

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年11月11日(11.11.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/128677 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/02 (2006.01) C12Q 1/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/057826
- (22) 国際出願日: 2010年5月7日(07.05.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-113920 2009年5月8日(08.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人 北九州産業学術推進機構 (KITAKYUSHU FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF INDUSTRY SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒8080135 福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 河野 智謙 (KAWANO, Tomonori) [JP/JP]; 〒8080135 福岡県北九州市若松区ひびきの1番1号 北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科 内 Fukuoka (JP). 陽川 憲 (YOKAWA, Ken) [JP/JP]; 〒8080135 福岡県北九州市若松区ひびきの1番1号 北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科 内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 恩田 博宣, 外 (ONDA, Hironori et al.); 〒5008731 岐阜県岐阜市大宮町2丁目12番地の1 Gifu (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2010/128677 A1

(54) Title: ARTIFICIAL OXIDOREDUCTASE AND METHOD FOR USING SAME

(54) 発明の名称: 人工酸化還元酵素及びその使用方法

(57) Abstract: Disclosed is an artificial oxidoreductase having a structure wherein a metal ion binds to a polypeptide having 6 to 13 amino acids. The polypeptide contains, as the constituting amino acids thereof, tyrosine and histidine. The histidine residue is present at a position other than the N-terminus of the aforesaid polypeptide.

(57) 要約: 本発明の人工酸化還元酵素は、アミノ酸の数が6~13個のポリペプチドに金属イオンが結合した構造を有する。前記ポリペプチドは、構成アミノ酸としてチロシン及びヒスチジンを含む。ヒスチジン残基は前記ポリペプチドのN末端以外の位置に存在している。

明 細 書

発明の名称：人工酸化還元酵素及びその使用方法

技術分野

[0001] 本発明は、特定のポリペプチドからなる人工酸化還元酵素及びその使用方法に関する。

背景技術

[0002] 一般に、生物が生産する天然の触媒である酵素はアミノ酸が連なることで形成されるタンパク質（ポリペプチド）からなることが知られている。遺伝子工学に基づくアプローチにより既知の酵素のアミノ酸配列にランダムにアミノ酸配列を付加・延長させる人為的な「分子進化」によって有用な触媒機能を持つタンパク質を創出・選抜する手法（random elongation mutagenesis）の有用性が現在までに確認されている。例えば、非特許文献1には、カタラーゼ活性を主として有するタンパク質を、酸化還元酵素活性を主として有するタンパク質へと改変（進化）させる方法が開示されている。また、非特許文献2には、ランダムなアミノ酸配列からDNA結合能を持つタンパク質を選抜する方法が開示されている。

[0003] 現在、世界では、多くの研究者が、分子生物学の知見と技術を駆使してペプチド配列をデザインすることで新規の触媒活性を付与したタンパク質を創出することに取り組んでいる。しかしながら既に機能することが知られる酵素中のアミノ酸配列ですら、実際の反応において果たす役割についての理解は、全く十分ではない。そのため、人為的に「酵素」を創出する試みは必ずしも成功しているとは言えない。

[0004] 酸化還元酵素の例としては、例えば、 $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$ で表される基質の脱水素反応を触媒するペルオキシダーゼ、及び $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ で表される過酸化水素の分解反応を触媒するカタラーゼが知られている。酸化還元酵素は、分子生物学および生化学の基礎研究だけでなく医療・保健・食品・環境分野でも利用可能であるために、人工的な合成に成功すれば

工業的な応用が最も容易な酵素群の一つである。しかしながら、酸化還元酵素の多くは現在、生体による産生に依存しており、そのため、収量と品質がバッチやメーカーによって大きく異なる。したがって、高純度で高活性の酵素の調達にかかるコストを無視することができない。

- [0005] 天然の酸化還元酵素は主に、ヘムポケット内のヘムと周辺アミノ酸残基を活性中心とするヘムタンパク質である。酸化還元酵素活性の改変の為の試みとしては、変性による構造変化を利用することが知られている。例えばヘモグロビンのメト化により得られるメトヘモグロビンは、活性は低い酸化還元酵素様活性（シュード酸化還元酵素活性）を示す。メトヘモグロビンはまた、植物酸化還元酵素と同様にモノアミン類を基質として酸化し、スーパーオキシドの生成の触媒もする。一方、本来酸化還元酵素ではないタンパク質骨格にヘムを取り込ませて酸化還元酵素活性を付与する試みが知られている。例えば、アミロイドβペプチドにヘムを結合させると、酸化還元酵素活性が発現する。（非特許文献3参照）。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : Matsuura, T. et al., Nature Biotechnol. 17, 58-61 (1999)
非特許文献2 : Nakashima, T. et al., J. Biosci. Bioeng. 103(2), 155-160 (2007)
非特許文献3 : Atamna, H. and Boyle, K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(9), 3381-6 (2006)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、発明者らの鋭意研究の結果、これまでに酵素としての機能が全く知られていないアミノ酸配列を有する人為的に合成したペプチド短鎖について、酸化還元酵素活性を有することを発見したことに基づくものである。
- [0008] 本発明の目的とするところは、容易に且つ簡便に利用することができる人

工酸化還元酵素及びその使用方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0009] 上記目的を達成するために、本発明の第1の態様では、アミノ酸の数が6～13個のポリペプチドに金属イオンが結合した構造を有し、前記ポリペプチドが構成アミノ酸としてチロシン及びヒスチジンを含み、ヒスチジン残基が前記ポリペプチドのN末端以外の位置に存在している人工酸化還元酵素を提供する。
- [0010] 好ましくは、前記ポリペプチドは、Gly-His (GH) 及びPro-His (PH) から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号3, 4, 6～9, 12, 13から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号3, 4, 6～9, 12, 13から選ばれる一つのアミノ酸配列で表されるポリペプチドである。
- [0011] 好ましくは、前記人工酸化還元酵素は、カタラーゼ様反応を触媒する酵素又は過酸化水素依存性のスーパーオキシド生成反応を触媒する酵素である。
- 好ましくは、前記金属イオンは遷移金属イオンである。
- [0012] 好ましくは、前記人工酸化還元酵素は、タンパク質、ペプチド、多糖類、合成樹脂、金属及びガラスから選ばれる少なくとも一つに結合して構成される。
- 好ましくは、前記多糖類、合成樹脂、金属及びガラスは、繊維状、顆粒状、板状、棒状又は球状の形態を有する。
- [0013] 本発明の第2の態様では、前記第1の態様の人工酸化還元酵素を使用する方法を提供する。その方法は、人工酸化還元酵素の触媒による反応産物との反応により発光、蛍光、着色、及び色素沈着から選ばれる少なくとも一つを生じるプローブ化合物を利用して人工酸化還元酵素の触媒活性を検出することを含む。
- [0014] 好ましくは、前記プローブ化合物は、ルミノール、ジアミノベンジジン、及びウミホタルルシフェリンアナログから選ばれる少なくとも一つである。
- 本発明の第3の態様では、前記第1の態様の人工酸化還元酵素を使用する

別の方法を提供する。その方法は、人工酸化還元酵素を構成する前記ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化又は脱リン酸化することにより、人工酸化還元酵素の触媒活性を調節することを含む。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、容易に且つ簡便に利用することができる人工酸化還元酵素及びその使用方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 試験例 1 のペプチド C ~ F の触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される最大発光強度を示したグラフ。

[図2] 試験例 1 のペプチド C ~ F の触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される発光強度の時間変化を示したグラフ。

[図3] 試験例 2 の 8 種類のペプチドの触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される発光強度の時間変化を示したグラフ。

[図4] 試験例 2 の 8 種類のペプチドの触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される最大発光強度を示したグラフ。

[図5] 試験例 3 の 2 種類のペプチドの触媒作用によるカタラーゼ様反応で生じる酸素の濃度の時間変化を、ペプチドなしの場合に同様の測定を行ったときの結果と併せて示したグラフ。

[図6] 試験例 4 の 3 種類のペプチドの触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される発光強度の時間変化を、ペプチドなしの場合及び CuSO_4 なしの場合に同様の測定を行ったときの結果と併せて示したグラフ。

[図7] 試験例 4 の 3 種類のペプチドの触媒作用による過酸化水素依存性スーパーオキシド生成に基づいて測定される最大発光強度を、ペプチドなしの場合及び CuSO_4 なしの場合に同様の測定を行ったときの結果と併せて示したグラフ。

[図8] 試験例 5 のペプチドの触媒作用による過酸化水素の分解に基づいて測定される波長 240 nm における吸光度の時間変化を示したグラフ。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。

本実施形態の人工酸化還元酵素は、アミノ酸の数が6～13個のポリペプチドに金属イオンが結合した構造を有している。前記ポリペプチドは、構成アミノ酸としてチロシン及びヒスチジンを含む。前記ポリペプチドのチロシン残基は電子供与基として働く。前記ポリペプチドのヒスチジン残基は、前記ポリペプチドのN末端以外の位置に存在し、金属イオン結合領域を構成する。

[0018] チロシン及びヒスチジン以外の人工酸化還元酵素の構成アミノ酸はいずれのアミノ酸であってもよい。チロシン残基は、前記ポリペプチド内のいずれの位置に存在してもよい。ヒスチジン残基は、前記ポリペプチドのN末端以外の位置であればいずれの位置に存在してもよいが、人工酸化還元酵素の触媒活性をより向上させるためには前記ポリペプチドのC末端に位置するか、あるいはC末端の近くに位置することが望ましい。

[0019] 前記ポリペプチドは、人工酸化還元酵素の触媒活性をより向上させる観点からは、Gly-His (GH) 及びPro-His (PH) から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含むことが好ましく、より好ましくは配列番号3, 4, 6～9, 12, 13から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含み、さらに好ましくは配列番号3, 4, 6～9, 12, 13から選ばれる一つのアミノ酸配列で表されるポリペプチドである。

[0020] 人工酸化還元酵素は、タンパク質、ペプチド、多糖類、合成樹脂、金属及びガラスから選ばれる少なくとも一つに結合して構成されてもよい。人工酸化還元酵素が結合する多糖類、合成樹脂、金属及びガラスの形状は特に限定されないが、例えば、繊維状、顆粒状、板状、棒状及び球状が挙げられる。また、人工酸化還元酵素は、例えば生化学試験用キットとして用いられる合成樹脂製の容器の壁面にコーティングして用いてもよい。

[0021] 人工酸化還元酵素は、以下の理化学的性質を有する。

(a) ポリペプチド中に存在するチロシン残基が電子供与基として機能す

る。

(b) 過酸化水素や有機過酸化物などのペルオキシ構造(—O—O—)を有する過酸化物が電子受容体としての基質となる。

[0022] (c) 上記(b)に記載の過酸化物の分解産物である酸素、水及び活性酸素種、及び／又は反応中間体である有機ラジカル種と反応系に共存する分子酸素との二次反応の産物として生じるスーパーオキシド及び該スーパーオキシドから派生する活性酸素種を反応産物として生じる。

[0023] 人工酸化還元酵素の触媒活性の検出は、人工酸化還元酵素の触媒作用による反応産物、例えば一次反応産物又は二次反応産物との反応により発光、蛍光、着色、及び色素沈着から選ばれる少なくとも一つを生じるプローブ化合物を利用して行うことができる。このようなプローブ化合物は疑似基質として用いられてもよい。使用可能なプローブ化合物の例としては、ルミノール及びジアミノベンジジンのほか、スーパーオキシドと特異的に反応して発光するウミホタルルシフェリンアナログを挙げることができる。こうして触媒活性を検出することにより、人工酸化還元酵素の定量及び定性を行うことができる。

[0024] 人工酸化還元酵素は、人工酸化還元酵素の直接的な基質とはならない物質が人工酸化還元酵素の触媒作用による反応産物又は反応中間体、例えば活性酸素種や有機ラジカル種と反応することにより2次的に進行する反応の触媒としても利用することができる。そのような基質の例としてはポルフィリン類を挙げることができる。ポルフィリン類は、人工酸化還元酵素の直接的な基質となる過酸化水素と共存することで初めて人工酸化還元酵素の触媒作用により酸化的に開環する。

[0025] 人工酸化還元酵素の前記ポリペプチドは、公知の化学合成法又は遺伝子工学的的手法によって製造することができる。例えば、既知のアミノ酸配列からなるポリペプチドを各種の特異的プロテアーゼで処理することにより製造してもよい。遺伝子工学的的手法による前記ポリペプチドの製造は、公知のインビトロ(in vitro)タンパク合成系を利用して行うことができる。具体的に

は、前記ポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子を公知の任意のベクターに組み込み、該ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞などの宿主内に導入して形質転換体を作製し、該形質転換体を培養することによって行うことができる。

- [0026] 前記ポリペプチドに結合する金属イオンの例としては、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、コバルト (Co)、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、クロム (Cr)、及びチタン (Ti) などの遷移金属のイオン、セリウム (Ce)、ユーロピウム (Eu)、及びテルビウム (Tb) などの希土類金属のイオン、マグネシウム (Mg)、カルシウム (Ca)、及びストロンチウム (Sr) などのアルカリ土類金属のイオン、リチウム (Li)、ナトリウム (Na)、及びカリウム (K) などのアルカリ金属のイオンが挙げられる。これらの金属イオンは補因子としての役割を果たす。中でも好ましいのは、銅イオン、ニッケルイオン、コバルトイオン、鉄イオン、マグネシウムイオンであり、特に好ましいのは銅イオンである。
- [0027] 前記ポリペプチドの金属イオン結合領域に金属イオンが結合することによって、人工酸化還元酵素の触媒活性、すなわち酸化還元酵素様活性が発現する。人工酸化還元酵素は、例えば、過酸化水素を分解するカタラーゼ様反応を触媒したり、過酸化水素依存性のスーパーオキシド生成反応を触媒する。カタラーゼは、 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ で表される過酸化水素の分解反応を触媒する酵素として知られている。人工酸化還元酵素もまた、過酸化水素の分解反応を触媒する。
- [0028] 先に述べたとおり、前記ポリペプチドのチロシン残基は電子供与基として働く。したがって、このチロシン残基を公知の方法を用いて修飾することにより、人工酸化還元酵素の触媒活性を調節することが可能である。チロシン残基の修飾方法としては、例えばリン酸化及び脱リン酸化が挙げられる。チロシン残基のリン酸化又は脱リン酸化によれば、オンオフ制御を含む人工酸化還元酵素の触媒活性の調節を容易に行うことができる。
- [0029] 人工酸化還元酵素は、例えば試薬、医薬品及び飲食品等の分野において使

用することができる。また、人工酸化還元酵素は、タンパク質、ペプチド、多糖類、合成樹脂、金属、ガラスなどの基材に結合させて使用してもよいし、基材に結合させることなくそのまま使用してもよい。

[0030] 人工酸化還元酵素は、例えば分子生物学及び生化学の基礎研究だけでなく医療、保健、食品、環境、工業、及び研究用試薬分野においても用いることができる。具体的には、カタラーゼの代替酵素として、あるいは過酸化水素を対象としたバイオセンサ用酵素として人工酸化還元酵素は用いられる。環境・工業分野では、例えば、繊維・紙・パルプの漂白、電子機器部品の漂白、配管内スライムの除去、食品容器の殺菌、浴場のレジオネラ菌の殺菌などの用途で使用される過酸化水素の残留分を除去する目的で人工酸化還元酵素を使用することができる。研究用試薬としては、人工酸化還元酵素を例えば酸素発生試薬として利用することが考えられる。生化学分野においては、人工酸化還元酵素を例えばリン酸化研究用試薬として利用することが考えられる。また、バイオ燃料電池用の酸素電極資材としての利用も考えられる。

[0031] 人工酸化還元酵素は、医薬品又は試薬の分野において、酵素等のタンパク質又はペプチドに標識として結合させて使用してもよい。また、人工酸化還元酵素は、合成樹脂又はガラスに担持させてからカラム等に充填して使用してもよい。合成樹脂へのペプチドの担持は、例えばグラフト重合法で行うことができる。ガラス表面へのペプチドの固定は、例えばアレイ作成技術を利用して行うことができる。

[0032] 本実施形態の利点を以下に記載する。

本実施形態の人工酸化還元酵素は、従来の酸化還元酵素と少なくとも同じ程度に、容易に且つ簡便に利用することができる。

[0033] 人工酸化還元酵素は、従来の酸化還元酵素と比較して低分子である。このことは、安定性の向上及び酵素力価の向上を可能にする。

人工酸化還元酵素のポリペプチドがG l y - H i s (GH) 及びP r o - H i s (PH) から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号3, 4, 6~9, 12, 13から選ばれる少なくとも一つのA

ミノ酸配列を含むか、あるいは配列番号 3, 4, 6~9, 12, 13 から選ばれる一つのアミノ酸配列で表されるポリペプチドである場合、人工酸化還元酵素の触媒活性はより向上する。

- [0034] 酸化還元酵素であるペルオキシダーゼが触媒活性を発揮するためには一般に、フェノール類のような電子供与体の添加が必要である。しかしながら、本実施形態の人工酸化還元酵素は、電子供与体の別途の添加を必要とすることなく触媒活性を発揮し、例えば、過酸化水素の分解反応又はスーパーオキシドの生成反応を触媒する。よって、人工酸化還元酵素は、ペルオキシダーゼよりも利用が容易且つ簡便であり、また用途の範囲も広い。
- [0035] 人工酸化還元酵素をタンパク質、ペプチド、多糖類、合成樹脂及びガラスから選ばれる少なくとも一つに結合して構成した場合、工業、試薬、医薬品、飲食品等の分野において各種の用途で使用することができる。
- [0036] 人工酸化還元酵素の主体であるポリペプチドは、例えば公知の化学合成法又は遺伝子工学的手法によって製造することができる。したがって、天然の生体由来の酵素による産生に比べ、収量及び品質が時期や製造者によって大きく異なることがない。また、生体からの精製のような手間を必要としないために、人工酸化還元酵素の製造は安価で且つ短時間である。
- [0037] 人工酸化還元酵素は、比較的分子量であることから、高い安定性を有する。そのため、基質となる物質をモニターするのに用いられる化学センサー（例えば固定酵素センサーや屋外用酵素センサー）に適用した場合には、野外等の過酷な気象条件で長期間に亘って使用することが可能になると期待される。
- [0038] 人工酸化還元酵素を構成するポリペプチド中のチロシン残基を修飾することにより、人工酸化還元酵素の触媒活性は調節される。チロシン残基のリン酸化又は脱リン酸化によれば、オンオフ制御を含む人工酸化還元酵素の触媒活性の調節を容易に行うことができる。またこの場合、人工酸化還元酵素をリン酸化研究用試薬として利用することができる。
- [0039] 前記実施形態は以下のように変更してもよい。

前記実施形態の人工酸化還元酵素は、緩衝液等の溶液中に保存してもよいし、あるいは結晶状又は粉末状の形態で保存してもよい。

[0040] 前記実施形態の人工酸化還元酵素のポリペプチドを一つ以上の同じポリペプチドと公知の方法で連結したものを主体として人工酸化還元酵素を構成してもよい。かかる構成の人工酸化還元酵素も本発明の人工酸化還元酵素と同様の作用効果が期待される。

[0041] 人工酸化還元酵素のポリペプチドが遊離のオリゴペプチドである場合は、アミノ基末端をアセチル化してもよい。この場合、ポリペプチドの環状化を防ぐことができる点で有利である。

[0042] 次に、実施例を挙げて前記実施形態を更に具体的に説明する。

＜試験例 1：MAPキナーゼと人工ペルオキシダーゼのキメラによる新規人工酵素の作成＞

以下のA～Fの6種類のペプチドを人工的に合成した。

[0043] ペプチドA：ペルオキシダーゼ様活性を有する配列番号1のアミノ酸配列で表されるペプチド（以下、「G5H」とも表記する）、

ペプチドB：MAPキナーゼ（Mitogen activated protein kinase、Erk1）のリン酸化領域（MEK基質）に相当する配列番号2のアミノ酸配列で表されるチロシン残基含有ペプチド（以下、「Erk」とも表記する）、

ペプチドC：C末端側にペプチドA（G5H）のアミノ酸配列を有し、N末端側にペプチドB（Erk）のアミノ酸配列を有する配列番号3のアミノ酸配列で表されるキメラペプチド（以下、「ErkG5H」とも表記する）

、
ペプチドD：配列番号3のアミノ酸配列におけるチロシン残基がリン酸化されたペプチド（以下、「YpErkG5H」とも表記する）、

ペプチドE：配列番号3のアミノ酸配列におけるスレオニン残基がリン酸化されたペプチド（以下、「TpErkG5H」とも表記する）、

ペプチドF：配列番号3のアミノ酸配列におけるチロシン残基及びスレオニン残基がリン酸化されたペプチド（以下、「TpYpErkG5H」とも

表記する)。

[0044] スーパーオキシドアニオンと反応して発光する2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾール[1,2-a]ピラジン-3-オン(東京化成工業社製のCypridina luciferin analog(CLA))を使用してペプチドA~Fの過酸化水素依存性スーパーオキシド生成活性を評価した。より具体的には、pH7.0の50mMリン酸緩衝液に5 μ MのCLA、0.15mMのペプチドA~Fのいずれか、補因子として0.5mMのCuSO₄を順に添加し、最後に0.5mMの過酸化水素を添加した。このとき、ルミノメーター(アト株式会社製のルミネッセンサーAB-2200)を使用して、CLAによる発光を測定した。発光の測定は、過酸化水素を添加する60秒前から開始した。ペプチドC~Fについて同じ試験を4度行った結果を図1及び図2に示す。

[0045] 図1及び図2にはデータを示していないが、ペプチドA(G5H)又はペプチドB(Erk)を用いた場合には、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成は認められなかった。一方、図1及び図2に示されるように、ペプチドAとペプチドBのキメラであるペプチドC(ErkG5H)を用いた場合には、顕著な過酸化水素依存性スーパーオキシド生成が認められた。興味深いことに、このペプチドCのチロシン残基をリン酸化することにより、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成は大きく阻害された(図1及び図2中のペプチドD(YpErkG5H)の結果を参照)。これに対し、ペプチドCのスレオニン残基をリン酸化した場合には、チロシン残基をリン酸化した場合ほどには過酸化水素依存性スーパーオキシド生成は阻害されなかった(図1及び図2中のペプチドE(TpErkG5H)の結果を参照)。ペプチドCのチロシン残基及びスレオニン残基をリン酸化した場合には、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成は最も大きく阻害された(図1及び図2中のペプチドF(TpYpErkG5H)の結果を参照)。以上のことは、ペプチドCの触媒活性におけるチロシン残基の重要性を示している。

[0046] この結果から、人工ペルオキシダーゼであるペプチドAに、チロシン残基

を含んだペプチドを付加することにより、過酸化水素依存性の活性酸素生成を触媒することのできる人工酵素を作成できることが確認された。また、この人工酵素の触媒活性がリン酸化により制御可能であることが確認された。

[0047] <試験例 2 : ニワトリプリオン由来のアミノ酸配列を有する人工的に合成したペプチドによる過酸化水素依存性スーパーオキシド生成反応の触媒活性試験>

先に述べたとおり、ペルオキシダーゼが触媒活性を発揮するためには一般に、フェノール類のような電子供与体の添加が必要である。発明者らは、人工ペルオキシダーゼである配列番号 1 のアミノ酸配列で表されるペプチド A が触媒活性を発揮するのにも、チロシンなどのフェノール類の添加が必要であることを既に確認している。ニワトリプリオンの銅結合領域（ヘキサリピート領域）のアミノ酸配列にはチロシン残基が含まれている。そこで、このニワトリプリオン由来のアミノ酸配列を利用して新規の人工酵素の開発を検討した。具体的にはまず、以下の 8 種類のペプチド（オリゴペプチド）を合成した。

[0048] H e x 1 : 配列番号 4 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 2 : 配列番号 5 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 3 : 配列番号 6 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 4 : 配列番号 7 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 5 : 配列番号 8 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 6 : 配列番号 9 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 3 F : 配列番号 10 のアミノ酸配列で表されるペプチド、
H e x 6 F : 配列番号 11 のアミノ酸配列で表されるペプチド。

[0049] H e x 1 ~ H e x 6 はそれぞれ、ニワトリプリオンの銅結合領域において繰り返される 6 つのアミノ酸残基からなるリピート単位に相当するヘキサペプチドである。H e x 3 F は、H e x 3 のチロシン残基をフェニルアラニン残基で置き換えたヘキサペプチドである。H e x 6 F は、H e x 6 のチロシン残基をフェニルアラニン残基で置き換えたヘキサペプチドである。これら

8種類のペプチドの過酸化水素依存性スーパーオキシド生成活性を評価するべく、試験例1と同様にして行った試験の結果を図3及び図4に示す。なお、試験例1では過酸化水素を添加する60秒前から発光の測定を開始したが、試験例2では過酸化水素を添加する100秒前から発光の測定を開始した(図3参照)。

[0050] 図3及び図4に示されるように、Hex3を用いた場合に最も高い過酸化水素依存性スーパーオキシド生成が認められた。一方、ヒスチジン残基がN末端に位置するHex2や、チロシン残基を含まないHex3F及びHex6Fを用いた場合には、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成が弱くしか認められないか、あるいはほとんど認められなかった。

[0051] <試験例3：ニワトリプリオン由来のアミノ酸配列を有する人工的に合成したペプチドによるカタラーゼ様反応の触媒活性試験>

pH7.0の50mMリン酸カリウム緩衝液に、配列番号4のアミノ酸配列で表されるペプチドであるHex1及び配列番号8のアミノ酸配列で表されるペプチドであるHex5のいずれか0.15mM、0.5mMのCuSO₄及び10mMの過酸化水素を添加した。このとき、過酸化水素の分解により生じる酸素の濃度の時間変化を、酸素電極を用いて測定温度25℃で測定した結果を図5に示す。図5には、対照試験として、ペプチドなしの場合に同様の測定を行ったときの結果も示している。

[0052] 図5に示される結果からは、Hex1及びHex5のいずれを用いた場合も、過酸化水素を分解するカタラーゼ様反応が触媒されることが分かった。

<試験例4：植物由来のアミノ酸配列を有する人工的に合成したペプチドによる過酸化水素依存性スーパーオキシド生成反応の触媒活性試験>

アカザ科のAtriplex canescensへのオゾン暴露実験により、植物体内においてオゾンにより誘導されるペプチドがこれまでに単離されている。このペプチドは、水分欠乏やSO₂への暴露によっても植物体内で誘導されることが知られている。このペプチドは、配列番号13で表されるアミノ酸配列が繰り返されるリピート構造を有し、2価の銅イオンの結合を受けることが知ら

れている。したがって、このペプチドは銅イオンをキレートすることができ、これにより酸化ストレスを防御する働きをすとの報告もある。配列番号 13 で表されるアミノ酸配列は、試験例 1～3 で酸化還元反応に対する触媒活性を示したペプチドと類似した構造を有している。そのため、ニワトリプリオン由来のアミノ酸配列と同様、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成反応に対する触媒活性を有していることが期待される。

[0053] そこで、配列番号 12 のアミノ酸配列で表されるペプチド、配列番号 13 のアミノ酸配列で表されるペプチド、及び配列番号 14 のアミノ酸配列で表されるペプチドを人工的に合成した。これらのペプチドの過酸化水素依存性スーパーオキシド生成活性を評価するべく、試験例 1 と同様にして行った試験の結果を図 6 及び図 7 に示す。なお、試験例 1 では過酸化水素を添加する 60 秒前から発光の測定を開始したが、この試験例 4 では過酸化水素を添加する 100 秒前から発光の測定を開始した（図 6 参照）。また、図 6 及び図 7 には、対照試験として、ペプチドなしの場合に同様の試験を行ったときの結果、また配列番号 12 のアミノ酸配列で表されるペプチドを用いたが CuSO_4 （補因子）の添加を行わなかった場合に同様の試験を行ったときの結果も示している。

[0054] 図 6 及び図 7 に示されるように、配列番号 12 のペプチド及び配列番号 13 のペプチドを用いた場合、高い過酸化水素依存性スーパーオキシド生成が認められた。これら 2 つのペプチドを比較すると、ヒスチジン残基の位置が C 末端により近い配列番号 12 のペプチドを用いた場合において、より高い過酸化水素依存性スーパーオキシド生成が認められた。ヒスチジン残基が N 末端に位置する配列番号 14 のペプチドを用いた場合には、過酸化水素依存性スーパーオキシド生成がほとんど認められなかった。以上の結果からは、配列番号 12 のペプチド及び配列番号 13 のペプチドが過酸化水素依存性スーパーオキシド生成反応に対する触媒活性を発揮するためには遊離のチロシンの添加の必要がないことが分かった。

[0055] <試験例 5：植物由来のアミノ酸配列を有する人工的に合成したペプチド

による過酸化水素分解反応の触媒活性試験＞

配列番号 1 2 のペプチドを含んだ溶液中に銅イオン及び過酸化水素を添加したときの波長 2 4 0 n m における吸光度の時間変化を測定した結果を図 8 に示す。この試験により、図 8 に示されるように、過酸化水素が経時的に減少することが確認されたことから、配列番号 1 2 のペプチドが過酸化水素の分解を触媒することが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] アミノ酸の数が6～13個のポリペプチドに金属イオンが結合した構造を有し、前記ポリペプチドが構成アミノ酸としてチロシン及びヒスチジンを含み、ヒスチジン残基が前記ポリペプチドのN末端以外の位置に存在していることを特徴とする人工酸化還元酵素。
- [請求項2] 前記ポリペプチドは、G l y－H i s（GH）及びP r o－H i s（PH）から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項3] 前記ポリペプチドは、配列番号3，4，6～9，12，13から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸配列を含む、請求項2に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項4] 前記ポリペプチドは、配列番号3，4，6～9，12，13から選ばれる一つのアミノ酸配列で表されるポリペプチドである、請求項3に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項5] 前記人工酸化還元酵素は、カタラーゼ様反応を触媒する酵素又は過酸化水素依存性のスーパーオキシド生成反応を触媒する酵素である、請求項1から請求項4のいずれか一項に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項6] 前記金属イオンは遷移金属イオンである、請求項1から請求項5のいずれか一項に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項7] 前記人工酸化還元酵素は、タンパク質、ペプチド、多糖類、合成樹脂、金属及びガラスから選ばれる少なくとも一つに結合して構成されている、請求項1から請求項6のいずれか一項に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項8] 前記多糖類、合成樹脂、金属及びガラスは、繊維状、顆粒状、板状、棒状又は球状の形態を有する、請求項7に記載の人工酸化還元酵素。
- [請求項9] 請求項1から請求項8のいずれか一項に記載の人工酸化還元酵素の使用方法であって、

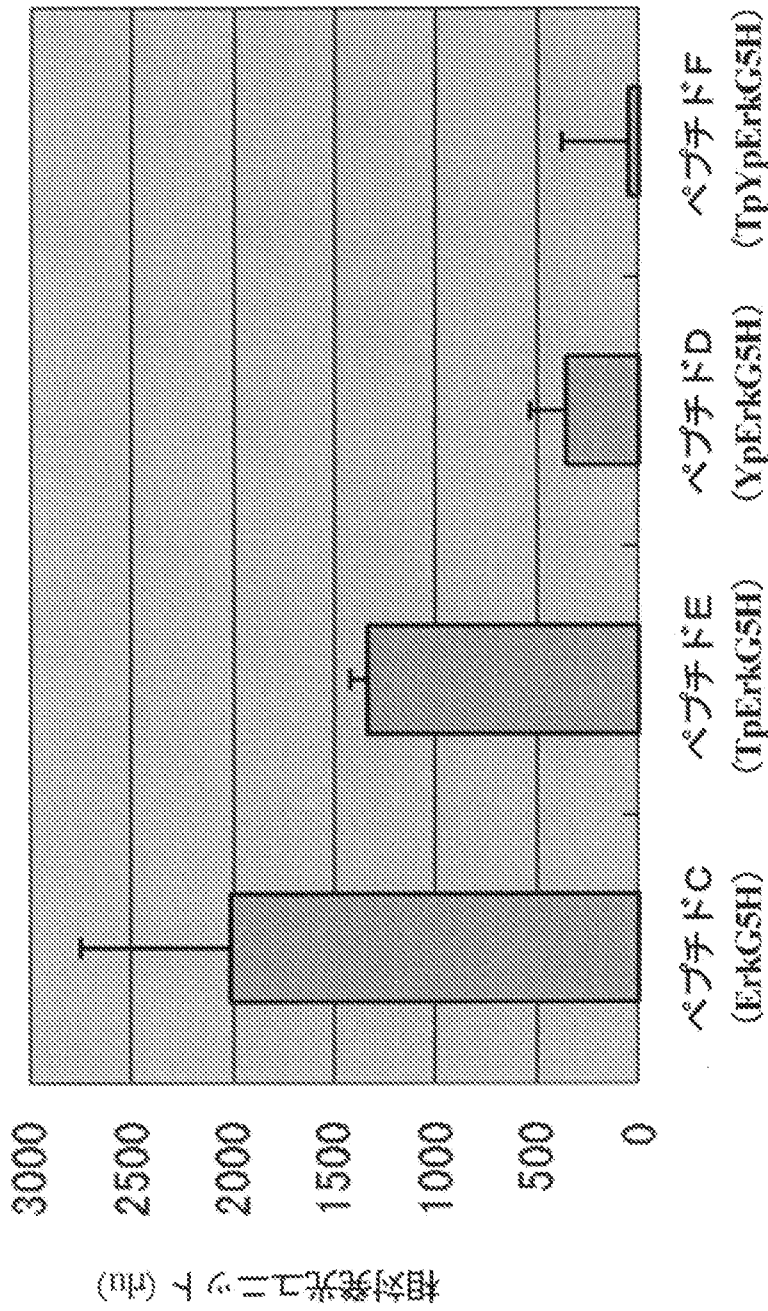
人工酸化還元酵素の触媒による反応産物との反応により発光、蛍光、着色、及び色素沈着から選ばれる少なくとも一つを生じるプローブ化合物を利用して人工酸化還元酵素の触媒活性を検出することを含むことを特徴とする方法。

[請求項10] 前記プローブ化合物は、ルミノール、ジアミノベンジジン、及びウミホタルルシフェリンアナログから選ばれる少なくとも一つである、請求項9に記載の方法。

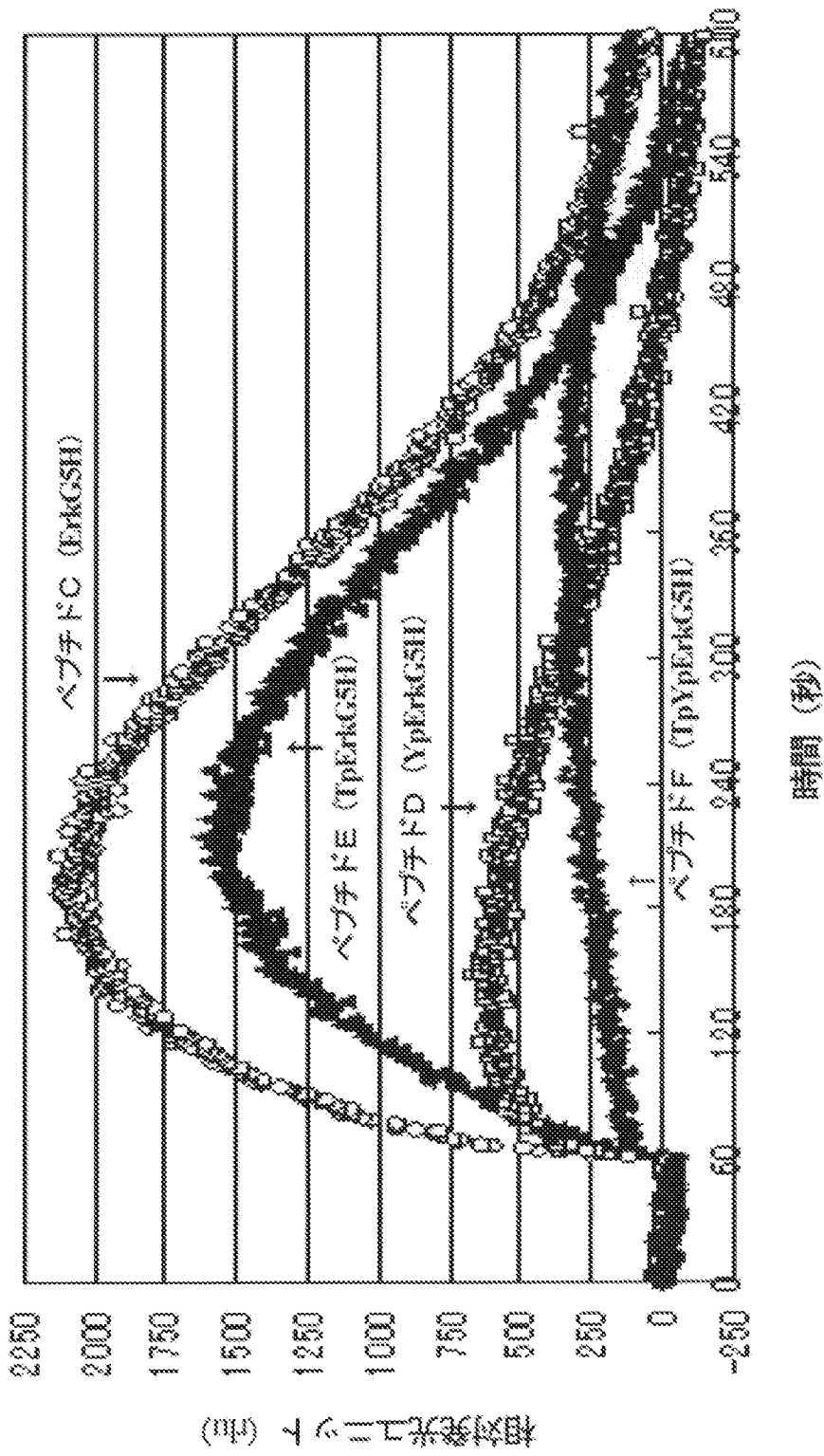
[請求項11] 請求項1から請求項8のいずれか一項に記載の人工酸化還元酵素の使用方法であって、

人工酸化還元酵素を構成する前記ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化又は脱リン酸化することにより、人工酸化還元酵素の触媒活性を調節することを含むことを特徴とする方法。

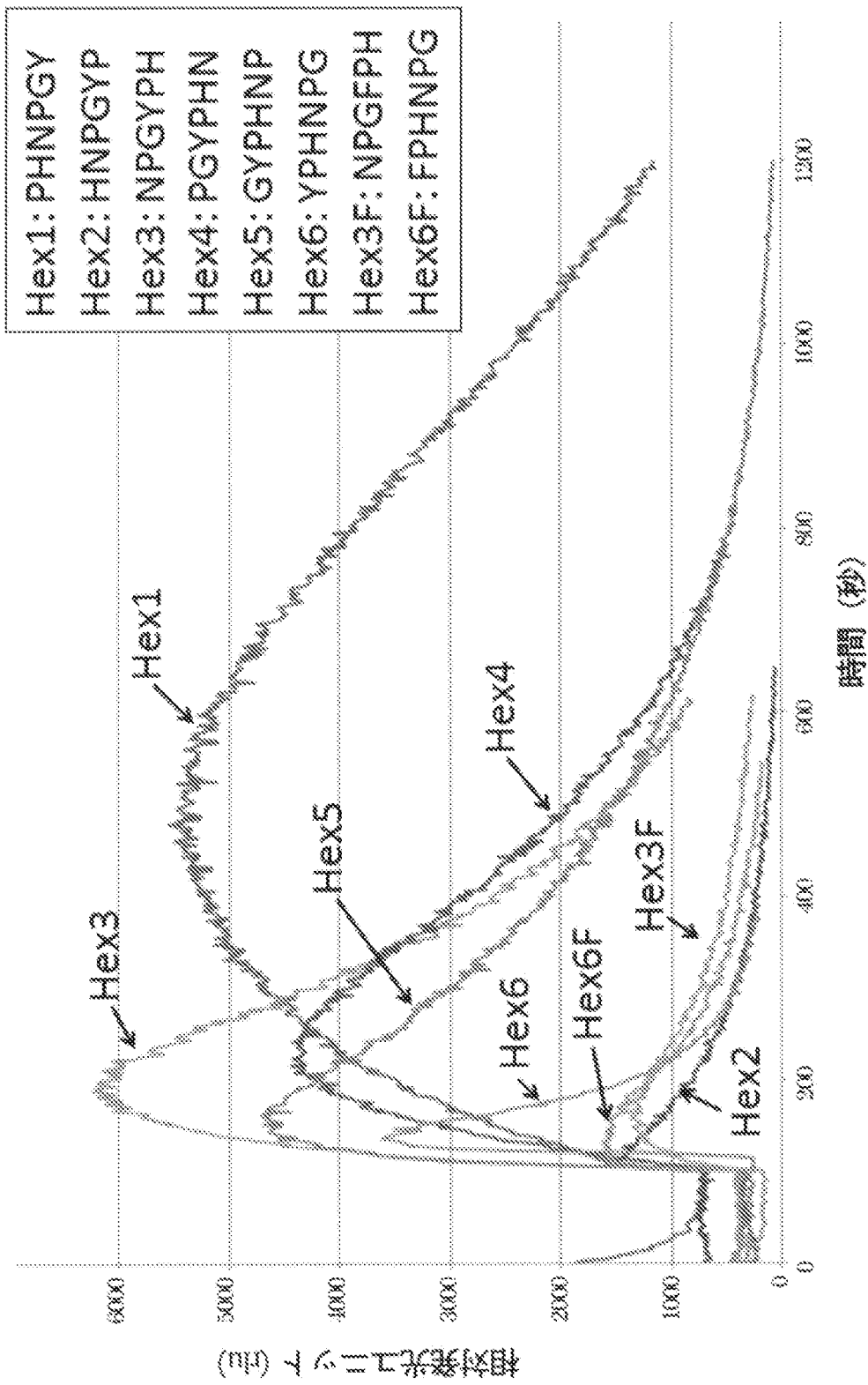
[図1]



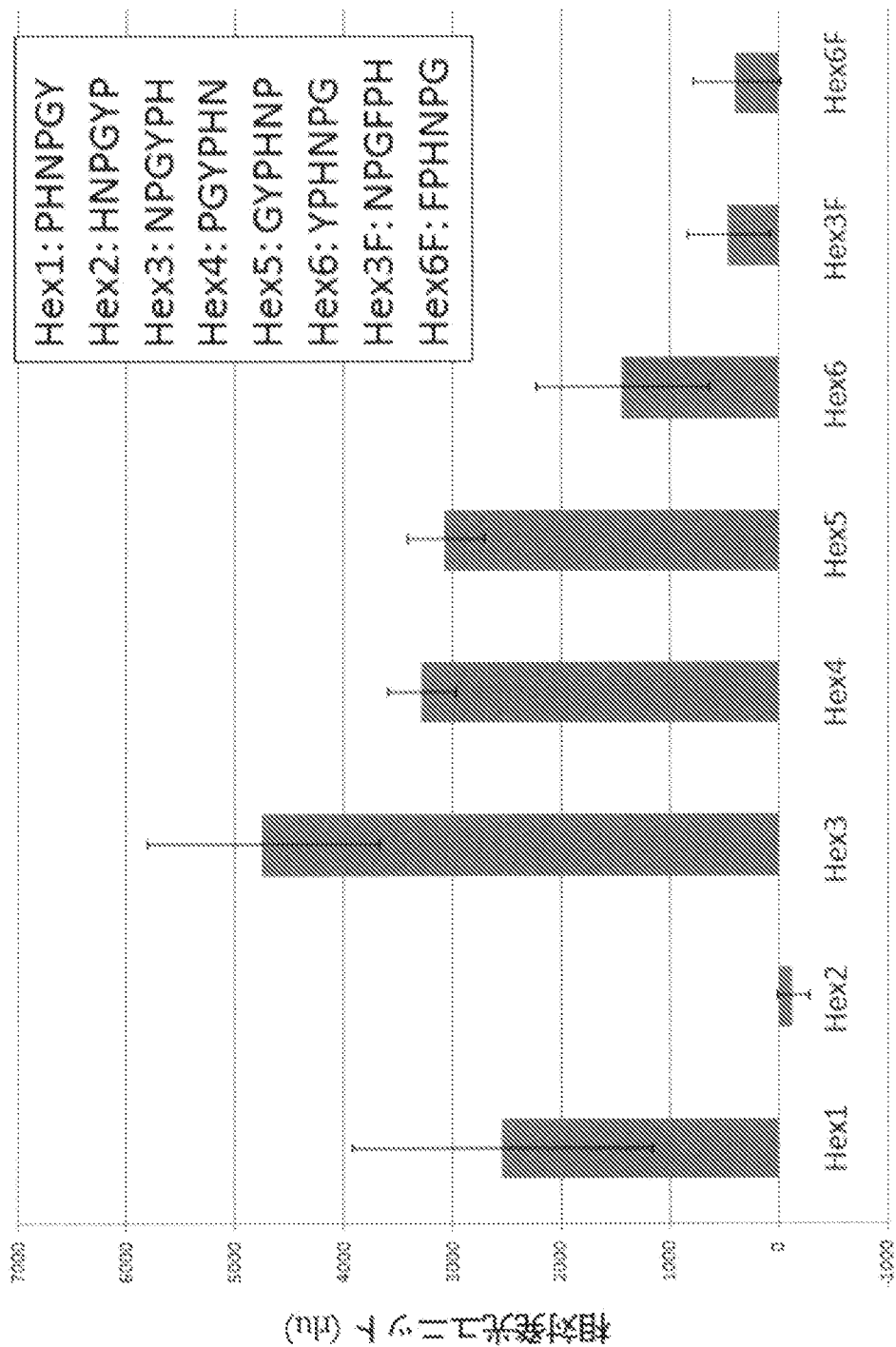
[図2]



[図3]

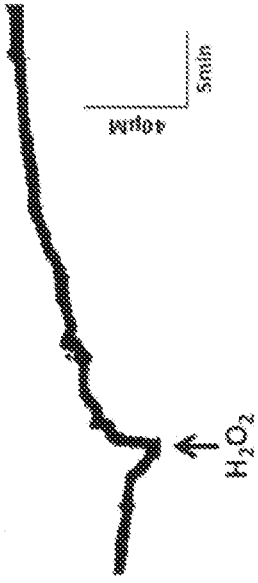


[図4]

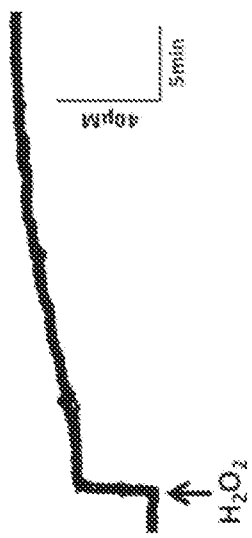


[図5]

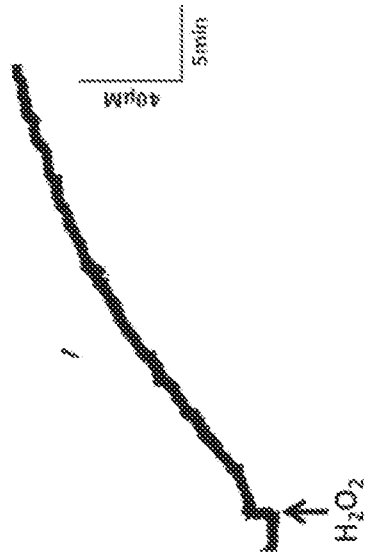
Hex5 (GYPIINP)



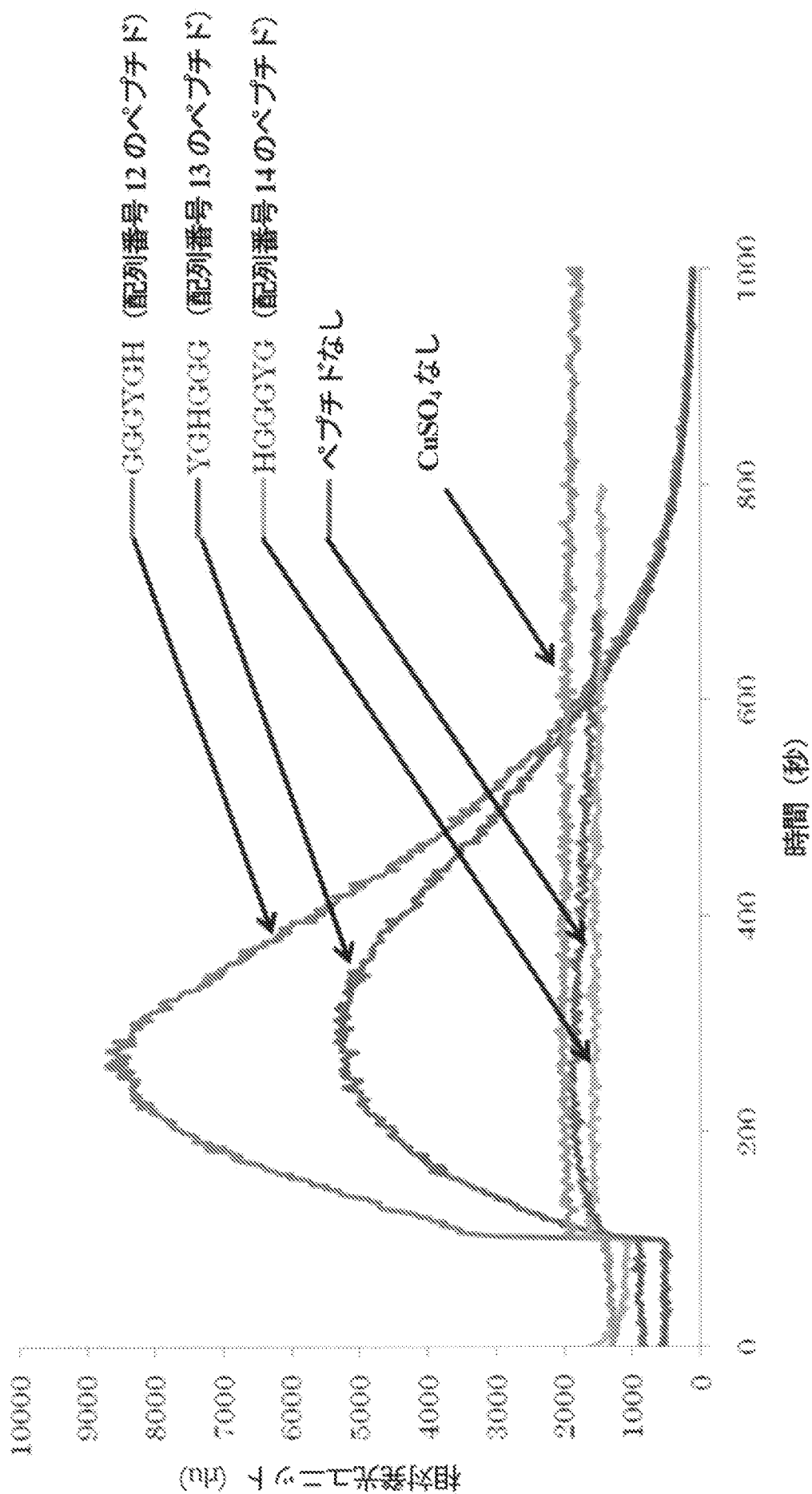
ベブチドなし



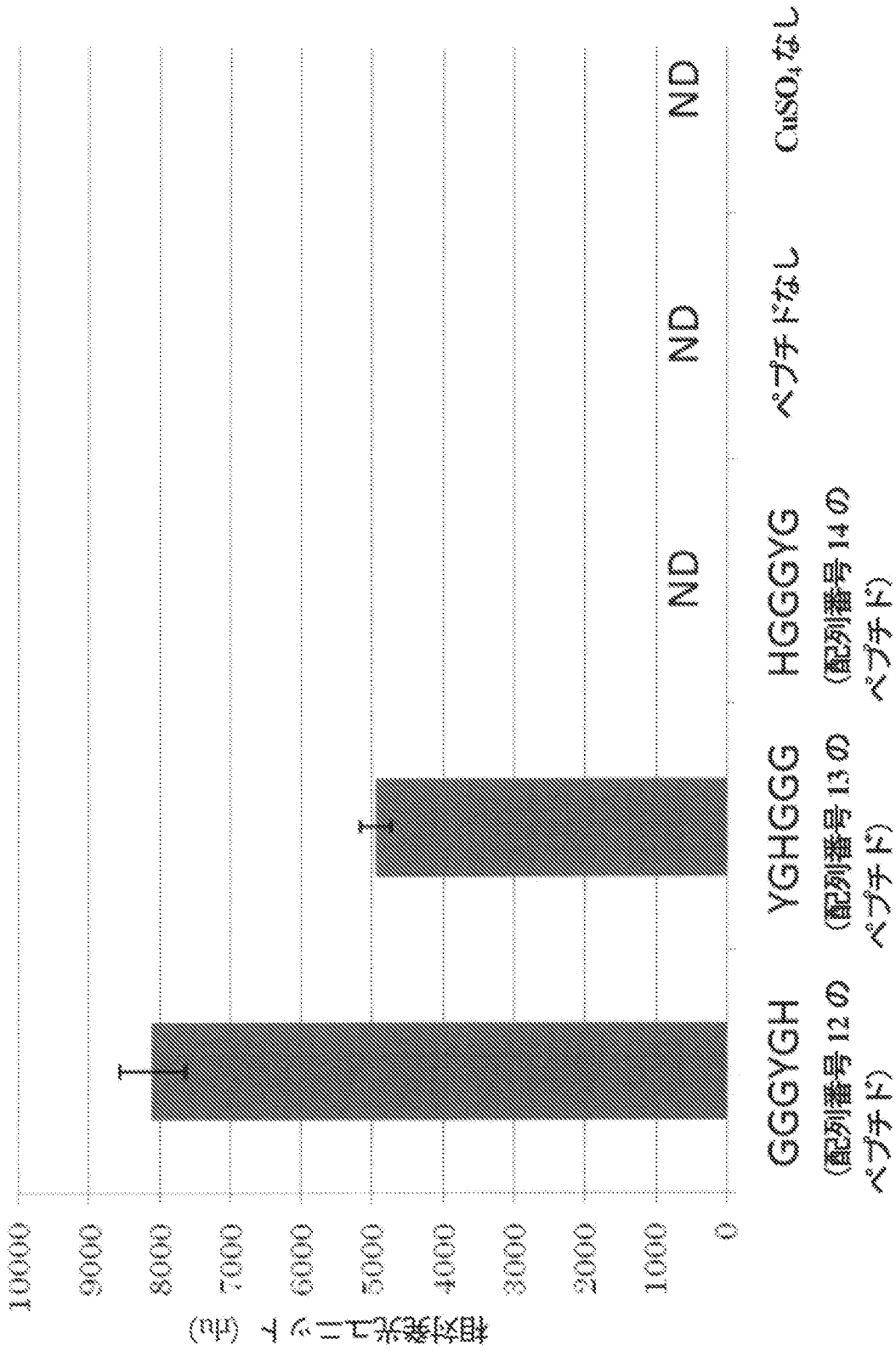
Hex1 (PHNPGY)



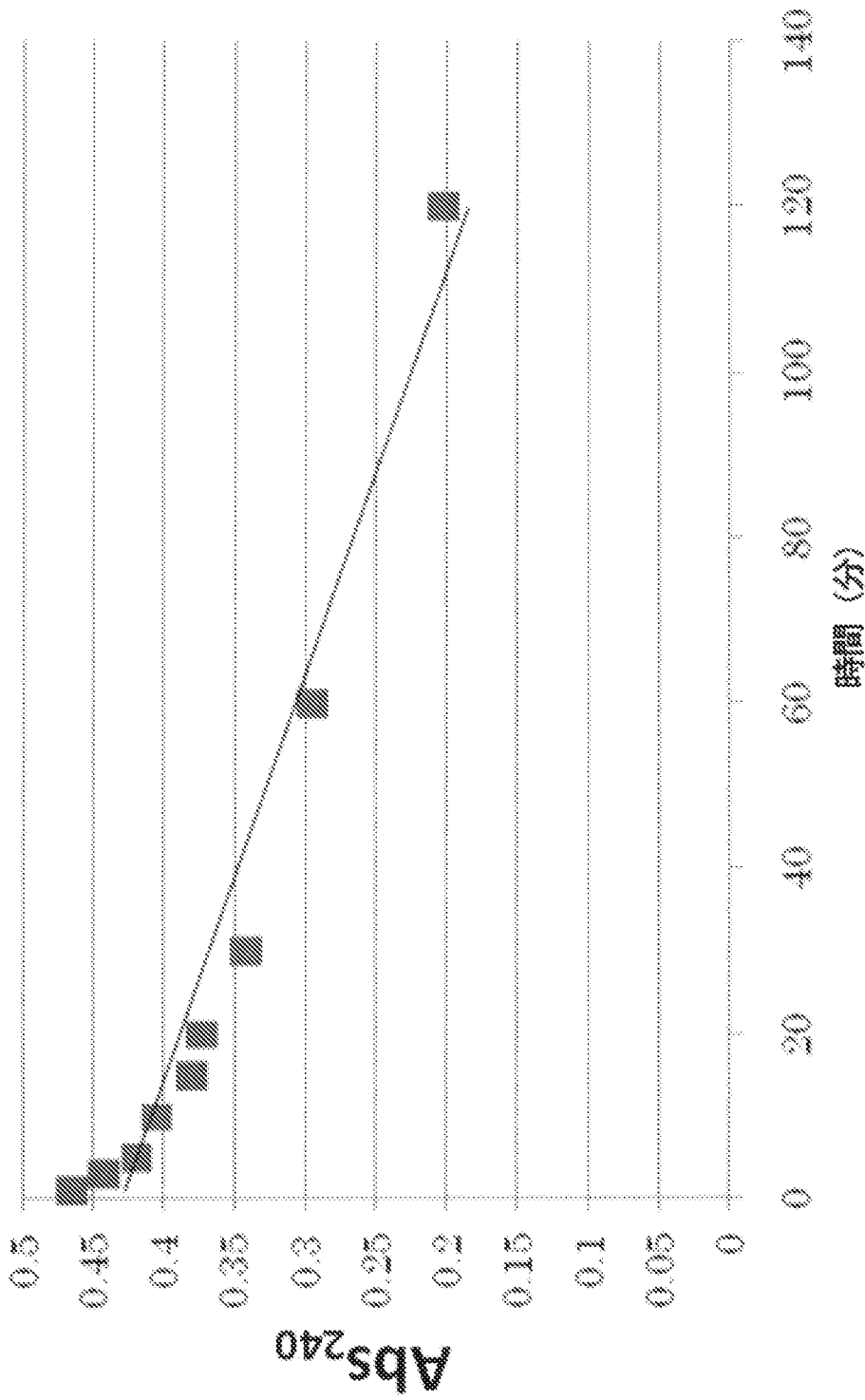
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057826

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N9/02(2006.01) i, C12Q1/26(2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N9/02, C12Q1/26		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	KAMIYA, M. et al., The binding of copper ions to glycine-rich proteins (GRPs) from Cicer arietinum, Biochim.Biophys.Acta, 2005, Vol.1722, No.1, p.69-76	<u>1-3, 5-7</u> <u>4, 8-11</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	KAMIYA, M. et al., Copper binding to plant ozone-inducible proteins (OI2-2 and OI14-3), Biochem.Biophys.Res.Comm., 2004, Vol.314, No.3, p.908-915	<u>1-3, 5-7</u> <u>4, 8-11</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	LA MENDOLA, D. et al., Copper(II) complexes with chicken prion repeats: influence of proline and tyrosine residues on the coordination features, J.Biol.Inorg.Chem., 2005, Vol.10, No.5, p.463-475	<u>1-7</u> <u>8-11</u>
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 02 August, 2010 (02.08.10)	Date of mailing of the international search report 10 August, 2010 (10.08.10)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057826

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	REDECKE, L. et al., Comparative analysis of the human and chicken prion protein copper binding regions at pH 6.5, J.Biol.Chem., 2005, Vol.280, No.14, p.13987-13992	<u>1-7</u> 8-11
Y	STANCZAK, P. et al., Can chicken and human PrPs possess SOD-like activity after beta-cleavage?, Biochem.Biophys.Res.Comm., 2007, Vol.352, No.1, p.198-202	1-11
Y	Tomoko KAGENISHI et al., "Saisho Tan'i no Jinko Peroxidase to shite Kino suru Gosei Cu Ketsugo Peptide no Toketsu Yukai Taisei Oyobi Netsu Taisei", Japanese Society for Cryobiology and Cryotechnology Seminar Oyobi Nenkai Koen Yoshishu, 2008, vol.54th, page 21	1-11
Y	KAWANO, T., Prion-derived copper-binding peptide fragments catalyze the generation of superoxide anion in the presence of aromatic monoamines, Int.J.Biol.Sci., 2007, Vol.3, No.1, p.57-63	1-11
P,Y	JP 2009-131250 A (Kitakyushu Foundation for the Advancement of Industry, Science and Technology), 18 June 2009 (18.06.2009), entire text (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/02(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N9/02, C12Q1/26		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY(STN), PubMed, JSTPlus(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	KAMIYA, M. et al., The binding of copper ions to glycine-rich proteins (GRPs) from <i>Cicer arietinum</i> , Biochim. Biophys. Acta, 2005, Vol. 1722, No. 1, p. 69-76	1-3, 5-7 4, 8-11
X Y	KAMIYA, M. et al., Copper binding to plant ozone-inducible proteins (OI2-2 and OI14-3), Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol. 314, No. 3, p. 908-915	1-3, 5-7 4, 8-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.08.2010	国際調査報告の発送日 10.08.2010	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9 2 8 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> Y	LA MENDOLA, D. et al., Copper(II) complexes with chicken prion repeats: influence of proline and tyrosine residues on the coordination features, J. Biol. Inorg. Chem., 2005, Vol. 10, No. 5, p. 463-475	<u>1-7</u> 8-11
<u>X</u> Y	REDECKE, L. et al., Comparative analysis of the human and chicken prion protein copper binding regions at pH 6.5, J. Biol. Chem., 2005, Vol. 280, No. 14, p. 13987-13992	<u>1-7</u> 8-11
Y	STANCZAK, P. et al., Can chicken and human PrPs possess SOD-like activity after beta-cleavage?, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, Vol. 352, No. 1, p. 198-202	1-11
Y	蔭西 知子 他, 最小単位の人工ペルオキシダーゼとして機能する合成 Cu 結合ペプチドの凍結融解耐性および熱耐性, 低温生物工学会セミナー及び年会講演要旨集, 2008, Vol. 54th, p. 21	1-11
Y	KAWANO, T., Prion-derived copper-binding peptide fragments catalyze the generation of superoxide anion in the presence of aromatic monoamines, Int. J. Biol. Sci., 2007, Vol. 3, No. 1, p. 57-63	1-11
P, Y	JP 2009-131250 A (財団法人北九州産業学術推進機構) 2009. 06. 18, 全文 (ファミリーなし)	1-11