSYPRO ORANGE Protein Gel Stain (ライフテクノロジーズジャパン株式会社)を用いた染色により目的酵素と考えられるタンパク質の存在を確認し、Bradford法によるタンパク質量を行った後、評価に供した。なお、野生型酵素についても同様の手順で、直鎖状DNAの調製、セルフリー合成、酵素の精製および分析を行った。精製には、下記の緩衝液を用いた。

結合バッファ：750mM NaCl、20mM NaPi、pH 8.0

洗浄バッファ：750mM NaCl、20mM NaPi、pH 8.0

回収・測定バッファ：300mM NaCl、50mM NaPi、34mM EDTA、pH 7.0、10% D<sub>2</sub>O、0.01% NaN<sub>3</sub>

なお、変異を複数導入した変異型GlyOXを示す場合、導入した変異を/で区切り、続けて記載する。例えば、T42A/C245Sは、T42AとC245Sの2つの変異を有する変異型GlyOXであることを意味する。WTは野生型であることを意味する。

【0085】

〔実施例2〕活性測定

実施例1で合成された野生型GlyOXおよび変異型GlyOXの活性評価は、以下の手順にて行った。まず、下記の反応液Aおよび反応液Bを調製した。

反応液A：4mM フェノール、100mM リン酸カリウム、pH 8.0

反応液B：50mM 4-アミノアンチピリン、500U/ml ペルオキシダーゼ

続いて、96穴マイクロプレートを用い、25℃にて、反応液Aを49μl、反応液Bを1μl、2.5mM Glyまたは100mM Glyを10μl、超純水を20μl、0.5mg/ml GlyOXを20μl混合した液の、波長500nmにおける吸光度の3分後の変化をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e、モレキュラーデバイス ジャパン株式会社)を用いて測定した。表7および8に、各変異型GlyOXの活性を、野生型GlyOXの活性に対する比で示した。各値は、同一サンプルについて3回実験を行った際の平均値より算出した。なお、表7は直鎖状DNAを調製する際に野生型の遺伝子を鋳型として用いて、表8は目的とする変異型の遺伝子を鋳型として用いて合成したタンパク質に関する結果である。

【0086】

10

20

30

40

## 【表 7】

表 7. 各変異型 GlyOX の野生型に対する相対活性

	野生型に対する相対活性	
	反応系中の Gly 濃度	
	0.25 mM	10 mM
T42A	2.59	1.05
T42S	1.03	1.35
C245A	0.29	0.87
C245D	0.04	0.07
C245G	0.12	0.38
C245H	0.36	0.93
C245N	0.19	0.58
C245S	0.41	0.84
C245W	0.06	0.26
C245Y	0.18	0.72
L301A	0.58	0.34
L301I	2.57	1.02
L301N	0.12	0.05
L301S	0.11	0.07
L301V	4.19	0.87

10

20

【 0 0 8 7 】

【表 8】

表 8. 各変異型 GlyOX の野生型に対する相対活性

	野生型に対する相対活性	
	反応系中の Gly 濃度	
	0.25 mM	10 mM
T42C	2.78	0.59
T42G	2.94	0.97
L301C	3.64	0.56
L301P	0.47	0.81
L301T	3.90	0.75
T42A/C245S	1.37	0.60
T42A/L301C	4.84	0.28
T42A/L301V	3.74	0.44
T42S/C245S	0.30	1.00
T42S/L301C	2.47	0.15
T42S/L301V	4.80	0.56
C245S/L301C	1.23	0.13
C245S/L301V	3.31	0.48
T42A/C245S/L301V	3.33	0.42
T42S/C245S/L301C	1.40	0.09
T42S/C245S/L301V	3.10	0.62

10

20

## 【 0 0 8 8 】

## 〔実施例 3〕安定性の評価

実施例 1 で合成された野生型酵素および変異型酵素の安定性評価は、下記手順にて行った。0.5 mg/ml GlyOX をマイクロチューブへ分注し、4、40、50、60 にて 1 時間インキュベーションした。その後、これら酵素液について、実施例 2 にて添加する基質溶液を 100 mM Gly とした条件で、反応 10 分後の吸光度変化から活性を測定し、4 でインキュベーションした酵素液の活性に対する比として残存活性を求めることで、安定性を評価した。その結果を表 9 および 10 に示す。各値は、表 9 の L301 を変異した GlyOX については同一サンプルを用いた 2 回の実験から、それ以外の GlyOX については 3 回の実験から求めた平均値より算出した。なお、表 9 は直鎖状 DNA を調製する際に野生型の遺伝子を鋳型として用いて、表 10 は目的とする変異型の遺伝子を鋳型として用いて合成したタンパク質に関する結果である。

30

## 【 0 0 8 9 】

## 【表9】

表9. 野生型および各変異型GlyOXの、1時間加熱後の残存活性

	残存活性		
	インキュベーション温度		
	40℃	50℃	60℃
C245D	1.07	0.50	0.00
C245G	1.03	0.63	0.01
C245H	0.97	0.71	0.01
C245N	0.99	0.66	0.01
C245W	1.05	0.94	0.12
C245Y	1.05	0.68	0.02
L301A	0.87	0.31	0.02
L301N	0.88	0.27	0.03
L301S	0.85	0.37	0.03
WT	0.95	0.52	0.01

10

【0090】

20

## 【表 10】

表 10. 野生型および各変異型 GlyOX の、1 時間加熱後の残存活性

	残存活性		
	インキュベーション温度		
	40°C	50°C	60°C
T42A	0.99	0.92	0.19
T42S	1.00	0.93	0.32
T42C	0.92	0.32	0.00
T42G	1.02	0.87	0.01
C245A	0.93	0.73	0.01
C245S	0.97	0.82	0.04
L301C	0.97	0.68	0.00
L301I	0.98	0.90	0.06
L301V	0.98	0.94	0.13
L301P	1.00	0.87	0.00
L301T	0.93	0.43	0.00
T42A/C245S	0.96	0.95	0.56
T42A/L301C	0.99	0.89	0.03
T42A/L301V	0.95	0.96	0.39
T42S/C245S	1.04	0.97	0.75
T42S/L301C	1.00	0.78	0.00
T42S/L301V	0.97	0.94	0.10
C245S/L301C	0.99	0.89	0.01
C245S/L301V	0.98	0.95	0.55
T42A/C245S/L301V	0.98	0.96	0.74
T42S/C245S/L301C	1.00	0.90	0.00
T42S/C245S/L301V	0.96	0.94	0.56
WT	0.97	0.69	0.01

10

20

30

## 【0091】

〔実施例 4〕大腸菌を用いた GlyOX 発現系および GlyOX の精製

大腸菌を用いた GlyOX の組換え発現系を構築した。まず、組換え発現用のプラスミドを構築した。DNA プライマー 1 (TAATTCCATGGCTAAAAGGCATTATGAAGCAGTGGTGATTG : 配列番号 3) および DNA プライマー 2 (TAATACTCGAGTATCTGAACCGCCTCCTTGCGATC : 配列番号 4) を用いて、標準的な PCR 法により目的遺伝子を増幅した。続いて、NcoI (タカラバイオ株式会社) と XhoI (タカラバイオ株式会社) を用いて、PCR 産物と pET-28a (メルク株式会社) を制限酵素消化し、プラスミドの消化物はさらに Alkaline Phosphatase (E. Coli C75) (タカラバイオ株式会社) で脱リン酸処理した後、QIAquick PCR Purification Kit (株式会社キアゲン) を用いて除タンパク及び不要な消化断片の除去を行った。得られた両産物を、Ligation High Ver. 2 (東洋紡績株式会社) を用いてライゲーションし、標準的な方法でライゲーション産物による大腸菌 DH5 の形質転換体を取得した。得られた DH5 の形質転換体からプラスミドを抽出し、標準的な DNA 配列の解析法を用いて、プラスミドへの目的遺伝子の挿入を確認した。この目的遺伝子が挿入されたプラスミドを、以後、pET28a-GlyOX、pET28a-GlyOX による BL21 (DE3) の形質転換体を pET28a-GlyOX-BL21 (DE3) と呼ぶ。

40

50

## 【0092】

GlyOXの調製は、下記のようにして行った。まず、pET28a-GlyOX-BL21(DE3)のグリセロールストックから、25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLBプレートへ植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、静置培養した。25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地50mlを250ml容量のバッフル付フラスコへ入れ、LBプレート上のシングルコロニーから植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、旋回振盪にて培養した。25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地2Lを5L容量のバッフル付フラスコへ入れ、先の一晩培養した液を全量添加し、OD<sub>660</sub>の値が0.5~0.6となった時点でIPTGを終濃度0.5mMとなるよう添加した。続いて、旋回振盪で30 $^{\circ}$ Cの下一晩培養した後に集菌し、生理食塩水で洗浄後、破碎用バッファ(20mM Tris-HCl、0.02 $\mu$ M Flavin adenine dinucleotide、pH8.0)にて菌体を懸濁し、超音波破碎機(201M、株式会社久保田製作所)を用いて180Wで20分間処理した。この破碎液を12000 $\times$ gで30分間遠心し上清を回収した後、Washバッファ(50mM HEPES、500mM NaCl、20mM imidazole、0.02 $\mu$ M Flavin adenine dinucleotide、pH7.5)で平衡化したNi Sepharose 6 Fast Flow(GEヘルスケア・ジャパン株式会社)へ添加し、室温で5分穏和に転倒混和した後、エコノパックカラム(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)を用いて自然落下により溶液を除いた。続いてWashバッファで洗浄した後、溶出バッファ(50mM HEPES、500mM NaCl、500mM imidazole、0.02 $\mu$ M Flavin adenine dinucleotide、pH7.5)で目的タンパク質であるGlyOXを溶出した。GlyOX溶液は、限外濾過によりストック用バッファ(50mM リン酸カリウム、0.02 $\mu$ M Flavin adenine dinucleotide、pH8.0)へ溶媒を置換し、濃度を0.5mg/mlに調製した。

10

20

## 【0093】

〔実施例5〕大腸菌を用いたT42A/C245S/L301V変異型の調製

T42A/C245S/L301V変異型を、下記のようにして調製した。QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて、pET28a-GlyOXを鋳型として製品添付のプロトコルに従い、GlyOX遺伝子への変異導入を行った。変異の複数導入については、変異を入れたプラスミドを鋳型として用い変異を追加していくことで行った。この変異導入済みプラスミドを用いて、実施例4に記載の方法に従い組換え発現、精製および溶媒置換を行うことで、T42A/C245S/L301V変異型を取得した。

30

## 【0094】

〔実施例6〕大腸菌を用いた変異型の調製

目的とする変異型を、下記のようにして調製した。QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて、pET28a-GlyOXを鋳型として製品添付のプロトコルに従い、GlyOX遺伝子への変異導入を行った。変異の複数導入については、変異を入れたプラスミドを鋳型として用い変異を追加していくことで行った。この変異導入済みプラスミドを用いて、以下に記載の方法に従い組換え発現、精製および溶媒置換を行うことで、目的とする変異型を取得した。

40

## 【0095】

GlyOXの調製は、下記のようにして行った。まず、pET28a-GlyOX-BL21(DE3)のグリセロールストックから、25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLBプレートへ植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、静置培養した。25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地50mlを250ml容量のバッフル付フラスコへ入れ、LBプレート上のシングルコロニーから植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩、旋回振盪にて培養した。25 $\mu$ g/mlカナマイシンを含むLB培地1Lを5L容量のバッフル付フラスコへ入れ、先の一晩培養した液を

50

10 mL 添加し、OD660の値が0.5~0.6となった時点でIPTGを終濃度0.5 mMとなるよう添加した。続いて、旋回振盪で30 の下一晩培養した後に集菌し、生理食塩水で洗浄後、破碎用バッファ(20 mM Tris-HCl、0.02 μM Flavin adenine dinucleotide、pH8.0)にて菌体を懸濁し、超音波破碎機(201 M、株式会社久保田製作所)を用いて180 Wで20分間処理した。この破碎液を12000 × gで30分間遠心し上清を回収した後、Washバッファ(50 mM HEPES、500 mM NaCl、20 mM imidazole、0.02 μM Flavin adenine dinucleotide、pH7.5)で平衡化したHisTrap FF crude(GEヘルスケア・ジャパン株式会社)へ添加した。続いてWashバッファで洗浄した後、溶出バッファ(50 mM HEPES、500 mM NaCl、500 mM imidazole、0.02 μM Flavin adenine dinucleotide、pH7.5)で目的タンパク質であるGlyOXを溶出した。GlyOX溶液は、限外濾過によりストック用バッファ(50 mM リン酸カリウム、0.02 μM Flavin adenine dinucleotide、pH8.0)へ溶媒を置換し、濃度を0.5 mg/mlに調製した。

10

【0096】

〔実施例7〕活性測定

野生型と実施例6で合成された変異型GlyOXについて、活性を評価した。具体的には、実施例2に示す組成のうち、酵素液を実施例6で調製したGlyOXとした。その結果を表11に示す。

20

【0097】

【表11】

表11. 各変異型GlyOXの野生型に対する相対活性

	野生型に対する相対活性	
	反応液中のGly濃度	
	0.25mM	10mM
M49I	0.29	0.29
S190R	0.84	0.81
G304Y	0.77	0.88
S44K	1.02	0.96
T42A/C245S/L301V/M49I	0.24	0.06
T42A/C245S/L301V/S190R	0.84	0.24
T42A/C245S/L301V/G304Y	0.92	0.80
T42A/C245S/L301V/S44K	1.11	0.31
T42A/C245S/L301V/G304Q	1.49	0.84

30

【0098】

〔実施例8〕安定性の評価

野生型と実施例6で合成された変異型GlyOXについて、安定性を評価した。具体的には、実施例3に示す組成のうち、酵素液を実施例6で調製したGlyOXとした。その結果を表12に示す。

40

【0099】

## 【表 1 2】

表 1 2. 野生型および各変異型 G l y O X の、1 時間加熱後の残存活性。

	残存活性		
	インキュベーション温度		
	40°C	50°C	60°C
M49I	0.91	0.74	0.25
S190R	0.89	0.70	0.05
G304Y	0.90	0.65	0.02
S44K	0.91	0.70	0.04
T42A/C245S/L301V/M49I	0.96	0.92	0.36
T42A/C245S/L301V/S190R	0.88	0.79	0.18
T42A/C245S/L301V/G304Y	0.91	0.81	0.42
T42A/C245S/L301V/S44K	0.90	0.77	0.16
T42A/C245S/L301V/G304Q	0.89	0.79	0.37
WT	0.92	0.66	0.01

10

## 【 0 1 0 0 】

〔実施例 9〕大腸菌を用いた T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型の調製

20

T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q を実施例 5 と同様の方法で調製した。

## 【 0 1 0 1 】

〔実施例 1 0〕基質特異性の評価

野生型と T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型と T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型について、基質特異性を確認した。具体的には、実施例 2 に示す組成のうち、酵素液を実施例 4 または実施例 5 または実施例 9 で調製した G l y O X 溶液とし、基質として G l y 溶液の代わりに ( 1 ) 1 m M G l y、( 2 ) 標準アミノ酸 2 0 種類、シスチン、タウリン、シトルリン、オルニチンおよび - アミノ酪酸をそれぞれ 1 m M 含有する混合液、( 3 ) ( 2 ) の 2 5 種類の混合液から G l y を除いたもの、のいずれかを用いて活性を求めることで評価した。なお、T y r とシスチンは 2 M H C l、それ以外のアミノ酸は 0 . 1 M H C l で溶解して 1 0 0 m M 溶液を調製し、各アミノ酸溶液を混合した後に超純水で 1 0 0 倍希釈することでアミノ酸溶液を調製した。この際、( 1 ) および ( 3 ) では、混合しないアミノ酸溶液の代わりに 2 M H C l または / および 0 . 1 M H C l を混合した。活性は、3 7 で波長 5 0 0 n m における吸光度の変化 ( A b s <sub>500</sub> ) をマイクロプレートリーダーで検出することで求めた。野生型に関する結果を図 1 に、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型に関する結果を図 2 に、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型に関する結果を図 3 に示す。基質が上記 ( 1 )、( 2 )、( 3 ) の場合を、それぞれ G l y、2 5 m i x、2 5 m i x - G l y と表現した。野生型、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型すべて、G l y 以外のアミノ酸に対する触媒活性は見られなかった。G l y と共に他のアミノ酸が共存した条件下においては、野生型および T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型では他のアミノ酸による反応阻害が見られ、野生型の反応開始より 1 0 分後の A b s <sub>500</sub> は G l y のみを基質とした場合の 8 5 %、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型の反応開始より 1 0 分後の A b s <sub>500</sub> は G l y のみを基質とした場合の 5 2 % であったが、T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型については反応阻害が見られず性質が改善されていた。

30

40

## 【 0 1 0 2 】

〔実施例 1 1〕G l y 濃度依存的な吸光度変化の確認

T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型または T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V /

50

G304Q変異型を用いて、反応系中のGly濃度とエンドポイント法で得られる吸光度との関係を確認した。まず、反応液C(4mM フェノール、100mM HEPES、pH8.0)を調製し、96穴マイクロプレートを用いて37℃にて、反応液Cを49μl、50mM 4-アミノアンチピリンを1μl、500U/ml ペルオキシダーゼを1μl、各種濃度のGly水溶液10μl、超純水を19μl、4.0mg/ml GlyOXを20μl混合した液の、10分後の波長500nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。この実験を3回行い、平均値を求めた。酵素液には実施例5または実施例9で調製したGlyOX溶液を、Gly水溶液は0M(すなわち超純水)、0.025mM、0.05mM、0.1mM、0.25mM、0.5mM、1mM、2.5mMの濃度に調製したものをを用いた。反応系中のGly濃度と吸光度の関係は、図4または5に示す通り良好な正の相関を示し、本酵素を用いたGlyの測定が可能であることが示された。なお、図4または5におけるエラーバーは標準偏差を示す。

10

## 【0103】

〔実施例12〕血漿中Glyの定量分析

T42A/C245S/L301V変異型またはT42A/C245S/L301V/G304Q変異型を用いて、ヒト血漿中のGlyを定量分析した。反応、測定はキュベットを用いて37℃にて行った。実施例11の反応液Cを441μl、50mM 4-アミノアンチピリンを9μl、500U/ml ペルオキシダーゼを9μl、超純水を171μl、測定検体として各種濃度のGly水溶液またはヒト血漿を90μl混合した液(合計720μl)へ4.0mg/ml GlyOXを180μl混合させる前および混合10分後の波長500nmおよび800nmにおける吸光度(Abs500nm(前)、Abs500nm(後)、Abs800nm(前)、Abs800nm(後))を測定した。酵素液には実施例5または実施例9で調製したGlyOX溶液を、Gly水溶液には0M(すなわち超純水)、0.25mM、0.5mMの濃度に調製したものをを用いた。

20

## 【0104】

反応前後の各測定ポイントにおける吸光度としては、Abs500nm - Abs800nmの値を用い、酵素液添加の前後における吸光度の変化量(Abs)は、(Abs500nm(後) - Abs800nm(後)) - (Abs500nm(前) - Abs800nm(前)) × 720 ÷ 900として求めた。検体としてGly水溶液を用いた際のAbsとGly濃度との関係から検量線を作成し、検体としてヒト血漿を用いた際のAbsから、ヒト血漿中のGly濃度を求めた。検量線は、各Gly濃度において3回実験を行った際の平均値を用いて作成し、同一ロットのヒト血漿サンプルを6回分析して、アミノ酸アナライザーにおける分析値(332μM)と比較した。以上を方法1として、結果を表13または14に示す。また、例えば体外診断用医薬品 認証番号第221AAMX00010000号 ダイヤカラー・リキッドBTR(東洋紡績株式会社)の添付文書に記載されているように、検体中の分析対象成分に基づく吸光度値と、既知濃度の分析対象成分に基づく吸光度値との比から濃度を求める方法(方法2)でGly濃度を求めた結果を、併せて表13または14に示す。いずれの方法を用いても、正確性、精密性ともに良好な結果となり、変異型GlyOXを用いたGly測定系を用いることで、ヒト血漿中のGly濃度を精度良く定量分析できることが示された。

30

40

## 【0105】

## 【表 1 3】

表 1 3. T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V 変異型 G l y O X を用いたヒト血漿中 G l y 濃度の分析結果と、アミノ酸アナライザーでの分析値 ( 3 3 2 μ M ) との乖離率

		1	2	3	4	5	6	平均値	C. V. (%)
Gly 濃度 ( μ M )	方法 1	340	340	336	339	342	345	341	0.9
	方法 2	342	342	338	341	344	347	342	0.9
乖離率 (%)	方法 1	2.5	2.4	1.3	2.2	3.2	4.0	2.6	-
	方法 2	3.0	2.9	1.8	2.7	3.6	4.5	3.1	-

10

## 【 0 1 0 6】

## 【表 1 4】

表 1 4. T 4 2 A / C 2 4 5 S / L 3 0 1 V / G 3 0 4 Q 変異型 G l y O X を用いたヒト血漿中 G l y 濃度の分析結果と、アミノ酸アナライザーでの分析値 ( 3 3 2 μ M ) との乖離率

		1	2	3	4	5	6	平均値	C. V. (%)
Gly 濃度 ( μ M )	方法 1	353	353	356	354	352	353	354	0.3
	方法 2	355	354	357	355	353	354	355	0.3
乖離率 (%)	方法 1	6.5	6.3	7.1	6.6	6.1	6.3	6.5	—
	方法 2	6.8	6.7	7.5	7.0	6.4	6.7	6.8	—

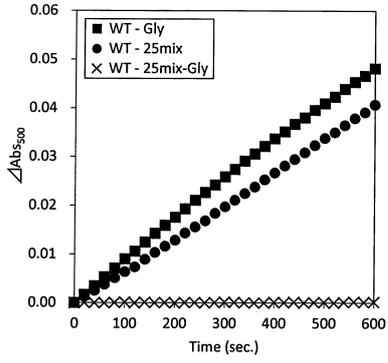
20

## 【産業上の利用可能性】

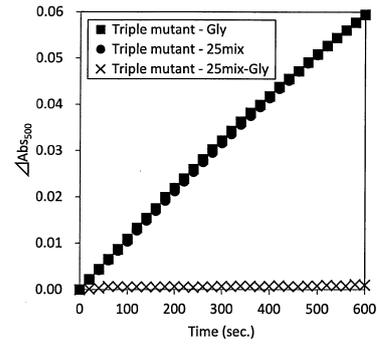
## 【 0 1 0 7】

本発明の改変酵素は、グリシンの迅速かつ高感度な測定、および/またはグリシンオキシレートの製造に有用である。本発明の改変酵素はまた、液状試薬として有用である。本発明の改変酵素はさらに、グリシンの特異的な測定に有用である。本発明の分析方法は、例えば、生体研究、健康栄養、医療、食品製造など広範な分野において有用である。

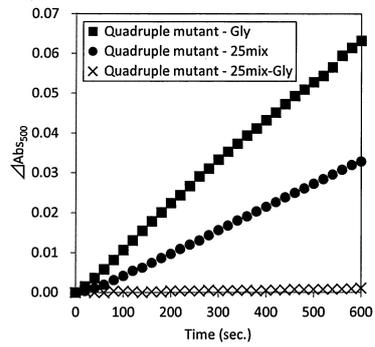
【 図 1 】



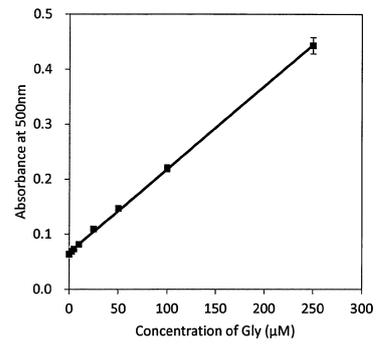
【 図 2 】



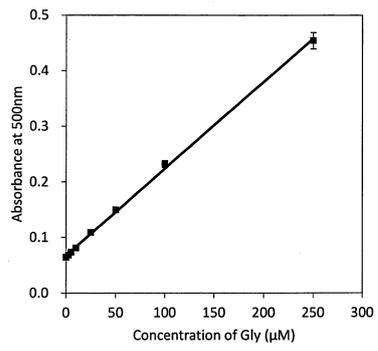
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0006350519000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
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
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68
G 0 1 N	37/00 (2006.01)	G 0 1 N	37/00 1 0 1
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34 E
G 0 1 N	27/327 (2006.01)	G 0 1 N	27/327 3 5 3 Z

- (72)発明者 高橋 一敏  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内
- (72)発明者 伊藤 萌美  
 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特開昭59-020853(JP,A)  
 J. Biotechnol., (2008), 133, [1], p.1-8  
 J. Biol. Chem., (2009), 284, [52], p.36415-36423

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 1 2 N 15/00 - 15/90  
 C 1 2 N 9/06  
 C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
 U n i P r o t / G e n e S e q  
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
 T h o m s o n I n n o v a t i o n