

2013年度 生物工学技術賞 受賞

新規フルクトシルペプチドオキシダーゼの開発と それを用いた糖尿病診断法の構築

五味 恵子^{1*}・廣川 浩三³・一柳 敦¹・
荒井あゆみ²・梶山 直樹¹

Development of novel fructosyl peptide oxidases
and their applications for the clinical diagnosis for diabetes

Keiko Gomi^{1*}, Kozo Hirokawa³, Atsushi Ichiyanagi¹, Ayumi Arai², and Naoki Kajiyama (¹Research & Development Division; ²Intellectual Property Department, Kikkoman Corporation, 399 Noda, Noda-shi, Chiba 278-0037; ³Edogawa Plant, Kikkoman Biochemifa Company, 376-2, Kamihanawa, Noda-shi, Chiba, 278-0033) *Seibutsu-kogaku* **92**: 62-68, 2014.



はじめに

世界の糖尿病患者数は2012年現在で約3億7100万人、さらに2030年には約5億5180万人に達するとも予想されており、患者数の増加は世界的な社会問題ととらえられている。糖尿病は、初期の段階では症状は特に現れないため、健康診断などの適切な検査により発見されない限り見逃されてしまう。ところが、特に注意せずそのまま見逃すと慢性的に高血糖状態が続くことになり、過剰な糖による「糖化」が引き起こされる。その結果、生体内の組織がダメージを受け、網膜症、腎症、神経障害、血管障害などの重篤な合併症を引き起こす心配がある。失明、人工透析、血管障害による下肢切断といった合併症まで症状が進んでしまうと、患者のQOLは急激に低下し、高額な医療費負担の恐れがあることから、糖尿病の発症や合併症を予防することが、患者にとっても、社会にとっても非常に重要であるといえる。また、近年、アルツハイマー病や歯周病など、広範にわたる病態と糖尿病との関連性が報告されるようになり、糖尿病がさまざまな病気の温床となっている可能性が示唆されている^{1,2)}。これらより、糖尿病に関する検査・診断をタイミング良く行うことは非常に重要であるといえる。

血糖値は、いわゆる血液中のグルコース濃度であるが、直前の食事などに強く影響されるのに対し、ヘモグロビンのβ鎖N末端のパリン残基に血中のグルコースが結合した糖化ヘモグロビン (HbA1c) は過去1~2か月の平均血糖値を反映すると言われている。つまり、HbA1cを測定することにより、生体内の血糖状態を正確に把握することが可能であることから、糖尿病の診断および病態の把握や血糖コントロールに最適な指標として受け入れられている。

2008年からメタボリックシンドローム対策として始まった特定健診・特定保健指導において、血糖検査項目として血糖値とHbA1cが採用された。さらに2010年7月には日本糖尿病学会による糖尿病診断基準(図1)が改定され、これまで補充的な位置づけで測定されてきたHbA1cをより積極的に診断に取り入れることが糖尿病診断基準に定められている³⁾。

このように、糖尿病診断マーカーであるHbA1cの測定件数も増加の一途をたどっている。従来、HbA1cに関しては酵素測定法が存在せず、HPLC法、免疫法などの他の方法により測定されていた(表1)。HPLC法は正確に測定可能であるが、専用カラムと専用測定機が必要である。一方、免疫法はラテックス凝集法を原理とする

* 著者紹介 ¹キッコーマン株式会社 研究開発本部 E-mail: kgomi@mail.kikkoman.co.jp

²キッコーマン株式会社 知的財産部、³キッコーマンバイオケミファ株式会社 江戸川プラント

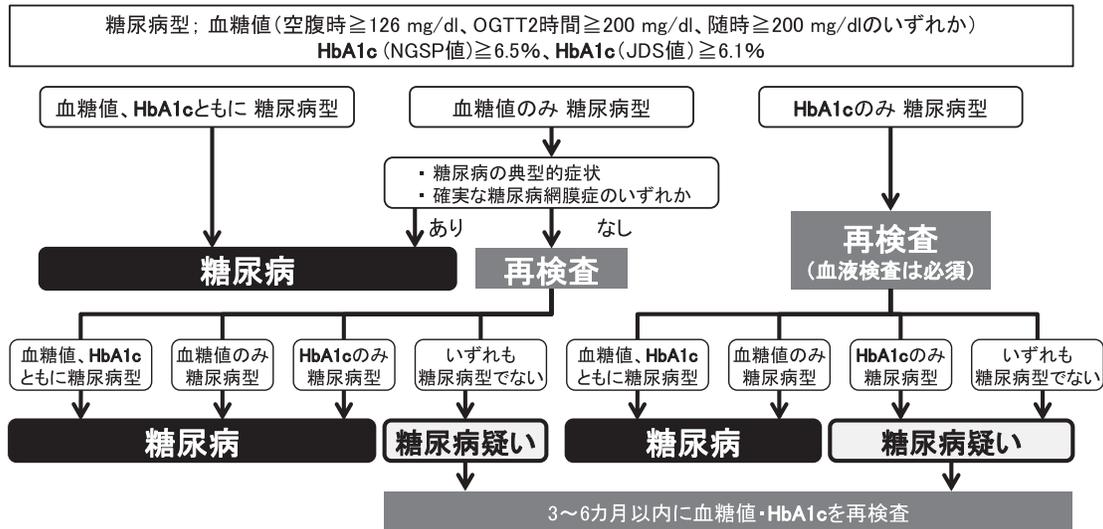


図1. 糖尿病診断基準（参考文献3より一部改変）。OGTT（経口糖負荷試験）：グルコースを経口負荷し、その後の糖処理能を調べる検査。HbA1cには、国際的に広く使用されているNGSP（National Glycohemoglobin Standardization Program）値と、日本で使用されてきたJDS（Japan Diabetes Society）値がある。国際標準化の流れの中で、JDS値とNGSP値の換算式（ $NGSP = 1.02 \times JDS + 0.25$ ）が確定され、NGSP値で表記する方向で進んでいる。

表1. 血糖値とHbA1c

	意味	主な測定方法
血糖値	血中グルコース濃度 採血時の血糖値	酵素法
HbA1c	糖化ヘモグロビンの割合 1～2か月の血糖値を反映	HPLC 免疫法 酵素法（報告）

ものであり、多くのキットメーカーから自動分析装置対応の臨床検査用キットが発売されているが、自動分析装置のセル汚染の可能性があることが心配されていた。HbA1c測定をはじめとする、いわゆる臨床検査は検査センターや病院の検査室で行われることが多く、多量の検体を正確・迅速・簡便に測定するニーズが非常に高いといえる。HbA1c検査についても、そのようなニーズを備えた酵素測定法の開発が待望されていた。

筆者らは、HbA1cの酵素測定法開発を模索する中で、HbA1cをプロテアーゼで前処理することによりヘモグロビンのβ鎖N末端のバリン残基に血中のグルコースが結合したフルクトシルジペプチド（F-ValHis）が遊離してくるのを見いだした。本稿では、F-ValHisに特異的に反応するフルクトシルペプチドオキシダーゼ（FPOX）の発見と酵素測定法開発を中心として紹介する。

F-ValHisの遊離

HbA1cはエンドプロテイナーゼGlu-CによりβサブユニットのN末端フルクトシルヘキサペプチド（F-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu）が遊離することがわかっており

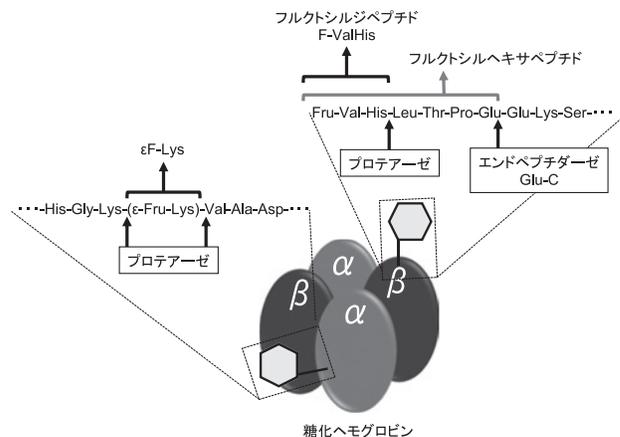


図2. プロテアーゼにより遊離する糖化ペプチドなど。εF-Lysは、代表例として示したものであり、ヘモグロビンの他のリジン残基、ヘモグロビン以外の血中タンパク質のリジン残基由来のものが想定される。

（図2）⁴⁾、国際臨床化学連合（IFCC）による基準測定法では、このフルクトシルヘキサペプチドをLC/MS（またはキャピラリー電気泳動）で測定することが定められている。しかしながら、この基準測定法は非常に時間と手間がかかることから、医療現場においては前述のとおり、HPLC法や免疫法による測定が日常的に行われている。

当初、筆者らは、社内にてすでに酵素を発見していたフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（FAOX）を用いたHbA1c測定法の構築を目指していた。FAOXは、フルクトシルアミノ酸、特にHbA1cのN末端であるフルクトシルバリン（F-Val）に反応する *Corynebacterium* 由来の酵素であり、当時、すでにクローニングおよび大腸

菌発現を確認しており、酵素が自由に使える状況にあった⁵⁻⁷⁾。FAOXは残念ながらHbA1cそのものや、フルクトシルヘキサペプチドにはまったく反応しないため、HbA1cやフルクトシルヘキサペプチドを各種プロテアーゼにより消化し、遊離してくるF-Valを測定することを試みたが、夾雑物から遊離する糖化アミノ酸や糖化ヘモグロビンβ鎖ではなくα鎖末端から遊離するF-Valを測りこむ可能性があるなど、そのままでは臨床検査に使用するには特異性などの面で十分ではない可能性が示唆された。そこで、プロテアーゼ消化による反応産物の詳細な解析を行うことにより問題解決の糸口を見いだそうと各種機器分析を行った。

フルクトシルヘキサペプチドに対し、各種プロテアーゼを混和、反応させたのち、逆相カラムを用いたHPLCにより分析を行ったところ、F-ValHisに相当する位置にピークが得られることがわかった。さらにアミノ酸分析およびマススペクトル解析を行ったところGlu, Pro, Thr, Leuが遊離する一方で、His残基の遊離が観察できないことから、フルクトシルヘキサペプチドが、より短鎖の糖化ペプチドに分解されており、その大部分がF-ValHisであることを確認した。分解の程度はプロテアーゼの種類や反応条件によって大きく異なり、たとえば、モルシン（キッコーマン製アスペルギルス由来プロテアーゼ）ではF-ValHisのみのシグナルが観察されたが、条件によっては、分解が十分進まない場合も存在した。

さらに、HbA1cのプロテアーゼ消化物について逆相カラムを用いたHPLCにより分析した結果、F-ValHisのシグナルを検出できたことから、F-ValHisに強く働き、発色などの検出系に持ち込める酵素さえあれば、酵素によるHbA1c測定系が構築可能となることが強く示唆された⁸⁾。

以上より、HbA1c酵素測定法の開発の方策としてF-ValHisに特異的な酵素の開発を進めることとしたが、
1) 自然界からF-ValHisに強く働く酵素を新たに探索する。
2) FAOXへの変異導入により反応性を改良する。

という二つの方向性が考えられた。これら二つの方向性を模索する中、新たな微生物源からF-ValHisへの反応性が高い酵素活性を見いだすことができた。この発見をもとにHbA1c酵素測定法の事業化に向けた研究を進めることになった。次章にて、このF-ValHisへの反応性が高い酵素活性を見つけるに至った、フルクトシルペプチドオキシダーゼ（FPOX）の探索について述べる。

FPOXの探索

酵素の探索は、土壌から新たに分離した微生物や保存菌株コレクションに対し、F-ValHisに働く酸化還元酵素、

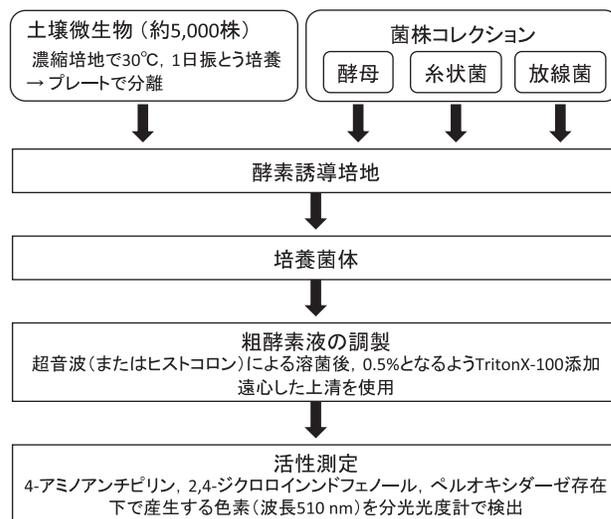


図3. F-ValHis検出用酵素（FPOX）のスクリーニング

すなわち、発色系で検出可能な酵素の生産能という観点からスクリーニングを行った。具体的には、スクリーニング対象の微生物を一つひとつ培養し、培養上清および菌体破碎液における当該酵素活性の有無を端から調べるというきわめて実直な方法で行った（図3）。

土壌由来微生物については、千葉県野田市周辺、茨城県筑波山周辺の土壌を採取し、F-ValHisを含む濃縮培地により土壌全体の微生物を培養することによりF-ValHisを資化する菌を分離し、スクリーニング効率向上を狙った。土壌分離菌はバクテリア、酵母を中心として約5000株、保存菌株コレクションより酵母約400株、糸状菌約500株、放線菌約700株など、約7000株の微生物を対象としてスクリーニングを行った。

結果として、糸状菌コレクションからF-ValHisに働くオキシダーゼ活性をもつ19株が選抜された（表2）。なお、スクリーニングで使用した目的酵素基質であるF-ValHisを自社内で高純度に合成することに成功し、潤沢に用いることができたこともスクリーニング成功の要因の一つであったと考えている。

スクリーニングの結果得られた糸状菌について、産生する酵素の性状の評価を行った（表2）。いずれも菌体破碎液にF-ValHisを基質とするオキシダーゼ活性が再確認された。中でもF-ValHisに対するオキシダーゼ活性の生産量が高いものとして*Coniochaeta* sp. NISL9330が選抜された^{9,10)}。また、HbA1c測定では、上述のとおり、ヘモグロビンをプロテアーゼ消化することにより、β鎖N末端バリンに由来するF-ValHisが遊離してくる。ところが、それと同時に、反応条件によってはリジンのε位のアミノ基が糖化されたεフルクトシルリジン（εF-Lys）が遊離してくることが示唆されていた（図2）。

表2. 産生されるFPOX（菌体破砕液）の基質特異性

菌 株	基質特異性（相対活性%）		
	F-ValHis	F-Gly	εF-Lys
<i>Achaetomiella virescens</i> ATCC 32393	100	35	141
<i>Achaetomium globosum</i> NISL9321	100	56	556
<i>Achaetomium luteum</i> ATCC18524	100	188	1250
<i>Achaetomium luteum</i> NISL9323	100	47	263
<i>Achaetomium</i> sp. NISL9327	100	81	385
<i>Achaetomium</i> sp. NISL9328	100	55	263
<i>Achaetomium strumarium</i> NISL9324	100	81	385
<i>Achaetomium strumarium</i> NISL9325	100	57	238
<i>Achaetomium strumarium</i> NISL9326	100	40	667
<i>Chaetomium quadrangulatum</i> NISL9329	100	188	1250
<i>Chaetomium</i> sp. NISL 9335	100	128	145
<i>Coniochaeta</i> sp. NISL 9330	100	39	61
<i>Eupenicillium euglaucum</i> IFO 31729	100	83	39
<i>Eupenicillium idahoense</i> IFO 9510	100	86	41
<i>Eupenicillium senticosum</i> IFO 9158	100	83	31
<i>Eupenicillium terrenum</i> ATCC 18547	100	182	10
<i>Gelasinospora pseudoreticulata</i> NISL 9332	100	82	588
<i>Microascus</i> sp. NISL9333	100	137	370
<i>Thielavia novoquineensis</i> NISL9334	100	59	588

(参考文献9より改変)

*Eupenicillium*属に属する菌が産生する酵素は、F-ValHisに働くがεF-Lysへの反応性が低いことが窺えたため、F-ValHisへの基質特異性が優れたものとしてεF-Lysへの反応性が一番低い*Eupenicillium terrenum* ATCC 18547が選抜された。

FPOXのクローニング

産生される酵素の性状を確かめるために、スクリーニングで選抜された菌株より酵素単離を行った。二つの菌株を酵素生産培地で培養して得られた菌体について、フレンチプレスを用いて菌体破砕を行った。その遠心上清から硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過などの分画操作を経て、SDS-PAGE上でほぼ単一となるまで精製することに成功した^{9,10}。得られた酵素は、いずれもSDS-PAGE上で50 kDaほどの大きさのモノマーであり、菌体破砕液で検出した基質特異性をほぼ再現することを確認できた。

酵素生産株から精製した酵素は、エドマン分解法に基づくプロテインシークエンサーを用いてそれぞれN末ア

ミノ酸配列およびトリプシン消化内部アミノ酸配列の解析を行った。得られたアミノ酸配列情報から、縮重プライマーを設計し、RT-PCRによる部分cDNA配列を得た。さらに3'RACE、5'RACEなどのクローニング手法により全長のcDNAを得ることができた。得られたcDNA配列から予想された一次アミノ酸配列についてBlast検索を行うと、*Penicillium*や*Aspergillus*由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼが上位に選択され、相同性は75%程度であった。また、今回クローニングした二つの由来の異なる糸状菌より得られたcDNAから予想された一次アミノ酸配列は、配列全体にわたって相同性が高かったことから、これらは同じグループに含まれる一群の酵素であると考えられた。

次にこれら両酵素の大腸菌による異種発現を試み、活性を持った形で発現に成功した。大腸菌で発現された酵素は、両者とも求めるF-ValHisを基質とするオキシダーゼ活性を持っていることが確認された。本酵素活性は、これまでに報告がない新規な酵素活性であったため、フルクトシルペプチドオキシダーゼ（FPOX）と名づけた

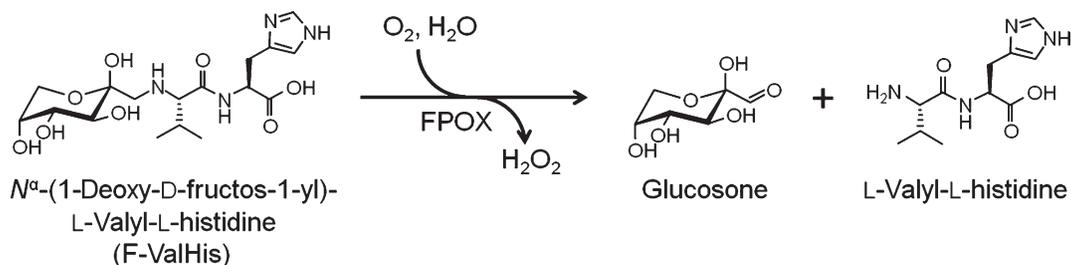


図4. フルクトシルペプチドオキシダーゼ (FPOX) の反応機構. FPOXは糖化ジペプチド (F-ValHis) を脱糖化し, H_2O_2 を生成する酵素である.

(図4)^{9,11)}. さらに, FPOXはフルクトシルヘキサペプチドのプロテアーゼ消化物を基質として過酸化水素を産生することから, HbA1c酵素測定法に用いる酵素として使用可能であることが示唆された.

表3に二つの組換え酵素の性状を示した. 酵素の各種性質を比較すると, FPOX-CEとFPOX-EEはおおよそ同じであると言えるが, 両者の大きな違いは, スクリーニングの項で記述したように, 基質特異性の違いにあるといえる. アミノ酸配列を比較すると, 前述のとおり, 全体にわたって相同性が高いにも関わらず, ϵ F-Lysへの反応性において大きく異なることがわかった.

二つのポリペプチド鎖に共通して, N末端付近にはFAD結合モチーフ (GxGxxG) が予想どおり含まれた. さらに, 相同性が30%程度であるが全長にわたって比較的相同性の高い既知配列である Amadriase Iとの配列比較の結果, FADと共有結合していることが示されていたCys342が二つの遺伝子にも存在することが確認された¹²⁾. これらの酵素はいずれも糸状菌由来の酵素ではあったが, 大腸菌にて十分活性を持った形で発現可能であったことから, 糖鎖付加がないか, もしくは活性に糖鎖が関与しないことが示唆された.

現在, 二つの酵素のアミノ酸配列をクエリーとしてBlast検索を行うと, FAOX, FAODなどのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼや我々の研究の後に発見された他の微生物由来のFPOX配列が, 糸状菌を中心として細菌, 酵母からもピックアップされることから, 糖化アミノ酸, 糖化ペプチドに働く酵素が広く微生物界に存在することが示唆される.

Coniochaeta 由来FPOX-CE, *Eupenicillium* 由来FPOX-EEはそれぞれ弊社オリジナルのファージ系大腸菌生産システム「スリーパーベクターシステム」にて大量発現に成功した. 「スリーパーベクターシステム」は, IPTGのような化学物質ではなく, 熱誘導により酵素生産を行うことを特徴とする¹³⁾. 組換え大腸菌の培養最適化, 大量発現した酵素を用いた種々の精製スキーム検討を経て, 工業スケールでの酵素生産に成功した. このように

表3. FPOX-CE, FPOX-EEの性質比較

	FPOX-CE	FPOX-EE
由来	<i>Coniochaeta</i> sp. NISL 9330	<i>Eupenicillium terrenum</i> ATCC 18547
分子量(ゲルろ過)	52,000	50,000
アミノ酸数	437	437
構造	モノマー	モノマー
K_m (F-ValHis)	3.4 mM	2.8 mM
基質特異性		
F-ValHis	100%	100%
ϵ F-Lys	84%	わずかに働く
温度安定性	45°C以下	40°C以下
至適温度	35–42°C	30–45°C
pH安定性	6.0–9.5	5.5–9.0
至適pH	7.5–8.0	7.0–8.0

基質特異性はF-ValHisへの反応を100%としたときの相対値 (キッコマンバイオケミファ株式会社 酵素カタログより改変).

して十分な量の酵素が得られるようになったことから, HbA1c測定キット開発に向けた事業化がスピードアップすることとなった.

FPOXを用いたHbA1c測定法の確立

大量に組換え発現したFPOXを用いたHbA1c測定法の確立のため, プロテアーゼを組み合わせた反応を確認することにした. まずはモデル系としてフルクトシルヘキサペプチドに対しプロテアーゼ各種を反応させた後, FPOXおよび発色試薬による検出を試みたところ, フルクトシルアミノ酸のみに働くFAOXでは全く発色しないのに対し, フルクトシルジペプチドに働くFPOXでは顕著に発色が観察されたことから, 麹菌や酵母, パチ

ルスなどから産生されるプロテアーゼが効率的にF-ValHisを遊離させることを確認した¹⁴⁾。

さらに、HbA1cを基質としてプロテアーゼ反応を行った後、同様にFPOXおよびパーオキシダーゼによる発色反応を行った結果、HbA1c濃度に従って発色が増大したことから、新たに発見したFPOXを用いてHbA1cが測定できることが確認された。このようにして確立したFPOXを用いた酵素測定法の概略を図5に示した。

FPOXの改良

FPOXの安定性をさらに高めることにより、酵素生産効率の向上やFPOXを使用した測定キットの品質保持期間の延長、流通の簡便化、さらにはセンサー用途での応用の可能性が広がると考えられた。そこで、FPOX-CE遺伝子を鋳型に*in vivo*での遺伝子への変異導入とメンブレンアッセイとを組み合わせさせたスクリーニングを複数回繰り返すことによって指向進化による耐熱性向上型酵素の取得を試みた。

変異導入はランダムな突然変異を引き起こす大腸菌XL1-redを用いて行い、得られた全コロニーからプラスミドを回収し、大腸菌JM109を形質転換したものをスクリーニング対象とした。得られたコロニーをナイロンメンブレンに転写し、メンブレンを48°Cで熱処理した後に、活性測定試薬に浸漬し、コロニー部分が発色したクローンを選抜した。スクリーニングのラウンドを重ねるごとに熱処理の温度や時間を長くすることで指向進化の選択圧を高めた。その結果得られた変異候補株について、2 ml規模の液体培養により耐熱性を再確認し、変

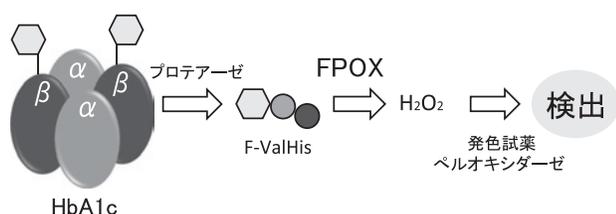


図5. FPOXを用いたHbA1c測定概略図

異箇所を解析を行ったところ、R94K, G184D, F265L, N272D, H302R, H388Yが熱安定性向上に効果をもたらす変異として同定された。変異箇所の多重化および組合せ最適化により、野生型酵素では5%以下の残存活性となる条件の熱処理(50°C, 60分)でもまったく活性を失わない、熱安定性が向上した変異体を作製することができた(表4)^{15,16)}。

これらの変異体は、熱安定性のみならず、プロテアーゼに対する安定性も著しく向上していた(図6)。これは、FPOXを使用したHbA1c測定キットにおいてその測定スキーム上、プロテアーゼ処方が必須であることを考えると、今後のキット開発において意義がある性質向上であると考えられた。

FPOXの立体構造

FPOXの実用化が進むにつれ、タンパク質立体構造情報の解析を進めることにより、新たな酵素機能改変の手掛かりが得られると考えられた。京都大学との共同研究による解析の結果、基質特異性の異なる2種類のFPOX、*Coniochaeta* sp. NISL9330由来FPOX-CE、*Eupenicillium terrenum* ATCC 18547由来FPOX-EEのそれぞれ耐熱型酵素のタンパク質結晶構造の解明に成功した(図7)¹⁷⁾。

結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法により行

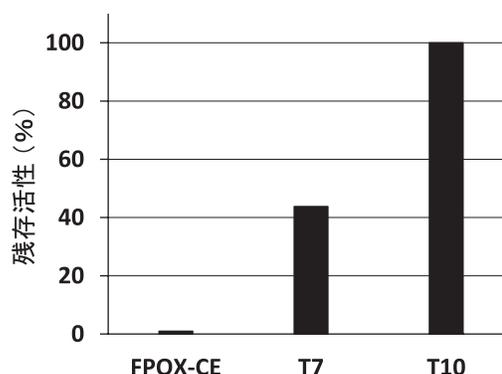


図6. 熱安定性FPOXのプロテアーゼ耐性。中性プロテアーゼ共存下で30分放置後のFPOX残存活性(参考文献16より改変)。

表4. 熱安定性変異FPOX

FPOX 変異体	変異	残存活性 (%)
FPOX-CE	—	3.9
FPOX-CE-T7	N272D, H302R, H388Y	83.3
FPOX-CE-T8	F265L, N272D, H302R, H388Y	102.4
FPOX-CE-T9	G184D, F265L, N272D, H302R, H388Y	108.1
FPOX-CE-T10	R94K, G184D, F265L, N272D, H302R, H388Y	105.7

残存活性: pH 8, 50°C, 30分処理後の活性 (参考文献16より改変)



図7. *Coniochaeta* sp. NISL9330由来FPOX-CEの耐熱型酵素の立体構造

い、沈殿剤として K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、PEG400を用いて20°CでインキュベートすることによりFPOXの結晶が得られた。結晶の回折データは大型放射光施設SPring-8を利用してそれぞれ1.8 Å、1.6 Åの分解能まで収集した。初期位相はAmadoriase IIの結晶構造を利用した分子置換法により決定し、FPOXの分子モデルの構築および精密化を行うことができた。

このように、タンパク質結晶の構造が明らかになったことで、活性中心近傍へのアミノ酸置換による変異導入手法により、基質特異性や反応性に関する機能改変のアプローチが取れるようになった。構造情報からだけでは機能改良の確実な予測はできないが、改良目的に応じて変異箇所が絞られることにより、効率的な酵素機能改良が可能になったことは特記に値する。構造解析結果を活用して、基質特異性向上型変異体、熱安定性がさらに向上した変異体、また、次世代測定に向けた各種変異体の取得にもすでに成功しており、今後の実用化において応用の幅を広げるような活躍が期待できると考えている。

おわりに

筆者らは、HbA1cからプロテアーゼ消化により遊離する糖化ジペプチド検出を特徴とする新規測定法を世界で初めて構築した。また、新規測定法に使用する新規酵素FPOXを自然界から発見し、工場規模での遺伝子組換え生産に成功したことにより、世界初となるHbA1c酵素測定法の実用化を達成した。現在、FPOXとその変異体酵素のシリーズはグループ会社であるキッコーマンバイオケミファ株式会社から臨床診断用酵素として製造

販売されており、本酵素を用いたHbA1c測定キットがキットメーカー数社より販売中である。FPOXを用いたHbA1c酵素測定法のシェアは徐々に拡大しており、日本生まれの酵素測定法が海外をも席卷できる可能性は十分あると考えている。正確・迅速・簡便な酵素測定法がさらに市場を伸ばし、糖尿病診断や病態コントロールに今後も役立つことを期待している。

謝 辞

タンパク質結晶構造解析については、京都大学薬学研究科薬科学専攻構造生物薬学分野 加藤博章教授、中津亨准教授の熱いご指導を受けましたことを感謝いたします。生物工学技術賞応募に際し、日本生物工学会理事の先生方からご推薦いただきました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hokama, M., Oka, S., Leon, J., Ninomiya, T., Honda, H., Sasaki, K., Iwaki, T., Ohara, T., Sasaki, T., LaFerla, F.-M., Kiyohara, Y., and Nakabeppu, Y.: *Cereb. Cortex*, doi:10.1093/cercor/bht101.
- 2) Grossi, S. G., Skrepcinski, F. B., DeCaro, T., Robertson, D. C., Ho, A. W., Dunford, R. G., and Genco, R. J.: *J. Periodontol.*, **68**, 713–719 (1997).
- 3) 清野 裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, 門脇 孝, 柏木厚典, 荒木栄一, 伊藤千賀子, 稲垣暢也, 岩本安彦, 春日雅人, 花房俊昭, 羽田勝計, 植木浩二郎: *糖尿病*, **53**, 450–467 (2010).
- 4) Kobold, U., Jeppsson, J.-O., Dülffer, T., Finke, A., Hoelzel, W., and Miedema, K.: *Clin. Chem.*, **43**, 1994–1951 (1997).
- 5) Horiuchi, T., Kurokawa, T., and Saito, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 103–110 (1989).
- 6) Sakaue, R., Hiruma, M., Kajiyama, N., and Koyama, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1256–1261 (2002).
- 7) Sakaue, R. and Kajiyama, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 139–145 (2003).
- 8) 阪上了一, 荒井あゆみ, 梶山直樹, 小山泰二: 特許第3949854号.
- 9) 黒澤恵子, 廣川浩三, 梶山直樹: 特許第4231668号.
- 10) Hirokawa, K., Gomi, K., Bakke, M., and Kajiyama, N.: *Arch. Microbiol.*, **180**, 227–231 (2003).
- 11) Hirokawa, K., Gomi, K., and Kajiyama, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 104–111 (2003).
- 12) Wu, X., Takahashi, M., Chen, S. G., and Monnier, V. M.: *Biochemistry*, **39**, 1515–1521 (2000).
- 13) 中野衛一: *蛋白質核酸酵素*, **32**, 1133–1140 (1987).
- 14) Hirokawa, K., Shimoji, K., and Kajiyama, N.: *Biotechnol. Lett.*, **27**, 963–968 (2005).
- 15) Hirokawa, K., Ichianagi, A., and Kajiyama, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 775–781 (2008).
- 16) 廣川浩三, 一柳 敦: 特許第5074386号.
- 17) Ichianagi, A., Hirokawa, K., Gomi, K., Nakatsu, T., Kato, H., and Kajiyama, N.: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **69**, 130–133 (2013).