

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-42757

(P2006-42757A)

(43) 公開日 平成18年2月16日(2006.2.16)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/96	(2006.01)	C 1 2 N	9/96	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00	
G 0 1 N 33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2004-239876 (P2004-239876)	(71) 出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目6番1号
(22) 出願日	平成16年8月19日(2004.8.19)	(74) 代理人	100124512 弁理士 堀口 努
(31) 優先権主張番号	特願2003-296005 (P2003-296005)	(72) 発明者	石丸 剛 東京都東大和市狭山4丁目1489-16
(32) 優先日	平成15年8月20日(2003.8.20)	(72) 発明者	宮浦 修一 神奈川県横浜市青葉区美しが丘4-36-21
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	Fターム(参考)	4B050 CC07 HH02 HH03 HH04 KK18 LL03
(31) 優先権主張番号	特願2004-93864 (P2004-93864)		
(32) 優先日	平成16年3月26日(2004.3.26)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-96607 (P2004-96607)		
(32) 優先日	平成16年3月29日(2004.3.29)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-197050 (P2004-197050)		
(32) 優先日	平成16年7月2日(2004.7.2)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 酵素の安定化剤

(57) 【要約】

【課題】

酵素の保存において、その安定性を高めるための新規な安定化剤、酵素と前記安定化剤との組成物及び安定化剤を含むキットを提供する。

【解決手段】

植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する酵素の安定化剤、前記植物由来のポリペプチドが、植物由来のタンパク質を分解して得られうるポリペプチドであることを特徴とする前記安定化剤、前記安定化剤と酵素とを含む組成物、かかる組成物を含むキット及び植物由来のポリペプチドの酵素の安定化剤としての使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、酵素の安定化剤。

【請求項 2】

「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られうるポリペプチドであることを特徴とする、請求項 1 記載の安定化剤。

【請求項 3】

「植物」が、「農作物」であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の安定化剤。

【請求項 4】

「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の安定化剤。 10

【請求項 5】

タンパク質が、グリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、請求項 2 記載の安定化剤。

【請求項 6】

酵素が、分析用酵素であることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の安定化剤。

【請求項 7】

分析用酵素が、臨床検査用酵素又は免疫学的測定に使用される酵素であることを特徴とする、請求項 6 記載の安定化剤。 20

【請求項 8】

免疫学的測定に使用される酵素が、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される酵素であることを特徴とする、請求項 7 記載の安定化剤。

【請求項 9】

分析用酵素が、特異的結合対形成物質と複合体を形成したものであることを特徴とする、請求項 6 に記載の安定化剤。

【請求項 10】

分析用酵素が、糖関連酵素、タンパク質関連酵素、脂質関連酵素、核酸関連酵素又は呼吸系酵素であることを特徴とする、請求項 6 記載の安定化剤。 30

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれかに記載の安定化剤とアルカリ又は緩衝剤とを含む、安定化組成物。

【請求項 12】

無菌濾過された溶液であって、pH3.0～9.0であることを特徴とする、請求項 11 記載の安定化組成物。

【請求項 13】

請求項 1～10 のいずれかに記載の安定化剤又は請求項 11 もしくは 12 に記載の安定化組成物と酵素とを含む、酵素組成物。 40

【請求項 14】

乾燥状態又は溶液状態であることを特徴とする、請求項 13 記載の酵素組成物。

【請求項 15】

酵素に、請求項 1～10 のいずれかに記載の安定化剤又は請求項 11 もしくは 12 に記載の安定化組成物を共存させることを特徴とする、酵素の安定化方法。

【請求項 16】

請求項 13 又は 14 に記載の酵素組成物を含むことを特徴とするキット。

【請求項 17】

植物由来のポリペプチドの、酵素に対する安定化剤としての使用。 50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、酵素の安定化剤、これを含む組成物及びキット等に関する。

【背景技術】

【0002】

一般に、酵素が有する機能は、その立体構造が関与していることが知られており、保存中、立体構造が変化することでその機能を失ったり、活性の低下を起こすことが知られている。また、酵素は凍結乾燥した形態で供給されることが一般的であったため、凍結乾燥時の酵素の失活、変性を防止する方法について様々な研究がなされている。例えば、グルタミン酸ソーダ、アルブミン、スキムミルク等のアミノ酸又はタンパク質、シュクロース、マルトース等の糖類、グルタチオン、メルカプトエタノール等の還元剤、グリセロール、ソルビトールなどの多価アルコールを添加する方法が一般に知られている。

【0003】

また、植物タンパク質やその分解物を用いた酵素の安定化技術としては、小麦、大豆などのタンパク質の加水分解物を食品加工等に使用されるトランスグルタミナーゼの安定化剤として使用する技術が特許文献1には開示されている。しかしながら、分析用酵素の安定化については開示も示唆もされていない。

【0004】

【特許文献1】W O 9 6 / 1 1 2 6 4

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

現在、一般的に使用されている酵素の安定化剤はウシ血清アルブミン(BSA)である。BSAはウシ由来のタンパク質であるが、一般に、動物由来のタンパク質は、たとえ医薬としての使用ではなくとも人畜共通感染症(例えばウシについては牛海綿状脳症(BSE)、口蹄疫等が挙げられる)などへの配慮が必要である。また、酵素の機能は失われやすく、たとえBSAを添加したとしても、溶液状態で室温に放置すると、数日のうちに酵素活性が著しく低下する等の問題があった。このように、酵素の失活、活性低下を防止し、かつ、BSE等の病原体の汚染の恐れがない安全で優れた酵素の安定化剤の開発が望まれていた。

【課題を解決するための手段】

【0006】

これらの課題を解決するために、本発明者らは検討した結果、植物由来のポリペプチドが酵素の安定性を著しく向上させることを見出し、これを安定化剤として使用することで本発明を完成させた。

【0007】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- (1) 植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、酵素の安定化剤。
- (2) 「植物由来のポリペプチド」が、「植物由来のタンパク質」を分解して得られうるポリペプチドであることを特徴とする、(1)記載の安定化剤。
- (3) 「植物」が、「農作物」であることを特徴とする、(1)又は(2)記載の安定化剤。
- (4) 「植物」が、大豆、小豆、インゲン豆、ソラ豆、アーモンド、ピーナッツ、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ及び米から選択される何れかの植物であることを特徴とする、(1)～(3)のいずれかに記載の安定化剤。
- (5) タンパク質が、グリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニンからなる群から選択される一以上のタンパク質であることを特徴とする、(2)記載の安定化剤。
- (6) 酵素が、分析用酵素であることを特徴とする、(1)～(5)のいずれかに記載

の安定化剤。

(7) 分析用酵素が、臨床検査用酵素又は免疫学的測定に使用される酵素であることを特徴とする、(6)記載の安定化剤。

(8) 免疫学的測定に使用される酵素が、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ及びグルコースオキシダーゼからなる群から選択される酵素であることを特徴とする、(7)記載の安定化剤。

(9) 分析用酵素が、特異的結合対形成物質と複合体を形成したものであることを特徴とする、(6)に記載の安定化剤。

(10) 分析用酵素が、糖関連酵素、タンパク質関連酵素、脂質関連酵素、核酸関連酵素又は呼吸系酵素であることを特徴とする、(6)記載の安定化剤。

10

(11) (1)~(10)のいずれかに記載の安定化剤とアルカリ又は緩衝剤とを含む、安定化組成物。

(12) 無菌濾過された溶液であって、pH3.0~9.0であることを特徴とする、(11)記載の安定化組成物。

(13) (1)~(10)のいずれかに記載の安定化剤又は(11)もしくは(12)に記載の安定化組成物と酵素とを含む、酵素組成物。

(14) 乾燥状態又は溶液状態であることを特徴とする、(13)記載の酵素組成物。

(15) 酵素に、(1)~(10)のいずれかに記載の安定化剤又は(11)もしくは(12)に記載の安定化組成物を共存させることを特徴とする、酵素の安定化方法。

(16) (13)又は(14)に記載の酵素組成物を含むことを特徴とするキット。

20

(17) 植物由来のポリペプチドの、酵素に対する安定化剤としての使用。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、酵素の安定化剤、酵素と前記安定化剤との組成物、安定化剤を含むキットが提供される。本発明の安定化剤を酵素に共存させることにより、該酵素を保存、乾燥、冷凍する際に酵素活性の失活、低下を防止することができ、また、該安定化剤によって酵素が病原体で汚染する恐れもない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、発明を実施するための最良の形態により詳説する。

30

【0010】

本発明安定化剤は、植物由来のポリペプチドを有効成分として含有する、酵素の安定化のための安定化剤である。

【0011】

本発明において「酵素の安定化」とは、酵素の保存、乾燥、熱に対する安定化を指し、より具体的には酵素を長期間保存、乾燥、凍結する際に酵素の失活や活性低下を防止する機能を意味する。

【0012】

本発明安定化剤における「植物」とは、「農作物」であり、例えば小麦、大麦、カラス麦、トウモロコシ、ジャポニカ米、インディカ米、ジャバニカ米、アフリカ米、餅米、大豆、小豆、インゲン豆、そら豆、アーモンド、ピーナッツ、ジャガイモ、サツマイモ、サトイモ、タロイモ等が好ましくは挙げられ、その中でも大豆、小麦(コムギ)、トウモロコシ、ジャガイモ及び米がより好ましく、大豆(ダイズ)及びトウモロコシが最も好ましい。

40

【0013】

本発明安定化剤における「植物由来のポリペプチド」としては、例えば上記植物由来のタンパク質を分解して得られうるポリペプチドが好ましい。ここで、上記植物由来のタンパク質としては、上記植物のタンパク質を含む部位から抽出されたタンパク質又はタンパク質を含む画分が挙げられ、より具体的にはグリアジン、ツェイン、グルテニン、グルテン、ホルデイン、オリゼニン、グリシニン、パタチン及びコングリシニン等の貯蔵タンパ

50

ク質、レクチン、アミラ - ゼ、呼吸及び光合成に關与する酵素等の機能タンパク質、根、茎、葉、花、果実、種子などに由来する構造タンパク質が挙げられる。それらの中でも特に貯蔵タンパク質が好ましくは挙げられる。また、上述のタンパク質からポリペプチドを得るには、該タンパク質を分解すればよく、「分解」の手法としては、酸分解、酵素分解、アルカリ分解等が挙げられるが、低分子化してポリペプチドを得るという目的を達成できる限りにおいて、これらに限定されるものではない。分解は特に加水分解が好ましい。

【0014】

加水分解に使用出来る酵素は、プロテアーゼに属するもので、タンパク質をポリペプチドに分解できるものあれば良く、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン等の動物由来のプロテアーゼ、パイン、フィシン、プロメライン等の植物由来のプロテアーゼ、その他、細菌、カビ、放射菌等の微生物由来のプロテアーゼ等が挙げられる。また、酸分解の場合、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸等の酸が挙げられ、アルカリ分解の場合は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム等が挙げられる。分解された後の「ポリペプチド」は、重量平均分子量200Da~30万Daであることが好ましく、重量平均分子量300Da~20万Daであることがより好ましい。また、タンパク質を加水分解するとアミノ酸が生ずるが、本発明安定化剤においては、「ポリペプチド」が構成成分として含まれている限りにおいて、「アミノ酸」が混入していても構わない。

また、好ましい植物由来ポリペプチドとしては、ダイズタンパク加水分解物、コムギタンパク加水分解物およびその誘導体、ジャガイモタンパク加水分解物、トウモロコシタンパク加水分解物、コメヌカタンパク加水分解物などが挙げられ、その中でもトウモロコシ加水分解物が好ましい。トウモロコシ加水分解物としては、例えば、分子量200Da~4000Daのペプチドで、遊離アミノ酸含量が全アミノ酸に対して1%以下であるものが好ましい。また、その中でも、アミノ酸組成(重量%)が、アスパラギン酸2.5~12.5、スレオニン2.5~6.0、セリン4.0~6.0、グルタミン酸15.0~50.0、グリシン2.0~5.5、アラニン2.0~13.5、バリン4.0~8.0、システイン0.0~1.5、メチオニン1.0~2.0、イソロイシン3.0~6.0、ロイシン6.0~15.0、チロシン1.0~4.0、フェニルアラニン2.0~5.5、リジン0.5~7.0、ヒスチジン0.5~3.0、アルギニン1.0~8.0、プロリン5.0~13.0であるものがより好ましい。

各分解物の主な性状の一例は下記の通りである。

1) ダイズタンパク加水分解物

外観：淡黄色~褐色

総窒素分(%)：2.6~3.4

pH：3.8~6.2

2) ダイズタンパクペプトン

3) ダイズタンパク酵素分解物

4) ダイズタンパク酸分解物

コムギタンパク加水分解物

外観：褐色液体

乾燥減量(%)：75~80

総窒素量(%)：2.7~3.5

6) コムギタンパク加水分解物誘導体

外観：灰色がかった白色

総固形分(%)：81.3~100

窒素(%)：13.0~16.0

強熱残分(%)：13.5以下

pH：3.5~4.5

水分(%)：5.0以下

7) ジャガイモタンパク加水分解物

外観：黄色

総固形分(%)：24.0~28.0

10

20

30

40

50

窒素 (%) : 2.5 ~ 4.0
 強熱残分 (%) : 4.5 以下
 pH : 4.0 ~ 5.0
 分子量 : 600

8) トウモロコシタンパク質加水分解物

外観 : 白色または微黄色
 水分 (%) : 5.0 以下
 粗灰分 (%) : 2.0 以下
 粗蛋白 (%) : 90.0 以上
 糖分 (%) : 5.0 以下
 重金属 (ppm) : 4.0 以下
 ヒ素 (ppm) : 1.0 以下

分子量分布 : 2 ~ 10 程度のオリゴペプチド

アミノ酸組成 (重量%) : グルタミン酸 24.67、ロイシン 13.69、アラニン 12.99、プロリン 9.69、アスパラギン酸 6.04、セリン 5.33、バリン 4.94、スレオニン 3.95、イソロイシン 3.77、チロシン 3.42、グリシン 2.39、フェニルアラニン 2.00、メチオニン 1.45、アルギニン 1.21、システイン 1.07、リジン 1.00、ヒスチジン 1.00

10

9) コメヌカタンパク質加水分解物

pH : 6.5 ~ 7.5
 分子量 : 150,000

20

本発明安定化剤が安定化する対象は「酵素」であり、その由来、種類、存在形態は特に限定はされない。酵素としては分析用酵素が好ましい。ここで、「分析用酵素」とは、医薬品、農薬、食品等の分析に使用される酵素であり、分析目的に使用される酵素であれば、特に限定されない。

分析用酵素としては、臨床検査用酵素、免疫学的測定に使用される酵素、糖関連酵素、タンパク質関連酵素、脂質関連酵素、核酸関連酵素、呼吸系酵素等が挙げられ、その中でも免疫学的測定に使用される酵素が好ましい。

「臨床検査用酵素」又は「免疫学的測定に使用される酵素」とは、分析用酵素の内、臨床化学分析又は免疫測定に使用される酵素であり、具体的には、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、モノアミノオキシダーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、カタラーゼ、アシラーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、アシルCoAシンセターゼ、ビリルビンオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、グリセロールキナーゼ、L- α -グルセロフォスフェイトオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、リポプロテインリパーゼ、マレートデヒドロゲナーゼ、ムタローゼ等が挙げられるが、臨床検査用又は免疫学的測定に使用される酵素である限りにおいて、これらに限定されるものではない。この中でもペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼが好ましい。

30

40

また、糖関連酵素としては、マンノシダーゼ、グルコシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ヘパリチナーゼ、ヒアルロン酸合成酵素等が、タンパク質関連酵素としては、ヘプシン、パパイン、プロテイナーゼ、ペプチダーゼ、ペプチジル転移酵素等が、脂質関連酵素としては、リパーゼ、ホスホリパーゼ、セラミダーゼ等が、核酸関連酵素としては、ヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼ、制限酵素、逆転写酵素等が、呼吸系酵素としては、グルコキナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ等、その他の酵素としては、フォスファターゼ、スルファターゼ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、本発明安定化剤は、分析用酵素と特異的結合対形成物質と複合体を形成したのも

50

安定化させることができる。ここで「特異的結合対形成物質」とは、生体物質の示す特異的相互作用（親和性）に基づいて結合対を形成する対物質の一方を意味し、例えば、抗原と抗体、ビオチンとアビジン又はストレプトアビジン、特定の糖とそれに対応するレクチン、サイトカイン、ケモカイン等の生理活性物質とそれに対するレセプター（受容体）、ヒアルロン酸とヒアルロン酸結合物質、エンドトキシンとエンドトキシン中和タンパク質、 α -グルカンと β -グルカン結合タンパク質等の組合せ（対）の一方の物質が例示される。

【0015】

本発明安定化剤組成物は、上記安定化剤とアルカリ又は緩衝剤を含む。特に、溶液状態であることが好ましいが、乾燥状態であってもよい。

10

【0016】

すなわち、本発明安定化剤は酵素を安定化する際に、アルカリを含む水性溶媒に溶解して溶液状の安定化剤として使用することが可能である。アルカリとしては、アルカリ金属水酸化物、アルカリ土類水酸化物が挙げられ、特に、アルカリ金属水酸化物が好ましい。

アルカリ金属水酸化物は、カリウム、リチウム、ナトリウム等のアルカリ金属の水酸化物であり、具体的には水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム等である。又、これらは単独あるいは複数のアルカリ金属水酸化物を含む水溶液として使用することもできる。その中でも最も好ましいのは水酸化ナトリウムである。アルカリ、特に、アルカリ金属水酸化物の濃度は、通常、5mmol/l~2mol/l、好ましくは10mmol/l~500mmol/lである。前記水溶液のpHは、通常pH3.0~9.0であり、好ましくは、pH6.5~8.0、更に好ましくは、pH6.8~7.2である。

20

【0017】

又、本発明安定化剤は緩衝剤（緩衝剤溶液）に溶解して使用することも可能である。緩衝剤の種類としては、リン酸緩衝剤、トリス塩酸緩衝剤、グッド緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等が望ましいが、これらに限定されるものではない。また、これらは単独あるいは混合物として使用され、任意の量を用いることができる。

更に、アルカリ金属水酸化物又は緩衝剤に溶解してpHを調整した後、0.22 μ mフィルター等を用いて無菌濾過した液を本発明の安定化剤組成物として用いることもできる。

【0018】

本発明安定化剤又は安定化剤組成物のポリペプチドの濃度は、通常0.01~40%(w/v)、好ましくは0.1~30%(w/v)である。

30

【0019】

本発明安定化剤は酵素を安定化させてその活性を保持したり、失活を防止する働きを有しており、酵素を保存しておく際に、ポリペプチドが0.01~10%(w/v)となるように本発明安定化剤又は安定化剤組成物を添加して酵素組成物としておき、この溶液状の組成物の状態或いはそれを乾燥させた状態の酵素組成物として、酵素を安定に保存することが可能である。なお、実際に使用する際には、例えば、酵素を1pg/ml~10mg/ml含む溶液（例えばリン酸緩衝生理的食塩水（PBS）などの溶液）に本発明安定化剤又は安定化剤組成物を添加して使用することができる。

また、かかる酵素組成物には、本発明安定化剤もしくは安定化剤組成物及び酵素の他に、例えばその他の安定化剤、防腐剤、界面活性剤、糖類、その他のペプチド/タンパク質などを含んでも良い。この様な酵素組成物は、酵素を使用するキット（例えば分析用のキット）の構成要素として加えることができ、キットの品質保持期限を大幅に延ばすことが可能となるため極めて有用である。

40

【実施例1】

【0020】

本発明安定化剤の酵素標識抗体及び酵素に対する安定化作用の検討

1) 方法

(1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識抗体の調製及び保存

表1及び2に記載の試験物質（安定化剤）を0.15mol/l塩化ナトリウム、0.05%Tween20及

50

び防腐剤として0.05%プロクリン300を含む50mmol/l トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl: pH7.3 ~ 7.7) (以下、T-TBSと記載する) で、所定の濃度に調整した後、0.22 μmフィルターで濾過した溶液を試験物質溶液とした。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (以下、HRP-抗マウスIgG抗体と記載) (Jackson社製) を上記試験物質溶液で10000倍希釈した溶液を試験に用いた。調製当日(day0)、37 °C で保存した5日目(day5)及び12日目(day12)におけるHRP-抗マウスIgG抗体の安定性を検討した。各試験溶液は、測定前に常温に戻して、活性測定に使用した。なお、BSAは生化学工業株式会社販売、ゼラチン、脱脂粉乳はナカライテスク社販売、カゼインは和光純薬工業株式会社販売を使用し、ダイズ(大豆)タンパク質分解物、コムギ(小麦)タンパク質分解物、ジャガイモタンパク質分解物及びトウモロコシタンパク質分解物は、それぞれ、前記の2)ダイズタンパク質ペプトン、3)ダイズタンパク質酵素分解物、4)ダイズタンパク質酸分解物、5)コムギタンパク質加水分解物、6)コムギタンパク質加水分解物誘導体、7)ジャガイモタンパク質加水分解物、8)トウモロコシタンパク質加水分解物を使用した。

10

20

30

40

50

(2) HRP標識抗体の活性測定方法

(i) 固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの作成

ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson社製) をリン酸緩衝生理食塩水 [pH7.2~7.5、カルシウムイオン等の2価イオン不含: 以下、PBS(-)と記載する] で、20 μg/mLに希釈し、この溶液50 μLずつをヌンクイムプレート (商品名: マキシソープ、ヌンク社製) の各ウェルに加え、4 °C で14~18時間保存することにより、均一にコーティングした。このプレートをPBS(-)で2回洗浄し、ウェルのヤギ抗マウスIgG抗体でコーティングされていない部分をブロッキングするためのブロッキング物質として、2%ウシ血清アルブミン (BSA) (生化学工業株式会社製) 及び防腐剤として0.05%プロクリン300を含むPBS(-)溶液を加え、室温で2時間静置した。静置後、このプレートを洗浄液 (T-TBS) で4回洗浄して、所望する固相化抗マウスIgG抗体プレートを得た。

(ii) HRP標識抗体の活性測定

上記洗浄後、上記(i)において作成した固相化ヤギ抗マウスIgG抗体プレートの各ウェルに、1%BSAを含むT-TBS (以下、反応液と記載する) を100 μL ずつ加え、続いて、所定の各ウェルに反応液で100ng/mLに調製したマウスIgGを20 μLあるいはブランクとして反応液のみを20 μL加え、37 °C で60分間静置して抗原抗体反応を行った。

【0021】

この反応終了後、T-TBSで各ウェルを4回洗浄した後、上記(1)で調製したHRP-抗マウスIgG抗体の各試験物質溶液 (安定化剤) を各ウェルに100 μL加え、これを37 °C で60分間静置して反応させた。

【0022】

反応終了後、このプレートをT-TBSで4回洗浄し、ペルオキシダーゼの基質としてテトラメチルベンジジン (TMB) 溶液 (モス社製) を100 μL 加え、37 °C で30分間反応させ、発色させた。プレートに1N-HClを100 μL 加えて反応を停止させ、TMBの分解による着色液の波長450nmの吸光度 (対照波長630nm) をウェルリーダー (商標名) SK-603 (生化学工業株式会社販売) で測定した。

(iii) HRP標識抗体中のHRPの活性測定

上記(1)で調製した各HRP-抗マウスIgG抗体の試験物質溶液を12倍希釈した後各ウェルに10 μLずつ添加し、ペルオキシダーゼの基質としてテトラメチルベンジジン (TMB) 溶液 (モス社製) を100 μL 加え、37 °C で30分間反応させ、発色させた。プレートに1N-HClを100 μL 加えて反応を停止させ、TMBの分解による着色液の波長450nmの吸光度 (対照波長630nm) をウェルリーダー (商標名) SK-603 (生化学工業株式会社販売) で測定した。

【0023】

試験物質 (安定化剤) を含むHRP-抗マウスIgGの反応性は、マウスIgG 100ng/mLにおける吸光度からブランクにおける吸光度を減算した吸光度差 (以下、吸光度差と記載する) で評価した。試験物質 (安定化剤) を含むHRP-抗マウスIgGの安定性は、各試験物質ともに、試験溶液調製当日 (day0) における吸光度差に対する各試験日における吸光度差の百

分率（残存活性、%）で示した。対照品であるBSAでの残存活性の-10%を許容範囲とし、それ以上の残存活性を有する物質をBSAと同等以上の安定化効果ありと評価した。HRP-抗マウスIgG抗体の安定性についての結果を表1に、HRP-抗マウスIgG抗体中のHRPの安定性についての結果を表2に示した。

(3) HRPの調製及び保存

表3及び4に記載の試験物質（安定化剤）を0.15mol/l塩化ナトリウム、0.05%Tween20及び防腐剤として0.05%プロクリン300を含む50mmol/l トリス塩酸緩衝液（Tris-HCl：pH7.3～7.7）（以下、T-TBSと記載する）で、所定の濃度に調製した後、0.22 μ mフィルターで濾過した溶液を試験物質溶液とした。（1）のHRP-抗マウスIgG抗体のHRPと同等の活性を有するHRP(25ng/ml)（以下、HRP(25)と記載する）及びHRP-抗マウスIgG抗体のIgGと同等の濃度を有するHRP(80ng/ml)（以下、HRP(80)と記載する）とを上記試験物質溶液で10000倍希釈した溶液を試験に用いた。調製当日(day0)、37 $^{\circ}$ Cで保存した及び12日目(day12)におけるHRPの安定性を検討した。各試験溶液は、測定前に常温に戻して、活性測定に使用した。なお、ダイズタンパク質（酵素分解物）は前記の1）ダイズタンパク質加水分解物を使用した

10

(4) HRPの活性測定

上記(3)で調製したHRP(25)を12倍希釈、HRP(80)を20倍希釈した後各ウェルに10 μ Lずつ添加し、ペルオキシダーゼの基質としてテトラメチルベンジジン（TMB）溶液（モス社製）を100 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、発色させた。プレートに1N-HClを100 μ L加えて反応を停止させ、TMBの分解による着色液の波長450nmの吸光度（対照波長630nm）をウェルリーダー（商標名）SK-603（生化学工業株式会社販売）で測定した。

20

試験物質（安定化剤）を含むHRPの安定性は、各試験物質ともに、試験溶液調製当日（day0）における吸光度に対する各試験日における吸光度の百分率（残存活性、%）で示した。対照品であるBSAでの残存活性の-10%を許容範囲とし、それ以上の残存活性を有する物質をBSAと同等以上の安定化効果ありと評価した。HRP(25)の安定性についての結果を表3に、HRP(80)の安定性についての結果を表4に示した。

(5) α -ガラクトシダーゼの調製及び保存

表5に記載の試験物質（安定化剤）を2倍濃度に蒸留水で調製した後、0.22 μ mフィルターで濾過した溶液を試験物質溶液とした。ナタ豆由来 α -ガラクトシダーゼ（生化学工業社製。以下、GJと記載する。）は、10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）で10U/mLとなるように、また、大腸菌由来 α -ガラクトシダーゼ（シグマ社販売。以下、GEと記載する。）は、蒸留水で64U/mLに調製した。各2倍濃度の試験物質溶液と上記調製した各酵素溶液とを等量混合した後、40 μ L/バイアルで分注し、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥酵素を試験に用いた。調製時、凍結乾燥直後及び25 $^{\circ}$ Cで4週間(4W)保存した α -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定し、安定性の相違を比較した。なお、ダイズタンパク質（酵素分解物）及びトウモロコシタンパク質分解物は、前記の1）ダイズタンパク質加水分解物及び8）トウモロコシタンパク質加水分解物を使用した。

30

(6) α -ガラクトシダーゼの活性測定

α -ガラクトシダーゼの酵素活性測定には、基質として、パラニトロフェニル- α -ガラクトシドを用いた。酵素の活性は、吸光度で評価した。酵素の安定性は、各試験物質ともに、調製時における吸光度に対する各試験時点における吸光度の百分率（残存活性、%）を算出した。

40

(i) ナタ豆由来 α -ガラクトシダーゼの酵素活性測定方法

酵素は、0.83U/mLとなるように10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）で調製し、試験酵素溶液とした。基質は、100mMクエン酸リン酸緩衝液（pH3.5）で1mg/mLに調製し、基質溶液とした。試験酵素溶液10 μ Lに基質溶液100 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで15分反応させた。続いて、1M炭酸水素ナトリウムを2mL添加し、酵素反応を停止させた後、反応生成物による着色液の波長420nmを分光光度計で測定した。測定は3重測定とした。結果を表5に記載する。

(ii) 大腸菌由来 α -ガラクトシダーゼの酵素活性測定方法

酵素は、6.4U/mLとなるように10mM塩化マグネシウムを含む100mMリン酸ナトリウム緩衝液

50

(pH7.2)で調製し、試験酵素溶液とした。基質は、蒸留水で2mg/mLに調製し、基質溶液とした。試験酵素溶液50 μ Lに基質溶液50 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで15分反応させた、続いて、1M炭酸水素ナトリウムを2mL添加し、酵素反応を停止させた後、反応生成物による着色液の波長420nmを分光光度計で測定した。測定は3重測定とした。酵素の活性は、吸光度で評価した。酵素の安定性は、各試験物質ともに、調製時における吸光度に対する各試験時点における吸光度の百分率(残存活性、%)を算出し、その結果を表5に示した。

(7) α -マンノシダーゼの調製及び保存

表6に記載の試験物質(安定化剤)を試験濃度の2倍濃度に蒸留水で調製した後、0.22 μ mフィルターで濾過した溶液を試験物質溶液とした。ナタ豆由来 α -マンノシダーゼ(生化学工業製)を1mmol/lの塩化亜鉛を含む10mmol/lリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)で228U/mLとなるように調製した。各2倍濃度の試験物質溶液と上記調製した各酵素溶液とを等量混合した後、40 μ L/バイアルで分注し、凍結乾燥した。このように得られた凍結乾燥酵素を試験に用いた。調製時、凍結乾燥直後及び25 $^{\circ}$ Cで4週間保存した α -マンノシダーゼの酵素活性を測定し、安定性の相違を比較した。各試験溶液は、以下の酵素活性測定方法に従って酵素活性を測定した。なお、ダイズタンパク質(酵素分解物)及びトウモロコシタンパク質は前記の1)ダイズタンパク質加水分解物及び8)トウモロコシタンパク質加水分解物を使用した。

(8) α -マンノシダーゼの酵素活性測定方法

α -マンノシダーゼの酵素活性測定には、基質として、パラニトロフェニル α -マンノシドを用いた。酵素は、1.14U/mlとなるように1mmol/lの塩化亜鉛を含む10mmol/lリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)で調製し、試験酵素溶液とした。基質は、50mmol/lクエン酸リン酸緩衝液(pH4.5)で1mg/mLに調製し、基質溶液とした。試験酵素溶液10 μ Lに基質溶液100 μ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで15分反応させた。続いて、1M炭酸水素ナトリウムを2mL添加し、酵素反応を停止させた後、反応生成物による着色液の波長420nmを分光光度計で測定した。測定は、3重測定とした。酵素の活性は、吸光度で評価した。酵素の安定性は、各試験物質ともに、調製時における吸光度に対する各試験時点における吸光度の百分率(残存活性、%)を算出し、その結果を表6に示した。

【0024】

2) 結果

(I) HRPの酵素活性

37 $^{\circ}$ C、12日間保存において、HRP-抗マウスIgG抗体の残存活性は、無添加では4%以下、BSA添加では68%であった。BSA以外によく使用される動物性タンパクについては、カゼインが69%と良好であったが、ゼラチンは14%、脱脂粉乳は17%と不良であった。

【0025】

一方、本発明の植物性由来ポリペプチドでは、いずれの物質においても、残存活性が60%以上と良好な安定化効果を示した。特に、トウモロコシタンパク質加水分解物では86%以上、ダイズタンパク質加水分解物では90%以上と非常に良好な安定化効果を示した。

【0026】

又、HRP(25)及びHRP(80)の残存活性は、本発明ポリペプチドのいずれの物質においても良好な安定化効果を示した。特に、ダイズ加水分解物は73%以上、トウモロコシ加水分解物では84%以上と非常に良好な安定化効果を示した。

(II) α -ガラクトシダーゼの酵素活性

凍結乾燥時におけるGJの残存活性は、無添加では87%、BSAの添加では61%と調整時よりも低下したが、ダイズ加水分解物、トウモロコシ加水分解物では100-107%と調製時の酵素活性を維持した。25 $^{\circ}$ C、4週間(4W)保存における残存活性では、無添加では38%、BSA添加では31%と更に低下し、ダイズ加水分解物、トウモロコシ加水分解物では88-106%と、調製時の酵素活性をほぼ維持し、BSAに比べ優れた安定化効果を示した。

又、凍結乾燥時におけるGEの残存活性は、無添加では7%、BSAの添加では35%と著しく低下したが、ダイズ加水分解物、トウモロコシ加水分解物では71-74%と、いずれもBSAと比較して優れた残存活性を示した。25 $^{\circ}$ C、4週間(4W)保存における残存活性は、無添加では0%

10

20

30

40

50

、BSA添加では13%と更に著しく低下したが、ダイズ加水分解物、トウモロコシ加水分解物では75-80%であり、凍結乾燥時の酵素活性をほぼ維持し、BSAに比べて優れた安定化効果を示した。

(I I I) -マンノシダーゼの酵素活性

凍結乾燥時におけるの残存活性は、無添加では12%であり、著しく低下した。BSAでは、44%と無添加よりも安定化効果は認められたものの、半分に以下に低下した。一方、実験群の試験物質（ダイズ加水分解物、トウモロコシ加水分解物）では88-101%と、調製時の酵素活性を維持し、且つ、いずれもBSAに比べ優れた安定化効果を示した。25℃、4週間（4W）保存における残存活性は、無添加では0%、BSA添加では21%と更に低下した。一方、試験物質では63-81%と、BSAより著しく高い安定化効果を示した。特に、ダイズタンパクでは81%と、調製時の酵素活性をほぼ維持し、非常に良好な安定化効果が認められた。

【 0 0 2 7 】

これらの結果から、植物由来のタンパク質の分解物は、動物性タンパク質より優れた酵素の安定化効果があることが示された。

【 0 0 2 8 】

【表 1】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)			評価	
			day0	day5	day12		
対照	BSA	1%	100	73	68	○	
	ゼラチン	0.1%	100	40	14	×	
	カゼイン	0.1%	100	83	69	○	
	脱脂粉乳	0.1%	100	51	17	×	
	無添加	-	100	24	4	×	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	1%	100	99	95	◎
		酵素分解物	1%	100	101	90	◎
		酸分解物	1%	100	88	69	○
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	100	78	74	◎
		加水分解物誘導体	1%	100	80	62	○
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	100	91	78	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	100	-	86	◎

【 0 0 2 9 】

【表 2】

	試験物質	試験濃度	残存活性 (%)		評価	
			day0	day12		
対照	BSA	1%	100	64	○	
	無添加	0%	86	0	×	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	1%	88	83	◎
		酵素分解物	1%	85	84	◎
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	86	79	◎
		加水分解物誘導体	1%	86	87	◎
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	89	76	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	87	84	◎

【 0 0 3 0 】

【表 3】

	試験物質		試験濃度	残存活性 (%)		評価
				day0	day12	
対照		BSA	1%	100	49	△
		無添加	0%	100	0	×
実験群	ダイズタンパク質	α-ブドウ	1%	101	73	◎
		酵素分解物	1%	99	73	◎
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	97	76	◎
		加水分解物誘導体	1%	98	68	○
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	98	70	○
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	100	84	◎

10

【0031】

【表 4】

	試験物質		試験濃度	残存活性 (%)		評価
				day0	day12	
対照		BSA	1%	100	69	○
		無添加	0%	94	0	×
実験群	ダイズタンパク質	α-ブドウ	1%	100	84	◎
		酵素分解物	1%	93	85	◎
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	99	90	◎
		加水分解物誘導体	1%	97	85	◎
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	96	86	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	95	100	◎

20

【0032】

注：12日後の残存活性が0～30%を×、30～50%を△、50～70%を○、それ以上を◎とした。 30

【0033】

【表 5】

	試験物質	試験濃度	残存活性 (%)					
			GJ			GE		
			調製時	凍結乾燥時	4W	調製時	凍結乾燥時	4W
対象群	無添加	0%	100	87	38	100	7	0
	BSA	1%	100	61	31	100	35	13
実験群	ダイズ 加水分解物	1%	100	100	88	100	71	80
	トウモロコシ 加水分解物	1%	100	107	106	100	74	75

40

【0034】

【表 6】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)		
			α -マンノシダーゼ		
			調製時	凍結乾燥時	4W
対象群	無添加	0%	100	12	0
	BSA	1%	100	44	21
実験群	ダイズ 加水分解物	1%	100	101	81
	トウモロコシ 加水分解物	1%	100	88	63

专利名称(译)	酶稳定剂		
公开(公告)号	JP2006042757A	公开(公告)日	2006-02-16
申请号	JP2004239876	申请日	2004-08-19
[标]申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	生化学工业株式会社		
[标]发明人	石丸剛 宮浦修一		
发明人	石丸 剛 宮浦 修一		
IPC分类号	C12N9/96 C12N9/00 G01N33/531		
FI分类号	C12N9/96 C12N9/00 G01N33/531.B		
F-TERM分类号	4B050/CC07 4B050/HH02 4B050/HH03 4B050/HH04 4B050/KK18 4B050/LL03		
代理人(译)	堀口勉		
优先权	2003296005 2003-08-20 JP 2004093864 2004-03-26 JP 2004096607 2004-03-29 JP 2004197050 2004-07-02 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供新的稳定剂以增强酶的保存稳定性，提供包含酶和稳定剂的组合物，并提供含有稳定剂的试剂盒。ZSOLUTION：该酶稳定剂含有源自植物的多肽作为活性成分。稳定剂的特征在于源自植物的多肽是通过水解源自植物的蛋白质获得的多肽。包含稳定剂和酶的组合物。试剂盒包含该组合物。并且提供了来源于植物的多肽作为酶稳定剂的用途。Z

【表1】

	試験物質	試験濃度	残存活性(%)			評価	
			day0	day5	day12		
対照	BSA	1%	100	73	68	○	
	ゼラチン	0.1%	100	40	14	×	
	カゼイン	0.1%	100	83	69	○	
	脱脂粉乳	0.1%	100	51	17	×	
	無添加	・	100	24	4	×	
実験群	ダイズタンパク質	ペプトン	1%	100	99	95	◎
		酵素分解物	1%	100	101	90	◎
		酸分解物	1%	100	88	69	○
	コムギタンパク質 (誘導体)	加水分解物	1%	100	78	74	◎
		加水分解物誘導体	1%	100	80	62	○
	ジャガイモタンパク質	加水分解物	1%	100	91	78	◎
	トウモロコシタンパク質	加水分解物	1%	100	・	86	◎