

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-245303

(P2005-245303A)

(43) 公開日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 1/21

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-59997(P2004-59997)

(22) 出願日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(71) 出願人 501145295

独立行政法人食品総合研究所

茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎

(74) 代理人 100086221

弁理士 矢野 裕也

(72) 発明者 小林 秀行

茨城県つくば市吾妻4-13-6

(72) 発明者 金子 哲

茨城県つくば市吾妻2-1-2-713-103

(72) 発明者 一ノ瀬 仁美

茨城県つくば市春日2-45-5 グリーンヒルズやまのい504号室

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エキソ-1, 3-ガラクタナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むベクター及び形質転換体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 プロテオグリカンからの糖鎖遊離などに有用なエキソ-1, 3-ガラクタナーゼの活用を図るため、該酵素の遺伝的情報を解明し、これを活用して該酵素の工業的な生産に寄与する。

【解決手段】 特定の塩基配列からなるエキソ-1, 3-ガラクタナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、及び該プラスミドで形質転換された大腸菌(FERM BP-08652、FERM BP-08651、FERM BP-08649、FERM BP-08650)を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子。

【請求項 2】

請求項 1 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 3】

請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08652)。

【請求項 4】

配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子。

【請求項 5】

請求項 4 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミド。

10

【請求項 6】

請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08651)。

【請求項 7】

配列表の配列番号 5 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子。

【請求項 8】

請求項 7 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 9】

請求項 8 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08649)。

【請求項 10】

配列表の配列番号 7 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子。

20

【請求項 11】

請求項 10 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミド。

【請求項 12】

請求項 11 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08650)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドベクター及び形質転換体に関する。

30

【背景技術】

【0002】

エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼは、ガラクトースが - 1 , 3 - 結合で繋がった多糖である 1 , 3 - ガラクタンの非還元末端から順にガラクトースを遊離するエキソ型の酵素であり、正式な名称はガラクタン 1 , 3 - - ガラクトシダーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 145) である。本酵素は高等植物の細胞表層プロテオグリカンであるアラビノガラクタン - プロテインの糖鎖部分に作用する。

【0003】

アラビノガラクタン - プロテインは、高等植物の細胞表層に存在するプロテオグリカンで、ヒドロキシプロリンを多く含むタンパク部分とアラビノース、ガラクトースを主成分とする糖鎖 (アラビノ 1 , 3 - 、 1 , 6 - ガラクタン) とで構成されている。このアラビノガラクタン - プロテインは、時期、器官特異的に発現することが知られ、植物の生長や分化と深く関わると考えられている (非特許文献 1 の総説参照)。増粘剤として食品に使われているアカシアの樹液由来のガムアラビックは、アラビノガラクタン - タンパク質の一種である。

40

【0004】

アラビノガラクタン - プロテインを分解する酵素としては、 - L - アラビノフラノシダーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 55)、 - ガラクトシダーゼ (E . C . 3 . 2 . 1 . 2

50

2)、エンド - 1, 6 - ガラクタナーゼ (EC 番号なし)、及びエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ (E.C.3.2.1.145) が知られている。

【0005】

エキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼは、これまで2種類の起源のもの、すなわち、イルペックス (*Irpex*) 属微生物及びアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物のそれぞれの培養液である市販の酵素製剤から精製されたとの報告がある (非特許文献2及び非特許文献3参照)。しかしながら、両文献ともアミノ酸配列の情報はもちろん、遺伝的情報に関して全く記載されていない。

【0006】

様々なグリコシダーゼがその特異性を利用して多糖やオリゴ糖などの構造解析に広く利用されている。その中で、エキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼは、側鎖が結合しているガラクトースの結合を加水分解するバイパス反応を触媒するという性質を有することから、非常にヘテロで複雑な構造を持つアラビノガラクトタン - プロテインの糖鎖構造の解析に有用である。

しかしながら、上記の通りエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼに関する遺伝的情報は全く知られていなかったため、アラビノガラクトタン - プロテインの糖鎖構造の解析は進展せず、その用途の開発も進んでいなかった。

【0007】

【非特許文献1】Y. Gasparã, *Plant Mol. Biol.* 47巻, 161 - 176頁, 2001年

【非特許文献2】Y. Tsumurayaã, *J. Biol. Chem.* 265巻, 7207 - 7215頁, 1990年

【非特許文献3】P. Pellerinã, *Carbohydrate Res.* 264巻, 281 - 291頁, 1994年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、エキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼの活用を図るため、該酵素の遺伝的情報を解明し、これを活用して該酵素の工業的な生産に寄与することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、その結果、種々の生物のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を解明するに至った。

すなわち、ファネロキータ属微生物由来cDNAをイルペックス属微生物のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼの部分アミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いたPCRにより増幅して部分塩基配列を得て、得られたPCR産物の前後の塩基配列をRACE-PCRにより更に増幅することにより、第一のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼをコードする遺伝子の全長をクローニングすることに成功した。

また、クロストリディウム属微生物のゲノムDNAを鋳型とし、目的とするDNA全長を得るべくデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、第二のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼをコードする遺伝子の全長をクローニングすることにも成功した。

更にアラビドプシス属植物由来cDNAを鋳型とし、目的とするそれぞれのDNA全長を得るべくデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、第三及び第四のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼをコードする遺伝子の全長をクローニングすることにも成功した。

本発明は、係る知見に基づくものである。

【0010】

請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1記載の塩基配列からなるエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子である。

請求項2記載の本発明は、請求項1記載のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミドである。

10

20

30

40

50

請求項 3 記載の本発明は、請求項 2 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08652) である。

【0011】

請求項 4 記載の本発明は、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子である。

請求項 5 記載の本発明は、請求項 4 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミドである。

請求項 6 記載の本発明は、請求項 5 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08651) である。

【0012】

請求項 7 記載の本発明は、配列表の配列番号 5 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子である。

請求項 8 記載の本発明は、請求項 7 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミドである。

請求項 9 記載の本発明は、請求項 8 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08649) である。

【0013】

請求項 10 記載の本発明は、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子である。

請求項 11 記載の本発明は、請求項 10 記載のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を含むプラスミドである。

請求項 12 記載の本発明は、請求項 11 記載のプラスミドで形質転換された大腸菌 (FERM BP - 08650) である。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの遺伝的情報が提供されるので、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの工業的な生産が可能となる。

エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼは、アラビノガラクトサン - プロテインに作用することから、本発明は、アラビノガラクトサン - プロテインの糖鎖構造解析用の試薬として、該糖タンパク質の構造解析の進展に寄与するものである。また、アラビノガラクトサン - プロテインの物性を改変し、増粘剤としての用途を切り開くことも可能である。

更に、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼは、動物のプロテオグリカンにも作用する可能性があることから、本発明は、動物のプロテオグリカン糖鎖遊離用酵素としても利用が期待される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明は、第一に、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を提供するものであり、第二に、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を提供するものであり、第三に、配列表の配列番号 5 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を提供するものであり、第四に、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列からなるエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子を提供するものである。

【0016】

まず、第一の本発明について説明する。

第一の本発明のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなるものであり、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものである。

この本発明の遺伝子の入手方法について、特に限定はないが、ファネロキーテ属微生物から得ることが好ましい。

【0017】

10

20

30

40

50

ファネロキータ属微生物からの入手方法の一例としては、ファネロキータ属微生物由来 cDNA をイルベックス属微生物のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの部分アミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いた PCR により増幅して部分塩基配列を得て、得られた部分配列の前後の塩基配列を RACE - PCR により更に増幅し、得られる塩基配列をつなぎ合わせる方法を挙げることができる。

【0018】

すなわち、まず、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼをイルベックス属微生物から高度に精製し、得られる精製酵素の N 末端のアミノ酸配列を決定する (配列表の配列番号 9 参照)。また、この精製酵素を V8 プロテアーゼで消化し、得られる断片の N 末端アミノ酸配列 (すなわち、精製酵素の内部アミノ酸配列) についても解読する (配列表の配列番号 10 参照)。

10

一方、ファネロキータ属微生物から全 RNA を抽出後、3' RACE アダプタープライマーを用いる逆転写反応を行って一本鎖 cDNA を得る。

【0019】

次に、上記 N 末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列を基に、1 対のプライマー (それぞれ配列表の配列番号 11 及び 12 記載の塩基配列からなる。) を作成し、このプライマーを用いて、ファネロキータ属微生物から調製した cDNA を鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR 法) を行なう。その結果得られる PCR 産物は、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子の一部を構成する 504 bp の DNA 断片 (配列表の配列番号 13 記載の塩基配列からなる。) である。

20

【0020】

次に、RACE - PCR 法により、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子の全長を構成する塩基配列を決定する。

先に得られたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子の部分配列 (PCR 産物) を基に、2 対のプライマーを新たに作成し (それぞれ、配列表の配列番号 14 及び 15 記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号 16 及び 17 記載の塩基配列からなるプライマー)、これらを用いて上記ファネロキータ属微生物から調製した cDNA を鋳型とした 5' - RACE、及び 3' - RACE PCR を行い、それぞれ 1050 bp、622 bp の PCR 産物を得る。

得られた PCR 産物の塩基配列を解読し (配列表の配列番号 18 及び 19 参照)、これらをつなぎ合わせて、ファネロキータ属微生物由来のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの全長をコードする遺伝子 (配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなる。) を得ることができる。

30

【0021】

本発明の第一の遺伝子をファネロキータ属微生物から得る場合の方法は、上記例に限定されず、例えば、ファネロキータ属微生物の cDNA を適当なフェージベクターにパッケージングし、これを適当なフェージに感染させ cDNA ライブラリーを得て、続いて、配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列に基づいて作製したプローブをブランクハイブリダイゼーションさせて、目的とする DNA を特定し、回収して取得することもできる。

また、本発明の第一の遺伝子は、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列からなるものであれば、ファネロキータ属微生物以外の他の生物から得ることもできる。更に、DNA 自動合成機等を利用して配列表の配列番号 1 記載の塩基配列を合成しても良い。

40

【0022】

このような、第一の本発明のエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、pGEM - TEasy (プロメガ) 等の適当なプラスミドベクターに含ませることにより、プラスミドとすることができ、更に、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第 2 版" 1.74 章、Vol. 1 (1989) に記載された方法等に従い、該プラスミドで大腸菌を形質転換することにより、形質転換大腸菌を得ることができる。

50

本発明の第一の遺伝子を含むプラスミド pGEM-T Easy / P c 1, 3 - Gal を用いて形質転換して得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は FERM BP - 08652 である。

【0023】

次に、第二の本発明について説明する。

第二の本発明のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなるものであり、配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものである。

この本発明の遺伝子の入手方法について、特に限定はないが、クロストリディウム属微生物から得ることが好ましい。クロストリディウム属微生物としては、後述の実施例 2 で用いるクロストリディウム サーモセラム (ATCC 27405 株) を例示することができる。

クロストリディウム属微生物からの入手方法の一例としては、クロストリディウム属微生物のゲノム DNA を鋳型とし、目的とする DNA 全長を得るべくデザインしたプライマー (配列表の配列番号 20 及び 21 参照) を用いて PCR を行い、第二のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼをコードする遺伝子の全長をクローニングする方法を挙げることができる。

【0024】

本発明の第二の遺伝子をクロストリディウム属微生物から得る場合の方法は、上記例に限定されず、例えば、クロストリディウム属微生物のゲノム又は cDNA を適当なファージベクターにパッケージングし、これを適当なファージに感染させ DNA ライブラリーを得て、続いて、配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列に基づいて作製したプローブをプライクハイブリダイゼーションさせて、目的とする DNA を特定し、回収して取得することもできる。

また、本発明の第二の遺伝子は、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなるものであれば、クロストリディウム属微生物以外の他の生物から得ることもできる。更に、DNA 自動合成機等を利用して配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を合成しても良い。

【0025】

このような、第二の本発明のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、pGEM-T Easy (プロメガ) 等の適当なプラスミドベクターに含ませることにより、プラスミドとすることができ、更に、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第 2 版" 1.74 章、Vol. 1 (1989) に記載された方法等に従い、該プラスミドで大腸菌を形質転換することにより、形質転換大腸菌を得ることができる。

本発明の第二の遺伝子を含むプラスミド pGEM-T Easy / C t 1, 3 - Gal を用いて形質転換して得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は FERM BP - 08651 である。

【0026】

更に、第三の本発明及び第四の本発明について説明する。

第三の本発明のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、配列表の配列番号 5 記載の塩基配列からなるものであり、配列表の配列番号 6 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものである。また、第四の本発明のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列からなるものであり、それぞれ、配列表の配列番号 8 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものである。

これらの本発明の遺伝子の入手方法について、特に限定はないが、アラビドプシス属植物から得ることが好ましい。アラビドプシス属植物としては、後述の実施例 3 で用いるシロイヌナズナを例示することができる。

10

20

30

40

50

アラビドプシス属植物からの入手方法の一例としては、アラビドプシス属植物由来 cDNA を鋳型とし、目的とするそれぞれの DNA 全長を得るべくデザインしたプライマー（それぞれ、配列表の配列番号 22 及び 24 記載の塩基配列からなるプライマー、配列番号 26 及び 28 記載の塩基配列からなるプライマー。）を用いて PCR を行い、第三及び第四のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼをコードする遺伝子の全長をクローニングする方法を挙げることができる。

【0027】

本発明の第三及び第四の遺伝子をアラビドプシス属植物から得る場合の方法は、上記例に限定されず、例えば、アラビドプシス属植物の cDNA を適当なファージベクターにパッケージングし、これを適当なファージに感染させ cDNA ライブラリーを得て、続いて、配列表の配列番号 5 及び 7 に記載の塩基配列に基づいて作製したプローブをブランクハイブリダイゼーションさせて、目的とする DNA を特定し、回収して取得することもできる。

10

また、本発明の第三及び第四の遺伝子は、それぞれ配列表の配列番号 5 及び 7 記載の塩基配列からなるものであれば、アラビドプシス属植物以外の他の生物から得ることもできる。更に、DNA 自動合成機等を利用して配列表の配列番号 5 及び 7 のそれぞれに記載の塩基配列を合成しても良い。

【0028】

このような、第三の本発明及び第四の本発明のエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼ遺伝子は、pGEM-T Easy (プロメガ) 等の適当なプラスミドベクターに含ませることにより、プラスミドとすることができ、更に、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版" 1.74章、Vol. 1 (1989) に記載された方法等に従い、該プラスミドで大腸菌を形質転換することにより、形質転換大腸菌を得ることができる。

20

本発明の第三及び第四の遺伝子をそれぞれ含むプラスミド pGEM-T Easy / At 1, 3 - Gal 1 及び pGEM-T Easy / At 1, 3 - Gal 2 を用いて形質転換して得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は、それぞれ FERM BP - 08649、FERM BP - 08650 である。

30

【実施例】

【0029】

実施例 1

イルペックス ラクテウス (Irpex lacteus) の培養液であるドリセラゼ (協和発酵) より、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-cellulose (Whatman)、CM-Toyopearl (Tosoh) 及び Hydroxylapatite (Bio-rad)) を活用して高度に精製し、エキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼを得た。この精製酵素の N 末端のアミノ酸配列を、プロテインシーケンサー G1005A 型 (ヒューレットパカード) を用いて決定したところ、配列表の配列番号 9 に記載するアミノ酸配列からなることが分かった。

40

【0030】

また、「遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析」平野 久 著、東京化学同人、に記載の方法に従い、上記精製酵素を、V8 プロテアーゼ (V8 protease from Staphylococcus aureus (和光純薬工業)) により、SDS-PAGE ゲル中で室温、15 分の条件下で部分分解した。この分解産物の N 末端アミノ酸配列 (すなわち、精製酵素の内部アミノ酸配列) を、上記の同様に決定したところ、配列表の配列番号 10 に記載するアミノ酸配列からなることが分かった。

一方、ファネロキータ クライソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium: P. chrysosporium) を、セルロース 2%、2, 2 - ジメチルスクシネート 0.22%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.26%、 KH_2PO_4 0.

50

11%、MgSO₄・7水和物0.05%、CaCl₂・2水和物0.0074%、FeSO₄・7水和物0.001%、MnSO₄・7水和物0.0005%、ZnSO₄・7水和物0.0005%、CoCl₂・6水和物0.0001%、チアミン-HCl0.00001%、及び尿素0.00006%を含む培地で3日間培養した。得られた菌体から全RNAを抽出した後、このうちのmRNAを鋳型にして、3' RACEアダプタープライマー(Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、一本鎖cDNA(P. chrysosporium cDNA)を合成した。逆転写反応は、Ready-To-Go You-Prime First-strand Beads(Amersham Biosciences)を用い、予め65℃で10分間インキュベートして高次構造を崩した後、37℃で1時間インキュベートして行った。

10

【0031】

次いで、すでに公開されているP. chrysosporiumのゲノム情報に対して、上記N末端アミノ酸配列を用いたBLAST検索を行い、得られた情報を基にフォワードプライマー(配列表の配列番号11に記載する塩基配列からなる。)を設計した。また、P. chrysosporiumのゲノム情報に対して、上記内部アミノ酸配列を用いたBLAST検索を行い、得られた情報を基に、上記フォワードプライマーに対応するリバースプライマー(配列表の配列番号12に記載する塩基配列からなる。)を設計した。

これらのプライマーを用いて、上述したP. chrysosporium cDNAを鋳型としたPCR反応を行った。PCRの条件は、Ex Taq(TaKaRa)を使い、95℃・30秒、60℃・30秒、72℃・1分を30サイクルとした。

20

こうして得られたPCR産物をアガロース電気泳動にかけた結果、504bpの明瞭なバンドを得た。また、このPCR産物をpGEM-T Easy Vector Systems(PROMEGA)を用いてクローニングし(尚、ライゲーションは16、30分の反応で行った。)、DNAシーケンサーで分析して、塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号17記載の塩基配列からなることが明らかとなった。

更に、この塩基配列をアミノ酸に翻訳して、得られたアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、先に得られたN末端のアミノ酸配列(配列表の配列番号9及び10参照)と高い相同性が見出された。このことから、該PCR産物は、エキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の一部であると判断した。

【0032】

そこで、RACE-PCR法により、エキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の全長を構成する塩基配列の決定を試みた。

30

まず、P. chrysosporiumのゲノム情報に対して、先に得られたエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の部分配列(PCR産物)を用いたBLAST検索を行い、該PCR産物の5'上流に位置するようにフォワードプライマー(配列表の配列番号14記載の塩基配列からなる。)を設計すると共に、先に得られたエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の部分配列からリバースプライマー(配列表の配列番号15記載の塩基配列からなる。)を設計した。

これらを用いてP. chrysosporium cDNAを鋳型とした5' RACE PCRを行った。PCRの条件は、Ex Taq(TaKaRa)を使い、95℃・30秒、60℃・30秒、72℃・1分30秒を30サイクルとした。

40

こうして得られたPCR産物をアガロース電気泳動にかけた結果、1050bpの明瞭なバンドを得た。また、このPCR産物をpGEM-T Easy Vector Systems(PROMEGA)を用いてクローニングし(尚、ライゲーションは16、30分の反応で行った。)、DNAシーケンサーで分析して、塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号18記載の塩基配列からなることが明らかとなった。

【0033】

一方、先に得られたエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の部分配列(PCR産物)からフォワードプライマー(配列表の配列番号16記載の塩基配列からなる。)を新しく設計した。また、前記の3' RACEアダプタープライマー(Invitrogen)部

50

分に相補的な配列を持つプライマー（配列表の配列番号17記載の塩基配列からなる。）を設計した。PCRの条件は、Ex Taq（Takara）を使い、95・30秒、55・30秒、72・1分30秒を30サイクルとした。

これらを用いて*P. chrysosporium* cDNAを鋳型とした3'RACEを行った。

こうして得られたPCR産物をアガロース電気泳動にかけた結果、622bpの明瞭なバンドを得た。また、このPCR産物をpGEM-T Easy Vector Systems（Promega）を用いてクローニングし（尚、ライゲーションは16、30分の反応で行った。）、DNAシーケンサーで分析して、塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号19記載の塩基配列からなることが明らかとなった。

10

【0034】

RACE-PCRの結果得られた塩基配列の情報（配列表の配列番号18及び19参照）をつなぎ合わせて、配列表の配列番号1記載の塩基配列からなるDNAが得られた。

この塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号2に示す通りであり、分子量45,632のタンパク質を構成することが明らかとなった。また、該タンパク質は、N型糖鎖付加可能サイトを3カ所（配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の79番目、194番目及び389番目のアスパラギン）有するため、一般的に言われている糖鎖の分子量約2,000が3つ付加された場合の分子量は51,000~52,000であるものと推定された。これは、ファネロキータ属微生物の培養上清から得られた活性型エキソ-1,3-ガラクタナーゼの分子量が約51,000であるのと良く一致していた。

20

このことから、得られた塩基配列は、ファネロキータ属微生物由来のエキソ-1,3-ガラクタナーゼの全長をコードする遺伝子である可能性が高いことが明らかとなった。

【0035】

次に、このようにして得られたファネロキータ属微生物由来のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子を、PCRにより増幅した。PCRの条件は、Ex Taq（Takara）を使い、98・10秒、60・1分、72・2分を25サイクルとした。

こうして得られたPCR産物をプラスミドpGEM-T Easy（Promega）にTAクローニングして、プラスミドpGEM-T Easy/Pc1,3-Galを調製した。

30

【0036】

次に、ファネロキータ属微生物のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の発現を行った。

すなわち、シグナル配列部分（配列表の配列番号2の1~20番目のアミノ酸部分）を除いた部分をPCRにより増幅し、制限酵素EcoRIとNotIで分解したpPICZA（Invitrogen）に導入し、プラスミドpPICZA/Pc1,3-Galを調製した。pPICZA/Pc1,3-Galは酵母菌ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）KM71H株に形質転換した。形質転換体は、100μg/mlの濃度でゼオシンを含むYPG培地（1%酵母エキス、2%ペプトン、1%グリセロール）で30、3日間培養した後、遠心により菌体を回収し、YPM培地（1%酵母エキス、2%ペプトン、1%メタノール）に懸濁し、更に2日間培養することでタンパクの発現を行った。

40

続いて、発現させたタンパク質の性質について調べた。

【0037】

（1）分子量

まず、発現させたタンパク質の分子量について調べた。

SDS電気泳動により発現させたタンパク質の分子量をSDS電気泳動により調べたところ、約51,000であり、前述したファネロキータ属微生物の培養上清から得られた活性型エキソ-1,3-ガラクタナーゼの分子量とほぼ同じであった。

そこで、発現させたタンパク質を1,3-ガラクトンに対して実際に作用させたところ

50

、非還元末端からガラクトースを遊離するエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼとしての作用が確認されたことから、得られた遺伝子はエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼをコードするものであることが実際に確認された。

【 0 0 3 8 】

(2) 至適 p H および p H 安定性

次に、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの作用における至適 p H 及び p H 安定性を確認した。

すなわち、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼを、37 °C において p H を変えて 1 , 3 - ガラクタンに対して作用させたところ、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼ作用は p H 4 . 5 近傍でピークに達した。

また、30 °C で 1 時間放置した後に 1 , 3 - ガラクタンに対して p H を変えて作用させたところ、p H 3 . 0 ~ 6 . 0 の範囲で安定に作用した。

これらの結果から、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの至適 p H は p H 4 . 5 近傍にあると共に p H 3 . 0 ~ 6 . 0 の範囲で安定であることが分かった。

【 0 0 3 9 】

(3) 至適温度および温度安定性

更に、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの作用における至適温度及び p H 安定性を確認した。

一方、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼタンパク質を、p H 4 . 5 で 1 5 分間 1 , 3 - ガラクタンに対して作用させたところ、エキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの作用は、50 °C 近傍でピークに達した。

また、p H 4 . 5 で 1 時間放置した後に 1 , 3 - ガラクタンに対して作用させたところ、55 °C 以下で安定に作用した。

これらの結果から、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼの至適温度は 50 °C 近傍にあると共に、55 °C 以下で安定であることが分かった。

【 0 0 4 0 】

(4) 基質特異性

発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼを、種々の多糖類 (基質) に対して作用させ、基質特異性を調べた。

すなわち、10 mg / ml 基質 50 μ l 及びマクイルバイン (M c I l v a i n e) 緩衝液 (p H 4 . 5) 40 μ l に、酵素液 10 μ l を加えて 37 °C で 2 4 時間反応させた。S o m o g y i - N e l s o n 法にて還元力を測定し、分解率 (%) に換算した。

各基質の反応液における濃度、及び分解率 (%) を、表 1 に示した。

【 0 0 4 1 】

【表 1】

基質	濃度	分解率 (%)
β - 1 , 3 - ガラクタン	5 m g / m l	1 0 0
p e c t i c ガラクタン	5 m g / m l	0
L a r c h アラビノガラクトン	5 m g / m l	0
アラビナン	5 m g / m l	0
アラビアゴム	5 m g / m l	0
d e b r a n c h e d アラビナン	5 m g / m l	0
ラミナリン	5 m g / m l	0
可溶性 b i r c h w o o d キシラン	5 m g / m l	0
可溶性 o a t s p e l t s キシラン	5 m g / m l	0

【 0 0 4 2 】

続いて、発現させたエキソ - 1 , 3 - ガラクタナーゼを、種々の p - ニトロフェニル基質に対して作用させ、p - ニトロフェニル基質に対する特異性を調べた。

すなわち、2 mM 基質（表 2 参照）25 μ l 及びマクイルバイン緩衝液（pH 4.5）20 μ l に、酵素液 5 μ l を加えて 37 で 10 分間反応させた。0.2 M 炭酸ナトリウム 100 μ l を加えることにより反応を停止し、400 nm の吸光度を測定して、分解率（%）に換算した。

各基質の分解率（%）を、表 2 に示した。

【0043】

【表 2】

	基質	分解率（%）
p-ニトロフェニル	β -D-ガラクトピラノシド	0
p-ニトロフェニル	α -D-ガラクトピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-グルコピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-マンノピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -L-アラビノピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-キシロピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-フコピラノシド	0

【0044】

表 1 及び表 2 に示すように、発現させたエキソ-1,3-ガラクタナーゼは、-1,3-ガラクトンのみを 100% 分解したことから、-1,3-ガラクトンに対し基質特異性を有することが確認された。

【0045】

さらに、このプラスミド pGEM-T Easy/Pc1,3-Gal を用いて、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第 2 版" 1.74 章 Vol. 1 (1989) に記載された方法に従い、大腸菌を形質転換した。こうして得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は FERM BP-08652 である。

【0046】

実施例 2

前記実施例 1 において得られたファネロキータ属微生物のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子のアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、クロストリディウムサーモセラム (*Clostridium thermocellum*: ATCC 27405 株) の機能未知な配列と約 30.7% の相同性が見出された。

そこで、この機能未知な配列を基に一对のプライマー（配列表の配列番号 20 及び 21 に記載する塩基配列からなる。）を化学合成した。

【0047】

一方、クロストリディウムサーモセラムから、K. Sakka らの方法 (*Agric. Biol. Chem.* (日本農芸化学会欧文誌) 53 巻 905-910 頁, 1989 年) に従い、ゲノム DNA を調製した。

これらのゲノム DNA を鋳型として、上述のプライマーを用いた PCR 反応を行った。PCR の条件は、Ex Taq (Takara) を加え、98、3 分の前処理で DNA を変性させた後、98・10 秒、57・1 分、72・2 分で 25 サイクル行った後、さらに 72 で 5 分間の伸長反応を行うものとした。

こうして得られた PCR 産物をアガロース電気泳動にかけた結果、1716 bp の明瞭なバンドを得た。また、この PCR 産物を pGEM-T Easy Vector Systems (PROMEGA) を用いてクローニングし（尚、ライゲーションは 16、1 時間の反応で行った。）、DNA シークエンサーで分析して、塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列からなることが明らかとなった。

この塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、分子量 63,894 のタンパク質を構成し

10

20

30

40

50

、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号4に示す通りであった。分泌シグナル配列（配列番号4記載のアミノ酸配列のうち、1～30番目の部分）を除いた成熟タンパクの分子量は60,994であることが明らかとなった。

【0048】

次に、このようにして得られたDNAを、実施例1と同様にしてプラスミドpGEM-T Easy (PROMEGA)にTAクローニングして、プラスミドpGEM-T Easy/Ct1,3-Galを調製した。

さらに、このプラスミドpGEM-T Easy/Ct1,3-Galを用いて、Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第2版" 1.74章、Vol. 1 (1989)に記載された方法に従い、大腸菌を形質転換した。こうして得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号はFERM BP-08651である。

【0049】

このクロストリディウム属微生物のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子を大腸菌で発現させた。

すなわち、シグナル配列部分（配列表の配列番号4の1～30番目のアミノ酸部分）を除いた部分をPCRにより増幅し、制限酵素MscIとXhoIで分解し、同様に制限酵素MscIとXhoIで分解したpET27b (Novagen)に導入し、プラスミドpET27/Ct1,3-Galを調製した。pET27/Ct1,3-Galは大腸菌Rosetta (DE3)株に形質転換した。形質転換体は、50 µg/mlの濃度のカナマイシンおよび34 µg/mlの濃度のクロラムフェニコールを含むLB培地で37、16時間前培養した。培養液5mlを、同じく50 µg/mlの濃度のカナマイシンおよび34 µg/mlの濃度のクロラムフェニコールを含むLB培地100mlに移し、500mlのフラスコで37でOD600が0.5になるまで培養した後、終濃度1mMになるようにIPTGを加え、更に25で24時間培養することでタンパクの発現を行った。

続いて、発現させたタンパク質の性質について調べた。

【0050】

(1) 分子量

まず、発現させたタンパク質の分子量について調べた。

SDS電気泳動により発現させたタンパク質の分子量をSDS電気泳動により調べたところ、約65,000であり、これは前記成熟タンパクの分子量と良く一致していた。

そこで、発現させたタンパク質を1,3-ガラクトンに対して実際に作用させたところ、非還元末端からガラクトースを遊離するエキソ-1,3-ガラクタナーゼとしての作用が確認されたことから、得られた遺伝子はエキソ-1,3-ガラクタナーゼをコードするものであることが実際に確認された。

【0051】

(2) 至適pHおよびpH安定性

次に、発現させたエキソ-1,3-ガラクタナーゼの作用における至適pH及びpH安定性を確認した。

すなわち、発現させたエキソ-1,3-ガラクタナーゼを、37においてpHを変えて1,3-ガラクトンに対して作用させたところ、エキソ-1,3-ガラクタナーゼ作用はpH6.0近傍でピークに達した。

また、30で1時間放置した後に1,3-ガラクトンに対してpHを変えて作用させたところ、pH2.0～10.0の範囲で安定に作用した。

これらの結果から、発現させたエキソ-1,3-ガラクタナーゼの至適pHはpH6.0近傍にあると共にpH2.0～10.0の範囲で安定であることが分かった。

【0052】

10

20

30

40

50

(3) 至適温度および温度安定性

更に、発現させたエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼの作用における至適温度及び pH 安定性を確認した。

一方、発現させたエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼを、pH 6.0 で 10 分間 1, 3 - ガラクタンに対して作用させたところ、エキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼの作用は、50 近傍でピークに達した。

また、pH 6.0 で 1 時間放置した後に 1, 3 - ガラクタンに対して作用させたところ、70 以下で安定に作用した。

これらの結果から、発現させたエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼの至適温度は 50 近傍にあると共に、70 以下で安定であることが分かった。

10

【0053】

(4) 基質特異性

発現させたエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼを、種々の多糖類 (基質) に対して作用させ、基質特異性を調べた。

すなわち、10 mg/ml 基質 50 μ l 及びマクイルバイン緩衝液 (pH 6.0) 40 μ l に、酵素液 10 μ l を加えて 37 で 24 時間反応させた。Somogyi - Nelson 法にて還元力を測定し、分解率 (%) に換算した。

各基質の反応液における濃度、及び分解率 (%) を、表 3 に示した。

【0054】

【表 3】

20

基質	濃度	分解率 (%)
β - 1, 3 - ガラクタン	5 mg/ml	100
pectic ガラクタン	5 mg/ml	0
Larch アラビノガラクトン	5 mg/ml	0
アラビナン	5 mg/ml	0
アラビアゴム	5 mg/ml	0
debranched アラビナン	5 mg/ml	0
ラミナリン	5 mg/ml	0
可溶性 birchwood キシラン	5 mg/ml	0
可溶性 oat speltz キシラン	5 mg/ml	0

30

【0055】

続いて、発現させたエキソ - 1, 3 - ガラクタナーゼを、種々の p - ニトロフェニル基質に対して作用させ、p - ニトロフェニル基質に対する特異性を調べた。

すなわち、2 mM 基質 (表 4 参照) 50 μ l 及びマクイルバイン緩衝液 (pH 4.5) 20 μ l に、酵素液 5 μ l を加えて 37 で 10 分間反応させた。0.2 M 炭酸ナトリウム 100 μ l を加えることにより反応を停止し、400 nm の吸光度を測定して、分解率 (%) に換算した。

各基質の分解率 (%) を、表 4 に示した。

40

【0056】

【表 4】

	基質	分解率 (%)
p-ニトロフェニル	β -D-ガラクトピラノシド	0
p-ニトロフェニル	α -D-ガラクトピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-グルコピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-マンノピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -L-アラビノピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-キシロピラノシド	0
p-ニトロフェニル	β -D-フコピラノシド	0

10

【0057】

表3及び表4に示すように、発現させたエキソ-1,3-ガラクタナーゼは、-1,3-ガラクトンのみを100%分解したことから、-1,3-ガラクトンに対し基質特異性を有することが確認された。

【0058】

実施例3

前記実施例1において得られたファネロキータ属微生物のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子のアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、アラビドプシスタリアナ (*Arabidopsis thaliana*) の2種類の機能未知な配列とそれぞれ約37.9%、約38.6%の相同性が見いだされた。

20

そこで、これらの機能未知な配列を基に、それぞれについて一对のプライマー(配列表の22と24及び26と28に記載する塩基配列からなる。)を化学合成した。

【0059】

一方、アラビドプシス属植物から、全RNAを抽出した後、このRNAを鋳型にしてReverse Transcription (TOYOBO)を用い、42℃で1時間反応させcDNAを調製した。

このcDNAを鋳型として、上述のプライマーを用いたPCR反応を行った。PCRの条件は、LA Taq (Takara)を用い、98℃・1分、65℃・1分、72℃・2分のサイクルのサイクルを25サイクルとした。

こうして得られたPCR産物をアガロース電気泳動にかけた結果、それぞれ1413bp、1428bpの明瞭なバンドを得た。また、このPCR産物をpGEM-T Easy Vector Systems (PROMEGA)を用いてTAクローニングし、プラスミドpGEM-T Easy/At1,3-Gal1及びpGEM-T Easy/At1,3-Gal2を調製した。DNAシーケンサーで分析して、それぞれの塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号5及び7記載の塩基配列からなることが明らかとなった。

30

この塩基配列をアミノ酸に翻訳したところ、分子量53,250及び53,785のタンパク質を構成し、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号6及び8に示す通りであった。また、該アミノ酸配列のN末端領域には、いずれも膜結合領域(配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列の15~37番目、及び配列表の配列番号8記載のアミノ酸配列の23~45番目)が観察されたことから、該アミノ酸配列は、膜結合タンパク質をコードするものであることが示唆された。

40

【0060】

次に、このようにして得られたDNAを、実施例1と同様にしてプラスミドpGEM-T Easy (PROMEGA)にTAクローニングして、プラスミドpGEM-T Easy/1,3-Gal1を調製した。

このようにして得られたアラビドプシス属植物のエキソ-1,3-ガラクタナーゼ遺伝子の発現を行った。

すなわち、得られたpGEM-T Easy/At1,3-Gal1及びpGEM-T Easy/At1,3-Gal2をそれぞれ鋳型とし、配列表の配列番号23及び24

50

記載の塩基配列からなるプライマー、及び配列番号 27 及び 28 記載の塩基配列からなるプライマーをそれぞれ用いて PCR を行い、膜結合領域を含まない部分のみをそれぞれ増幅した。

【0061】

各 PCR 産物（それぞれ配列表の配列番号 25 及び 29 記載の塩基配列からなる。）を、制限酵素 EcoRI と KpnI で分解し、同様に制限酵素 EcoRI と KpnI で分解した pPICZ A (Invitrogen) に導入し、プラスミド pPICZ A / At1, 3-Gal1 及び pPICZ A / At1, 3-Gal2 を調製した。pPICZ A / At1, 3-Gal1 及び pPICZ A / At1, 3-Gal2 は、それぞれ酵母菌ピキア・パストリス KM71H 株に形質転換した。形質転換体は、100 µg / ml の濃度でゼオシンを含む YPG 培地（1% 酵母エキス、2% ペプトン、1% グリセロール）で 30、3 日間培養した後、遠心により菌体を回収し、YPM 培地（1% 酵母エキス、2% ペプトン、1% メタノール）に懸濁し、更に 2 日間培養することでタンパクの発現を行った。

10

発現タンパクを 1, 3-ガラクトタンに作用させたところガラクトースを遊離した。このことから、得られた塩基配列は、シロイヌナズナ由来のエキソ-1, 3-ガラクタナーゼの全長をコードする遺伝子であることが明らかとなった。

【0062】

さらに、このプラスミド pGEM-T Easy / At1, 3-Gal1 及び pGEM-T Easy / At1, 3-Gal2 を用いて、実施例 1 と同様にして Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 第 2 版" 1.74 章、Vol. 1 (1989) に記載された方法に従い、大腸菌を形質転換した。こうして得られた形質転換大腸菌は、日本国茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6 の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は、それぞれ FERM BP-08649、FERM BP-08650 である。

20

【産業上の利用可能性】

【0063】

本発明によれば、エキソ-1, 3-ガラクタナーゼの遺伝的情報が提供されるので、エキソ-1, 3-ガラクタナーゼの工業的な生産が可能となる。

30

エキソ-1, 3-ガラクタナーゼは、アラビノガラクトタン-プロテインに作用することから、本発明は、アラビノガラクトタン-プロテインの糖鎖構造解析用の試薬として、該糖タンパク質の構造解析の進展に寄与するものである。また、アラビノガラクトタン-プロテインの物性を改変し、増粘剤としての用途を切り開くことも可能である。

更に、エキソ-1, 3-ガラクタナーゼは、動物のプロテオグリカンにも作用する可能性があることから、本発明は、動物のプロテオグリカン糖鎖遊離用酵素としても利用が期待される。

【配列表】

[2005245303000001.app](#)

フロントページの続き

- (72)発明者 円谷 陽一
東京都北区赤羽台3 - 2 1 - 1 2
- (72)発明者 小竹 敬久
埼玉県さいたま市桜区中島1 - 1 8 - 1 号
- (72)発明者 鯨島 正浩
東京都町田市旭町3 - 1 5 - 1 2
- (72)発明者 五十嵐 圭日子
東京都八王子市廿里町2 6 - 1 8 芳樹館1 2 0 5号室
- (72)発明者 吉田 誠
東京都文京区本郷5 - 1 7 - 4 ハイムえりか1 0 1号室
- Fターム(参考) 4B024 AA03 BA12 CA04 CA05 CA11 DA06
4B065 AA01Y AA23Y AA26X AB01 CA31 CA41