明　細　書

発明の名称 ： タンパク質脱アミド用酵素剤及びその用途

技術分野

[0001]　本発明はタンパク質脱アミド酵素を有効成分とする酵素剤（タンパク質脱アミド用酵素剤）及びその用途に関する。

背景技術

[0002]　タンパク質脱アミド酵素は、高分子であるタンパク質に作用して脱アミド化反応を触媒する酵素である。タンパク質脱アミド酵素は、タンパク質中のグルタミン残基を脱アミド化することで負電荷のカルボキシル基を生じさせるため、タンパク質に対し様々な特性変化をもたらす。例えば、タンパク質の等電点が低下することによる水和力の増加及び静電反撥力の上昇は、タンパク質間の相互作用を低下させ（すなわち会合性を低下させ）るため、タンパク質の可溶性及び水分散性を増大させる。また、タンパク質の高次構造が変化することによる内部疎水性領域の表出は、タンパク質に界面活性を付与するため、タンパク質の乳化力、乳化安定性、起泡性、泡沫安定性を向上させる。タンパク質脱アミド酵素は、このようにタンパク質の特性を大きく変化させることができるため、タンパク質の用途を飛躍的に増大させてきた。このため、タンパク質脱アミド酵素は非常に有用性が高く、当該技術分野で高い関心が寄せられている。

[0003]　最初に発見されたタンパク質脱アミド酵素は、２０００年にＣｈｒｙｓｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｍから見出されたプロテイングルタミナーゼである（非特許文献１）。しかしながら、プロテイングルタミナーゼは、その高い有用性に加えて、高い関心が寄せられているにも関わらず、その後約２０年間の長きにわたって新たに発見されてこなかった極めて特殊な酵素でもある。約２０年後にＢａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｈｅｌｃｏｇｅｎｅｓからプロテイングルタミナーゼが発見された（非特許文献２）が、２０２４年２月現在、産業利用されているプロテイングルタミナーゼ

はＣ．ｐｒｏｔｅｏｌｙｔｉｃｕｍ由来のもののみである。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：A novel protein-deamidating enzyme from Chryseobacterium proteolyticum sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66(8): 3337-43

非特許文献2：A novel protein glutaminase from Bacteroides helcogenes-characterization and comparison, Applied Microbiology and Biotechnology (2020) 104:187-199

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明が解決しようとする課題は、タンパク質脱アミド活性を有する新規な酵素剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、今回新たにＬｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のポリペプチドがタンパク質脱アミド活性を有することを見出した。本発明は、上記の知見に基づいて完成したものである。

[0007] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

＜１＞　配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

＜２＞　タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属由来である、＜１＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

＜３＞　＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

＜４＞　＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク

質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

＜５＞　＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜６＞　＜１＞又は＜２＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

＜７＞　Longimycelium属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。

＜８＞　配列番号１のアミノ酸配列と６０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

＜９＞　タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属、Crossiella属又はKrasilnikovia属由来である、＜８＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

＜１０＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

＜１１＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

＜１２＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜１３＞　＜８＞又は＜９＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

＜１４＞　Longimycelium属細菌、Crossiella属細菌又はKrasilnikovia属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と６０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。

＜１５＞　配列番号１のアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性を有するア

ミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

＜１６＞　前記タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属、Crossiella属、Krasilnikovia属又はLongispora属由来である、＜１５＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

＜１７＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

＜１８＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

＜１９＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

＜２０＞　＜１５＞又は＜１６＞に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

＜２１＞　Longimycelium属、Crossiella属、Krasilnikovia属又はLongispora属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。

[0008] ＜Ａ＞　タンパク質脱アミドのための、酵素剤の使用であって、酵素剤は配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、酵素剤の使用。

発明の効果

[0009]　本発明によるタンパク質脱アミド酵素を含むタンパク質脱アミド用酵素剤は、食品や医療用途の分野での使用に適している。

発明を実施するための形態

[0010] １．タンパク質脱アミド用酵素剤

本発明のタンパク質脱アミド用酵素剤は、配列番号１、６、１０又は１４

のアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と等価なアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む。

本発明のタンパク質脱アミド酵素は、タンパク質のアミド基含有側鎖を分解する作用を示す酵素であり、上記作用を有する限り、ペプチド結合の切断及びタンパク質の架橋を伴うタンパク質のアミド基含有側鎖を分解する作用をさらに有していても良い。本発明のタンパク質脱アミド酵素は、具体的にはタンパク質中のグルタミン残基を脱アミド化し、グルタミン酸に変換する酵素（プロテイングルタミナーゼ）である。

[0011] 「等価なアミノ酸配列」とは、基準のアミノ酸配列（配列番号１、６、１０又は１４のアミノ酸配列）と一部で相違するが、当該相違がタンパク質の機能（ここではタンパク質脱アミド活性）に実質的な影響を与えていないアミノ酸配列のことをいう。従って、等価なアミノ酸配列を有する酵素はタンパク質脱アミド酵素による酵素反応を触媒する。活性の程度は、タンパク質脱アミド酵素としての機能を発揮できる限り特に限定されない。但し、基準となるアミノ酸配列からなる酵素（配列番号１、６、１０又は１４のアミノ酸配列を有する）と同程度又はそれよりも高いことが好ましい。

[0012] タンパク質脱アミド酵素は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ属、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ属、ＫｒａｓｉＩｎｉｋｏｖｉａ属又はＬｏｎｇｉｓｐｏｒａ属由来であることが好ましく、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来、ＫｒａｓｉＩｎｉｋｏｖｉａ ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来又はＬｏｎｇｉｓｐｏｒａ ｆｕｌｖａ由来であることがより好ましい。配列番号１のアミノ酸配列は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のタンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来のタンパク質脱アミド酵素の全長アミノ酸配列を配列番号２に示す。配列番号６のアミノ酸配列は、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来のタンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来

のタンパク質脱アミド酵素の全長アミノ酸配列を配列番号７に示す。配列番号１０のアミノ酸配列は、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ　ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来のタンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ　ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来のタンパク質脱アミド酵素の全長アミノ酸配列を配列番号１１に示す。配列番号１４のアミノ酸配列は、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来のタンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列（成熟体）である。尚、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来のタンパク質脱アミド酵素の全長アミノ酸配列を配列番号１５示す。

[0013] 「アミノ酸配列の一部の相違」は、例えば、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の１又は複数のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して１又は複数のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの任意の組合せによって生じる。アミノ酸配列の一部の相違はタンパク質脱アミド活性が保持される限り許容される（活性の多少の変動があってもよい）。この条件を満たす限り、アミノ酸配列の相違する位置は特に限定されない。また、アミノ酸配列の相違が複数の箇所（場所）で生じていてもよい。

[0014] アミノ酸配列の一部の相違をもたらすアミノ酸の数は、アミノ酸配列を構成する全アミノ酸の例えば、約５０％未満、約４０％未満、約３０％未満、約２０％未満、又は約１０％未満に相当する数であり、好ましくは約８％未満に相当する数であり、より好ましくは約６％に相当する数であり、さらに好ましくは約４％未満に相当する数であり、一層好ましくは約２％未満に相当する数であり、最も好ましくは約１％未満に相当する数である。従って、等価タンパク質は、基準のアミノ酸配列と例えば、約５０％以上、約５５％以上、約６０％以上、約６５％以上、約７０％以上、約７５％以上、約８０％以上、約８１％以上、約８２％以上、約８３％以上、約８４％以上、約８５％以上、約８６％以上、約８７％以上、約８８％以上、約８９％以上、約９０％以上、約９１％以上、約９２％以上、好ましくは約９３％以上、より好ましくは約９４％以上、さらに好ましくは約９５％以上、一層好ましくは約９６％以上、より一層好ましくは約９７％以上、さらに一層好ましくは約

９８％以上、最も好ましくは約９９％以上の同一性を有する。

[0015] 「アミノ酸配列の一部の相違」の典型例の一つは、アミノ酸配列を構成するアミノ酸の中の１～４０個（好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～７個、一層好ましくは１～５個、より一層好ましくは１～３個）のアミノ酸の欠失、置換、アミノ酸配列に対して１～４０個（好ましくは１～３０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～７個、一層好ましくは１～５個、より一層好ましくは１～３個）のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることである。

[0016] 好ましくは、タンパク質脱アミド活性に必須でないアミノ酸残基において保存的アミノ酸置換が生じることによって等価なアミノ酸配列が得られる。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、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（例えばアラニン、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）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0017] 二つのアミノ酸配列の同一性（％）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるといえる。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関

数であり（すなわち、同一性（％）＝同一位置の数／位置の総数 ×100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

[0018] 二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。アミノ酸配列の同一性は例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のblastp(protein-protein BLAST)により得ることが出来る。パラメータはデフォルトのパラメータを用いれば良いが、例えばBLOSUM62マトリックスを使用してGap CostsをExistence:11、Extension:1に設定すればよい。

[0019] 本発明の酵素剤の有効成分であるタンパク質脱アミド酵素は、より大きいタンパク質（例えば融合タンパク質）の一部であってもよい。融合タンパク質において付加される配列としては、例えば、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、組み換え生産の際の安定性を確保する付加配列等が挙げられる。

[0020] 本発明におけるタンパク質脱アミド酵素（以下、本酵素とも言う）は、当該タンパク質脱アミド酵素を産生する微生物（タンパク質脱アミド酵素産生株）、例えば、ロンギマイセリウム（Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ）属細菌、クロシエラ（Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ）属細菌、クラシルニコビア（Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ）属細菌又はロンギスポラ（Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ）属細菌を培養することにより得ることができる。一例としては、ロンギマイセリウム・ツルファネンス（Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ）、クロシエラ・クリオフィラ（Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ ｃｒｙｏｐｈｉｌａ）、クラシルニコビア・シナモメア（Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ）又はロンギスポラ・フルバ（Ｌｏｎｇｉｓｐｏ

ｒａ　ｆｕｌｖａ）を培養することにより得ることができる。すなわち、本発明は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ属細菌、Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ属細菌、Ｋｒａｓｉｌｎｉｋｏｖｉａ属細菌又はＬｏｎｇｉｓｐｏｒａ属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と５０％以上（好ましくは、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法に関するものであってもよい。タンパク質脱アミド酵素産生株は野生株であっても変異株（例えば紫外線照射によって変異株が得られる）であってもよい。タンパク質脱アミド酵素産生株の具体例は、Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ（ＮＢＲＣ１０７７２６）である。Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ（ＮＢＲＣ１０７７２６）は、ＮＢＲＣ（独立行政法人製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター）に保管された菌株であり、所定の手続を経ることによってその分譲を受けることができる。

[0021] 本酵素は、本酵素を産生する微生物の培養液及び／又は菌体より調製することができる。培養条件や培養法は、本酵素が生産されるものである限り特に限定されない。即ち、本酵素が生産されることを条件として、使用する微生物の培養に適合した方法や培養条件を適宜設定できる。培養法としては液体培養、固体培養のいずれでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養を例にとり、その培養条件を説明する。

[0022] 培地としては、使用する微生物が生育可能な培地であれば、特に限定されない。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、さらに硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ゼラチン、ペプトン、酵母エキス、コーンスティープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、さらにカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。使用する微生物の生育を促進する

ためにビタミン、アミノ酸などを培地に添加してもよい。培地のｐＨは例えば約３～８、好ましくは約４～７程度に調整し、培養温度は通常約２０～４０℃、好ましくは約２５～３５℃程度で、１～２０日間、好ましくは３～１０日間程度好気的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーメンターによる好気的深部培養法が利用できる。

[0023] 以上の条件で培養した後、培養液又は菌体より目的の酵素を回収する。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理等することによって不溶物を除去した後、限外ろ過膜による濃縮、硫安沈殿等の塩析、透析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破砕した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより本酵素を得ることができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破砕、分離、精製）を行ってもよい。

[0024] 本酵素は、遺伝子工学的手法によっても容易に調製することができる。例えば、本酵素をコードするＤＮＡで適当な宿主細胞（例えば大腸菌）を形質転換し、形質転換体内で発現されたタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。このように組換えタンパク質として目的の酵素を得ることにすれば種々の修飾が可能である。例えば、本酵素をコードするＤＮＡと他の適当なＤＮＡとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、任意のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質からなる本酵素を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはＮ末端若しくはＣ末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

[0025] 通常は、以上のように適当な宿主－ベクター系を利用して遺伝子の発現～発現産物（本酵素）の回収を行うが、無細胞合成系を利用することにしても

よい。ここで、「無細胞合成系（無細胞転写系、無細胞転写／翻訳系）」とは、生細胞を用いるのではく、生細胞由来の（或いは遺伝子工学的手法で得られた）リボソームや転写・翻訳因子などを用いて、鋳型である核酸（DNAやmRNA）からそれがコードするmRNAやタンパク質をin vitroで合成することをいう。無細胞合成系では一般に、細胞破砕液を必要に応じて精製して得られる細胞抽出液が使用される。細胞抽出液には一般に、タンパク質合成に必要なリボソーム、開始因子などの各種因子、tRNAなどの各種酵素が含まれる。タンパク質の合成を行う際には、この細胞抽出液に各種アミノ酸、ATP、GTPなどのエネルギー源、クレアチンリン酸など、タンパク質の合成に必要なその他の物質を添加する。勿論、タンパク質合成の際に、別途用意したリボソームや各種因子、及び／又は各種酵素などを必要に応じて補充してもよい。

[0026] タンパク質合成に必要な各分子（因子）を再構成した転写／翻訳系の開発も報告されている（Shimizu, Y. et al.: Nature Biotech., 19, 751-755, 2001）。この合成系では、バクテリアのタンパク質合成系を構成する３種類の開始因子、３種類の伸長因子、終結に関与する４種類の因子、各アミノ酸をtRNAに結合させる２０種類のアミノアシルtRNA合成酵素、及びメチオニルtRNAホルミル転移酵素からなる３１種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムから増幅し、これらを用いてタンパク質合成系をin vitroで再構成している。本発明ではこのような再構成した合成系を利用してもよい。

[0027] 用語「無細胞転写／翻訳系」は、無細胞タンパク質合成系、in vitro翻訳系又はin vitro転写／翻訳系と交換可能に使用される。in vitro翻訳系ではRNAが鋳型として用いられてタンパク質が合成される。鋳型RNAとしては全RNA、mRNA、in vitro転写産物などが使用される。他方のin vitro転写／翻訳系ではDNAが鋳型として用いられる。鋳型DNAはリボソーム結合領域を含むべきであって、また適切なターミネータ配列を含むことが好ましい。尚、in vitro転写／翻訳系では、転写反応及び翻訳反応が連続して進行するように各反応に必要な因子が添加された条件が設定される。

[0028] 上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いは

スプレードライなどにより粉末化して提供することも可能である。その際、精製酵素を予め酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解させておいてもよい。好ましくは、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液を使用することができる。尚、ここでGOODの緩衝液としてはPIPES、MES又はMOPSが挙げられる。

[0029] 酵素の精製度は特に限定されない。また、最終的な形態は液体状であっても固体状（粉体状を含む）であってもよい。

[0030] 本酵素はタンパク質中のグルタミン残基のγ－アミド基を脱アミドする酵素である。本発明の酵素剤における有効成分（本酵素）の含有量は特に限定されないが、例えば、本酵素剤１g当たりのタンパク質脱アミド活性が０．０１Ｕ～５０００Ｕ、好ましくは０．１Ｕ～２０００Ｕ、より好ましくは１Ｕ～１０００Ｕになるように有効成分の含有量を設定ないし調整することができる。

[0031] タンパク質脱アミド活性の測定方法としては、合成基質を用いた以下の方法を採用できる。３０ｍＭ　Ｚ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙを含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ６．５）１ｍＬにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液０．１ｍＬを添加して、３７℃、１０分間放置した後、０．４Ｍ　ＴＣＡ（トリクロロ酢酸）溶液を１ｍＬ加えて反応を停止する。ブランクとして、３０ｍＭ　Ｚ－Ｇｌｎ－Ｇｌｙを含む０．２Ｍリン酸バッファー（ｐＨ６．５）１ｍＬに０．４Ｍ　ＴＣＡ溶液を１ｍＬ加え、さらにタンパク質脱アミド酵素を含む試料溶液０．１ｍＬを添加して、３７℃で１０分間放置する。

[0032] 上記で得られた溶液についてアンモニアテストワコー（富士フイルム和光純薬）を用い、反応液中に生じたアンモニア量の測定を行う。アンモニア標準液（塩化アンモニウム）を用いて作成したアンモニア濃度と吸光度（６３０ｎｍ）との関係を表す検量線より、反応液中のアンモニア濃度を求める。

[0033] タンパク質脱アミド酵素の活性を、１分間に１μｍｏｌのアンモニアを生成する酵素量を１単位（１Ｕ）とし、以下の式から算出する。式中、反応液

量は２．１、酵素溶液量は０．１、Ｄｆは酵素溶液の希釈倍率である。また、１７．０３はアンモニアの分子量である。

[0034] [数1]

タンパク質脱アミド酵素活性(U/mL)
＝反応液中のアンモニア濃度(mg/L)×(1/17.03)×(反応液量／酵素溶液量)×(1/10)×Df

[0035] 一方、タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性については、インスリンＢ鎖を基質として用いた場合の脱アミド化インスリンＢ鎖生産量から算出することができる。測定条件、測定手順などの詳細は後述の実施例に示す。

[0036] 本発明の酵素剤におけるタンパク質脱アミド活性は特に限定されないが、例えば、インスリンＢ鎖を用いた評価方法における脱アミド率の下限値は４％以上、５％以上、７％以上、好ましくは１０％以上、より好ましくは１５％以上であり、脱アミド率の上限値は９９％以下、９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、好ましくは４０％以下、より好ましくは３０％以下、さらに好ましくは２０％以下である。

[0037] また、本発明の酵素剤におけるタンパク質脱アミド活性は、上述したように、合成基質との反応を行った後に反応停止液についてＨＰＬＣを用いて分析を行い、ピークの遷移を検出することによって評価することもできる。測定条件、測定手順などの詳細は後述の実施例に示す。

[0038] 本発明の酵素剤は、有効成分（本発明のタンパク質脱アミド酵素）の他、賦形剤、緩衝剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水、各種タンパク質、各種タンパク質の分解物、各種エキス類、各種塩類、各種酸化防止剤、システイン、グルタチオン、グルタミン酸ナトリウム、イノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウム、貝殻焼成カルシウム、二酸化ケイ素などを含有していてもよい。賦形剤としてはデンプン、デキストリン、マルトース、トレハロース、乳糖、D-グルコース、ソルビトール、D-マンニトール、白糖、グリセロール等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコ

ール、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としてはエタノール、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。タンパク質の例は、大豆タンパク質、小麦タンパク質、トウモロコシタンパク質、乳タンパク質、動物由来タンパク質などである。エキス類の例は肉エキス、植物エキス、酵母エキスなどである。塩類の例は、塩化塩、リン酸塩、ポリリン酸塩、ピロリン酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、炭酸塩などである。酸化防止剤の例は、L-アスコルビン酸塩、亜硫酸水素ナトリウムなどである。本発明の酵素剤の形状は特に限定されず、例えば粉末状、顆粒状、液体状、カプセル状等である。

[0039] ２．遺伝子

本酵素をコードする遺伝子は、配列番号１、６、１０又は１４のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするＤＮＡからなる。当該態様の具体例は、配列番号３、８、１２又は１６に示す塩基配列からなるＤＮＡ、及び配列番号４、９、１３又は１７に示す塩基配列からなるＤＮＡである。配列番号３のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１）のみをコードするものであり、配列番号４のＤＮＡは、成熟体（配列番号１のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。配列番号８のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号６）のみをコードするものであり、配列番号９のＤＮＡは、成熟体（配列番号６のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。配列番号１２のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１０）のみをコードするものであり、配列番号１３のＤＮＡは、成熟体（配列番号１０のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。配列番号１６のＤＮＡは、成熟体のアミノ酸配列（配列番号１４）のみをコードするものであり、配列番号１７のＤＮＡは、成熟体（配列番号１４のアミノ酸配列）に加え、シグナルペプチドとプロ配列をコードしている。

[0040] 本酵素をコードする遺伝子は典型的には本酵素の調製に利用される。本酵素をコードする遺伝子を用いた遺伝子工学的調製法によれば、より均質な状態の本酵素を得ることが可能である。また、当該方法は大量の本酵素を調製する場合にも好適な方法といえる。尚、本酵素をコードする遺伝子の用途は本酵素の調製に限られない。例えば、本酵素の作用機構の解明などを目的とした実験用のツールとして、或いは本酵素の変異体（改変体）をデザイン又は作製するためのツールとして、当該核酸を利用することもできる。

[0041] 本明細書において「本酵素をコードする遺伝子」とは、それを発現させた場合に本酵素が得られる核酸のことをいい、本酵素のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸をも含む。また、コドンの縮重も考慮される。

[0042] 核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法、化学合成、PCR法（例えばオーバーラップPCR）或いはこれらの組合せによって、単離された状態に調製することができる。

[0043] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列と比較した場合にそれがコードするタンパク質の機能は同等であるものの一部において塩基配列が相違する核酸（以下、「等価核酸」ともいう。また、等価核酸を規定する塩基配列を「等価塩基配列」ともいう）を使用してもよい。等価核酸の例として、本酵素をコードする核酸の塩基配列を基準として１若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、本酵素に特徴的な酵素活性（即ち、タンパク質脱アミド活性）を有するタンパク質をコードするＤＮＡを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該核酸がコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば２～４０塩基、好ましくは２～２０塩基、より好ましくは２～１０塩基である。等価核酸は、基準となる塩基配列（配列番号３、４、８、９、１２、１３、１６又

は１７）に対して、例えば５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、８１％以上、８２％以上、８３％以上、８４％以上、８５％以上、８６％以上、８７％以上、８８％以上、８９％以上、９０％以上、９１％以上、９２％以上、好ましくは９３％以上、より好ましくは９４％以上、さらに好ましくは９５％以上、一層好ましくは９６％以上、より一層好ましくは９７％以上、さらに一層好ましくは約９８％以上、最も好ましくは９９％以上の配列同一性を有する。

[0044] 以上のような等価核酸は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13 ,Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。また、紫外線照射など他の方法によっても等価核酸を得ることができる。

[0045] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸を使用してもよい。本酵素をコードする遺伝子の塩基配列、或いはそれに相補的な塩基配列に対して少なくとも約５０％、６０％、７０％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一な塩基配列を有する核酸を使用してもよい。

[0046] 本酵素をコードする遺伝子の塩基配列又はその等価塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する核酸を使用してもよい。「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジェントな条件は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) を参照して設定することができる。スト

リンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアミド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いて約50℃でインキュベーションし、その後0.1×SSC、0.1%SDSを用いて約65℃で洗浄する条件を挙げることができる。さらに好ましいストリンジェントな条件として例えば、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアミド、5×SSC(0.15M NaCl,15mM sodium citrate, pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10μg/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5)）を用いる条件を挙げることができる。

[0047] 本酵素をコードする遺伝子を含む組換えDNAを使用してもよい。組換えDNAは例えばベクターの形態で提供される。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいう。

[0048] 使用目的（クローニング、タンパク質の発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。大腸菌を宿主とするベクターとしてはM13ファージ又はその改変体、λファージ又はその改変体、pBR322又はその改変体（pB325、pAT153、pUC8など）等、酵母を宿主とするベクターとしてはpYepSec1、pMFa、pYES2等、昆虫細胞を宿主とするベクターとしてはpAc、pVL等、哺乳類細胞を宿主とするベクターとしてはpCDM8、pMT2PC等を例示することができる。

[0049] ベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、挿入された核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる

。

[0050] 核酸のベクターへの挿入、選択マーカー遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。

[0051] 宿主細胞としては、取り扱いの容易さの点から、大腸菌（エシェリヒア・コリ）、糸状菌（アスペルギルス・オリゼ）、放線菌（ストレプトマイセス属、ストレプトマイセス・リビダンス、ストレプトマイセス・モバラエンシス）、枯草菌(バチルス・サブティリス)、出芽酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）などの微生物を用いることが好ましいが、組換えDNAが複製可能で且つ本酵素の遺伝子が発現可能な宿主細胞であれば利用可能である。大腸菌の例としてT7系プロモーターを利用する場合は大腸菌BL21(DE3)pLysS、そうでない場合は大腸菌JM109を挙げることができる。また、出芽酵母の例として出芽酵母SHY2、出芽酵母AH22あるいは出芽酵母INVSc1（インビトロジェン社）を挙げることができる。

[0052] 組換えDNAを保有する微生物（即ち形質転換体）を使用することができる。微生物は、上記本発明のベクターを用いたトランスフェクション乃至はトランスフォーメーションによって得ることができる。例えば、塩化カルシウム法（ジャーナル オブモレキュラー バイオロジー(J.Mol. Biol.)、第53巻、第159頁（1970)）、ハナハン（Hanahan）法（ジャーナル オブモレキュラー バイオロジー、第166巻、第557頁（1983)）、SEM法（ジーン（Gene)、第96巻、第23頁(1990)〕、チャング（Chung）らの方法（プロシーディングズ オブザ ナショナル アカデミーオブ サイエンシーズ オブザ USA、第86巻、第2172頁(1989)）、リン酸カルシウム共沈降法、エレクトロポーレーション(Potter,H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165(1984))、リポフェクション(Felgner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84,7413-7417(1984))、接合伝達法等によって実施することができる。上記した微

生物は、本酵素を生産することに利用することができる。

[0053] ３．酵素剤の用途

本発明はさらに、本発明の酵素剤の用途に関する。

即ち、本発明の酵素剤を基質（タンパク質又はペプチド）に作用させることによって、タンパク質又はペプチドを改質することができる。具体的には、本発明の酵素剤を、グルタミン残基を含有するタンパク質又はペプチドに作用させることによって、タンパク質のグルタミン残基を脱アミドすることができる。すなわち、本発明は、タンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法に関するものであってもよい。また、本発明の酵素剤は、グルタミン残基及びリジン残基の両方を含有するタンパク質又はペプチドに作用させる場合であっても、タンパク質のグルタミン残基を脱アミドすることができる。従来の一般的なトランスグルタミナーゼにおいては、グルタミン残基及びリジン残基の両方を含有するタンパク質又はペプチドに作用させた場合（アシル受容体存在下において作用させた場合）には、脱アミド化反応をほとんど触媒しないことが知られているが、本発明の高素材においては、アシル受容体としてリジン残基が存在する場合においてもタンパク質のグルタミン残基を脱アミドすることができる。

[0054] タンパク質又はペプチドは、タンパク質含有飲食品に含まれるものであることが好ましく、本発明は、タンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法に関するものであることが好ましい。

[0055] 本発明は、タンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法に関するものであってもよい。例えば、本発明の酵素剤をタンパク質又はペプチドを含む飲食品又は飲食品素材（タンパク質含有飲食品等）に作用させることによって、脱アミド化タンパク質を含む飲食品又は飲食品素材（脱アミド化タンパク質含有飲食品等）を製造することができる。本発明の酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させるこ

とによって、タンパク質含有飲食品の品質を改良することができる。本発明によれば、本発明の酵素剤で処理された飲食品（脱アミド化タンパク質含有飲食品）が提供される。また、本発明の酵素剤は、飲食品又は飲食品素材（タンパク質含有飲食品等）以外にも産業用素材や医薬原料の製造用途にも使用できる。

[0056] タンパク質含有飲食品の品質の改良の具体例としては、特には限定されないが、動物性タンパク質や植物性タンパク質の可溶性、分散性、乳化性などを向上させる用途（例えば、乳製品（ミルク、ヨーグルトなど）、植物性ミルク、植物性ヨーグルト、コーヒー・ホワイトナー、ジュースなどの飲料、ドレッシング、マヨネーズ、クリームの製造用途）；植物性難溶解性蛋白質の可溶性、分散性の増大化（例えば、小麦グルテンを用いた天ぷら粉等の製造用途）；製パン・製菓におけるドウの改質用途（例えば、クラッカー、ビスケット、クッキー、ピザ或いはパイのクラストの製造用途）；飲食品中のアレルギー性蛋白質におけるアレルゲンの除去又は低減化用途（例えば、小麦アレルギー患者用の食品の製造用途）；蛋白質のミネラル感受性を低下させ、蛋白質及びミネラルを含む液体中の可溶性ミネラル含量を高め、ミネラルの人体への吸収性を高める用途（例えば、高ミネラル（例えばカルシウム）含有飲料、ミネラル（例えばカルシウム）の吸収促進剤の製造用途）；苦みを低下させる用途、プロテアーゼの蛋白質分解率を向上させる用途、及び／又はグルタミン酸含有量を増強させる用途（例えば、アミノ酸系調味料（動物性蛋白質の加水分解物（ＨＡＰ）、植物性蛋白質の加水分解物（ＨＶＰ））、味噌・醤油の製造用途）等が挙げられる。

[0057] 本酵素剤を用いた飲食品の製造方法は特に限定されないが、例えば以下の工程（ａ）を含む方法が挙げられる。さらに、工程（ａ）の後に工程（ｂ）及び又は（ｃ）を含んでいても良い。

（ａ）タンパク質を含有する食品又は食品素材（タンパク質含有飲食品）に本酵素剤を作用させる工程

（ｂ）脱アミド化タンパク質を含む食品又は食品素材を回収する工程

（ｃ）得られた酵素処理食品又は酵素処理食品素材に含まれる本酵素を失活又は除去する工程。

実施例

[0058] 例１：Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅ由来タンパク質脱アミド酵素の調製

Ｌｏｎｇｉｍｙｃｅｌｉｕｍ　ｔｕｌｕｆａｎｅｎｓｅの菌体（独立行政法人 製品評価技術基盤機構（ＮＩＴＥ）から入手）（ＮＢＲＣ１０７７２６）を、トリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて３７℃、４日間培養を行い、上清を回収した。得られた上清を、常法に従い２０ｍＭ リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロース ＦＦ，ＧＥ ｈｅａｌｔｈ ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトを実施し、活性画分を脱塩濃縮後、さらにＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００ＨＲでゲル濾過に供することにより本酵素サンプルを取得した。

[0059] 本酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１）

ATSLPPIAPPLPRGVQSKSWSVPDYIAAWEKQHGRPMTAEERYHLARGCIGVTVVNLDREDAPNPPLNLSFGTYQRAMEVQAALNEIVATRPSPREYAEQVRKHPALQGVQNLVRAFPTFIDPANLHAAIFSKRFYSKQDPNWTDEQAAEMYRPNPRTGQVDMSTYRYRARPGYVNFDYGWYDEQTNNWWHANHAEPGMKVYQSTLRYYSRPLLDFDEQVFTVAFARVA

[0060] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号２）

MKKWLPRALVALFVLLGLPAGLAGTAHAAVVAHAAVATSLPPIAPPLPRGVQSKSWSVPDYIAAWEKQHGRPMTAEERYHLARGCIGVTVVNLDREDAPNPPLNLSFGTYQRAMEVQAALNEIVATRPSPREYAEQVRKHPALQGVQNLVRAFPTFIDPANLHAAIFSKRFYSKQDPNWTDEQAAEMYRPNPRTGQVDMSTYRYRARPGYVNFDYGWYDEQTNNWWHANHAEPGMKVYQSTLRYYSRPLLDFDEQVFTVAFARVA

[0061] 塩基配列（成熟体）（配列番号３）

gccacgtcgctgccaccgatcgcaccgccgcttccccggggcgtgcagagcaagagctggtcggtgccggactacattgccgcctgggagaagcaacacggtaggccgatgacggccgaggagcggtaccacctcgcc

cggggctgcatcggcgtcaccgtggtcaacctcgaccgggaggacgcgccgaacccgccgctcaacctg
tcgttcggcacttaccagcgggccatggaagtgcaggccgcgctgaacgagatcgtcgcgacccggccg
tcgccgcgggagtacgccgagcaggtgcgcaagcacccggcgctgcagggcgtgcagaacctggtgcgg
gcgttccccacgttcatcgacccggcgaacctgcacgccgccatcttctccaagcggttctactcgaag
caggacccgaactggaccgacgagcaggcggccgagatgtaccggccgaatccgcggaccggccaggtc
gacatgagcacctaccgctaccgggcgcggccgggttacgtgaacttcgactacggttggtacgacgag
cagacgaacaactggtggcacgccaaccacgcggagccgggcatgaaggtctaccagagcacgttgcgg
tactactcccggccgctgctggatttcgacgagcaggttttcaccgtggcgttcgcgcgggtcgcctga

[0062] 塩基配列（全長）（配列番号４）

gtgaagaagtggttgccgcgcgccctggtcgcgctgttcgtgctcctggggttacccgccggcctggcc
ggaacggcacatgccgcggtcgtcgcgcacgccgccgtcgccacgtcgctgccaccgatcgcaccgccg
cttccccggggcgtgcagagcaagagctggtcggtgccggactacattgccgcctgggagaagcaacac
ggtaggccgatgacggccgaggagcggtaccacctcgcccggggctgcatcggcgtcaccgtggtcaac
ctcgaccgggaggacgcgccgaacccgccgctcaacctgtcgttcggcacttaccagcgggccatggaa
gtgcaggccgcgctgaacgagatcgtcgcgacccggccgtcgccgcgggagtacgccgagcaggtgcgc
aagcacccggcgctgcagggcgtgcagaacctggtgcgggcgttccccacgttcatcgacccggcgaac
ctgcacgccgccatcttctccaagcggttctactcgaagcaggacccgaactggaccgacgagcaggcg
gccgagatgtaccggccgaatccgcggaccggccaggtcgacatgagcacctaccgctaccgggcgcgg
ccgggttacgtgaacttcgactacggttggtacgacgagcagacgaacaactggtggcacgccaaccac
gcggagccgggcatgaaggtctaccagagcacgttgcggtactactcccggccgctgctggatttcgac
gagcaggttttcaccgtggcgttcgcgcgggtcgcctga

[0063] 例２：タンパク質脱アミド活性の確認

本酵素サンプルのタンパク質脱アミド活性について、インスリンＢ鎖（グルタミン残基とリジン残基を持つペプチド）を基質としたときの脱アミド化インスリンＢ鎖の生成で確認した。

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich 社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO_3H)-Gly-Ser-His-Leu-Va

l-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO_3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液 ９０μＬに対し、１ｍｇ／ｍＬ精製酵素溶液１０μＬ又は２０μＬと、０．２Ｍ リン酸二水素カリウム・リン酸水素二ナトリウム緩衝液（ｐＨ ６．５）を総量１８０μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液をインキュベーター内部で４０℃に加温し、１時間静置の後に１Ｎ ＨＣｌを２０μＬ添加して反応を停止させた。記載の反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖へのピーク遷移によって脱アミド活性を検出した。比較例としてＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ由来トランスグルタミナーゼ（天野エンザイム株式会社製）を用いて同様に脱アミド活性を検出した。

〈脱アミド評価〉

クロマトグラムより算出されるインスリンＢ鎖および脱アミド化インスリンＢ鎖のピーク面積から脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、脱アミド率（脱アミド化インスリンＢ鎖生産量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）で評価した。

[0064] （結果）

結果を表１に示す。

[表1]

	比較例		実施例	
使用酵素	Streptomyces 由来 トランスグルタミナーゼ		Longimycelium 由来 タンパク質脱アミド酵素	
酵素添加量（μL）	10	20	10	20
脱アミド率（%）	3.3	3.4	10.8	18.9

[0065] （考察）

表１に示す結果において、比較例のトランスグルタミナーゼでは脱アミド化インスリンＢ鎖をわずかにしか生成しておらず、酵素添加量を増やしても生成量が変化しなかった。このことから、グルタミン残基とリジン残基を持つペプチドに対してトランスグルタミナーゼは脱アミド化反応を触媒しない

ことが確認できた。それに対して、本発明のタンパク質脱アミド酵素は脱アミド化インスリンＢ鎖を生成しており、酵素添加量を増やすことでその生成量が増加していることから脱アミド化反応を触媒することが示された。

[0066] 例３：Ｃｒｏｓｓｉｅｌｌａ　ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド活性酵素及びＫｒａｓｉＩｎｉｋｏｖｉａ　ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド活性酵素の調製

１．形質転換体の作製

Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属微生物用発現ベクターを使用して、目的配列を組み込んだ。ＰＣＲで増幅し、常法を用いて形質転換体（Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド酵素異種発現株、及びＫ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド酵素異種発現株）を取得した。取得した形質転換体のシーケンス解析を行い、目的の配列が組み込まれているか確認した。

[0067] ２．Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド酵素異種発現株、Ｋ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド酵素異種発現株

取得した形質転換体をトリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて３２℃、４日間培養を行い、上清を回収した。得られた上清について、常法に従い２０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液にて平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロースＦＦ，ＧＥ　ｈｅａｌｔｈ　ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトグラフィーを実施した。その後さらにＨｉｓ　ｔａｇ蛋白質精製用カラム（Ｈｉｓ　ｔｒａｐ　ＨＰ，Ｃｙｔｉｖａ製）にて精製することで各酵素サンプルを取得した。

[0068] Ｃ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号６）

GLPIAPPLRPGVESKTWKVADYIKAWETYHGRPMTADERENLARGCIGVTVVNLERGDVGNPPLGLSFG
TFGKAREVQAALNEIIKSKPSAAQYAAAVRSHPLLSKLENVQRALPADLNTGELTAAIFSKRFYSKQNP

NWTDEFAEKMYRANARGQVDMNSYRYVARPGYVNFDYGWYDENTRNWWHANHAEPGMKVYQSTFDYYSR
DLLDFDRQVFTVAFAKKV

[0069] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号７）

MRNSVLIRTLTTAALGLGLLIPGAAAATAAPAPSTAAAVSIVGLPIAPPLRPGVESKTWKVADYIKAWE
TYHGRPMTADERENLARGCIGVTVVNLERGDVGNPPLGLSFGTFGKAREVQAALNEIIKSKPSAAQYAA
AVRSHPLLSKLENVQRALPADLNTGELTAAIFSKRFYSKQNPNWTDEFAEKMYRANARGQVDMNSYRYV
ARPGYVNFDYGWYDENTRNWWHANHAEPGMKVYQSTFDYYSRDLLDFDRQVFTVAFAKKV

[0070] 塩基配列（成熟体）（配列番号８）

ggcctccccatcgccccccgctgcgcccgggcgtcgagtcgaagacgtggaaggtcgcggactacatc
aaggcgtgggagacgtaccatggccgcccgatgaccgcggacgaacgggagaacctcgcgcggggctgc
atcggggtcaccgtggtcaacctcgagcggggcgacgtggggaatccgccgctcggcctctcgttcggc
acgttcggcaaagcgcgggaggtccaagcggcgctcaacgagatcatcaagtcgaagccgtcggcggcg
cagtacgcggccgcggtccgctcgcacccccctgctctcgaagctcgagaacgtgcagcgggccctcccg
gcggatctcaacacgggcgagctcacggcggcgatcttctcgaagcggttctactcgaagcagaacccg
aactggacggacgagttcgcggagaagatgtaccgggcgaacgcgcggggccaagtcgacatgaactcg
taccggtacgtcgcgcggccgggctacgtcaacttcgactacggctggtacgacgagaacacgcggaac
tggtggcacgcgaatcacgcggagccgggcatgaaggtctatcagtcgacgttcgactactactcgcgg
gatctcctcgacttcgaccggcaagtcttcacggtcgcgttcgcgaagaaggtc

[0071] 塩基配列（全長）（配列番号９）

atgcggaactccgtgctcatccgcacgctgaccaccgccgccctcggcctgggcctcctgatccccggg
gcggcggccgcgacggcggccccggcgccctccaccgcggcggccgtctccattgtcggcctccccatc
gccccccgctgcgcccgggcgtcgagtcgaagacgtggaaggtcgcggactacatcaaggcgtgggag
acgtaccatggccgcccgatgaccgcggacgaacgggagaacctcgcgcggggctgcatcggggtcacc
gtggtcaacctcgagcggggcgacgtggggaatccgccgctcggcctctcgttcggcacgttcggcaaa
gcgcgggaggtccaagcggcgctcaacgagatcatcaagtcgaagccgtcggcggcgcagtacgcggcc
gcggtccgctcgcacccccctgctctcgaagctcgagaacgtgcagcgggccctcccggcggatctcaac
acgggcgagctcacggcggcgatcttctcgaagcggttctactcgaagcagaacccgaactggacggac
gagttcgcggagaagatgtaccgggcgaacgcgcggggccaagtcgacatgaactcgtaccggtacgtc

gcgcggccgggctacgtcaacttcgactacggctggtacgacgagaacacgcggaactggtggcacgcg
aatcacgcggagccgggcatgaaggtctatcagtcgacgttcgactactactcgcgggatctcctcgac
ttcgaccggcaagtcttcacggtcgcgttcgcgaagaaggtc

[0072] Ｋ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド酵素のアミノ酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１０）

TESDPRSPTPARTATQAPIAEVRPAERSLANANAATATELTPLAPALPPGVSTRTWSVEDFVELFERKY
GRPMTQDERNALARGCIGVTTVNLERGNINPPLGMSFGTFATSRDVQNAINDILATNPSRTQFVAAVAQ
HPLLSRIDNVTDSLPGGPTSQWTAVIFSKRFYSKQDPSWTDEQADQAFRPDPATGQVDMTDYRYRAKPG
YVNFDYGWLDEGSGNWWHANHAEPGMKVYQSTLRHYSRPLLDFDRQVFSVTFGRVHP

[0073] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号１１）

MPKRLLRLFVIFVAGLSISTMVAAPALATESDPRSPTPARTATQAPIAEVRPAERSLANANAATATELT
PLAPALPPGVSTRTWSVEDFVELFERKYGRPMTQDERNALARGCIGVTTVNLERGNINPPLGMSFGTFA
TSRDVQNAINDILATNPSRTQFVAAVAQHPLLSRIDNVTDSLPGGPTSQWTAVIFSKRFYSKQDPSWTD
EQADQAFRPDPATGQVDMTDYRYRAKPGYVNFDYGWLDEGSGNWWHANHAEPGMKVYQSTLRHYSRPLL
DFDRQVFSVTFGRVHP

[0074] 塩基配列（成熟体）（配列番号１２）

accgaatccgacccgcggtcccccaccccgcgcgcacggccacgcaagcgccgatcgcggaagtgcgg
ccggcggaacgctcgctggcgaacgccaatgccgccaccgccaccgaactgacccccctcgcccccgcc
ctcccccgggggtgtcgacgcggacgtggtcggtcgaggacttcgtcgagctcttcgagcggaagtac
gggcggccgatgacccaagacgaacgcaatgccctcgcgcggggctgcatcggcgtcacgacggtcaac
ctcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcatgtcgttcggcacgttcgcgacgtcgcgggacgtg
cagaacgcgatcaacgacatcctcgcgaccaatccctcccggacccaatttgtggcggccgtggcgcag
cacccgctcctctcgcggatcgacaacgtcacggactcgctcccgggcggcccgacgtcgcagtggacg
gcggtcatcttctcgaagcggttctactcgaagcaagacccgtcgtggacggacgagcaagcggatcaa
gcgttccgccccgatccggcgacgggccaagtcgacatgacggactaccggtaccgggcgaagccgggc
tacgtcaacttcgactacggctggctcgacgagggctcgggcaactggtggcacgcgaaccacgcggag
ccggggatgaaggtgtatcagtcgacgctccggcactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaa

gtcttctcggtcacgttcggccgggtccacccg

[0075] 塩基配列（全長）（配列番号１３）

atgccgaagcggctcctccggctcttcgtcatcttcgtcgcgggcctctcgatttcgaccatggtggcc
gccccggccctcgcgaccgaatccgacccgcggtcccccacccccgcgcgcacggccacgcaagcgccg
atcgcggaagtgcggccggcggaacgctcgctggcgaacgccaatgccgccaccgccaccgaactgacc
cccctcgcccccgccctccccccgggggtgtcgacgcggacgtggtcggtcgaggacttcgtcgagctc
ttcgagcggaagtacgggcggccgatgacccaagacgaacgcaatgccctcgcgcggggctgcatcggc
gtcacgacggtcaacctcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcatgtcgttcggcacgttcgcg
acgtcgcgggacgtgcagaacgcgatcaacgacatcctcgcgaccaatccctcccggacccaatttgtg
gcggccgtggcgcagcacccgctcctctcgcggatcgacaacgtcacggactcgctcccgggcggcccg
acgtcgcagtggacggcggtcatcttctcgaagcggttctactcgaagcaagacccgtcgtggacggac
gagcaagcggatcaagcgttccgccccgatccggcgacgggccaagtcgacatgacggactaccggtac
cgggcgaagccgggctacgtcaacttcgactacggctggctcgacgagggctcgggcaactggtggcac
gcgaaccacgcggagccggggatgaaggtgtatcagtcgacgctccggcactactcgcggccgctcctc
gacttcgaccggcaagtcttctcggtcacgttcggccgggtccacccg

[0076] 例４：タンパク質脱アミド活性の確認

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO3H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液２２．５μＬに対し、０．２ｍｇ／ｍＬ　各精製酵素溶液１０μＬと、０．１Ｍ　リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）２５μＬと、プロテアーゼインヒビター（ProteoGuard EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail(TaKaRa)）０．９μＬを総量５８．４μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液をインキュベーター内部で４０℃に加温し、一晩静置の後に１００℃で１０分間加温し反応を停止させた。記載の反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖

へのピーク遷移によって脱アミド活性を検出した。

〈脱アミド評価〉

クロマトグラムより算出されるインスリンＢ鎖および脱アミド化インスリンＢ鎖のピーク面積から脱アミド化インスリンＢ鎖生産量を算出し、脱アミド率（脱アミド化インスリンＢ鎖生産量÷基質インスリンＢ鎖量×１００）で評価した。

[0077] （結果）

結果を表２に示す。

[表2]

	実施例２	実施例３
	K. cinnamomea 由来タンパク質脱アミド酵素	C. cryophila 由来タンパク質脱アミド酵素
タンパク質脱アミド率(%)	２０	４４

（考察）

表２に示す結果において、本発明のＫ．ｃｉｎｎａｍｏｍｅａ由来タンパク質脱アミド酵素、及びＣ．ｃｒｙｏｐｈｉｌａ由来タンパク質脱アミド酵素は、脱アミド化インスリンＢ鎖を生成していることから脱アミド化反応を触媒することが示された。

[0078] 例５：タンパク質脱アミド活性の確認

Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来タンパク質脱アミド酵素の調製

Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａの菌体を、トリプトソーヤブイヨン培地（日水製薬株式会社製）にて２８℃、６日間培養を行い、上清を回収した。得られた上清を、常法に従い２０ｍＭ　リン酸緩衝液（ｐＨ６）にて透析を行った。透析後のサンプルは、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換カラム（ＳＰセファロース　ＦＦ，ＧＥ　ｈｅａｌｔｈ　ｃａｒｅ製）にて、イオン交換クロマトを実施し、活性画分を脱塩濃縮し粗精製酵素サンプルを得た。

[0079] Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来タンパク質脱アミド酵素のアミノ

酸配列と、塩基配列を以下に示す。

アミノ酸配列（成熟体配列のみ）（配列番号１４）

APPTSADRSGTPVAGLRVPSSLSAVRGAARFDAVAPEATPLPVGQKTRTWTIARYAAAWRTANGRAMTD
RERDALARGCIGVTTVNIERGNINPPLGLSFGTFEKATAVRDALDAVLAGAAGRTDYAARVGADPLLST
LDNVTESLPAGDPDQWAAVVFSKRFHSGQDSTWTAAETDRAFRPDARGQVDMSAYHYRAKPGYVNFDYG
WYDPATGSWWHANHAEPGMEIYQSTLKYYSRPLLDFDRQVYSVTFARKAAPAWRSSTN

[0080] アミノ酸配列（全長）*下線部は成熟体配列（配列番号１５）

MRNRLLRITMAAVLGVGATVGLAATTGYA<u>APPTSADRSGTPVAGLRVPSSLSAVRGAARFDAVAPEATP
LPVGQKTRTWTIARYAAAWRTANGRAMTDRERDALARGCIGVTTVNIERGNINPPLGLSFGTFEKATAV
RDALDAVLAGAAGRTDYAARVGADPLLSTLDNVTESLPAGDPDQWAAVVFSKRFHSGQDSTWTAAETDR
AFRPDARGQVDMSAYHYRAKPGYVNFDYGWYDPATGSWWHANHAEPGMEIYQSTLKYYSRPLLDFDRQV
YSVTFARKAAPAWRSSTN</u>

[0081] 塩基配列（成熟体）（配列番号１６）

gccccgccgacgtccgccgaccgctcggggacccccgtggcggggctgcgggtcccgtcgtccctctcc
gccgtgcgcggcgccgcccggtttgacgccgtggcgccggaagccaccccgctcccggtcgggcaaaag
acccgcacgtggacgattgcccgctacgccgcggcctggcggaccgcgaacggccgcgccatgaccgat
cgggagcgcgatgccctcgcccggggctgcatcggcgtcacgacggtcaacatcgagcggggcaacatc
aacccgccgctcggcctctccttcggcacgtttgaaaaagcgaccgcggtccgcgacgcgctggacgcc
gtcctcgccggggccgcgggccgcaccgactacgccgcgcgcgtcggcgcggatccgctcctctccacg
ctcgataatgtcacggaatcgctcccggcgggggacccggatcagtgggcggcggtcgtcttctcgaag
cgctttcattccgggcaagattccacctggaccgccgcggagaccgaccgggcgtttcggcccgatgcg
cgcggccaagtcgacatgtcggcgtaccactaccgggcgaagccgggctacgtcaacttcgactacggc
tggtacgacccggcgacgggctcgtggtggcacgcgaaccacgcggagccgggcatggagatctatcag
tcgacgctcaagtactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaagtctactcggtcacgttcgcg
cggaaggcggcgccggcgtggcggtcgtcgacgaac

[0082] 塩基配列（全長）（配列番号１７）

atgcggaaccgcctgctccggatcacgatggccgcggtcctgggggtgggcgccaccgtggggctcgcc
gcgaccacgggctatgcggccccgccgacgtccgccgaccgctcggggacccccgtggcggggctgcgg

gtcccgtcgtccctctccgccgtgcgcggcgccgcccggtttgacgccgtggcgccggaagccaccccg
ctcccggtcgggcaaaagacccgcacgtggacgattgcccgctacgccgcggcctggcggaccgcgaac
ggccgcgccatgaccgatcgggagcgcgatgccctcgcccggggctgcatcggcgtcacgacggtcaac
atcgagcggggcaacatcaacccgccgctcggcctctccttcggcacgtttgaaaaagcgaccgcggtc
cgcgacgcgctggacgccgtcctcgccggggccgcgggccgcaccgactacgccgcgcgcgtcggcgcg
gatccgctcctctccacgctcgataatgtcacggaatcgctcccggcgggggacccggatcagtgggcg
gcggtcgtcttctcgaagcgctttcattccgggcaagattccacctggaccgccgcggagaccgaccgg
gcgtttcggcccgatgcgcgcggccaagtcgacatgtcggcgtaccactaccgggcgaagccgggctac
gtcaacttcgactacggctggtacgacccggcgacgggctcgtggtggcacgcgaaccacgcggagccg
ggcatggagatctatcagtcgacgctcaagtactactcgcggccgctcctcgacttcgaccggcaagtc
tactcggtcacgttcgcgcggaaggcggcgccggcgtggcggtcgtcgacgaac

[0083] 例６：タンパク質基質に対するタンパク質脱アミド活性の評価

（方法）

５ｍｇのインスリンＢ鎖（インスリンＢ鎖，酸化型 ウシ膵臓由来、Sigma-Aldrich 社、配列：Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO3H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO3H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala（配列番号５））を２ｍＬの超純水に溶解させ、基質溶液とした。その後基質溶液９０μＬに対し、１ｍｇ／ｍＬ精製酵素溶液４０μＬと、０．１Ｍ　リン酸二水素カリウム・リン酸水素二ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）を総量１８０μＬになるように添加し、反応溶液とした。反応溶液をインキュベーター内部で４０℃に加温し、５時間静置の後に１００℃で１０分間加温し反応を停止させた。反応停止液をＨＰＬＣを用いて分析した。インスリンＢ鎖から脱アミド化インスリンＢ鎖へのピーク遷移によって脱アミド活性を検出した。

[0084] （結果）

ＨＰＬＣを用いた分析の結果、Ｌｏｎｇｉｓｐｏｒａ　ｆｕｌｖａ由来タンパク質脱アミド酵素を用いた場合、脱アミド反応に基づくピークが確認された。

産業上の利用可能性

[0085] 本発明の酵素剤は、タンパク質脱アミド酵素を有効成分とする。従って、食品や医療用途の分野での使用に適し、産業上の利用価値は高い。

本発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項2] 前記タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属由来である、請求項１に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項3] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

[請求項4] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

[請求項5] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項6] 請求項１又は２に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項7] Longimycelium属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。

[請求項8] 配列番号１のアミノ酸配列と６０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項9] 前記タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属、Crossiella属又はKrasilnikovia属由来である、請求項８に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項10] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

[請求項11] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

[請求項12] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項13] 請求項８又は９に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項14] Longimycelium属細菌、Crossiella属細菌又はKrasilnikovia属細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と６０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。

[請求項15] 配列番号１のアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素を有効成分として含む、タンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項16] 前記タンパク質脱アミド酵素がLongimycelium属、Crossiella属、Krasilnikovia属又はLongispora属由来である、請求項１５に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤。

[請求項17] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質又はペプチドに作用させることを含む、タンパク質又はペプチドの脱アミド方法。

[請求項18] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、タンパク質含有飲食品の脱アミド方法。

[請求項19] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤をタンパク質含有飲食品に作用させることを含む、飲食品の製造方法。

[請求項20] 請求項１５又は１６に記載のタンパク質脱アミド用酵素剤で処理された飲食品。

[請求項21] Longimycelium属、Crossiella属、Krasilnikovia属又はLongispora属

細菌を培養する工程を含む、配列番号１のアミノ酸配列と５０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質脱アミド酵素の製造方法。