

(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
2014年8月14日(14.08.2014)



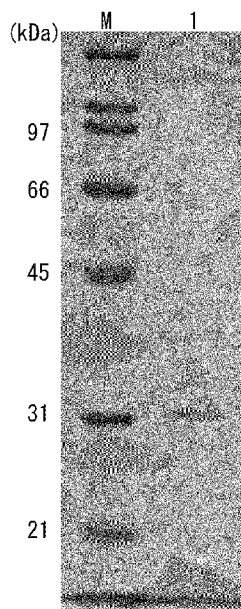
(10) 国際公開番号
WO 2014/122698 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 9/52 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/000724
- (22) 国際出願日: 2013年2月8日(08.02.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 国立大学法人福島大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION FUKUSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9601296 福島県福島市金谷川1番地 Fukushima (JP).
- (72) 発明者: 杉森 大助(SUGIMORI, Daisuke); 〒9601296 福島県福島市金谷川1番地 国立大学法人福島大学内 Fukushima (JP).
- (74) 代理人: 西川 恵清, 外(NISHIKAWA, Yoshikiyo et al.); 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田1丁目12番17号梅田スクエアビル9階 北斗特許事務所 Osaka (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, BN, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROTEASE, AND PROTEASE-CONTAINING CLEANING AGENT AND PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 発明の名称: プロテアーゼ、プロテアーゼ含有洗浄剤及びその製造方法



AA レーンM: タンパク質分子量マーカー
BB レーン1: プロテアーゼ (RD001933単独培養)

(57) Abstract: Provided is a protease exhibiting excellent protein breakdown performance, and excellent detergency, particularly with respect to protein-based stains caused by blood or the like. This protease is: a protease obtained by culturing *Actinomyces* sp. strain RD001933 (NBRC domestically isolated RD strain) of Actinobacteria; a protease obtained by culturing *Actinomyces miaoliensis* strain RD000920 (NBRC domestically isolated RD strain) of Actinobacteria; or a protease obtained by mixing and culturing the RD001933 strain and the RD000920 strain.

(57) 要約: タンパク質を分解する能力が強く、特に血液等のタンパク質汚れに対して高い洗浄力を有するプロテアーゼを提供する。プロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ・エスピー (*Actinomyces* sp.) RD001933株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼ、放線菌のアクチノマジュラ・マイアオリエンシス (*Actinomyces miaoliensis*) RD000920株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼ、又は前記RD001933株及び前記RD000920株を混合培養して得られたプロテアーゼである。

AA LANE M: PROTEIN MOLECULAR WEIGHT MARKER
BB LANE 1: PROTEASE (RD001933 MONOCULTURE)

WO 2014/122698 A1



添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 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))

明 細 書

発明の名称：

プロテアーゼ、プロテアーゼ含有洗浄剤及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規なプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）、このプロテアーゼを含有するプロテアーゼ含有洗浄剤及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、医療器具の洗浄剤として、非イオン界面活性剤、プロテアーゼ、金属イオン封鎖剤及びベンゾトリアゾール等からなる洗浄剤組成物が知られている（例えば、特許文献1参照）。また、プロテアーゼ、ノニオン界面活性剤、酵素安定剤を含有する洗浄剤組成物も知られている（例えば、特許文献2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開平5-279700号公報
特許文献2：特開2001-31999号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 現状ではアルカリ洗浄剤の洗浄力が最も高いとされるが、それでも医療器具の汚れを完全に洗浄するには至っていない。汚れの主な成分は、手術時に付着した血液や体液からなる細胞やタンパク質であり、この中には感染性プリオンも含まれる。特に医療器具の中でも剪刀やピンセット等の鋼製小物は頻繁に再利用されるため、これらの鋼製小物に付着した血液及びタンパク質性の汚れは、滅菌工程の前に洗浄することが必須工程になっている。また、これらの鋼製小物に感染性プリオン等の有害物質が除去されないまま残存していると、多数の手術患者に感染が広がるおそれがある。そのため、このような汚れを完全に洗い落とすことができる強力な洗浄剤の開発が望まれている。

る。

[0005] 本発明は上記の点に鑑みてなされたものであり、タンパク質を分解する能力が強く、特に血液等のタンパク質汚れに対して高い洗浄力を有するプロテアーゼ、プロテアーゼ含有洗浄剤及びその製造方法を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) RD001933株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼである。

[0007] 本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ・マイアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) RD000920株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼである。

[0008] 本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株及び放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株を混合培養して得られたプロテアーゼである。

[0009] 前記プロテアーゼが、以下の(a1)、(a2)又は(a3)に記載のポリペプチドであることが好ましい。

[0010] (a1) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0011] (a2) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1つ又は複数のアミノ酸残基が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0012] (a3) 配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも65%の相同性を有するポリペプチド。

[0013] 前記プロテアーゼのSDS-PAGEによる分子量が約31,000Da (31kDa) であることが好ましい。

[0014] 前記プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドが、以下の(b1)、(b2)又は(b3)に記載のポリヌクレオチドを含むことが好ましい。

- [0015] (b 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。
- [0016] (b 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
- [0017] (b 3) 配列番号 1 に記載の塩基配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリヌクレオチド。
- [0018] 本発明に係るプロテアーゼは、前記プロテアーゼを含有する。
- [0019] 本発明に係るプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法は、放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura* sp.) 属に属する RD001933 株を培養して製造する。
- [0020] 本発明に係るプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法は、放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属する RD000920 株を培養して製造する。
- [0021] 本発明に係るプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法は、放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura* sp.) 属に属する RD001933 株及び放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属する RD000920 株を混合培養して製造する。

発明の効果

- [0022] 本発明に係るプロテアーゼは、安全性の高い 2 種類の微生物 (同属株) から得ることができ、いずれもタンパク質を分解する能力が強く、特に血液等のタンパク質汚れに対して高い洗浄力を有する。特にこれらのプロテアーゼ含有洗浄剤は、従来のアルカリ洗浄剤では洗浄が困難であった変性固着した血液汚れを低温かつ短時間で洗浄することができる。また 2 種類の微生物をそれぞれ単独培養して得られるプロテアーゼ含有洗浄剤は洗浄効果が高いが、2 種類の微生物を混合培養して得られるプロテアーゼ含有洗浄剤はさらに洗浄効果が高い。またこれらのプロテアーゼ含有洗浄剤は、簡便かつ安価に大量生産することができ、液状のほか粉剤化又は錠剤化することもでき、長期保存も可能である。
- [0023] さらに本発明に係るプロテアーゼは、洗浄剤以外の様々な分野に応用する

ことも可能である。例えば、食肉加工やイカの皮むき、皮なめしなどである。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属する R D O O 1 9 3 3 株の培養液から得られた精製画分についての S D S - P A G E 解析結果を示す電気泳動写真である。

[図2]放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属する R D O O 0 9 2 0 株の培養液から得られた精製画分についての S D S - P A G E 解析結果を示す電気泳動写真である。

[図3] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (精製酵素) 及び R D O O 0 9 2 0 株由来プロテアーゼ (精製酵素) についての相対活性の温度依存性を示すグラフである。

[図4] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (精製酵素) 及び R D O O 0 9 2 0 株由来プロテアーゼ (精製酵素) についての比活性の温度依存性を示すグラフである。

[図5] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (精製酵素) 及び R D O O 0 9 2 0 株由来プロテアーゼ (精製酵素) についての相対活性の pH 依存性を示すグラフである。

[図6] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (精製酵素) 及び R D O O 0 9 2 0 株由来プロテアーゼ (精製酵素) についての比活性の pH 依存性を示すグラフである。

[図7] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (粗酵素) についての相対活性の温度依存性を示すグラフである。

[図8] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (粗酵素) についての相対活性の pH 依存性を示すグラフである。

[図9] R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ (粗酵素) についての相対活性の $C a C l_2$ 終濃度依存性を示すグラフである。

[図10] R D O O 0 9 2 0 株由来プロテアーゼ (粗酵素) についての相対活性

の温度依存性を示すグラフである。

[図11] RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）についての相対活性のpH依存性を示すグラフである。

[図12] RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）についての相対活性のCaCl₂終濃度依存性を示すグラフである。

[図13] RD001933株及びRD000920株の混合培養液から得られた粗酵素についての相対活性の温度依存性を示すグラフである。

[図14] RD001933株及びRD000920株の混合培養液から得られた粗酵素についての相対活性のpH依存性を示すグラフである。

[図15] RD001933株及びRD000920株の混合培養液から得られた粗酵素についての相対活性のCaCl₂依存性を示すグラフである。

[図16] RD001933株及びRD000920株の混合培養液から得られた粗酵素についての残存活性の経日変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0025] [プロテアーゼ]

本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) RD001933株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼである。RD001933株の菌株の帰属分類群は、16S rDNA塩基配列解析結果から、*Actinomadura miaoliensis* に近縁な *Actinomadura* sp. であると推定される。

[0026] また本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラ・マイアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) RD000920株 (NBRC国内分離RD株) を培養して得られたプロテアーゼである。RD000920株の菌株の帰属分類群は、16S rDNA塩基配列解析結果から、*Actinomadura miaoliensis* であると推定される。

[0027] また本発明に係るプロテアーゼは、放線菌のアクチノマジュラエスピー (*Actinomadura* sp.) RD001933株 (NBRC国内分離RD株) 及び放線菌のアクチノマジュラ・マイアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*)

R D 0 0 0 9 2 0 株 (N B R C 国内分離 R D 株) を混合培養して得られたプロテアーゼである。

[0028] プロテアーゼは、タンパク質に対して加水分解活性を示すものであり、精製酵素に限定されず、粗精製物、固定化物なども含む。プロテアーゼの精製は、例えば、微生物の培養液を用いて、硫酸沈澱、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等の方法を用いて行うことができる。これにより、種々の精製度の酵素（ほぼ単一までに精製された酵素を含む）が得られる。

[0029] 微生物は、野性株、変異株（例えば、紫外線照射などにより誘導されたもの）、あるいは、細胞融合もしくは遺伝子組換え法などの遺伝子工学的手法により誘導される組換え体などのいずれの株であってもよい。組換え体などの遺伝子操作された微生物は、例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版 (Sambrook, J. 編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載されているような技術を用いて容易に作成される。微生物の培養液とは、微生物菌体を含む培養液及び遠心分離などにより微生物菌体を除いた培養液の両方を意味する。さらに菌体内に含まれるプロテアーゼであってもよい。

[0030] プロテアーゼ含有洗浄剤を製造するにあたっては、特に以下に説明する R D 0 0 1 9 3 3 株由来プロテアーゼ及び R D 0 0 0 9 2 0 株由来プロテアーゼの少なくとも一方を酵素として用いることが好ましい。

[0031] プロテアーゼは、以下の (a 1) 、 (a 2) 又は (a 3) に記載のポリペプチドを含むことが好ましい。

[0032] (a 1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0033] (a 2) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1つ又は複数のアミノ酸残基が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0034] (a 3) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 6 5 % 、好ましく

は少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%の相同性を有するポリペプチド。

[0035] またプロテアーゼをコードするポリヌクレオチドは、以下の(b1)、(b2)又は(b3)に記載のポリヌクレオチドを含むことが好ましい。

[0036] (b1) 配列番号1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

[0037] (b2) 配列番号1に記載の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

[0038] (b3) 配列番号1に記載の塩基配列と少なくとも70%、好ましくは75%、より好ましくは80%の配列同一性を有するポリヌクレオチド。

[0039] 配列番号1に記載の塩基配列のポリヌクレオチドは、配列番号2に記載のポリペプチド(アミノ酸配列)をコードし得る。

[0040] プロテアーゼの酵素活性は、以下の方法で確認することができる。まず、トリス-塩酸緩衝液(pH7.5、終濃度80mM)198 μ Lに3%アゾカゼイン(終濃度0.6%)50 μ Lを混合させる。そして、酵素活性を確認する試料2 μ Lを添加し、65 $^{\circ}$ Cで5分間又は10分間反応させる。酵素反応後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させる。反応停止後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定する。酵素量1U(ユニット)は、1 μ mol相当のアゾ色素を1分間に生成する量とする。

[0041] プロテアーゼは、例えば、20~80 $^{\circ}$ Cで作用し得る。至適温度は、この範囲内にあり得る。好ましくは60~90 $^{\circ}$ Cの範囲内にあり、より好ましくは70~80 $^{\circ}$ Cの範囲内にあり、さらにより好ましくは約75 $^{\circ}$ Cである。

[0042] プロテアーゼは、例えば、pH4.0~9.5で作用し得る。至適pHは、この範囲内にあり得る。好ましくはpH7.5付近であるが、pH6.0~8.8で50%以上の活性を示す。

[0043] プロテアーゼは、電気泳動条件などにより若干変化し得るが、SDS-PAGEによる分子量が約31,000Da(31kDa)であることが好ましい。例えば、放線菌のアクチノマジュラ(Actinomadura sp.)属に属する

R D 0 0 1 9 3 3 株及び放線菌のアクチノマジユラ (Actinomadura miaolien sis) 属に属する R D 0 0 0 9 2 0 株由来の天然の酵素では、S D S - P A G E による分子量は約 3 1, 0 0 0 D a である。

[0044] プロテアーゼの一態様は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるものである。プロテアーゼは、好ましくは配列番号 2 の 1 1 1 位から 3 8 6 位までのアミノ酸配列（以下「配列番号 2 に記載内のアミノ酸配列」ともいう）を有する。配列番号 2 の 1 位から 2 6 位までのアミノ酸配列はシグナル配列であり、配列番号 2 の 2 7 位から 1 1 0 位までのアミノ酸配列はプロ配列である。

[0045] プロテアーゼは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又は配列番号 2 に記載内のアミノ酸配列に対して、1 個若しくは複数個のアミノ酸残基が、置換、欠失、挿入及び／又は付加したアミノ酸配列を有する酵素でもよい。例えば、部位特異的変異導入法 (Nucleic Acid Res., 1982 年, 10 巻, pp. 6487; Methods in Enzymol., 1983 年, 100 巻, pp. 448; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 年; PCR: A Practical Approach, IRL Press, 1991 年, pp. 200) などを用いて、適宜置換、欠失、挿入及び／又は付加変異を導入することにより、酵素 (タンパク質) の構造を改変することができる。置換、欠失、挿入及び／又は付加することができるアミノ酸残基数は、通常 50 以下、例えば 30 以下、あるいは 20 以下、好ましくは 16 以下、より好ましくは 5 以下、さらに好ましくは 0~3 である。また、人工的にアミノ酸残基を変異させた酵素のみならず、自然界においてアミノ酸残基が変異した酵素もプロテアーゼに含まれる。

[0046] 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又は配列番号 2 に記載内のアミノ酸配列に対して、相同性を有するアミノ酸配列を有する酵素もプロテアーゼに含まれる。プロテアーゼは、好ましくは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列又は

配列番号2に記載内のアミノ酸配列と、少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質である。

[0047] タンパク質の相同性の(ホモロジー)検索は、例えばSWISS-PROT、PIR、DADなどのタンパク質のアミノ酸配列に関するデータベース、DDBJ、EMBL、Gene-BankなどのDNAデータベースなどを対象に、BLAST、FASTAなどのプログラムを利用して、インターネットを通じて行うことができる。タンパク質の活性の確認は、上記に記載の手順を利用して行うことができる。

[0048] プロテアーゼの供給源は、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株(受託番号:NITE P-1467)、及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株(受託番号:NITE P-1468)から得ることができる。これらは、配列番号1に記載の塩基配列で示されるポリヌクレオチドをDNA中に有している。

[0049] 例えば、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株(受託番号:NITE P-1467)、及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株(受託番号:NITE P-1468)はいずれも、適当な栄養培地で液体培養することにより、プロテアーゼを菌体外に分泌するので、その培養上清を凍結乾燥、塩析、有機溶媒などにより処理したもの、あるいはこの処理物を固定化するなどしたものを酵素製剤として製造することができる。

[0050] さらに具体的に説明すると、まず上記の菌を適当な培地、例えば適当な炭素源、窒素源、無機塩類を含む培地中で培養し、プロテアーゼを分泌させる。このとき、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株を単独で培養してもよいし、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株を単独で培養してもよいし、これらを混合培養してもよい。

- [0051] ここで、炭素源としては、澱粉及び澱粉加水分解物、グルコース、シュークロースなどの糖類、グリセロールなどのアルコール類及び有機酸（例えば、酢酸及びクエン酸）又はその塩（例えば、ナトリウム塩）などが挙げられる。炭素源の濃度は、例えば1～20%（w/v）、好ましくは1～10%（w/v）の範囲である。
- [0052] 窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカー、大豆粉などの有機窒素源及び硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素などの無機窒素化合物が挙げられる。窒素源の濃度は、例えば1～20%（w/v）、好ましくは1～10%（w/v）の範囲である。
- [0053] 無機塩類としては、塩化ナトリウム、リン酸一カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、塩化カルシウム、硫酸第一鉄などが挙げられる。
- [0054] 培養温度は、プロテアーゼが安定であり、そして培養される微生物が十分に生育できる温度であることが好ましく、例えば、25～50℃であることが好ましい。培養時間は、プロテアーゼが十分に生産される時間であることが好ましく、例えば、1～7日間程度であることが好ましい。培養は、好ましくは好気的な条件下で、例えば、通気攪拌又は振とうしながら行うことができる。
- [0055] プロテアーゼに含まれるポリペプチドは、タンパク質の溶解度による分画（有機溶媒による沈殿や硫酸などによる塩析など）；陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー；キレート、色素、抗体などを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの方法を適当に組み合わせることにより精製することができる。例えば、上記の微生物の培養上清を回収した後、硫酸沈殿、さらに陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー及び／又は陽イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより精製することができる。これにより、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）において、ほぼ単一バンドにまで精製することができる。すなわち、プロテアーゼを構成するポリペプチドは、HPLC分析及びゲル濾過クロマトグラフィー分析により、単量体と推定することができる。

[0056] [微生物]

プロテアーゼは、微生物によって産生し得るものである。プロテアーゼについては、配列番号2に記載のアミノ酸配列情報や、配列番号1に記載の塩基配列情報から、人工的にポリペプチドを生成することができ、プロテアーゼ含有洗浄剤の製造に人工合成によって得た酵素（ポリペプチド）を用いてもよい。しかしながら、微生物により酵素を産生する場合、容易に上記の酵素を得ることができる。

[0057] 微生物としては、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株、及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura mi aoliensis*) 属に属するRD000920株を利用することができるが、上記のポリヌクレオチドが導入された微生物を用いてもよい。すなわち、その微生物とは、配列番号1に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチド、配列番号1に記載の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、配列番号1に記載の塩基配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%の配列同一性を有するポリヌクレオチドの中から選ばれる少なくとも1種のポリヌクレオチドが導入された微生物である。上記のポリヌクレオチドが導入された微生物は、ベクターを用いたり形質転換体を作製したりして得ることができる。例えば、上記のポリヌクレオチドをベクターに導入し、このベクターを大腸菌等の宿主に導入することにより、プロテアーゼを産生する能力を保有する形質転換体を作製することができる。

[0058] 形質転換体の作製のための手順及び宿主に適合した組換えベクターの構築は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる（例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989年参照）。特に放線菌に関しては、「PRACTICAL STREPTOMYCES GENETIC

S (Kieserら、John Innes Foundation、2000年)」を参照して行うことができる。

[0059] 微生物中で、上記の酵素をコードするポリヌクレオチドを発現させるためには、まず微生物中で安定に存在するプラスミドベクターやファージベクターにこのDNAを導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる。そのために、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターをDNA鎖の5'側上流に組み込むことが好ましい。また、転写・翻訳を制御するユニットにあたるターミネーターをDNA鎖の3'側下流に組み込むことが好ましい。より好ましくは、上記プロモーターとターミネーターの両方をそれぞれの部位に組み込む。このプロモーター及びターミネーターとしては、宿主として利用される微生物中において機能することが知られているプロモーター及びターミネーターが用いられる。これらの各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関しては、「微生物学基礎講座8 遺伝子工学、共立出版」、特に放線菌に関しては、「PRACTICAL STREPTOMYCES GENETICS (Kieserら、John Innes Foundation、2000年)」などに詳細に記述されており、その方法を利用することが可能である。また、必要に応じてシグナル配列を用いることで細胞外に効率的に分泌生産させることができる。

[0060] 形質転換の対象となる宿主は、上記の酵素をコードするポリヌクレオチドを含むベクターにより形質転換されて、酵素活性を発現することができる生物であれば特に制限はない。例えば、細菌、放線菌、枯草菌、大腸菌、酵母、カビなどが挙げられる。より具体的には、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属など宿主ベクター系の開発がされている細菌；ロドコッカス (*Rhodoco*

ccus) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属など宿主ベクター系の開発がされている放線菌；サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属などの宿主ベクター系の開発がされている酵母；ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などの宿主ベクター系の開発がされているカビなどが挙げられる。遺伝子組換えの操作の容易性からは大腸菌が好ましく、遺伝子の発現の容易性からは放線菌が好ましい。

[0061] また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が開発されており、例えば、蚕などの昆虫 (*Nature* 315, 592-594 (1985)) や菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種蛋白質を発現させる系が開発されており、これらを利用してもよい。

[0062] 得られた形質転換体は、上記のように酵素の製造に用いることができる。具体的には、形質転換体を適当な栄養培地で液体培養して、発現したポリペプチドを細胞外に分泌させ、その培養上清を凍結乾燥、塩析、有機溶媒などにより処理して酵素を製造することができる。

[0063] 宿主細胞に依存して培養条件は変動し得るが、培養は、通常の下で行うことができる。例えば、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属のような放線菌を宿主として用いる場合、チオストレプトンを含むトリプチックソイ培地 (例えば、ベクトン・ディッキンソン社製) を用いることができる。形質転換体により産生された酵素は、上述のようにしてさらに精製することができる。

[0064] [プロテアーゼ含有洗浄剤]

本発明に係るプロテアーゼ含有洗浄剤は、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するR D O O 1 9 3 3株、及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するR D O O 0 9 2 0株をそれぞれ単独培養又は混合培養した後、塩析（硫酸沈殿、アセトン沈殿、エタノール沈殿など）により粗酵素として得ることができる。すなわち、目的に応じて単独培養液又は混合培養液を濾紙やフィルターにより濾過して粗酵素液としてプロテアーゼ含有洗浄剤を得たり、遠心分離にかけて上澄み液（培養上清）としてプロテアーゼ含有洗浄剤を得たりすることもできる。濾過は、濁りの原因となる不純物を除去するために行う。濁りが気にならない程度であれば濾過は不要であり、遠心分離により十分に透明度のあるプロテアーゼ含有洗浄剤を得ることができる。必要に応じてさらに精製し、精製酵素として得てもよい。

[0065] 上記のようにして得られたプロテアーゼは、安全性の高い2種類の微生物（同属株）から得ることができ、いずれもタンパク質を分解する能力が強く、特に血液等のタンパク質汚れに対して高い洗浄力を有する。特にこれらのプロテアーゼを含有するプロテアーゼ含有洗浄剤は、従来のアルカリ洗浄剤では洗浄が困難であった変性固着した血液汚れを低温かつ短時間で洗浄することができる。また2種類の微生物をそれぞれ単独培養して得られるプロテアーゼ含有洗浄剤はタンパク質分解能力が強く洗浄効果が高いが、2種類の微生物を混合培養して得られるプロテアーゼ含有洗浄剤はさらにタンパク質分解能力が強く洗浄効果が高い。またこれらのプロテアーゼ含有洗浄剤は、簡便かつ安価に大量生産することができ、液状のほか粉剤化又は錠剤化することもでき、長期保存も可能である。

[0066] さらに上記のプロテアーゼは、洗浄剤以外の様々な分野に応用することも可能である。例えば、食肉加工やイカの皮むき、皮なめしなどである。

実施例

[0067] [R D O O 1 9 3 3株由来プロテアーゼの精製]

放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura* sp.) 属に属する R D O O 1 9 3 3 株を培養し、その培養上清について、硫安分画、疎水クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて R D O O 1 9 3 3 株由来プロテアーゼを精製した。以下に詳細を示す。

[0068] (a) 微生物の培養

菌体として、放線菌のアクチノマジュラ (*Actinomadura* sp.) 属に属する R D O O 1 9 3 3 株 (受託番号: N I T E P - 1 4 6 7) を使用した。

[0069] まず、I S P 2 培地 (酵母エキス 0.6%、麦芽エキス 1.4%、グルコース 0.6%) 490 mL を調製し、500 mL 容三角フラスコに 70 mL ずつ分注した。これにスプリングコイルを 1 個入れ、121°C で 20 分間蒸気殺菌を行った。さらに別滅菌した 2.5% スキムミルク 30 mL を添加して終濃度を 0.75% とした。

[0070] そして、グリセロールストックの菌体を 50 μ L とり、I S P 2 培地 5 mL を入れた ϕ 18 試験管 (18 \times 180 mm) に植菌し、45°C で良好な生育が得られるまで振とう培養した。この培養液を先の滅菌した培地 100 mL に 1 mL ずつ植菌し、45°C で 96 時間程度振とう培養した。遠心分離機を用いて、この培養液から上清を回収した。

[0071] (b) アセトン分画 (アセトン沈殿)

上記 (a) で回収した培養上清に、60% (v/v) 以上となるようにアセトンを添加し、生じた沈殿を遠心分離 (10,000 rpm、10分、4°C) により回収した。この沈殿を、終濃度 1 M の硫酸アンモニウムを含む 20 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.0) 15 mL で溶解し、粗酵素液を得た。

[0072] (c) T o y o p e a r l P h e n y l - 6 5 0 M カラムクロマトグラフィー

上記 (b) で得られた粗酵素液を、1 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 8.0) であらかじめ平衡化した T o y o p e

ar l Phenyl-650Mカラム（内径26mm、高さ38mm、東ソー株式会社製）にアプライした。同緩衝液でカラムを洗浄した後、硫酸アンモニウム（1Mから0Mまで）のリニアグラジェントにより、タンパク質を溶出させた。

[0073] (d) HiTrap Q HPカラムクロマトグラフィー

上記(c)で得られた活性画分を集め、20mM トリス-塩酸緩衝液（pH9.0）を用いて透析を行うことによって脱塩した。20mM トリス-塩酸緩衝液（pH9.0）であらかじめ平衡化したHiTrap Q HP（5mL）カラム（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）にアプライし、同緩衝液でカラムを洗浄した後、塩化ナトリウム（0Mから1Mまで）のリニアグラジェントにより、タンパク質を溶出させた。

[0074] (e) HiTrap SP HPカラムクロマトグラフィー

上記(d)で得られた活性画分を集め、20mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液（pH5.5）を用いて透析を行うことによって脱塩した。これを20mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液（pH5.5）であらかじめ平衡化したHiTrap SP（1mL）カラム（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製）にアプライし、同緩衝液でカラムを洗浄した後、塩化ナトリウム（0Mから1Mまで）のリニアグラジェントにより、タンパク質を溶出させた。

[0075] 以上のようにして、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株より、精製酵素を得た。なお、精製酵素が単一であることは、以下の(f) SDS-PAGEによる分析で確認した。

[0076] (f) SDS-PAGE

上記(e)で溶出した活性画分を集めてSDS-PAGE（12%（w/v）ポリアクリルアミドゲル）により分子量を解析した。図1は、この溶出画分のSDS-PAGEによる解析の結果を示す電気泳動写真である。図1の左側のレーンは、タンパク質分子量マーカー（M）であり、図1の右側のレーンは、(e)で得られた精製酵素（RD001933株由来プロテアー

ぜ) のバンドを示す。図 1 に示すように、活性画分において、単一のバンドが観察され、精製酵素 (ポリペプチド) の分子量は約 31,000 であった。なお、分子量の単位は Da (ダルトン) である。よって、kDa 表記では、この酵素の分子量は約 31 kDa となる。

[0077] 表 1 に RD001933 株由来プロテアーゼ精製における収量、収率等を示す。

[0078] [表1]

RD001933

	Total Volume (ml)	Activity (U/ml)	Total Activity (U)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
培養上清	580.0	1.05	608.62	-	-	-	-	100
アセトン沈殿	15.0	30.98	464.64	7.87	118.09	3.93	1.0	76
TOYOPEARL Phenyl-650M	18.0	12.51	225.20	1.82	32.79	6.87	1.7	37
HiTrapQ HP (5ml)	8.0	3.63	29.06	0.50	3.97	7.32	1.9	5
HiTrapSP HP (1ml)	1.0	20.16	20.16	1.17	1.17	17.29	2.5	4

[0079] なお、RD001933 株由来プロテアーゼの酵素活性は、次のようにして測定した。まず表 2 に示す反応液を 65℃、pH7.5 で 5 分間静置して反応させた後、20% トリクロロ酢酸を 50 μ L 加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の 340 nm の吸光度を測定した。酵素量 1 U (ユニット) は、1 μ mol 相当のアゾ色素を 1 分間に生成する量とした。

[0080] [表2]

酵素反応液組成

Tris-HCl, pH7.5 (終濃度 80mM)	198 μ l
3% アゾカゼイン (終濃度0.6%)	50 μ l
酵素液	2 μ l
	total 250 μ l

[0081] [RD001933 株由来プロテアーゼの性質]

RD001933 株由来プロテアーゼ (精製酵素) の酵素学的性質について検討した。

[0082] (1) 作用温度

表2に示す反応液を各温度、pH 7.5で5分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0083] 図3は、種々の反応温度での酵素活性を、反応温度が75 $^{\circ}$ Cである場合の活性を基準(100%)とする相対活性として示したグラフである。図3のグラフに示されるように、RD001933株由来プロテアーゼ(精製酵素)は、50~90 $^{\circ}$ Cで活性を発揮し、そして反応の至適温度は60~80 $^{\circ}$ Cの範囲内であり、好ましくは70~75 $^{\circ}$ C付近であった。なお、図4は、種々の反応温度での比活性を示すグラフである。

[0084] (2) 作用pH

表3に示す反応液を各pH、75 $^{\circ}$ Cで5分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0085] 使用した緩衝液は次のとおりである。

[0086] MES-水酸化ナトリウム緩衝液：pH 5.5、pH 6

Bis-Tris緩衝液：pH 6、pH 6.5、pH 7.2

Tris-HCl緩衝液：pH 7.2、pH 8、pH 8.8

Glycine-NaOH緩衝液：pH 9、pH 9.5

[0087] [表3]

酵素反応液組成

各緩衝液 各pH (終濃度 80mM)	198 μ l
3% アゾカゼイン (終濃度0.6%)	50 μ l
酵素液	2 μ l
total 250 μ l	

[0088] 図5は、種々の反応pHでの酵素活性を、反応pHが7.2である場合の酵素活性を基準(100%)とする相対活性として示したグラフである。図5のグラフから分かるように、RD001933株由来プロテアーゼ(精製

酵素)は、pH 5.5～9.0という広い範囲で活性を発揮し、そして、反応の至適pHは7.2付近(例えばpH 6.0～8.8)であった。なお、図6は、種々の反応pHでの比活性を示すグラフである。

[0089] (3) 添加試薬の影響

まず添加試薬を加えた酵素液を30分間、室温でインキュベートした後、表4に示す反応液(ただし、添加試薬、酵素液を除く)を加えて75℃、pH 7.5で5分間静置して反応させた。その後、20%トリクロロ酢酸を50μL加えて反応を停止させた。そして、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0090] 使用した添加試薬は、EDTA、PMSF(フッ化フェニルメチルスルホニル)(終濃度5mM)、ZnCl₂、MnCl₂、CaCl₂、CuCl₂、CoCl₂、MgCl₂(終濃度1mM)である。

[0091] [表4]

酵素反応液組成	
Tris-HCl, pH7.5 (終濃度 80mM)	193 μl
3% アゾカゼイン (終濃度0.6%)	50 μl
各添加試薬 (終濃度 1mM)	5 μl
酵素液	2 μl
total 250 μl	

[0092] 表5は、添加試薬を添加した場合の酵素活性を、添加試薬を添加していない場合の活性を基準(100%)とする相対活性として示したものである。RD001933株由来プロテアーゼ(精製酵素)は、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺の存在下では、60%程度の活性を示した。また、EDTA、PMSFの存在下では、活性が大きく低下し、活性阻害が見られた。

[0093]

[表5]

RD001933 Purified enzyme	
添加試薬	相対活性(%)
無し	100
5mM EDTA	2.2
5mM PMSF	0.7
1mM Zn ²⁺	59.7
1mM Mn ²⁺	60.4
1mM Ca ²⁺	58.9
1mM Cu ²⁺	61.1
1mM Co ²⁺	56.3
1mM Mg ²⁺	57.8

[0094] [RD001933株由来プロテアーゼ（精製酵素）のN末端アミノ酸配列の解析]

上記の精製酵素について、SDS-PAGE後、エレクトロブロッティングを行い、目的とする酵素をPVDF（ポリフッ化ビニリデン）膜に転写した。これをプロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列の解析を行った。解析から、この精製酵素のN末端アミノ酸配列は、配列番号3に示すものであることが確認された。

[0095] [RD001933株由来プロテアーゼ（精製酵素）の内部アミノ酸配列の解析]

上記の精製酵素について、SDS-PAGE後、目的とする酵素を切り出し、トリプシンを用いてゲル内消化を行った。そして、得られたペプチドサンプルについて質量分析計（nanoLC-MS/MS）により内部アミノ酸配列の解析を行った。これにより、内部アミノ酸配列は、配列番号4、5、6、7に示すものであることが確認された。

[0096] ここで、配列番号4は、配列番号2の277位から示される配列となっている。また、配列番号5は、配列番号2の331位から示される配列となっている。また、配列番号6は、配列番号2の348位から示される配列となっている。また、配列番号7は、配列番号2の364位から示され

る配列となっている。なお、nano LC-MS/MSによるデノボアミノ酸配列解析ではLeuとIleとが判別できないため、これらのアミノ酸が一部一致していない箇所があり得る。

[0097] [RD001933株の染色体DNAの分離]

RD001933株をISP2培地（酵母エキス0.6%、麦芽エキス1.4%、グルコース0.6%）50mLを用いて45℃で3日間培養し、集菌した。

[0098] 次に、この菌体を75mM NaCl、25mM EDTA、20mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）及び1mg/mLリゾチームからなる溶液2.5mLに懸濁し、37℃で1時間処理した。これに10%（w/v）SDSを900μL、proteinase Kを3.75mg添加し、55℃で2時間処理した。この溶液に5M NaCl 2mLとクロロホルム5mLを加えて攪拌し、遠心分離により水相を5mL分取した。

[0099] この水相に3mLのイソプロパノールを添加混合してDNA画分を回収し、70%エタノール1mLでリンスした後、遠心分離を行った。この沈殿を回収し、減圧乾燥した後、10mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）及び1mM EDTAからなる溶液500μLに溶解し55℃で一晩放置した。これにRNase Aを0.1mg/mLとなるように加え、37℃で20分間処理した後、0.8MのNaClを含む13%PEG溶液を500μL加え攪拌し、4℃、1時間静置後、遠心分離により沈殿を回収した。この沈殿を1mMEDTAを含む10mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）500μLで溶解した。これにフェノール/クロロホルム混合液500μLを加えて攪拌し、遠心分離により、水相を500μL分取した。

[0100] この水相に3M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.2）50μL及び100%エタノール1mLを添加混合し、RD001933株の染色体DNAを回収した。

[0101] このDNAを70%（v/v）エタノールでリンスした後、遠心分離を行って沈殿を回収した。回収した沈殿を減圧乾燥した後、10mM トリス-

塩酸緩衝液（pH 8.0）及び1 mM EDTAからなる溶液200 μ Lに溶解した。

[0102] [RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子のコア領域のクローニング]

アクチノマジュラ由来プロテアーゼに高く保存されているN末端及び内部配列をもとにプライマーを設計した。

[0103] プライマー（primer）の作製にあたっては、上記のN末端配列（配列番号3）及び上記の2つの内部アミノ酸配列（配列番号4及び配列番号5）をピックアップした。プライマー設計にあたっては、これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列中の適宜の配列を利用した。

[0104] N末端アミノ酸配列情報を「Sense primer」とし、内部アミノ酸配列情報を「Antisense primer」とした。縮重コドンに関しては、アクチノマジュラ属におけるコドン使用頻度が高いコドンを選択し、プライマー設計を行った。また、コドン使用頻度が同等のものに関しては、混合塩基プライマーとした。また、質量分析では分別が難しいLeuとIleを除外した。これにより、センスプライマー（Sense primer）として、PCR用の縮重オリゴヌクレオチドプライマーS1（配列番号8）を設計した。また、2種のアンチセンスプライマー（Antisense primer）として、配列番号4から設計した「primer A1-1」（配列番号9）と、配列番号5から設計した「primer A1-2」（配列番号10）とを設計した。ここで、配列中のsはc又はgを表し、wはa又はtを表している。

[0105] 次に上記のプライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応液組成は次のとおりである。

[0106] 上記[RD001933株の染色体DNAの分離]で得た鋳型染色体DNA 100 ng、2×Might Amp Buffer 25 μ L、プライマー各300 nM、及びMight Amp DNA Polymerase 0.5ユニットに、滅菌水を全量50 μ Lとなるように添加した。

[0107] PCR反応条件は次のとおりである。

- [0108] ステップ1 : 98℃、2分 ;
ステップ2 : 98℃、10秒 ;
ステップ3 : 80℃、15秒 ;
ステップ4 : 68℃、1分 ;
ステップ2からステップ4を30サイクル繰り返す ;
ステップ5 : 68℃、2分。
- [0109] 上記のプライマーを用いたPCRによって、約700bpの特異的な増幅産物を得た。
- [0110] このPCR反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、目的の約700bpのバンド部分を切り出し、Mighty TA-cloning Kit (Takara) を用いて、pMD20-T Vectorに結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換株をアンピシリン50 μ g/mLを含むLB培地(トリプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.5)で培養し、Miniprep法(ミニプレップ法)又はHigh Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) を用いてDNAシーケンス用のプラスミドを抽出・精製した。
- [0111] 続いて、ベクター(pMD20-T Vector)に由来するT7プライマー及びSP6プライマーを用いて自動シーケンサーによって、挿入断片の塩基配列を決定した。この塩基配列(692bp)を、配列番号11に示す。
- [0112] [RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子のコア領域の上流側及び下流側のクローニング]
上記[RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子のコア領域のクローニング]で決定した遺伝子配列の周辺領域の配列を明らかにするために、上記で得た染色体DNAをPstI又はSmaIで完全消化し、Ligation high Ver. 2 (Toyobo社製)を用いて消化断片を自己閉環させた。これを鋳型にして、RD001933株由来プロテアーゼの部分遺伝子配列に基づいて作製した2つのインバースPCRプライマー(配列番

号12及び配列番号13)を用いて、PCRを行うことでRD001933株由来プロテアーゼの上流側又は下流側におけるDNA断片を増幅した。

[0113] PCRの反応液組成は次のとおりである。

[0114] 鋳型DNA 25 ng、2×Might Amp Buffer 25 μL、プライマー各300 nM、及びMight Amp DNA Polymerase 0.5ユニットに、滅菌水を全量50 μLとなるように添加した。

[0115] PCR反応条件は次のとおりである。

[0116] ステップ1：98℃、2分；
ステップ2：98℃、10秒；
ステップ3：62℃、15秒；
ステップ4：68℃、3分；
ステップ2からステップ4を25サイクル繰り返す；
ステップ5：68℃、3分。

[0117] 上記のプライマーを用いたPCRによって、約3000 bpの特異的な増幅産物を得た。

[0118] このPCR反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、目的の約3000 bpのバンド部分を切り出し、Mighty TA-cloning Kit (Takara)を用いて、pMD20-T Vectorに結合させ、大腸菌を形質転換した。形質転換株をアンピシリン50 μg/mLを含むLB培地(トリプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.5)で培養し、Miniprep法(ミニプレップ法)又はHigh Pure Plasmid Isolation Kit (Roche)を用いてDNAシーケンス用のプラスミドを抽出・精製した。

[0119] 続いて、ベクター(pMD20-T Vector)に由来するSP6プライマー及びM13M4プライマーを用いて自動シーケンサーによって、挿入断片の塩基配列を決定した。このシーケンスによって、N末端側(上流側)の塩基配列として、配列番号14に示す塩基配列(330 bp)が得られた。この配列は、N末端側からシグナル配列(78 bp)及びプロ配列(

252bp)である。また、C末端側(下流側)の塩基配列として、配列番号15に示す塩基配列(139bp)が得られた。

[0120] [RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子の塩基配列の決定]

上記で決定した塩基配列に基づいて、RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子を含む領域の塩基配列(1161bp)を決定した(配列番号1)。配列番号2は、この配列(配列番号1)のコドンに対応するアミノ酸配列である。

[0121] 配列解析の結果から、RD001933株由来プロテアーゼをコードする遺伝子は1161bpのヌクレオチドからなり、386残基のアミノ酸をコードしていることが明らかとなった。

[0122] 上記にて決定したRD001933株由来プロテアーゼ(精製酵素)のN末端及び内部アミノ酸配列が、上記の推定アミノ酸配列中に存在し、ほぼ完全に一致していた。

[0123] [RD001933株由来プロテアーゼ(粗酵素)]

放線菌のアクチノマジユラ(*Actinomadura* sp.)属に属するRD001933株を培養し、その培養上清から3種の沈殿方法により、粗酵素液を得た。以下に詳細を示す。

[0124] (a) 微生物の培養

菌体として、放線菌のアクチノマジユラ(*Actinomadura* sp.)属に属するRD001933株(受託番号:NITE P-1467)を使用した。

[0125] まず、ISP2培地(酵母エキス0.6%、麦芽エキス1.4%、グルコース0.6%)700mLを調製し、500mL容三角フラスコに70mLずつ分注した。これにスプリングコイルを1個入れ、121℃で20分間蒸気殺菌を行った。さらに別滅菌した2.5%スキムミルク30mLを添加して終濃度を0.75%とした。

[0126] そして、グリセロールストックの菌体を50μLとり、ISP2培地5mLを入れたφ18試験管(18×180mm)に植菌し、45℃で良好な生育が得られるまで振とう培養した。この培養液を先の滅菌した培地100m

Lに1 mLずつ植菌し、45℃で96時間程度振とう培養した。遠心分離機を用いて、この培養液から上清を回収した。

[0127] (b1) アセトン沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% (v/v) となるように-20℃アセトンを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000 rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 9.0) 30 mLで溶解し、粗酵素液を得た。表6に酵素の回収率を示す。

[0128] (b2) エタノール沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% (v/v) となるように-20℃エタノールを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000 rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0) 30 mLで溶解し、粗酵素液を得た。表6に酵素の回収率を示す。

[0129] (b3) 硫安沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80%飽和量となるように硫酸アンモニウム粉末を添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000 rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 9.0) 30 mLで溶解し、粗酵素液を得た。表6に酵素の回収率を示す。

[0130] [表6]

RD001933

アセトン、エタノール(vol.%) 又は 硫安の飽和濃度(%)	酵素の回収率(%)		
	アセトン沈殿	エタノール沈殿	硫安沈殿
40	88	104	106
50	100	109	105
60	95	113	111
70	101	112	109
80	102	119	111

[0131] このように、酵素を濃縮回収する場合には3種の沈殿方法を適宜利用することができる。

[0132] 次に、RD001933株由来プロテアーゼ（粗酵素液）の酵素学的性質について検討した。

[0133] （1）作用温度

表2に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各温度、pH7.5で10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0134] 図7は、種々の反応温度での酵素活性を、反応温度が80 $^{\circ}$ Cである場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図7のグラフに示されるように、RD001933株由来プロテアーゼ（粗酵素液）は、50~95 $^{\circ}$ Cで活性を発揮し、そして反応の至適温度は70~85 $^{\circ}$ Cの範囲内であり、好ましくは75~85 $^{\circ}$ C付近であった。

[0135] （2）作用pH

表3に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各pH、65 $^{\circ}$ Cで10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0136] 使用した緩衝液は次のとおりである。

[0137] 酢酸-酢酸Na緩衝液：pH5

Bis-Tris緩衝液：pH6

Tris-HCl緩衝液：pH7.2、pH8

Glycine-NaOH緩衝液：pH9

図8は、種々の反応pHでの酵素活性を、反応pHが8.0である場合の酵素活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図8のグラフから分かるように、RD001933株由来プロテアーゼ（粗酵素液）は、pH5.0~9.0という広い範囲で活性を発揮し、そして、反

応の至適 pH は 7.5 付近（例えば pH 7.0 ~ 8.0）であった。

[0138] (3) 添加試薬の影響

表 4 に示す反応液（酵素液は 80% エタノール沈殿により得たもの）を 65°C、pH 7.5 で 10 分間静置して反応させた。その後、20% トリクロロ酢酸を 50 μ L 加えて反応を停止させた。そして、反応液を遠心分離して上清の 340 nm の吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0139] 使用した添加試薬は、CaCl₂、NaCl、KCl、MgCl₂、MnCl₂、FeCl₂、FeCl₃、CuCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、EDTA である。

[0140] 表 7 は、添加試薬を添加した場合の酵素活性を、添加試薬を添加していない場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したものである。

[0141] [表7]

RD001933 Crude enzyme	
添加試薬	相対活性(%)
無し	100
1mM Ca ²⁺	110
1mM Na ⁺	102
1mM K ⁺	117
1mM Mg ²⁺	116
1mM Mn ²⁺	89
1mM Fe ²⁺	82
1mM Fe ³⁺	85
1mM Cu ²⁺	70
1mM Zn ²⁺	75
1mM Co ²⁺	70
5mM EDTA	87

[0142] (4) CaCl₂ 濃度の依存性

表 8 に示す反応液（酵素液は 80% エタノール沈殿により得たもの）を 65°C で 10 分間静置して反応させた後、20% トリクロロ酢酸を 50 μ L 加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の 340 nm の吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0143] [表8]

酵素反応液組成

	CaCl ₂ 終濃度[mM]					
	0	0.5	1	2	5	10
水道水(μl)	198	195.5	193	188	173	148
3% アゾカゼイン(μl)	50	50	50	50	50	50
50mM CaCl ₂ (μl)	0	2.5	5	10	25	50
酵素液(μl)	2	2	2	2	2	2

[0144] 図9は、種々のCaCl₂終濃度での酵素活性を、CaCl₂終濃度が0.5mMである場合の活性を基準(100%)とする相対活性として示したグラフである。

[0145] [RD000920株由来プロテアーゼの精製]

放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株を培養し、その培養上清について、硫酸分画、疎水クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてRD000920株由来プロテアーゼを精製した。以下に詳細を示す。

[0146] (a) 微生物の培養

菌体として、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株(受託番号: NITE P-1468)を使用した。

[0147] まず、ISP2培地(酵母エキス0.6%、麦芽エキス1.4%、グルコース0.6%)560mLを調製し、500mL容三角フラスコに70mLずつ分注した。これにスプリングコイルを1個入れ、121℃で20分間蒸気殺菌を行った。さらに別滅菌した2.5%スキムミルク30mLを添加して終濃度を0.75%とした。

[0148] そして、グリセロールストックの菌体を50μLとり、ISP2培地5mLを入れたφ18試験管(18×180mm)に植菌し、45℃で良好な生育が得られるまで振とう培養した。この培養液を先の滅菌した培地100m

Lに1 mLずつ植菌し、45°Cで96時間程度振とう培養した。遠心分離機を用いて、この培養液から上清を回収した。

[0149] (b) アセトン分画 (アセトン沈殿)

上記(a)で回収した培養上清に、60% (v/v) 以上となるように-20°Cアセトンを添加し、生じた沈殿を遠心分離(10,000 rpm、10分、4°C)により回収した。この沈殿を、終濃度1Mの硫酸アンモニウムを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)15mLで溶解し、粗酵素液を得た。

[0150] (c) Toyopearl Phenyl-650Mカラムクロマトグラフィー

上記(b)で得られた粗酵素液を、1Mの硫酸アンモニウムを含む20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)であらかじめ平衡化したToyopearl Phenyl-650Mカラム(内径26mm、高さ38mm、東ソー株式会社製)にアプライした。同緩衝液でカラムを洗浄した後、硫酸アンモニウム(1Mから0Mまで)のリニアグラジェントにより、タンパク質を溶出させた。

[0151] (d) HiTrap Q HPカラムクロマトグラフィー

上記(c)で得られた活性画分を集め、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を用いて透析を行うことによって脱塩した。これに、20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)を加えた。20mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.0)であらかじめ平衡化したHiTrap Q HP(5mL)カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)にアプライし、同緩衝液でカラムを洗浄した後、塩化ナトリウム(0Mから1Mまで)のリニアグラジェントにより、タンパク質を溶出させた。

[0152] (e) HiTrap SP HPカラムクロマトグラフィー

上記(d)で得られた活性画分を集め、20mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5)を用いて透析を行うことによって脱塩した。これに20mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5)を加えた。こ

れを20mM MES-水酸化ナトリウム緩衝液(pH5.5)であらかじめ平衡化したHiTrap SP(1mL)カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)にアプライし、同緩衝液でカラムを洗浄した後、塩化ナトリウム(0Mから1Mまで)のリニアグラジエントにより、タンパク質を溶出させた。

[0153] 以上のようにして、放線菌のアクチノマジュラ(*Actinomadura miaoliensis*)属に属するRD000920株より、精製酵素を得た。なお、精製酵素が単一であることは、以下の(f)SDS-PAGEによる分析で確認した。

[0154] (f) SDS-PAGE

上記(e)で溶出した活性画分を集めてSDS-PAGE(15%(w/v)ポリアクリルアミドゲル)により分子量を解析した。図2は、この溶出画分のSDS-PAGEによる解析の結果を示す電気泳動写真である。図2の左側のレーンは、タンパク質分子量マーカー(M)であり、図2の右側のレーンは、(e)で得られた精製酵素(RD000920株由来プロテアーゼ)のバンドを示す。図2に示すように、活性画分において、単一のバンドが観察され、精製酵素(ポリペプチド)の分子量は約31,000であった。なお、分子量の単位はDa(ダルトン)である。よって、kDa表記では、この酵素の分子量は約31kDaとなる。

[0155] 表9にRD000920株由来プロテアーゼ精製における収量、収率等を示す。

[0156] [表9]

RD000920								
	Total Volume (ml)	Activity (U/ml)	Total Activity (U)	Protein (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
培養上清	680.0	2.12	1440.83					100
アセトン沈殿	20.0	25.43	508.53	5.10	101.98	4.99	1.0	35
TOYOPEARL Phenyl-650M	11.0	11.56	127.19	1.77	19.46	6.54	1.3	9
HiTrapQ HP (5ml)	25.0	1.98	49.44	0.10	2.50	19.75	4.0	3
HiTrapSP HP (1ml)	1.0	4.90	4.90	0.36	0.36	13.51	2.7	0.3

[0157] なお、RD000920株由来プロテアーゼの酵素活性は、RD0019

3株由来プロテアーゼの酵素活性と同様にして測定した。

[0158] [RD000920株由来プロテアーゼの性質]

RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）の酵素学的性質について検討した。

[0159] (1) 作用温度

表2に示す反応液を各温度、pH7.5で10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0160] 図3は、種々の反応温度での酵素活性を、反応温度が75 $^{\circ}$ Cである場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図3のグラフに示されるように、RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）は、50 \sim 90 $^{\circ}$ Cで活性を発揮し、そして反応の至適温度は60 \sim 80 $^{\circ}$ Cの範囲内であり、好ましくは70 \sim 75 $^{\circ}$ C付近であった。なお、図4は、種々の反応温度での比活性を示すグラフである。

[0161] (2) 作用pH

表3に示す反応液を各pH、65 $^{\circ}$ Cで10分間攪拌して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0162] 使用した緩衝液は次のとおりである。

[0163] MES-水酸化ナトリウム緩衝液：pH5.5、pH6

Bis-Tris緩衝液：pH6、pH6.5、pH7.2

Tris-HCl緩衝液：pH7.2、pH8、pH8.8

Glycine-NaOH緩衝液：pH9、pH9.5

図5は、種々の反応pHでの酵素活性を、反応pHが7.2である場合の酵素活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図5のグラフから分かるように、RD000920株由来プロテアーゼ（精製

酵素)は、pH 5.5～9.0という広い範囲で活性を発揮し、そして、反応の至適pHは7.2付近(例えばpH 6.0～8.8)であった。なお、図6は、種々の反応pHでの比活性を示すグラフである。

[0164] (3) 添加試薬の影響

まず添加試薬を加えた酵素液を30分間、室温でインキュベートした後、表4に示す反応液(ただし、添加試薬、酵素液を除く)を加えて75℃、pH 7.5で5分間静置して反応させた。その後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。そして、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0165] 使用した添加試薬は、EDTA、PMSF(フッ化フェニルメチルスルホニル)(終濃度5mM)、ZnCl₂、MnCl₂、CaCl₂、CuCl₂、CoCl₂、MgCl₂(終濃度1mM)である。

[0166] 表10は、添加試薬を添加した場合の酵素活性を、添加試薬を添加していない場合の活性を基準(100%)とする相対活性として示したものである。RD000920株由来プロテアーゼ(精製酵素)は、Zn²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Mg²⁺の存在下では、60%程度の活性を示した。また、EDTA、PMSFの存在下では、活性が大きく低下し、活性阻害が見られた。

[0167] [表10]

RD000920 Purified enzyme	
添加試薬	相対活性(%)
無し	100
5mM EDTA	4.8
5mM PMSF	1.3
1mM Zn ²⁺	62.2
1mM Mn ²⁺	57.8
1mM Ca ²⁺	57.8
1mM Cu ²⁺	57.7
1mM Co ²⁺	64.3
1mM Mg ²⁺	57.8

[0168] [RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）のアミノ酸配列の解析]

RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）のアミノ酸配列の解析をRD001933株由来プロテアーゼ（精製酵素）の場合と同様に行った。その結果、RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）のアミノ酸配列は、RD001933株由来プロテアーゼ（精製酵素）のアミノ酸配列とほぼ100%一致したので、両方の酵素は同一のアミノ酸配列からなるものと考えられる。また、RD000920株由来プロテアーゼ遺伝子の塩基配列も、RD001933株由来プロテアーゼ遺伝子の塩基配列とほぼ100%一致したので、両方の遺伝子は同一の塩基配列からなるものと考えられる。

[0169] しかし、図3～図6に示すように、両方の酵素は、作用温度及び作用pH等の酵素学的性質にわずかな違いが見られた。

[0170] [RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）]

放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株を培養し、その培養上清から3種の沈殿方法により、粗酵素液を得た。以下に詳細を示す。

[0171] (a) 微生物の培養

菌体として、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株（受託番号：NITE P-1468）を使用した。

[0172] まず、ISP2培地（酵母エキス0.6%、麦芽エキス1.4%、グルコース0.6%）700mLを調製し、500mL容三角フラスコに70mLずつ分注した。これにスプリングコイルを1個入れ、121℃で20分間蒸気殺菌を行った。さらに別滅菌した2.5%スキムミルク30mLを添加して終濃度を0.75%とした。

[0173] そして、グリセロールストックの菌体を50μLとり、ISP2培地5mLを入れたφ18試験管（18×180mm）に植菌し、45℃で良好な生

育が得られるまで振とう培養した。この培養液を先の滅菌した培地 100 mL に 1 mL ずつ植菌し、45°C で 96 時間程度振とう培養した。遠心分離機を用いて、この培養液から上清を回収した。

[0174] (b1) アセトン沈殿

上記 (a) で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% (v/v) となるように -20°C アセトンを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離 (10,000 rpm、10分、4°C) により回収した。この沈殿を 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 30 mL で溶解し、粗酵素液を得た。表 11 に酵素の回収率を示す。

[0175] (b2) エタノール沈殿

上記 (a) で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% (v/v) となるように -20°C エタノールを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離 (10,000 rpm、10分、4°C) により回収した。この沈殿を 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 30 mL で溶解し、粗酵素液を得た。表 11 に酵素の回収率を示す。

[0176] (b3) 硫安沈殿

上記 (a) で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% 飽和量となるように硫酸アンモニウム粉末を添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離 (10,000 rpm、10分、4°C) により回収した。この沈殿を 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 30 mL で溶解し、粗酵素液を得た。表 11 に酵素の回収率を示す。

[0177] [表11]

RD000920

アセトン、エタノール (vol.%) 又は 硫安の飽和濃度 (%)	酵素の回収率 (%)		
	アセトン沈殿	エタノール沈殿	硫安沈殿
40	92	94	105
50	90	90	104
60	90	96	110
70	86	90	107
80	95	101	101

[0178] このように、酵素を濃縮回収する場合には3種の沈殿方法を適宜利用することができる。

[0179] 次に、RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素液）の酵素学的性質について検討した。

[0180] （1）作用温度

表2に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各温度、pH7.5で10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0181] 図10は、種々の反応温度での酵素活性を、反応温度が70 $^{\circ}$ Cである場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図10のグラフに示されるように、RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素液）は、50 \sim 85 $^{\circ}$ Cで活性を発揮し、そして反応の至適温度は65 \sim 80 $^{\circ}$ Cの範囲内であり、好ましくは70 \sim 80 $^{\circ}$ C付近であった。

[0182] （2）作用pH

表3に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各pH、65 $^{\circ}$ Cで10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0183] 使用した緩衝液は次のとおりである。

[0184] 酢酸-酢酸Na緩衝液：pH5

Bis-Tris緩衝液：pH6

Tris-HCl緩衝液：pH7.2、pH8

Glycine-NaOH緩衝液：pH9

図11は、種々の反応pHでの酵素活性を、反応pHが8.0である場合の酵素活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図11のグラフから分かるように、RD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素液）は、pH5.0 \sim 9.0という広い範囲で活性を発揮し、そして

、反応の至適 pH は 7.5 付近（例えば pH 7.0 ~ 8.0）であった。

[0185] (3) 添加試薬の影響

表 4 に示す反応液（酵素液は 80% エタノール沈殿により得たもの）を 65°C、pH 7.5 で 10 分間静置して反応させた。その後、20% トリクロロ酢酸を 50 μ L 加えて反応を停止させた。そして、反応液を遠心分離して上清の 340 nm の吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0186] 使用した添加試薬は、CaCl₂、NaCl、KCl、MgCl₂、MnCl₂、FeCl₂、FeCl₃、CuCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、EDTA である。

[0187] 表 12 は、添加試薬を添加した場合の酵素活性を、添加試薬を添加していない場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したものである。

[0188] [表12]

RD000920 Crude enzyme	
添加試薬	相対活性(%)
無し	100
1mM Ca ²⁺	106
1mM Na ⁺	99
1mM K ⁺	97
1mM Mg ²⁺	95
1mM Mn ²⁺	84
1mM Fe ²⁺	83
1mM Fe ³⁺	88
1mM Cu ²⁺	78
1mM Zn ²⁺	66
1mM Co ²⁺	68
5mM EDTA	68

[0189] (4) CaCl₂ 濃度の依存性

表 8 に示す反応液（酵素液は 80% エタノール沈殿により得たもの）を 65°C で 10 分間静置して反応させた後、20% トリクロロ酢酸を 50 μ L 加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の 340 nm の

吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0190] 図12は、種々のCaCl₂終濃度での酵素活性を、CaCl₂終濃度が0.5mMである場合の活性を基準(100%)とする相対活性として示したグラフである。

[0191] [RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ(粗酵素)]

放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株を混合培養し、その培養上清から3種の沈殿方法により、粗酵素液を得た。以下に詳細を示す。

[0192] (a) 微生物の培養

菌体として、放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura* sp.) 属に属するRD001933株(受託番号:NITE P-1467)及び放線菌のアクチノマジユラ (*Actinomadura miaoliensis*) 属に属するRD000920株(受託番号:NITE P-1468)を使用した。

[0193] まず、ISP2培地(酵母エキス0.6%、麦芽エキス1.4%、グルコース0.6%)4.2Lを調製し、10L容卓上型培養装置(丸菱バイオエンジニア製)に入れ、121℃で20分間蒸気殺菌を行った。さらに別滅菌した2.5%スキムミルク1.8Lを添加して終濃度を0.75%とした。

[0194] そして、グリセロールストックの菌体2種類を500μLとり、ISP2培地50mLを入れた500mL容三角フラスコにそれぞれ植菌し、45℃で良好な生育が得られるまで振とう培養した。先の滅菌した培地6Lにこの2種類の培養液を30mLずつ植菌し、45℃、500rpm、1vvmで1~7日間、好ましくは1~3日間培養した。培養開始時において2種類の培養液の比率は1:1であることが好ましいが、別段の定めはない。遠心分離機を用いて、この培養液から上清を回収した。

[0195] (b1) アセトン沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、8

0% (v/v) となるように-20℃アセトンを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50mLで溶解し、粗酵素液を得た。表13に酵素の回収率を示す。

[0196] (b2) エタノール沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80% (v/v) となるようにエタノールを添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50mLで溶解し、粗酵素液を得た。表13に酵素の回収率を示す。

[0197] (b3) 硫酸沈殿

上記(a)で回収した培養上清に、40%、50%、60%、70%、80%飽和量となるように硫酸アンモニウム粉末を添加し、各濃度で生じた沈殿を遠心分離(10,000rpm、10分、4℃)により回収した。この沈殿を20mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)50mLで溶解し、粗酵素液を得た。表13に酵素の回収率を示す。

[0198] [表13]

RD001933+RD000920

アセトン、エタノール(vol.%) 又は 硫酸の飽和濃度(%)	酵素の回収率(%)		
	アセトン沈殿	エタノール沈殿	硫酸沈殿
40	0	13	9
50	0	30	60
60	57	76	59
70	47	96	38
80	39	100	53

[0199] このように、酵素を濃縮回収する場合には3種の沈殿方法を適宜利用することができる。

[0200] 次に、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ(粗酵素)の酵素学的性質について検討した。

[0201] (1) 作用温度

表2に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各温度、pH7.5で10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0202] 図13は、種々の反応温度での酵素活性を、反応温度が70°Cである場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図13のグラフに示されるように、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）は、55~85°Cで活性を発揮し、そして反応の至適温度は65~80°Cの範囲内であり、好ましくは70°C付近であった。

[0203] (2) 作用pH

表3に示す反応液（酵素液は80%飽和硫酸沈殿により得たもの）を各pH、65°Cで10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0204] 使用した緩衝液は次のとおりである。

[0205] 酢酸-酢酸Na緩衝液：pH5

Bis-Tris緩衝液：pH6

Tris-HCl緩衝液：pH7.2、pH8

Glycine-NaOH緩衝液：pH9

図14は、種々の反応pHでの酵素活性を、反応pHが8.0である場合の酵素活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。図14のグラフから分かるように、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）は、pH5.0~9.0という広い範囲で活性を発揮し、そして、反応の至適pHは7.5付近（例えばpH7.0~8.0）であった。

[0206] (3) 添加試薬の影響

表4に示す反応液（酵素液は80%エタノール沈殿により得たもの）を65°C、pH7.5で10分間静置して反応させた。その後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。そして、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0207] 使用した添加試薬は、CaCl₂、NaCl、KCl、MgCl₂、MnCl₂、FeCl₂、FeCl₃、CuCl₂、ZnCl₂、CoCl₂、EDTAである。

[0208] 表14は、添加試薬を添加した場合の酵素活性を、添加試薬を添加していない場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したものである。

[0209] [表14]

RD001933+RD000920 Crude enzyme	
添加試薬	相対活性(%)
無し	100
1mM Ca ²⁺	104
1mM Na ⁺	109
1mM K ⁺	103
1mM Mg ²⁺	90
1mM Mn ²⁺	84
1mM Fe ²⁺	68
1mM Fe ³⁺	81
1mM Cu ²⁺	84
1mM Zn ²⁺	58
1mM Co ²⁺	71
5mM EDTA	73

[0210] (4) CaCl₂濃度の依存性

表8に示す反応液（酵素液は80%エタノール沈殿により得たもの）を65°Cで10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μ L加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340nmの吸光度を測定することによって酵素活性を求めた。

[0211] 図15は、種々のCaCl₂終濃度での酵素活性を、CaCl₂終濃度が0

、5 mMである場合の活性を基準（100%）とする相対活性として示したグラフである。

[0212] （5）保存安定性

上記（a）で回収した培養上清に60%飽和量となるように硫酸アンモニウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離（10,000 rpm、10分、4℃）により回収した。この沈殿を20 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）で90倍又は18倍に濃縮されるよう溶解し、粗酵素液を得た。90倍に濃縮した粗酵素液は4℃、室温（平均26.0℃）、40℃で静置し、18倍に濃縮した粗酵素液は真空凍結乾燥して凍結乾燥品とし、4℃、40℃で静置した。所定日数経過した後、各粗酵素の酵素活性を次のようにして測定した。まず表2に示す反応液（粗酵素液は水道水により200倍に希釈したものであり、凍結乾燥品は水道水に溶かして1 mg/mLとしたもの）を65℃で10分間静置して反応させた後、20%トリクロロ酢酸を50 μL加えて反応を停止させた。その後、反応液を遠心分離して上清の340 nmの吸光度を測定した。初日の活性を基準（100%）とした。

[0213] 図16は、各粗酵素についての残存活性の経日変化を示すグラフである。図16から凍結乾燥品を40℃で保存しても活性が低下しにくいことが分かる。

[0214] [洗浄効果確認試験]

（1）滴下試験

プロテアーゼ含有洗浄剤として、RD001933株由来プロテアーゼ（精製酵素）、RD000920株由来プロテアーゼ（精製酵素）、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）をそれぞれ、疑似血液で汚染された試験片（NITRON、洗浄評価インジケータ「TOSI-Gold」）上に滴下し、所定時間ごとに疑似血液を拭き取って洗浄を行った。この洗浄は、65℃で各酵素量を5 μL（濃度：約5 U/mL）に調製して行った。試験片の洗浄結果は、次の基準で目視により判定した。その結果を表15に示す。

- [0215] 「◎」：完全に洗浄された状態
「○」：ほとんど洗浄されている状態
「△」：ごくわずかな残留物（疑似血液汚れ）がある状態
「×」：残留物（疑似血液汚れ）が残っている状態

[0216] [表15]

経過時間	評価		
	RD001933	RD000920	RD001933+RD000920
10min	×	×	△
20min	△	×	○
23min	-	-	◎
30min	◎	×	-
50min	-	△	-
70min	-	○	-

[0217] (2) フラスコ試験

洗浄剤として、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）、市販酵素ナットウキナーゼ（和光純薬工業（株）「147-08801」）、市販ストレプトキナーゼ（和光純薬工業（株）「593-20581」）、市販酵素ウロキナーゼ（田辺三菱製薬（株）「873954」）、市販衣類洗剤（花王（株）「アタックNeo」）、市販酵素サーモリシン（シグマアルドリッチ「P1512-1G」）を用いた。

[0218] 上記の洗浄剤をそれぞれ200mL容フラスコに30mLずつ入れ、さらに試験片（NIT-ON、洗浄評価インジケータ「TOSI-Gold」）を入れて浸漬させた。そして、表17に示す温度及び時間の条件で攪拌子により上記のフラスコ内を攪拌した。その後、上記の試験片を取り出して軽く水洗した後、上記と同じ基準で洗浄結果を判定した。その結果を表16に示す。

[0219]

[表16]

洗浄剤		温度	時間	評価
RD001933+RD000920	粗酵素(1.6U/mL)	60°C	30~35min	◎
市販酵素ナットウキナーゼ	和光純薬工業(株)「147-08801」(7.8U/mL)	47°C	45min	○
市販酵素ストレプトキナーゼ	和光純薬工業(株)「593-20581」(100U/mL)	40°C	90min	×
市販酵素ウロキナーゼ	田辺三菱製薬(株)「873954」(100U/mL)	40°C	90min	×
市販衣類洗剤	花王(株)「アタックNeo」(10mL/30L水)	47°C	4h	×
		37°C	4h	×
市販酵素サーモリシン	シグマーアルドリッチ「P1512-1G」(6.5U/mL)	70°C	25min	○
		60°C	35min	○

[0220] 表16から明らかなように、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）は最も洗浄効果が高いと考えられ、次いで市販酵素サーモリシンの洗浄効果が高いことが確認された。

[0221] (3) 洗浄器試験その1

市販されている洗浄剤の中では最も洗浄効果が高いと考えられるサーモリシン（シグマーアルドリッチ「P1512-1G」）と、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）との洗浄効果を次のようにして確認した。

[0222] smeg社（イタリア）製器具除染用洗浄器「WD3060」に、試験片（NITRON、洗浄評価インジケータ「TOSI-Gold」）をセットした。さらにプロテアーゼ含有洗浄剤として、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）又はサーモリシン（シグマーアルドリッチ「P1512-1G」）をセットし、次の工程1~5で表17に示す温度X（°C）及び時間Y（min）の条件で試験片の洗浄を行った。試験片の洗浄結果は、上記と同じ基準で目視により判定した。その結果を表17に示す。

[0223] 工程1：水道水による予備洗浄、3分；
 工程2：洗浄、温度X（°C）、時間Y（min）；
 工程3：すすぎ1回目、40°C、1分；
 工程4：すすぎ2回目、水道水、1分；
 工程5：殺菌、90°C、5分。

[0224] [表17]

温度X	時間Y	サーモリシン		RD001933 +RD000920	
		評価	全活性	評価	全活性
70°C	30min	◎	65kU	◎	8.0kU
	15min	NT		◎	8.2kU
65°C	30min	NT		◎	7.8kU
	20min	NT		◎	7.2kU
	15min	NT		△	8.1kU
60°C	30min	△	33kU	NT	
	15min	○	65kU	NT	
		○	52kU	NT	
	20min	◎	65kU	○	9.3kU
○		39kU			
55°C	30min	○	52kU	△	8.7kU

全活性:サーモリシンの比活性は75U/mg

NT: not test

[0225] 表17から、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）の方が、市販酵素サーモリシンに比べて少ない酵素量で同等の洗浄効果を示すことから、より洗浄効果が高いと考えられる。

[0226] (4) 洗浄器試験その2

ヨーロッパ等の硬水を想定したCa²⁺濃度と洗浄力との関係について次のように調べた。

[0227] smeg社（イタリア）製器具除染用洗浄器「WD3060」に、試験片（NITRON、洗浄評価インジケータ「TOSI-Gold」）をセットした。さらにプロテアーゼ含有洗浄剤として、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ（粗酵素）をセットして、上記と同じ工程1～5で試験片の洗浄を行った。その結果を表18に示す。試験片の洗浄結果は、上記と同じ基準で目視により判定した。

[0228]

[表18]

RD001933+RD000920

酵素(洗剤)量	培養上清の濃縮率	CaCl ₂ 終濃度	温度X	時間Y	評価
0.5% (vol/vol)*	88倍	0.5mM	70°C	30min	◎
	90倍		60°C	20min	○
	90倍	0mM	70°C	15min	◎
	90倍		65°C	30min	○
	90倍		65°C	20min	○
	90倍		65°C	15min	△
	90倍		55°C	30min	△
	90倍				

*)洗浄器中での濃度

[0229] 表18から明らかなように、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ(粗酵素)は、Ca²⁺濃度の低い軟水(例えば日本国内の水道水)下に比べてCa²⁺濃度の高い硬水(ヨーロッパ等の水)下の方がさらに洗浄力が向上することが確認された。

[0230] (5) 洗浄器試験その3

現在広く使用されているアルカリ洗浄剤の洗浄効果を次のようにして確認した。

[0231] smeg社(イタリア)製器具除染用洗浄器「WD3060」に、試験片(NITRON、洗浄評価インジケータ「TOSI-Gold」)をセットした。さらに既存洗剤A(アルカリ洗浄剤、Borer Chemie社製「deconex(R)28ALKAONE-X」)、既存洗剤B(多酵素洗浄剤、Borer Chemie社製「deconex(R)POWERZYME」)をセットして、上記と同じ工程1~5で試験片の洗浄を行った。その結果を表19に示す。試験片の洗浄結果は、上記と同じ基準で目視により判定した。

[0232]

[表19]

洗剂量 (vol/vol)		温度X	時間Y	評価
既存洗剤A	既存洗剤B			
0.3%	0.1%	70°C	10min	×
0.5%	0%	80°C	10min	△
	0%	80°C	20min	△
	0%	70°C	15min	×
	0%	65°C	20min	×
	0%	65°C	15min	×
	0.2%	55°C	10min	×

既存洗剤A: アルカリ洗剤 (Borer Chemie社製「deconex(R) 28ALKAONE-X」)

既存洗剤B: 多酵素洗剤 (Borer Chemie社製「deconex(R) POWER ZYME」)

[0233] 表17及び表18に示すRD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ (粗酵素) の洗浄結果と、表19に示す既存のアルカリ洗剤の洗浄結果とを対比すると、RD001933株及びRD000920株由来プロテアーゼ (粗酵素) の方が、既存のアルカリ洗剤に比べて洗浄効果が高いことが確認された。

受託番号

[0234] [Actinomadura sp. RD001933株 (受託番号: NITE P-1467)]

受託番号: NITE P-1467

寄託機関の名称: 独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD)

寄託機関のあて名: 日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

寄託の日付: 2012年11月22日。

[Actinomadura miaoliensis RD000920株 (受託番号: NITE P-1468)]

受託番号: NITE P-1468

寄託機関の名称: 独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD)

寄託機関のあて名：日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8

寄託の日付：2012年11月22日。

配列表フリーテキスト

- [0235] 配列番号1：プロテアーゼ発現遺伝子
配列番号2：プロテアーゼ（ポリペプチド）
配列番号3：プロテアーゼのN末端配列
配列番号4：プロテアーゼの内部配列
配列番号5：プロテアーゼの内部配列
配列番号6：プロテアーゼの内部配列
配列番号7：プロテアーゼの内部配列
配列番号8：プライマーS1
配列番号9：プライマーA1-1
配列番号10：プライマーA1-2
配列番号11：プロテアーゼ発現遺伝子断片（解析結果）
配列番号12：プライマー（インバースPCR）
配列番号13：プライマー（インバースPCR）
配列番号14：プロテアーゼ発現遺伝子断片（解析結果、5'末端配列）
配列番号15：プロテアーゼ発現遺伝子断片（解析結果、3'末端配列）

請求の範囲

- [請求項1] 放線菌のアクチノマジュラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) R D O 0 1 9 3 3 株 (N B R C 国内分離 R D 株) を培養して得られたプロテアーゼ。
- [請求項2] 放線菌のアクチノマジュラ・ミアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) R D O 0 0 9 2 0 株 (N B R C 国内分離 R D 株) を培養して得られたプロテアーゼ。
- [請求項3] 放線菌のアクチノマジュラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) R D O 0 1 9 3 3 株 (N B R C 国内分離 R D 株) 及び放線菌のアクチノマジュラ・ミアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) R D O 0 0 9 2 0 株 (N B R C 国内分離 R D 株) を混合培養して得られたプロテアーゼ。
- [請求項4] 前記プロテアーゼが、以下の (a 1) 、 (a 2) 又は (a 3) に記載のポリペプチドを含む請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ。
- (a 1) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
 - (a 2) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 つ又は複数のアミノ酸残基が置換、挿入、欠失、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド。
 - (a 3) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 6 5 % の相同性を有するポリペプチド。
- [請求項5] 前記プロテアーゼの S D S - P A G E による分子量が約 3 1 , 0 0 0 D a (3 1 k D a) である請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ。
- [請求項6] 前記プロテアーゼをコードするポリヌクレオチドが、以下の (b 1) 、 (b 2) 又は (b 3) に記載のポリヌクレオチドを含む請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ。
- (b 1) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

(b 2) 配列番号 1 に記載の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジেন্টな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(b 3) 配列番号 1 に記載の塩基配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリヌクレオチド。

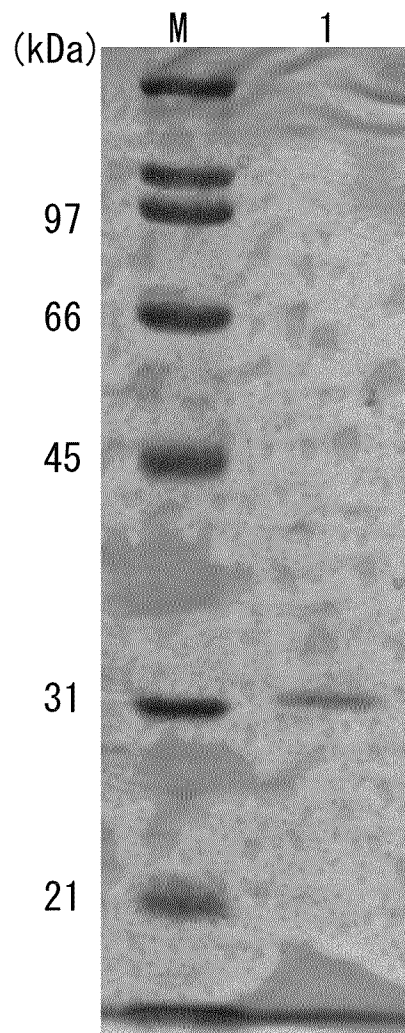
[請求項7] 請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載のプロテアーゼを含有するプロテアーゼ含有洗浄剤。

[請求項8] 放線菌のアクチノマジユラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) RD001933 株 (NBRC 国内分離 RD 株) を培養して製造するプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法。

[請求項9] 放線菌のアクチノマジユラ・ミアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) RD000920 株 (NBRC 国内分離 RD 株) を培養して製造するプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法。

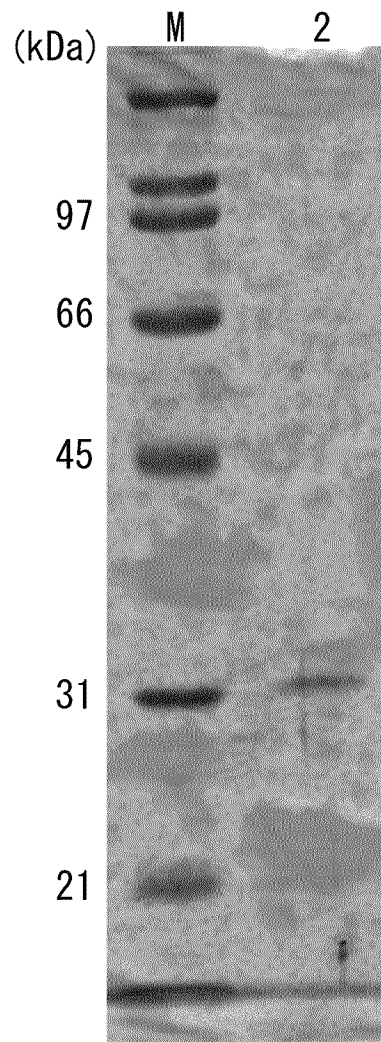
[請求項10] 放線菌のアクチノマジユラ・エスピー (*Actinomadura* sp.) RD001933 株 (NBRC 国内分離 RD 株) 及び放線菌のアクチノマジユラ・ミアオリエンシス (*Actinomadura miaoliensis*) RD000920 株 (NBRC 国内分離 RD 株) を混合培養して製造するプロテアーゼ含有洗浄剤の製造方法。

[図1]



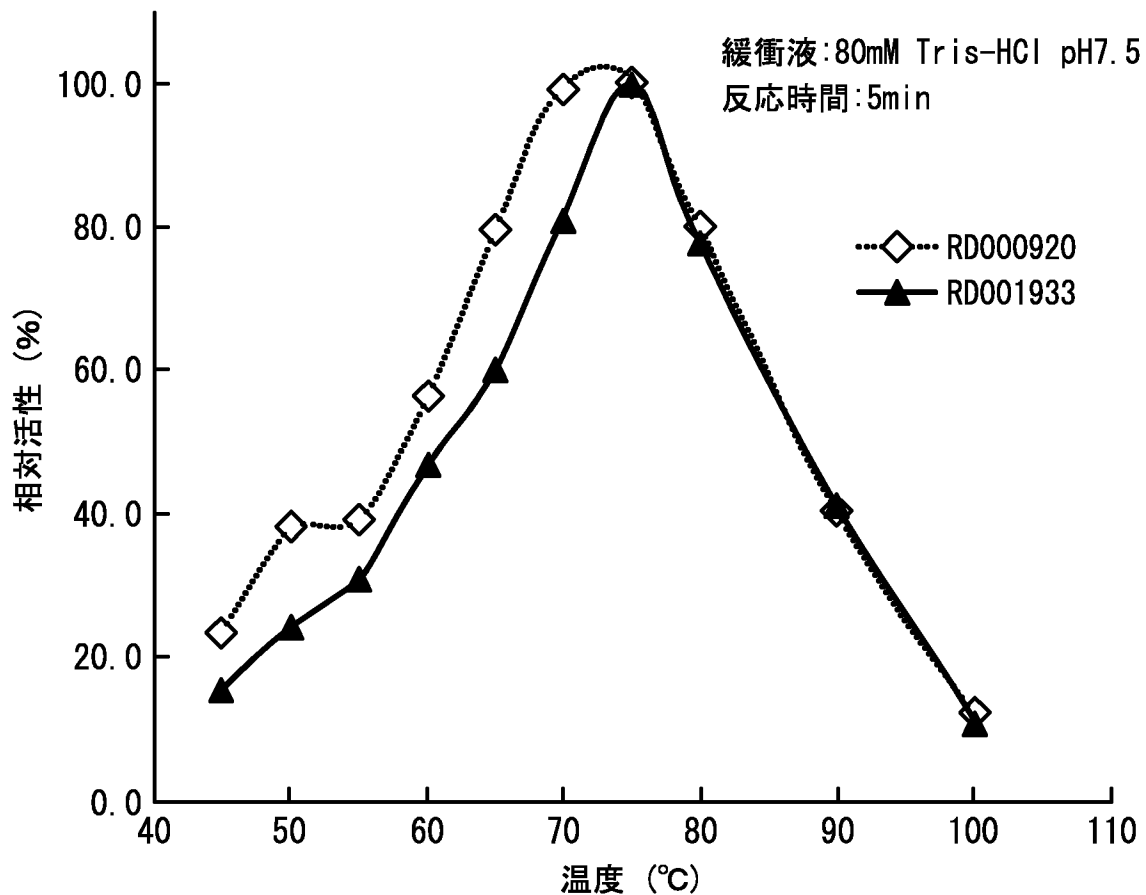
レーンM:タンパク質分子量マーカー
レーン1:プロテアーゼ(RD001933単独培養)

[図2]

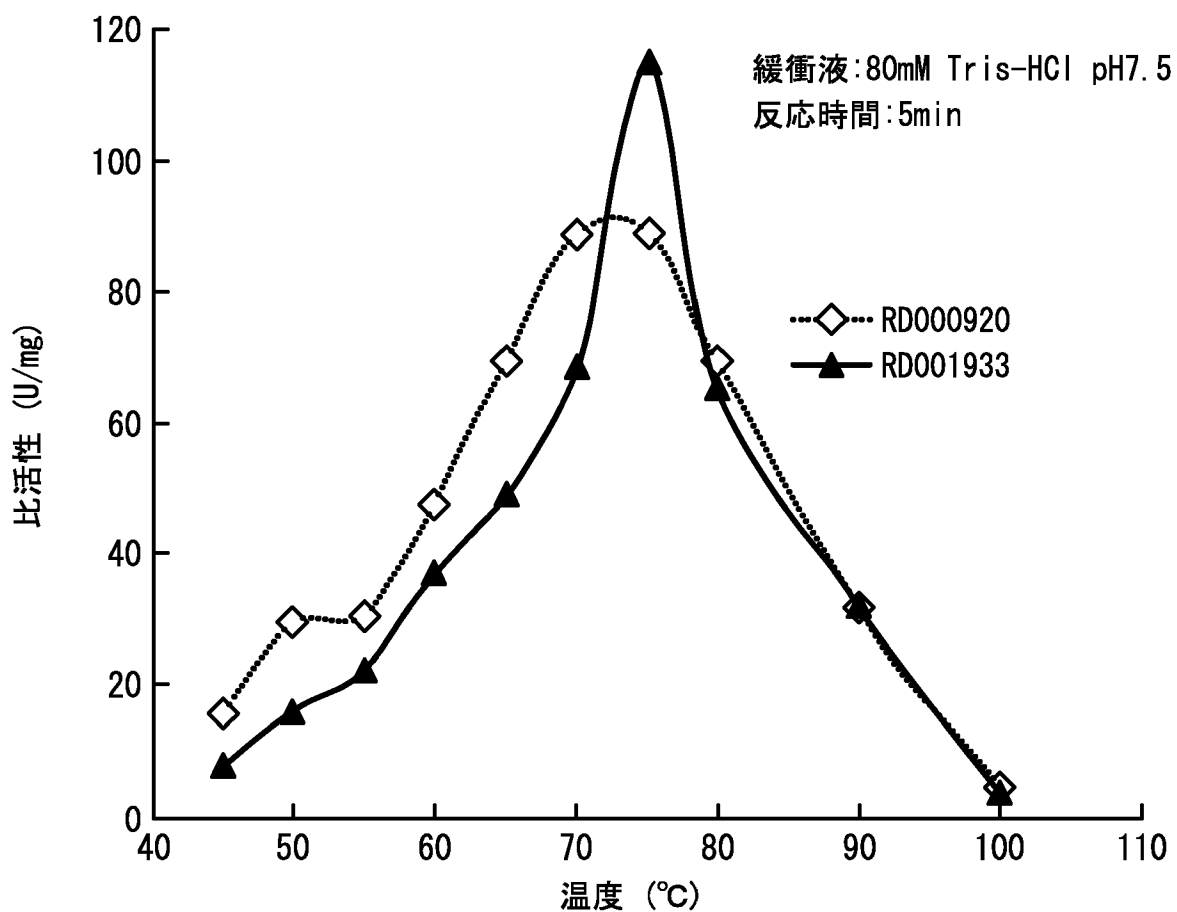


レーンM: タンパク質分子量マーカー
レーン2: プロテアーゼ (RD000920単独培養)

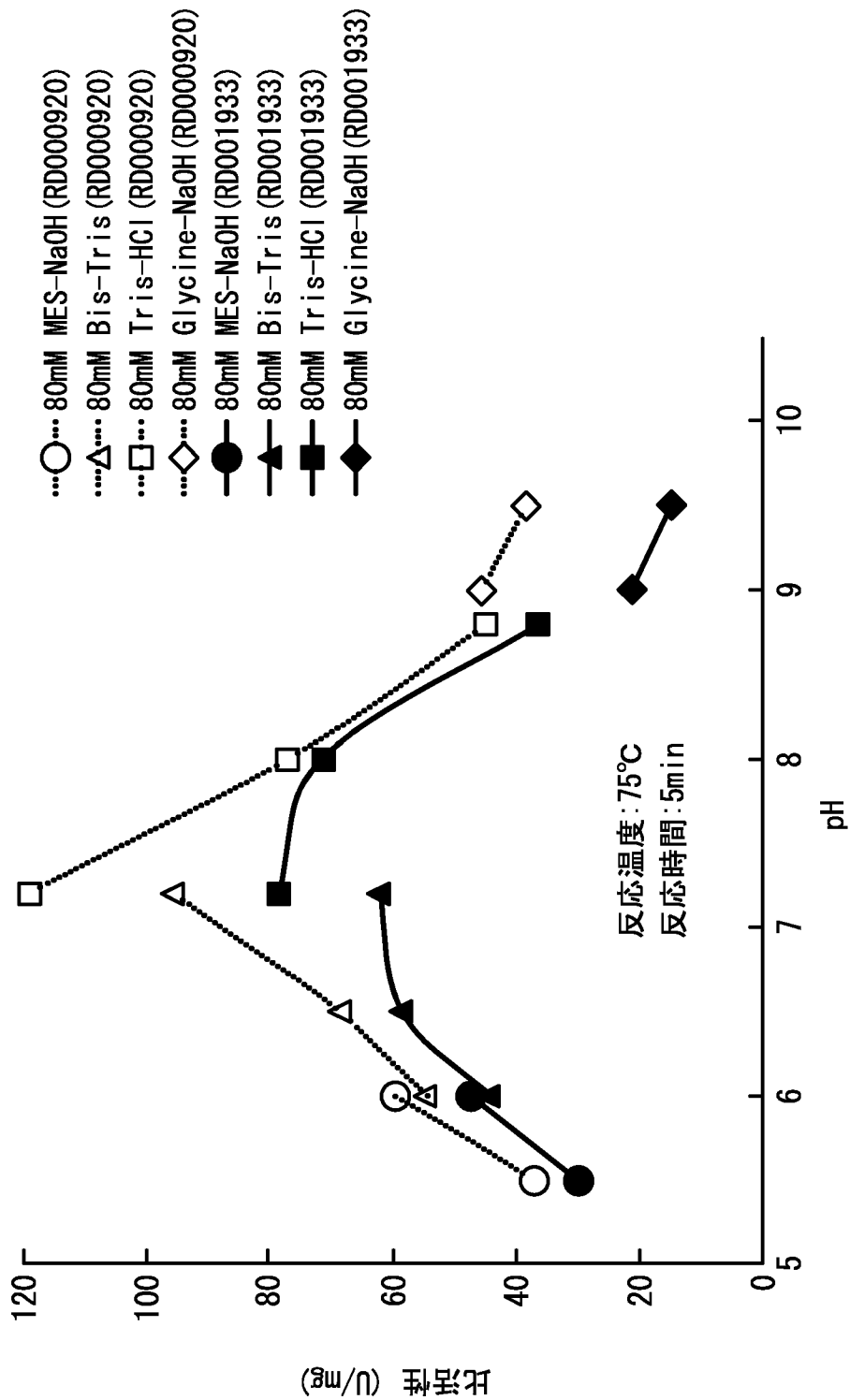
[図3]



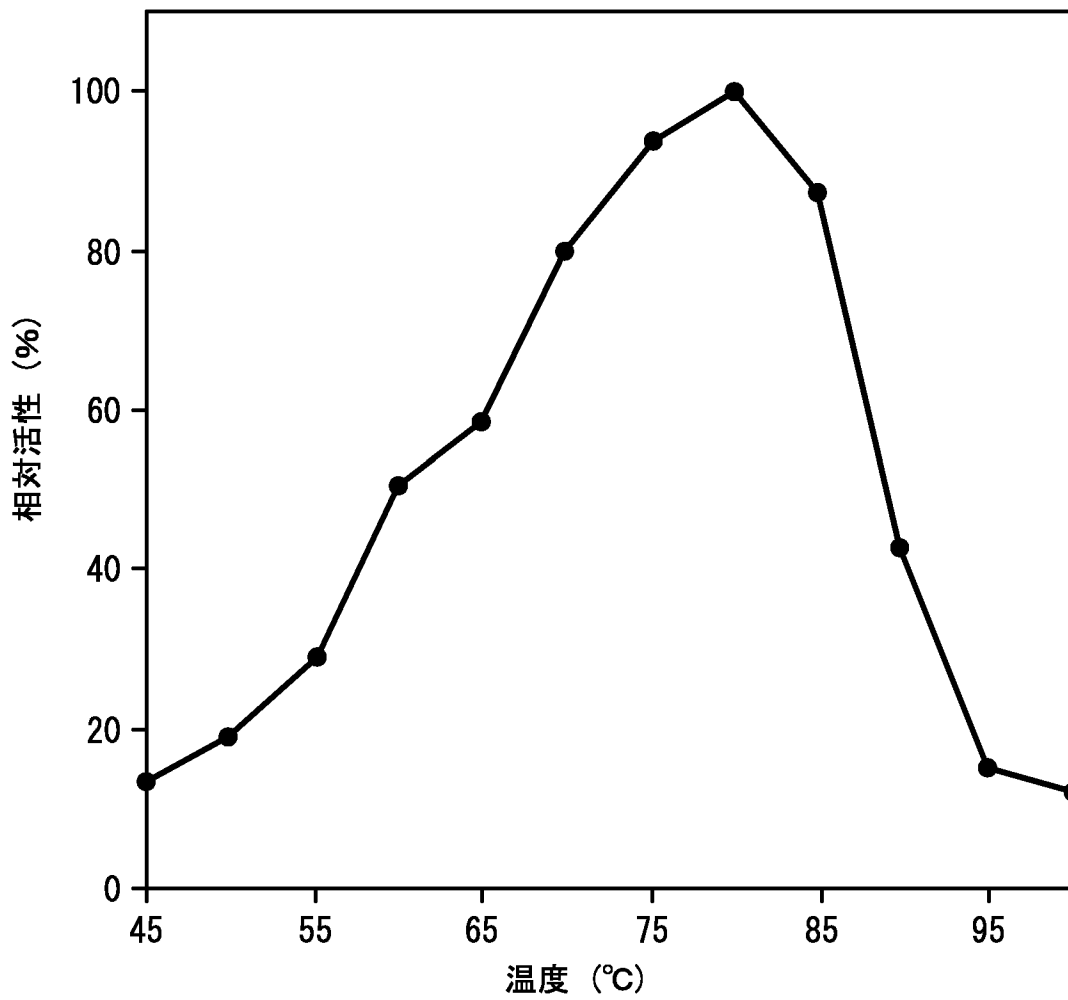
[図4]



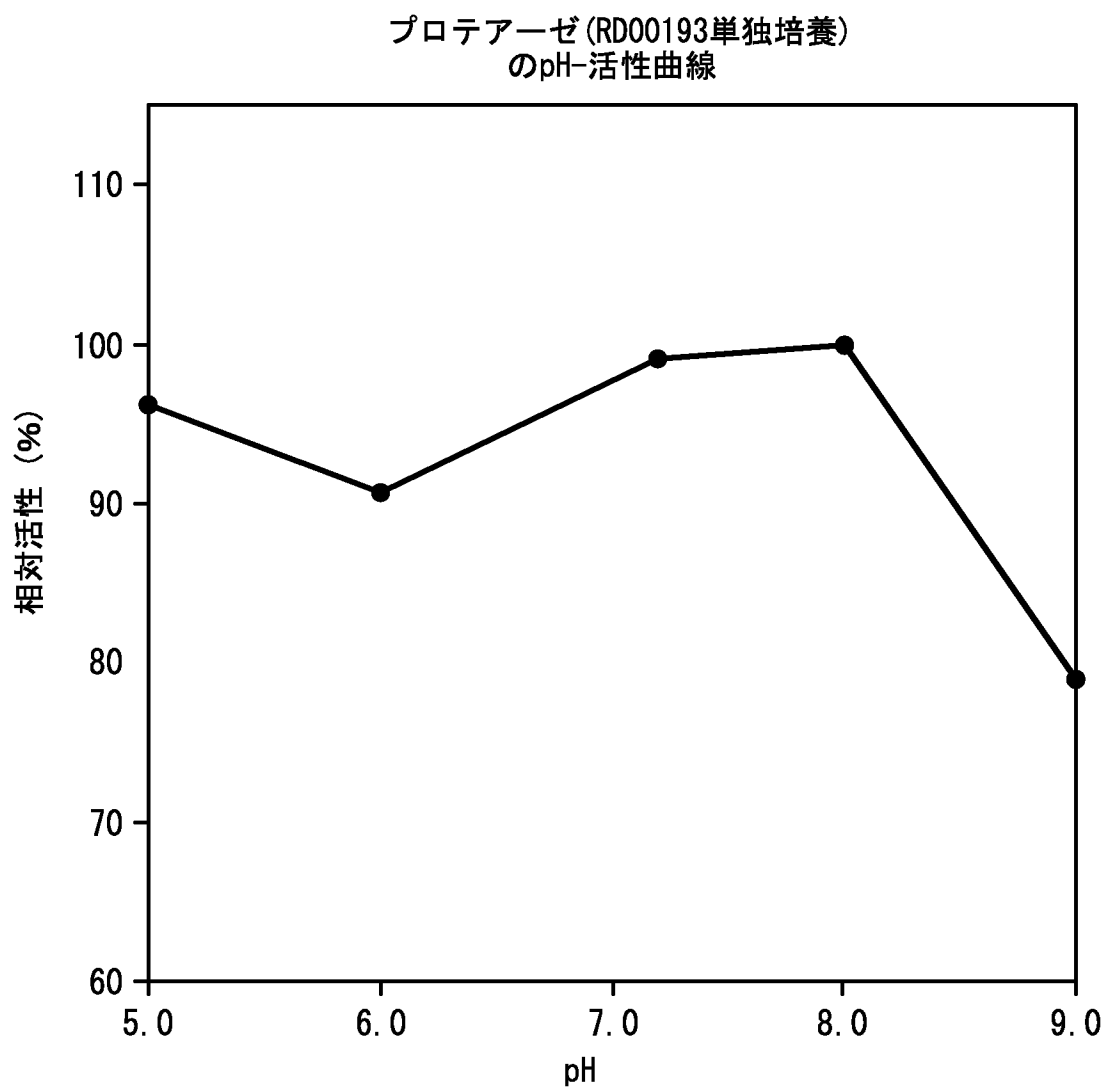
[図6]



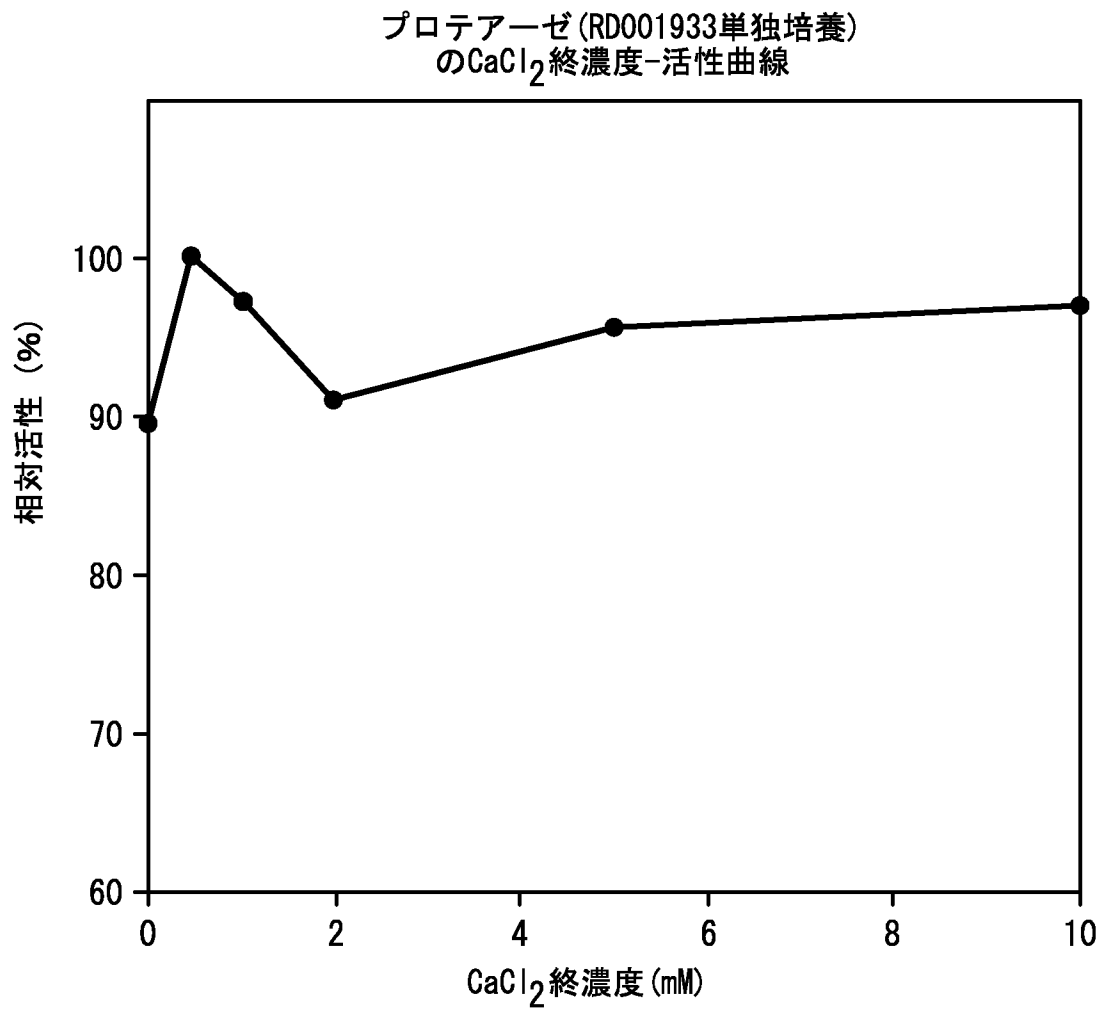
[図7]

プロテアーゼ (RD001933単独培養)
の温度-活性曲線

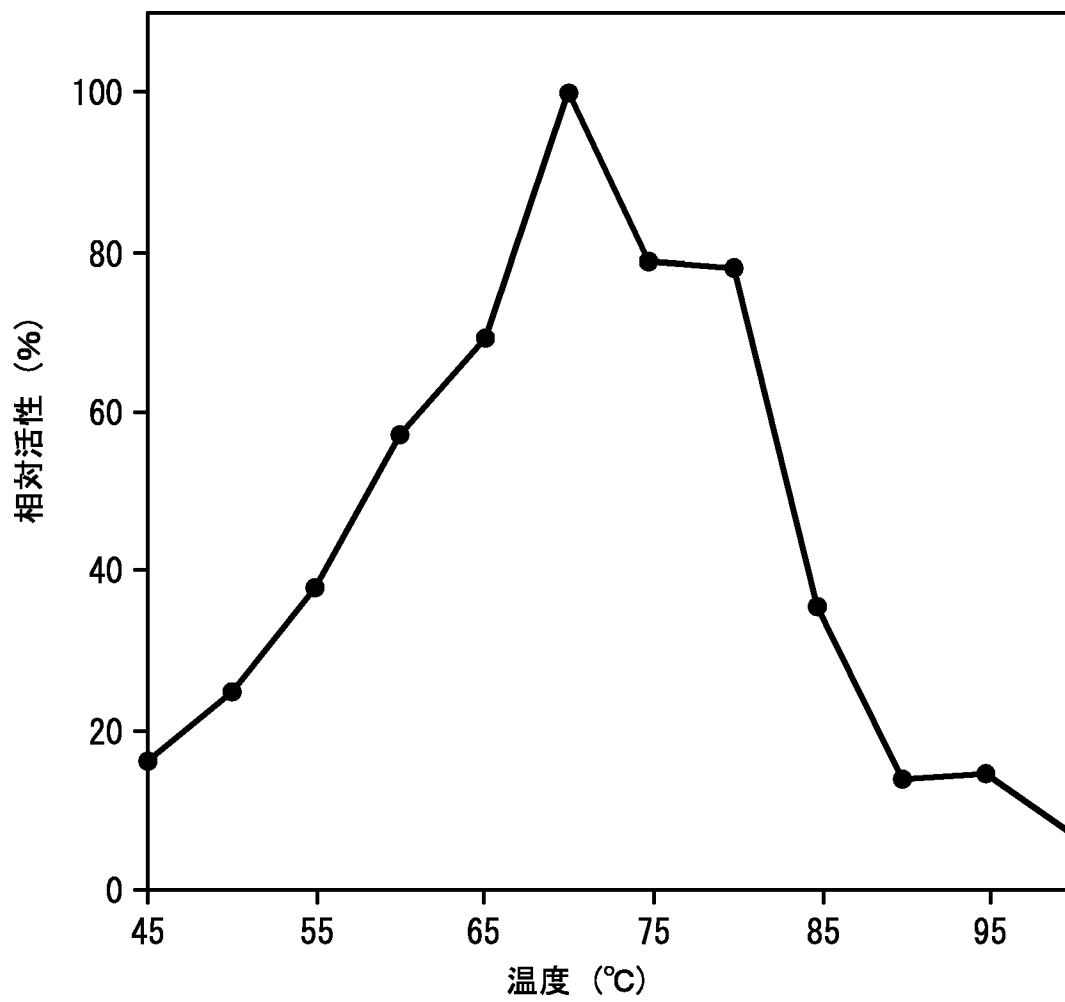
[図8]



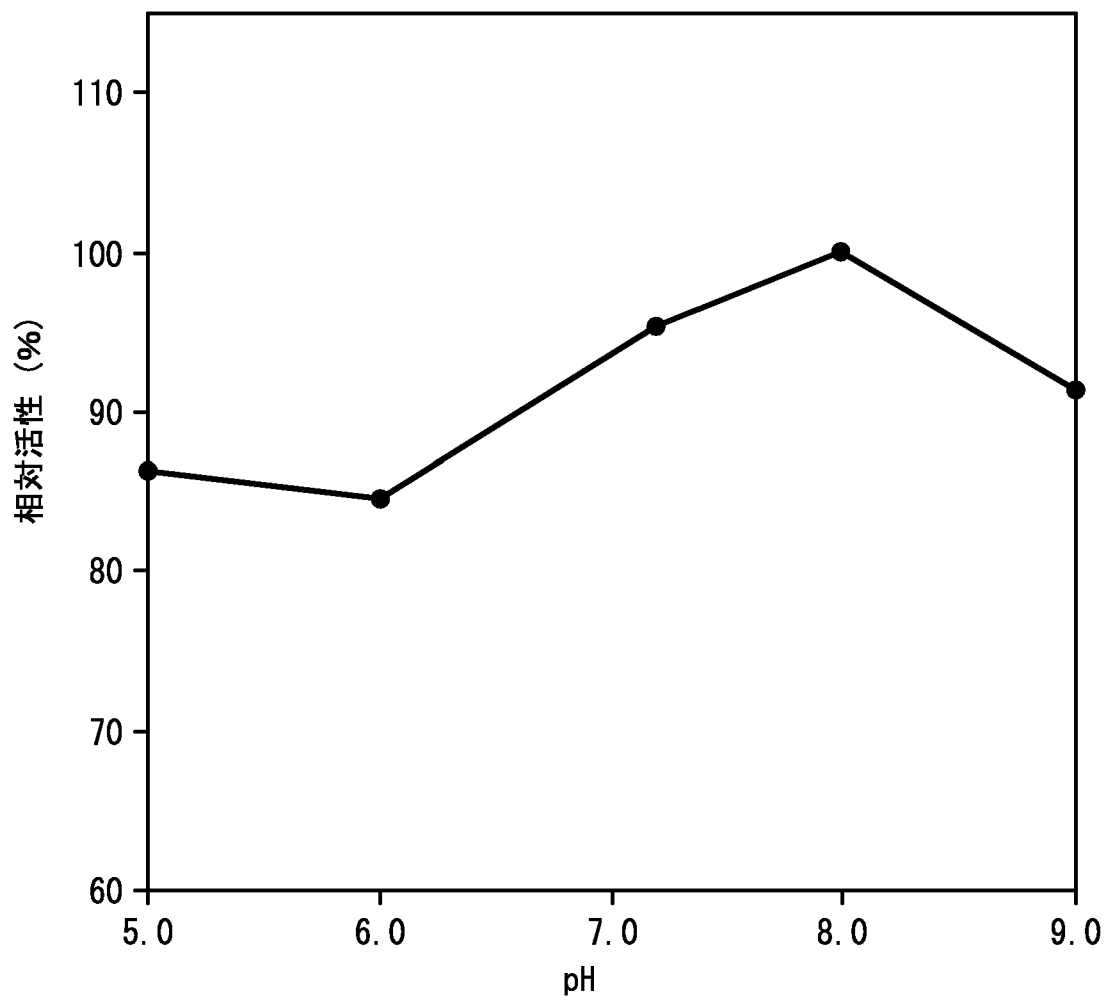
[図9]



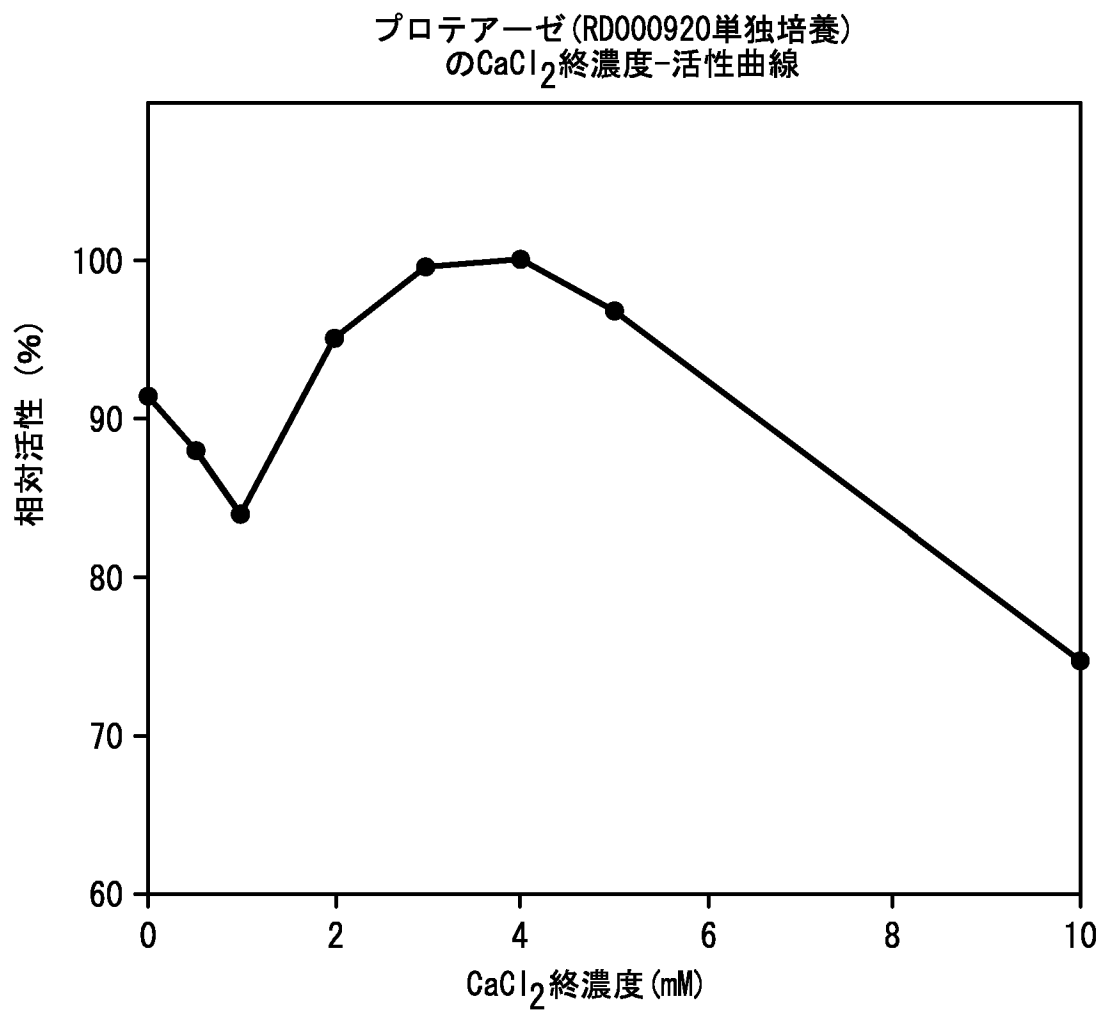
[図10]

プロテアーゼ (RD000920単独培養)
の温度-活性曲線

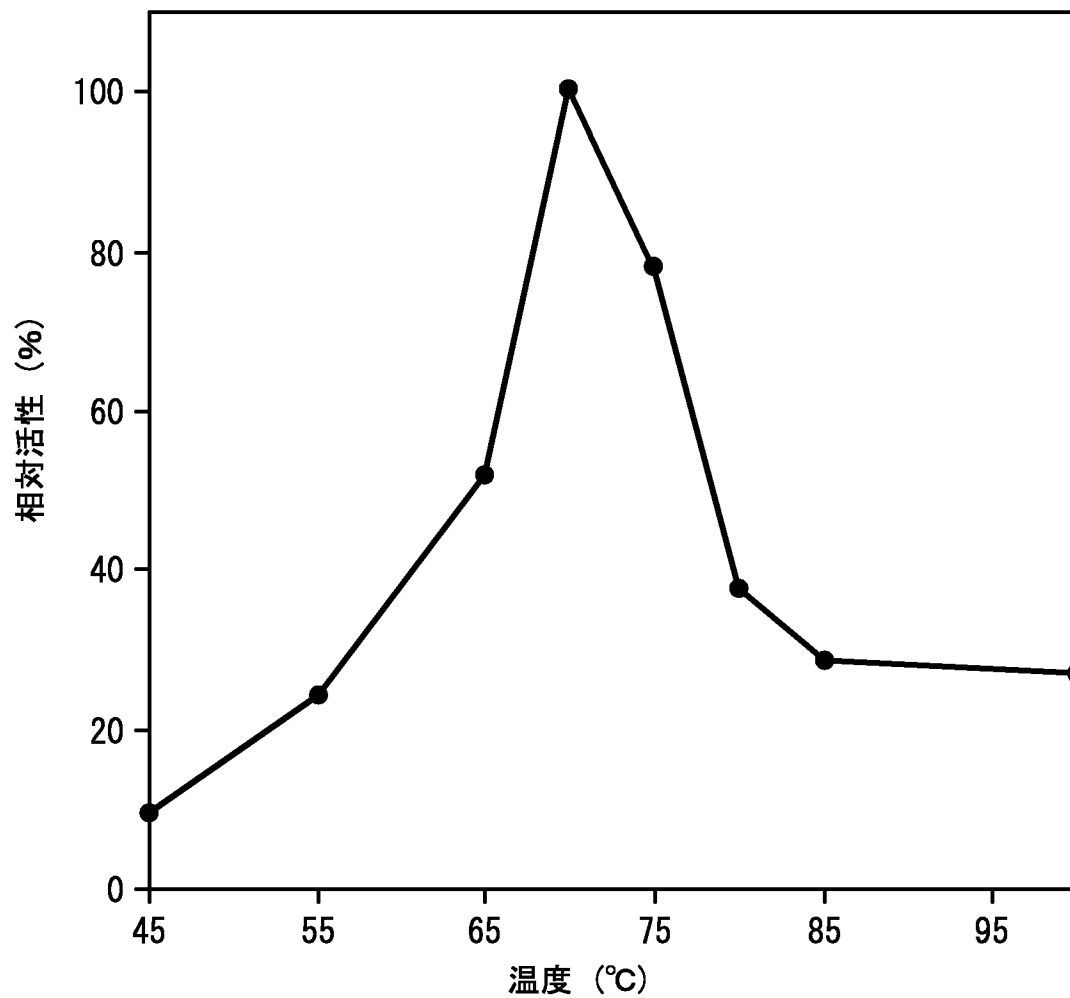
[図11]

プロテアーゼ (RD000920単独培養)
のpH-活性曲線

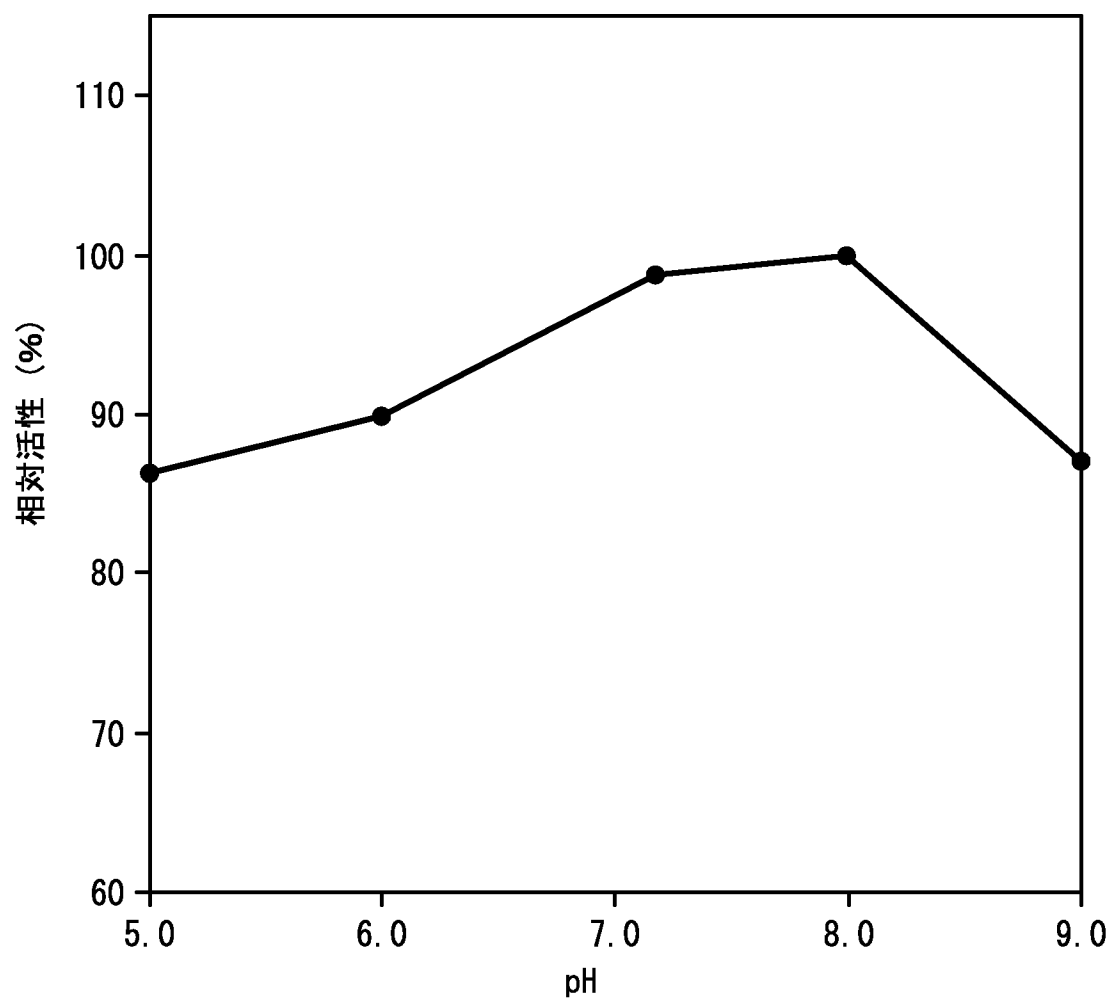
[図12]



[図13]

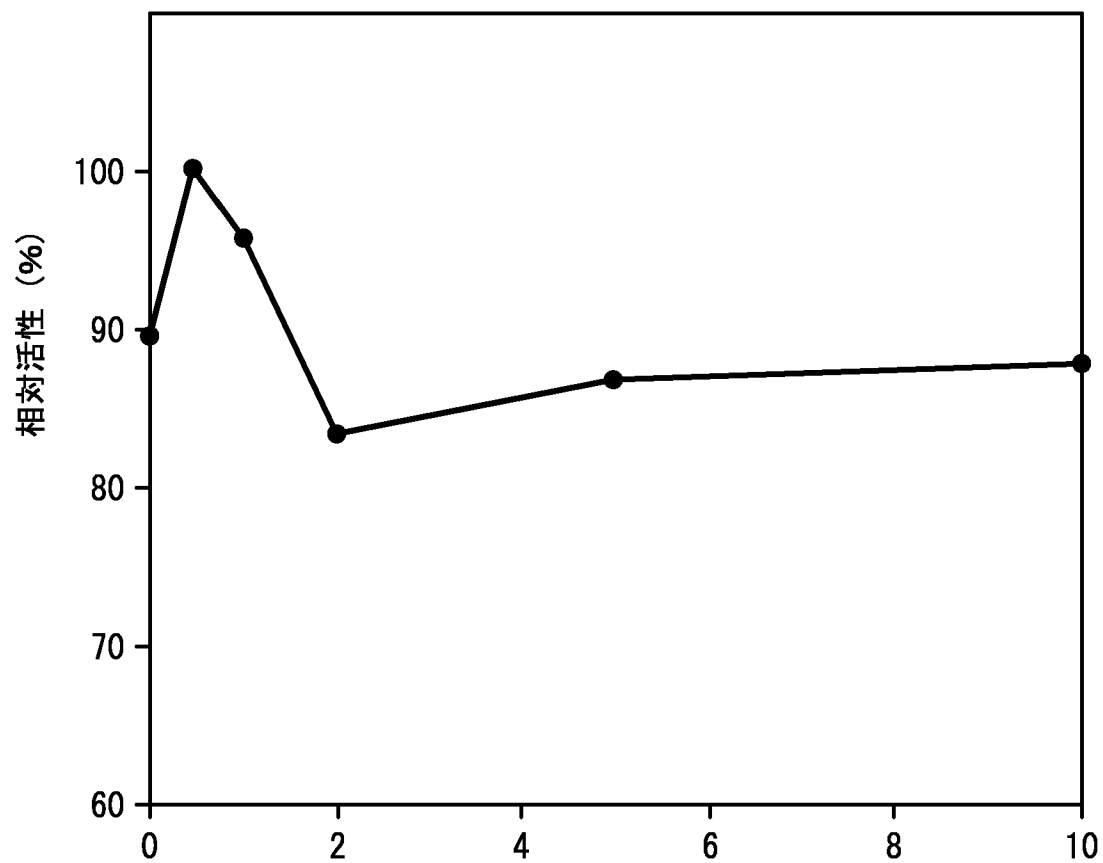
プロテアーゼ (RD001933及びRD000920混合培養)
の温度-活性曲線

[図14]

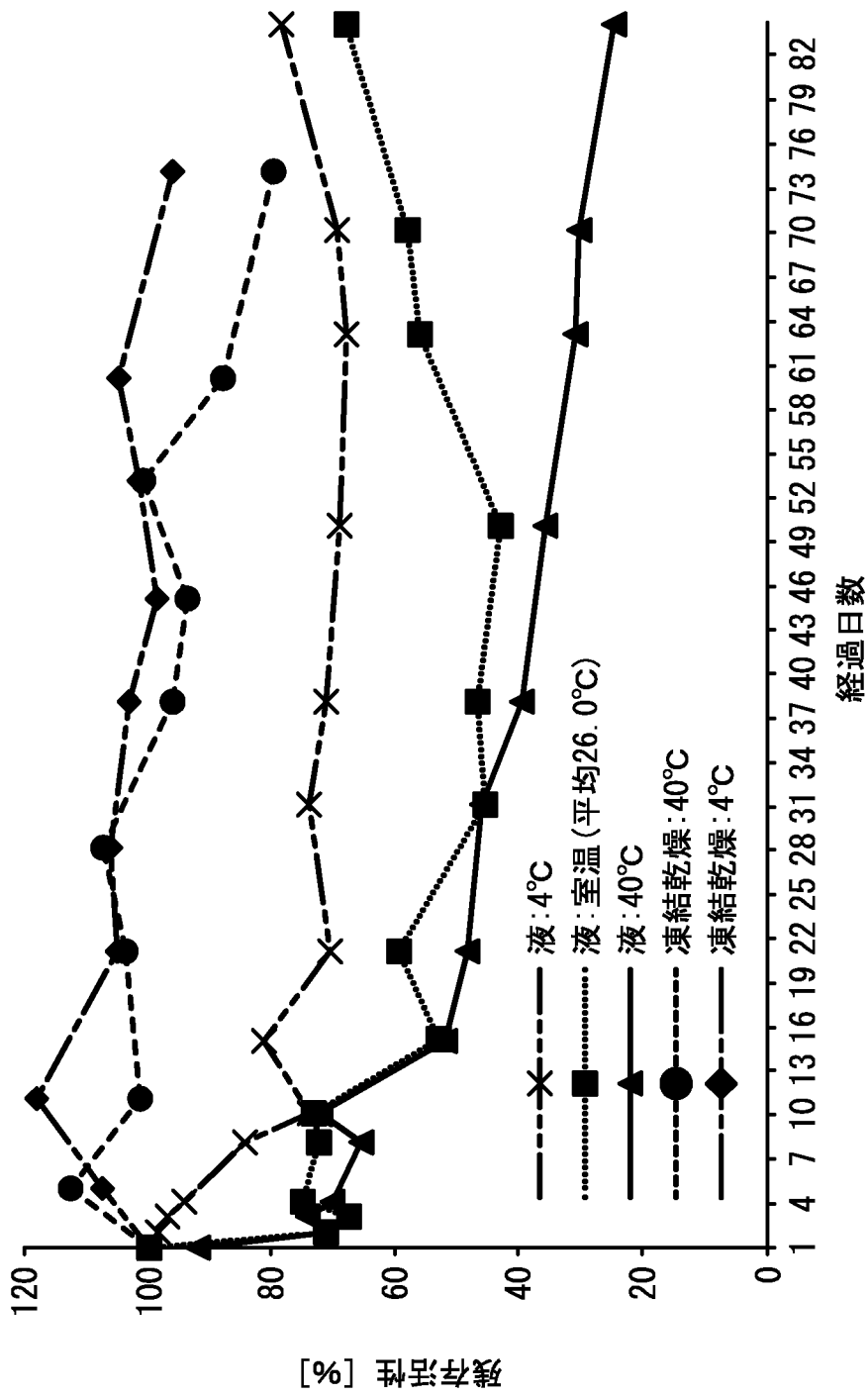
プロテアーゼ (RD001933及びRD000920混合培養)
のpH-活性曲線

[図15]

プロテアーゼ (RD001933及びRD000920混合培養)
のCaCl₂終濃度-活性曲線



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/000724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/52(2006.01) i, C11D3/386(2006.01) i, C12N15/09(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)

C12N9/52, C11D3/386, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUKKHUM S., et al., A novel poly (L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soil, phylogenic relationship and the enzyme characterization, J. Gen. Appl. Microbiol., 2009, vol.55, no.6, p.459-467	1-10
A	JP 2006-516889 A (Diversa Corp.), 13 July 2006 (13.07.2006), & WO 2004/033668 A2 & EP 1578935 A2 & US 2006/0259995 A1	1-10
A	JP 6-303984 A (Japan Tobacco Inc.), 01 November 1994 (01.11.1994), (Family: none)	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 March, 2013 (06.03.13)Date of mailing of the international search report
19 March, 2013 (19.03.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/000724

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-000099 A (National University Corporation Shizuoka University), 07 January 2013 (07.01.2013), (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N9/52(2006.01)i, C11D3/386(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N9/52, C11D3/386, C12N15/09

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

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/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、UniProt/GeneSeq

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
A	SUKKHUM S., et al., A novel poly (L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soil, phylogenic relationship and the enzyme characterization, J. Gen. Appl. Microbiol., 2009, vol.55, no.6, p.459-467	1 - 1 0
A	JP 2006-516889 A (ダイヴァーサ コーポレイション) 2006.07.13 & WO 2004/033668 A2 & EP 1578935 A2 & US 2006/0259995 A1	1 - 1 0

C 欄の続きにも文献が列挙されている。 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 0 6 . 0 3 . 2 0 1 3	国際調査報告の発送日 1 9 . 0 3 . 2 0 1 3
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 1 0 0 - 8 9 1 5 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) 池上 文緒 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B 3 7 6 5

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
A	JP 6-303984 A (日本たばこ産業株式会社) 1994.11.01 (ファミリーなし)	1 - 10
A	JP 2013-000099 A (国立大学法人静岡大学) 2013.01.07 (ファミリーなし)	1 - 10