

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/175694

発行日 令和1年5月9日 (2019. 5. 9)

(43) 国際公開日 平成29年10月12日 (2017. 10. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/60 (2006.01)	C 1 2 N 15/60	4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88	4 B 0 6 4
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 C	
G O 1 N 30/02 (2006.01)	G O 1 N 30/02 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2018-510583 (P2018-510583)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/013871	
(22) 国際出願日 平成29年4月3日 (2017. 4. 3)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-75364 (P2016-75364)	(74) 代理人 100108280 弁理士 小林 洋平
(32) 優先日 平成28年4月4日 (2016. 4. 4)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 柴田 敏行 日本国三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 三 重大学大学院生物資源学研究科内
	(72) 発明者 三宅 英雄 日本国三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 三 重大学大学院生物資源学研究科内
	(72) 発明者 村瀬 祥光 日本国三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 三 重大学大学院生物資源学研究科内

最終頁に続く

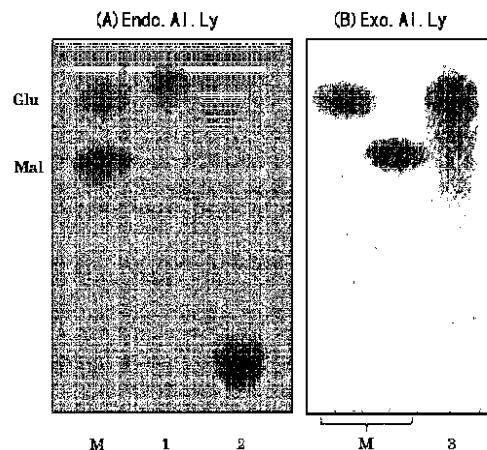
(54) 【発明の名称】 アルギン酸リアーゼ及び当該酵素を用いる不飽和ウロン酸単糖の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 新規なアルギン酸リアーゼ及び当該酵素を用いた不飽和ウロン酸単糖の製造方法を提供すること。

【解決手段】 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は当該配列と少なくとも90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドによって達成される。このポリペプチドは、(a) ウロン酸部分を含むアルギン酸に対し、当該ポリペプチドを接触させる酵素添加工程、(b) 前記アルギン酸とポリペプチドの混合物を前記エキソ型アルギン酸リアーゼ活性が働く温度で保持する酵素作用工程を備えた4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) の製造方法に用いられる。

【選択図】 図 1 0



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項 3】

請求項 2 に記載のDNAを請求項 1 に記載のポリペプチドを発現可能な状態で有する発現用ベクター。

10

【請求項 4】

(a) ウロン酸部分を含むアルギン酸に対し、請求項 1 に記載のポリペプチドを接触させる酵素添加工程と、
(b) 前記アルギン酸とポリペプチドの混合物を前記エキソ型アルギン酸リアーゼ活性が働く温度で保持する酵素作用工程と、
を備える4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) の製造システム。

【請求項 5】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチド。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のDNAを請求項 5 に記載のポリペプチドを発現可能な状態で有する発現用ベクター。

【請求項 8】

(c) ウロン酸部分を含むアルギン酸に対し、請求項 1 に記載のポリペプチド及びエンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドの二種類のポリペプチドを接触させる複数酵素添加工程と、
(d) 前記アルギン酸と二種類のポリペプチドの混合物を前記アルギン酸リアーゼ活性が働く温度で保持する複数酵素作用工程と、
を備えるDEHの製造システム。

30

【請求項 9】

前記エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドが、請求項 5 に記載のポリペプチドである請求項 8 に記載のDEHの製造システム。

【請求項 10】

陰イオン分析用カラムと、移動相として一種類のギ酸含有アンモニウム緩衝液とを有するHPLC (高速液体クロマトグラフ) 部を備えるDEH測定用LC-MS (液体クロマトグラフ質量分析計) 装置。

【請求項 11】

HPLC (高速液体クロマトグラフィー) において陰イオン分析用カラムを使用し、移動相として一種類のギ酸含有ギ酸アンモニウム緩衝液を用いるLC/MS (液体クロマトグラフィー質量分析) を用いたDEHの測定方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、アルギン酸リアーゼ及び当該酵素を用いる不飽和ウロン酸単糖の製造方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

50

世界の水生植物の種類別生産量の割合を見ると、700万トン中68.6%を褐藻類が占め、その構成多糖類はアルギン酸が最も多く、約30%である。褐藻類はコンブやワカメなど一部は食用として利用されているが、大部分は未利用資源である。褐藻類は、耕地や新鮮な水、肥料を必要とせず、天然でゲル状に存在しているため、陸生バイオマスに比べると容易に酵素反応を行えるなどの利点が注目されている。特に日本は国土が海に囲まれ、世界でも有数の海洋面積を誇ることから、褐藻類の利用ができれば安定した原料供給源と成り得る。また、褐藻類の構成多糖類としてはアルギン酸が最も多いことから、アルギン酸の利用が重要となってくる。

アルギン酸は α -D-マンヌロン酸とそのC5エピマーである α -L-グルロン酸の2種のウロン酸がグリコシド結合で結合した直鎖状のポリマーであり(図1)、 α -D-マンヌロン酸が結合したpoly(M)ブロック、 α -L-グルロン酸が結合したpoly(G)ブロック、 α -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸が交互に結合したpoly(M・G)ブロックの3画分が混在している。

【0003】

これまでに、アルギン酸を代謝することができる数種類の微生物が発見されており、これらの微生物はアルギン酸リアーゼを持つ。アルギン酸リアーゼは α -eliminationによってグリコシド結合を切断するpolysaccharide lyases (PLs) に属する。現在、アルギン酸リアーゼはPL5、PL6、PL7、PL14、PL15、PL17、PL18ファミリーに分けられている。また、切断様式としては、ポリマーを飽和オリゴ糖と不飽和オリゴ糖に分解するエンド型のもの、ポリマーを飽和単糖や不飽和単糖に分解するエキソ型のもの2種類が知られている。現在のところ、PL5とPL7ファミリーはエンド型、PL15とPL17ファミリーはエキソ型であるとされている。

エキソ型アルギン酸リアーゼによる分解で生じた不飽和単糖は非酵素的反応により不飽和二重結合が開裂することにより開環し、4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) になる。一部の海洋微生物や代謝改変した発酵微生物はDEHを資化することで乳酸やコハク酸などの有機酸や、バイオエタノールなどのバイオ燃料を作ることができる。このため、DEHを効率的に製造する方法が研究されている(特許文献1、2、非特許文献1~5)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2012-235773号公報

【特許文献2】特開2012-210208号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Bioprocess Biosyst Eng, Vol.37, No.10, Page 2105-2111 (2014.10)

【非特許文献2】日本生物工学会大会講演要旨集、Vol. 67th, Page 97 (2015.09.25)

【非特許文献3】マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、Vol. 17th, Page 68 (2015.05.30)

【非特許文献4】マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、Vol. 16th, Page 53 (2015.05.31)

【非特許文献5】日本生物工学会大会講演要旨集、Vol. 65th, Page 59 (2013.08.25)

【非特許文献6】Da Mao Wang, Hee Taek Kim, Eun Ju Yun Do Hyung Kim, Yong-Cheol Park, Hee Chul Woo, Kyoung Heon Kim (2014) Optimal production of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid from alginate for brown macro algae saccharification by combining endo- and exo-type alginate lyases. Bioprocess Biosyst Eng 37, 2105-2111

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、未だに工業的なレベルでウロン酸単糖を製造可能なアルギン酸リアーゼ

及び当該酵素を用いたウロン酸単糖の製造方法は知られていなかった。

本発明は、上記した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、新規なアルギン酸リアーゼ及び当該酵素を用いた不飽和ウロン酸単糖の製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するための発明に係るポリペプチドは、配列番号1 (MSTENKSRSNLFLPLDEPKAGRLTIQYGPLETTTLIENPPRFSWLPVIEDGATYALRISTDPEYSAANTLLFSGIQLNFFTPDAPLAAGTWYWSYACDASGKPVTEWSTSRRITLDEGLPQTPLAPRKTRFDAATRAHPRLWMDGGRLEQFRKDVAADPTHCTWSTFFEGSVLPWMDRDIIIEEPVGYPDHKRVAKIWRKVYIECQELMYAIRHLAVGGQVTQDAAMLARAKEWLLSAARWNPAGTTSTRAYTDEWAFRVNLALAWGYDWLYDQLDEDERTLVRTALLERTRQTADHLMRHASIHLFPFDSHAVRAVSAVLI PACIALLDDEPEAEDWLNAYAVEFLFTVYSPWGDHDDGGWAEGPHYWMTGMAYLIDAANLLRGWSGIDLQYRPFQKGTDFPLYTKAPDTRRATFGDDSTMGDLPAIKVGYNLRQYAGVTGNGAYQWYYDEILRTNPGTEMAFYNWGWDFRFDDEMLYRTDFPIVEAVPPADEDALRWFKGI GWVAIQHRMQAPDEHVQFVFKSSPYGSI SHSHGDQNAFCLSAFGEDLAI QSGHYVAFNSTMHQNWRRQTL SKNAI LIDGKGQYAGKDKAIAMQSTGKVINI AEDRGDHI FLQGDAT EAYRTLSP EYRSVVRDVYFVNREYFVIVDAIDADTPVSI DWRLHANAPFNLGDSFRYTGKAGFYGQILWSEAGPAELTQETGFPDVPSEIEGLPVSTCLTARFPKSTRHRITATLIVPYALDAPRRIFSFLDDQGYDCDLYFTDANDNSFRVIVPKTFDVGTPGIKNN) に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有する。

10

【0008】

また、上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドをコードするDNAを提供できる。当該DNAは、上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドを発現可能な状態で有する発現用ベクターを提供できる。

20

また、別の発明に係る4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH)の製造システムは、(a)ウロン酸部分を含むアルギン酸に対し、上記ポリペプチドを接触させる酵素添加工程と、(b)前記アルギン酸とポリペプチドの混合物を前記エキソ型アルギン酸リアーゼ活性が働く温度で保持する酵素作用工程とを備える。上記(a)及び(b)の工程を備えた方法によってもDEHを製造できる。

また、別の発明に係るポリペプチドは、配列番号2 (MSLKLRTFCLAGTATIFVALPSTYALAAGTGACTGVSQLAIVSASDDGTFDDIYAPEFAIDGEGFPSSRWSSLGEGKQLVLDLGEPTVSEVGLAWYKGNERTSSFTLEASNDGENWMLMDRTEASAGKSEAVEKYSFDATEARYVRVTGMGNSASGWSLSYEAQVFGCGSGEIAATGDGSGEVEKADVSAAYGLRTDVPPSENFDLTHWKLTLPADRDNDGKVDEIEEEELQGWSDPRFFYTDPATGGMVFRTPADGKTTSGSHYTRSELEREMIRGGDKSIATRVDGTPNKNWVWFSTAPEEAQALAGGVDGTMATLAVNHVTRTGESGKIGRVIIGQIHAMDDEPIRLYYRKLPTNKYGSIFYAHEPVGDDDLVNVIGDRGSDIDNPADGIALDEVFSYIEKVTSEEKDGELHPILNVSITRDDGTVVKAEPYDMFESGYSTDKDFMYFKAGAYSQNNSTWPDFFDQVTFYALDVTHGE) に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有する。

30

【0009】

また、上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドをコードするDNAを提供できる。当該DNAは、上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドを発現可能な状態で有する発現用ベクターを提供できる。

40

また、別の発明に係るDEHの製造システムは、(c)ウロン酸部分を含むアルギン酸に対し、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチド、及びエンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドの二種類のポリペプチドを接触させる複数酵素添加工程と、(d)前記アルギン酸と二種類のポリペプチドの混合物を前記アルギン酸リアーゼ活性が働く温度で保持する複数酵素作用工程とを備える。上記(c)及び(d)の工程を備えた方法によってもDEHを製造できる。

このとき、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドとしては、いずれのエンド型アルギン酸リアーゼを用いることもできるが、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるも

50

のであって、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドを用いることが好ましい。

本件発明に係るポリペプチドは、配列番号1又は配列番号2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドである。また、本件発明に係る不飽和ウロン酸単糖の製造方法に用いられるポリペプチドは、配列番号1及び/又は配列番号2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0010】

アミノ酸配列の同一性としては、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、より好ましくは95%、96%、97%、98%若しくは99%、又は100%同一である。

10

配列番号1又は配列番号2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドは、当然にアルギン酸リアーゼ活性を有する。

配列番号1に示すアミノ酸配列を持つポリペプチドは、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有する新規な酵素(Exo.A1.Ly)である。このアミノ酸配列は、公知のエキソ型アルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と比較して40%以下の同一性しか示さなかった。また、その酵素活性は、公知の酵素の活性に比べても、十分に強いものであった。

配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を持つポリペプチドは、配列番号1に示すポリペプチドのエキソ型アルギン酸リアーゼ活性と比べて、30%以上、好ましくは50%以上又は70%以上のエキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有する。

20

【0011】

上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号1に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを意味する。DNAは、3個の連続する塩基が一つのアミノ酸をコードしており、アミノ酸の種類によっては、複数のコードが対応しうる。DNA配列は、上記ポリペプチドをコードするものであれば、遺伝暗号を参照して、適当な配列を指定できる。但し、発現に用いる発現用ベクターの安定性・発現系に応じて、タンパク質発現性の良好なものを指定することが好ましい。大腸菌で発現するベクターを用いる場合には、配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNAとして、配列番号3に示すものを使用できる。

30

【0012】

配列番号2に示すアミノ酸配列を持つポリペプチドは、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有する新規な酵素(Endo.A1.Ly)である。このアミノ酸配列は、公知のエンド型アルギン酸リアーゼのアミノ酸配列と比較して40%以下の同一性しか示さなかった。また、その酵素活性は、公知の酵素の活性に比べても、十分に強いものであった。

配列番号2に示すアミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を持つポリペプチドは、配列番号2に示すポリペプチドのエンド型アルギン酸リアーゼ活性と比べて、30%以上、好ましくは50%以上又は70%以上のエンド型アルギン酸リアーゼ活性を有する。

40

上記アミノ酸配列を備えたポリペプチドをコードするDNAとは、配列番号2に示されるアミノ酸配列又は当該アミノ酸配列と少なくとも90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を備えるものであって、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを意味する。DNA配列は、上記ポリペプチドをコードするものであれば、遺伝暗号を参照して、適当な配列を指定できる。大腸菌で発現するベクターを用いる場合には、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAとして、配列番号4に示すものを使用できる。

【0013】

本発明において、「単離された」ポリペプチドというときは、自然界に存在しない程度まで分離・精製され、目的とするアルギン酸リアーゼ活性を示すことを意味し、必ずしも不純物を全く含まないことを意味するものではない。

50

本発明において、「アルギン酸」とは、不飽和ウロン酸単糖を製造するための出発材料として使用するものを意味し、褐藻類から得られたアルギン酸やエンド型アルギン酸リアーゼによって部分的に分解されたアルギン酸（例えばオリゴ糖）が含まれる。

本発明において、「不飽和ウロン酸単糖」とは、アルギン酸又はアルギン酸オリゴ糖末端から、エキソ型アルギン酸リアーゼの -脱離反応により遊離した非還元末端に二重結合を持つ不飽和単糖を意味する。

本発明において、「ウロン酸部分」とは、アルギン酸中において 1-4結合したMもしくはGを意味する。

【0014】

本発明において、アルギン酸と一種類又は二種類のポリペプチドを「接触させる」とは、ポリペプチドが有するアルギン酸リアーゼ活性を示す状態で、両物質を固体、水溶液又は懸濁液のいずれかの形態で混合することを意味する。アルギン酸と一種類又は二種類のポリペプチドは、混合する前にそれぞれ異なる形態であっても良い。

本発明において、「アルギン酸リアーゼ活性が働く温度」とは、ポリペプチドが持つアルギン酸リアーゼ活性が失われることなく、所定の時間（例えば、72時間以下、好ましくは24時間以下、更に好ましくは3時間以下）作用しうる温度のことを意味する。温度条件については、その他の反応条件（例えば、アルギン酸濃度、ポリペプチドの濃度、水溶液の種類（アルギン酸とポリペプチド以外の成分を含まない水、適当な塩を含む水溶液など）などの条件を含む）に応じて、適宜に決定できる。

アルギン酸に二種類のポリペプチド（エンド型アルギン酸リアーゼ又はエキソ型アルギン酸リアーゼ）を接触させる場合には、二種類のポリペプチドを同時に接触させることもできる、順次に接触させることもできる。

【0015】

また、別の発明に係るDEH測定用LC-MS（液体クロマトグラフ質量分析計）装置は、陰イオン分析用カラムと、移動相として一種類のギ酸含有ギ酸アンモニウム緩衝液とを有するHPLC（高速液体クロマトグラフ）部を備える。また、本発明は、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）において陰イオン分析用カラムを使用し、移動相として一種類のギ酸含有ギ酸アンモニウム緩衝液を用いるLC/MS（液体クロマトグラフィー質量分析）を用いたDEHの測定方法を提供できる。

上記構成によれば、HPLCの移動相として一種類のギ酸含有ギ酸アンモニウム緩衝液を用いれば、グラジエント送液を用いることなくDEHを分析できる。このため、グラジエント送液を用いる方法に比べると、サンプル1本あたりの測定に掛かる時間が少なくて済むため、多くのサンプルを迅速に処理できる。

陰イオン分析用カラムとしては、各社の市販品を用いることができる。但し、これらのうちShodex IC NI-424またはI-524Aを用いることが好ましい。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、エキソ型アルギン酸リアーゼ活性を持つ配列番号1に示すポリペプチド、エンド型アルギン酸リアーゼ活性を持つ配列番号2に示すポリペプチド、及びこれらのポリペプチドを用いた不飽和ウロン酸単糖の製造方法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】アルギン酸の化学構造を示す図である。

【図2】PCRで増幅したExo.AI.Ly遺伝子のアガロース電気泳動結果を示す写真図である。Lane Mは1 kb DNA Ladder（NEW ENGLAND Bio Labs）、Lane 1はExo.AI.Lyを、それぞれ示す。

【図3】目的遺伝子を導入した各プラスミドのアガロースゲル電気泳動結果を示す写真図である。Lane Mは1 kb DNA Ladder（NEW ENGLAND Bio Labs）、Lane AはpET25b(+)-Endo.AI.Ly、Lane BはpET22b(+)-Exo.AI.Lyを、それぞれ示す。

【図4】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyの発現を確認した結果を示すSDS-PAGE写真図で

10

20

30

40

50

ある。Lane Mはタンパク質マーカー、Lane 1はIPTG誘導なし、Lane 2はIPTG0.1 mM添加、Lane 3はIPTG1 mM添加を、それぞれ示す。

【図5】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyの可溶化を確認した結果を示すSDS-PAGE写真図である。Lane Mはタンパク質マーカー、Lane 1は分離前懸濁液、Lane 2は可溶性画分、Lane 3は不溶性画分を、それぞれ示す。

【図6】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.LyをNiアフィニティークロマトグラフィーで精製した後のSDS-PAGE写真図である。Lane Mはタンパク質マーカー、Lane 1~11は溶出画分を、それぞれ示す。

【図7】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyを陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した後のSDS-PAGE写真図である。Lane Mはタンパク質マーカー、Lane 1~11は溶出画分を、それぞれ示す。

【図8】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyをゲル濾過クロマトグラフィーで精製した後のSDS-PAGE写真図である。Lane Mはタンパク質マーカー、Lane AはEndo.AI.Ly、Lane BはExo.AI.Lyを、それぞれ示す。

【図9】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyの酵素活性を確認した結果を示すグラフである。

【図10】(A)Endo.AI.Ly及び(B)Exo.AI.Lyの組み合わせによるTLCの結果を示す写真図である。Lane Mはマーカー (Glucose (Glu)、Maltose (Maltose))、Lane 1はExo.AI.Lyのみによる生成物、Lane 2はEndo.AI.Lyのみによる生成物、Lane 3はEndo.AI.Ly及びExo.AI.Lyによる生成物を、それぞれ示す。

【図11】Exo.AI.Lyのみによる生成物をLC/MSで測定した結果を示すクロマトグラムである。(A)TIC、(B)SIMモード (m/z 175) の測定結果を、それぞれ示す。

【図12】Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyで処理したときの生成物をLC/MSで測定した結果を示すクロマトグラムである。(A)TIC、(B)SIMモード (m/z 175) の測定結果を、それぞれ示す。

【図13】(A)PolyMまたは(B)PolyGを基質として、Exo.AI.LyまたはEndo.AI.Lyの組み合わせによって分解活性を確認したTLCの結果を示す写真図である。Lane Mはマーカー (グルコース(Glu)、マルトース(Mal))、Lane 1はEndo.AI.Lyのみ、Lane 2はExo.AI.Lyのみ、Lane 3はEndo.AI.Ly及びExo.AI.Lyによる生成物をそれぞれ示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施できる。

<Exo.AI.Ly及びEndo.AI.Ly発現用組換え体の作製、並びにExo.AI.Ly及びEndo.AI.Lyの発現と精製>

エンド型アルギン酸リアーゼ (Exo.AI.Ly) とエキソ型アルギン酸リアーゼ (Endo.AI.Ly) の2つの酵素タンパク質を使用し、酵素反応によりアルギン酸からDEHを調製するため、大腸菌発現ベクターを用いて、タンパク質発現用プラスミドを構築し、酵素タンパク質を発現、可溶化し、単一バンドとなるまで精製した。Exo.AI.LyをコードするDNAとして、配列番号3 (ATGTCGACGGAAAACAAATCCCGTTCAAACCTGTTTCCACTTGATGAGCCCAAAGCGGGACGGCTGACGATCCAATATGGCCCGCTCGAAACGACGACGCTGATTGAAAACCCGCCACGCTTCTCATGGCTGCCGGTTCATCGAGGATGCGCAACCTATGCGTGCATCTCGACCGATCCCGAATATTCGCGCAAACACCCCTCCTGTTTTCGGGCATCCAGCTGAACTTCTTCACGCCTGATGCACCTTTGGCGGACGGCACTTGGTACTGGTCTATGCACAATGCGATGCCCTCGGGAAAAGCCGTTACCGAATGGAGCACGAGCCGTCGCATCACTCTCGACGAGGGTCTGCCACAGACACCGCTGGCACCACGCAAGACGC GTTTTGGACGCGGCGACCCGTGCGCACCCGCGCCTGTGGATGGACGGCGGCGGCTGGAACAGTTCCGCAAGGATGTTGCCGCCGACCCGACGCATTGCACATGGTCTACCTTTTTCGAGGGTTCGGTTCTGCCGTGGATGGACCGCGACATCATCGAAGAGCCTGTGGGCTATCCGGATCACAAGCGTGTGCGAAGATCTGGCGCAAGGTCTACATCGAGTGTGAGGAACTGATGTATGCGATCCGCCACCTTGCTGTGGGCGGTGAGTTACCCAGGACGCGGCAATGCTGGCACGCGCCAAGGAATGGCTGCTCAGCGCCGACGCTGGAATCCGGCAGGCACCACCTCGCGCGCTATAACCGATGAATGGGCTTTCCGTGTGAACCTCGCACTCGC

10

20

30

40

50

ATGGGGTTATGACTGGCTCTATGACCAGCTGGACGAGGATGAGCGTACGCTGGTCCGCACCGCCTTGCTGGAGCGTACGC
 GCCAGACGGCGGATCACCTGATGCGCCACGCCAGCATCCACCTGTTTTCCGTTTTGACAGCCACGCTGTCCGCGCGGTGTCT
 GCGGTTCTGATCCCCGCCTGTATTGCCCTTGCTGGATGATGAACCCGAGGCCGAGGACTGGCTGAACTATGCGGTGGAATT
 CCTGTTACCGTCTATTCGCCGTGGGGCGATCATGACGGTGGCTGGGCCGAGGGTCCGCACTACTGGATGACGGGTATGG
 CCTATCTGATCGACGCGCAAACCTGTGCGCGCTGGAGCGGAATCGACCTGTACCAACGCCCGTTCTTCCAGAAAACC
 GGGGACTTCCCGCTTTATACCAAGGCGCCGGACACACGTGCGGCCACATTCCGGCGATGATAGCACCATGGGCGATCTGCC
 CGCGATCAAGTTCGGATATAACCTGCGTCAATACGCAGGGGTGACCGGCAACGGTGCCTACCAATGGTACTACGACGAAA
 TCCTGCGCACCAACCCCGGCACGAAAATGGCCTTCTACAACCTGGGGCTGGTGGGATTTCCGGTTTTGACGAAATGCTCTAC
 CGCACGGACTTCCCGATCGTAGAGGCAGTTCGCCCCGCGGATGAGGATGCACTGCGCTGGTTCAAGGGCATCGGTTGGGT
 CGCGATCCAGCACCGTATGCAGGCACCGGACGAGCATGTTCAATTCGTGTTCAAATCCTCTCCCTACGGCTCGATCAGCC 10
 ACAGCCATGGGGATCAGAACGCGTTCTGTCTGTGCGCATTCCGGTGAGGATCTTGAATCCAGTCCGGCCATTATGTGCC
 TTCAACTCGACAATGCACCAGAACTGGCGTGCAGACCCCTGTGGAAGAACGCCATCCTGATCGACGGAAAAGGCCAGTA
 CGCCGGCAAGGACAAGGCGATTGCCATGCAATCGACCGGTAAGGTCAATATTGCCGAGGATCGTGGCGATCATATCTTCC
 TGCAGGGGGATGCGACCGAAGCCTATCGCACATTGTACCCGAGGTCCGCTCGGTTGTCCGTGATGTGTATTTTCGTGAAT
 CGCGAATATTTTCGTGATCGTGGATGCCATCGATGCGGATACGCCCGTCAGCATCGACTGGCGTCTGCACGCGAATGCTCC
 GTTCAATCTGGGTGATAGCAGCTTCCGCTATACCGGTGAAAAGGCCGGTTTTCTATGGCCAGATCCTGTGGTCCGAGGCGG
 GTCCTGCCGAACTGACGCAGGAAACCGGCTTTCCGGATGTGATCCGAGCGAAATCGAGGGACTGCCGGTCAGCACCTGC
 CTGACCGCCGTTTTCCCAAATCCACCCGTATCGTATCGCGACCTTGATCGTCCCGTATGCTCTGGATGCGCCGCGCCG
 CATTTTCAGCTTCTTGATGATCAGGGTTACGACTGCGATCTCTATTTACCGATGCCAATGACAATAGTTTCAGGGTGA
 TTGTTCCCAAGACGTTTCGACGTGGGAACACCTGGCATCAAAAATAACTGA) を、Endo.A1.LyをコードするDN 20
 Aとして、配列番号4 (ATGAGTCTGAAGCTACGCACGTTCTGTTTTGCGAGGTACGGCGACTATTTTTGTCGCATT
 ACCATCAACCTATGCATTGGCAGCCGGAACCGGCGCATGCACCGGGGTGTCCAGCTGGCCATTGTATCGGCCAGCGATG
 ACGGCACTTTCGATGACATCTACGCACCTGAATTCGCGATCGACGGCGAATTCGGCCCAAGTTCGCGCTGGTCATCCCTT
 GGGGAGGGGAAGCAGCTTGTCTGGATCTGGGAGAGCCCCAGACCGTAAGCGAGGTTGGTCTGGCCTGGTACAAGGGCAA
 TGAGCGCACATCCAGCTTTACGCTGGAAGCTTCAATGACGGCGAAAACCTGGATGCCTTTGATGGACCGCACGGAAAAGTG
 CCGGAAAATCCGAGGCTGTGGAGAAAATACAGCTTTGACGCGACCGAGGCCCGCTATGTTCCGGTGACCGGTATGGGCAAT
 AGCGCGAGCGGCTGGAACAGCCTTTACGAGGCACAGGTGTTCCGGCTGTGGCTCAGGTGAGATTGCGGCCACAGGCGACGG
 TTCCGGAGAGGTCAGGAAGCAGACGTACGCGCCTATGGCCTGCGTACCGACGTTCCGCCAAGCGAGAACTTCGATCTGA
 CCCACTGGAAGCTGACATTGCCGGCGGATCGGGACAATGACGGCAAAGTGGACGAGATTGAGGAAGAAGAGCTGCAGGGT
 TGGTCTGATCCCCGTTCTTCTATACCGATCCGGCAACGGGTGGCATGGTTTTCCGCACCGCTCCGGATGGAAAGACCAC 30
 CTCGGGATCGCATTATACGCGCAGCGAACTGCGCGAGATGATCCGCGCGGTGACAAGAGCATTGCCACGCGCGTGGATG
 ACGGAACGCCCAACAAGAACAACCTGGGTGTTCTCGACGGCGCCGAAGAGGGCGAGGCCCTTGCCGGCGGGGTGGACGGG
 ACCATGACGGCCACGTTGGCGGTGAACCATGTGACCCGTACCGGAGAATCCGGCAAGATCGGGCGTGTATCATCGGCCA
 GATCCACGCGATGGATGACGAGCCTATCCGGCTTTATTATCGCAAGCTTCCGACCAATAAATACGGCTCCATCTATTTCCG
 CGCATGAGCCGGTAGGGGGCGACGATGATCTGGTCAACGTCATCGGGGATCGTGGAAAGCGATATTGACAACCCCTGCGGAT
 GGCATCGCGCTGGACGAAAGTGTCTCTTACGAGATCAAGGTGACATCCGAAGAAAAGGATGGAGAGCTGCATCCGATTCT
 GAATGTTTCCATCACGCGGATGACGGAACGGTGGTGAAAGCCGAACCTACGACATGTTCCGAAAGCGGGTATTTCGACCG
 ACAAGGACTTCATGTACTTCAAGGCCGGAGCCTATTCGAGAACAATTCATCACATGGCCGGACGATTTTCGATCAGGTG
 ACCTTCTACGCGCTGGATGTGACGCACGGCGAATAA) をそれぞれ用いた。

【 0 0 1 9 】

1. 試験方法

(1) Exo.A1.Ly遺伝子のサブクローニング

共同研究者由来のプラスミド (Endo.A1.Lyを組み込んだもの。以下「Exo.A1.Ly遺伝子
 プラスミド」という) を用いた。大腸菌を用いてタンパク質発現系を作製することとした。
 発現後のタンパク質の精製を円滑に行うために、Endo.A1.Lyをコードする遺伝子の終始
 コドンを欠損させ、C末端側にHis-Tagを付加した。シグナルナルペプチド及び終始コド
 ンを含まないExo.A1.Ly遺伝子の塩基配列領域を増幅させるようにプライマーを設計した。D
 NAポリメラーゼとしてKOD-Plus-Neo (TOYOBO)、鋳型としてExo.A1.Ly遺伝子プラスミド
 を用いた。設計した二種類のプライマー (Exo.A1.Ly_Nde1_F : 配列番号5 : tat cat tgC
 ATA TGa tgt cga cgg aaa aca aat ccc及びExo.A1.Ly_Xho1_R : 配列番号6 : gca gCT CGA 40

Ggt tat ttt tga tgc cag。但し、制限酵素の認識部位は、大文字で示した。)を用い、次の条件でPCRを行い、目的遺伝子配列を増幅した。

PCR溶液として、5 μ Lの10 \times PCR buffer、5 μ Lの2mM dNTPs、3 μ Lの25mM MgSO₄、1.5 μ Lの10 μ M Exo.Al.Ly_Nde1_F、1.5 μ Lの10 μ M Exo.Al.Ly_Xho1_R、1 μ LのDNAテンプレート、1 μ LのDNAポリメラーゼ (KOD-Plus-Neo) にdH₂Oを添加して、全量を50 μ Lとしたものを用いた。PCR条件として、まず94 $^{\circ}$ Cにて2分間の変性反応を行った後、増幅サイクルとして、(i)98 $^{\circ}$ Cにて10秒間の変性、(ii)60 $^{\circ}$ Cにて30秒間のアニーリング及び(iii)68 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間の合成反応を設定し、(i)~(iii)を30回繰り返した。

PCRを実施した後、増幅された遺伝子配列をアガロースゲル電気泳動で分画し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製した。

10

【0020】

(2) Exo.Al.Lyコンストラクトの構築

PCRで増幅したExo.Al.LyおよびpET22b(+) (Novagen) をXho I、Nde I (TOYOBO) で制限酵素処理した。その後、アガロースゲル電気泳動により目的とするDNAを分画し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて精製した。

精製したインサート遺伝子とプラスミドベクターの質量比が3:1になるようにライゲーション反応液を調製し、Ligation high Ver. 2 (TOYOBO) を用いて16 $^{\circ}$ Cで30分間、ライゲーション反応を行った。その後、ライゲーション産物を大腸菌DH5 α に形質転換させ、100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地に植菌して、37 $^{\circ}$ Cで一晩静置培養した。

20

【0021】

培養後、LB寒天培地に生じたコロニーに目的遺伝子が挿入されていることを確認するため、コロニーPCRを行った。ポリメラーゼとしてQuick-Taq (TOYOBO)、プライマーとして前述のExo.Al.Ly_Nde1_F及びExo.Al.Ly_Xho1_Rを用い、コロニーを鋳型としてPCRを実施した。

PCR溶液として、60 μ LのQuick-Taq、2.4 μ Lの10 μ M Exo.Al.Ly_Nde1_F、2.4 μ Lの10 μ M Exo.Al.Ly_Xho1_RにdH₂Oを添加して、全量を120 μ Lとしたものを用いた。PCR条件として、まず94 $^{\circ}$ Cにて2分間の変性反応を行った後、増幅サイクルとして、(i)94 $^{\circ}$ Cにて30秒間の変性、(ii)60 $^{\circ}$ Cにて30秒間のアニーリング及び(iii)68 $^{\circ}$ Cにて2分30秒間の合成反応を設定し、(i)~(iii)を25回繰り返した。

PCR産物をアガロースゲル電気泳動で確認することで目的遺伝子が挿入されているコロニーを選択した。選択したコロニーをLB液体培地で37 $^{\circ}$ Cにて一晩振とう培養した。その後、Wizard Plus SV MiniprepsDNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドDNAを抽出した。このプラスミドDNAをpET22b(+)-Exo.Al.Lyとした。

30

【0022】

(3) Endo.Al.LyおよびExo.Al.Lyの発現確認

上記(1)及び(2)と類似の手順で配列番号2に示すポリペプチド (Endo.Al.Ly) をコードし、大腸菌を用いてEndo.Al.Lyを発現できるプラスミド (pET25b(+)-Endo.Al.Lyプラスミド) を得た。

こうして、pET22b(+)-Exo.Al.LyプラスミドおよびpET25b(+)-Endo.Al.Lyプラスミドを大腸菌BL21(DE3)株に形質転換させ、100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB寒天培地にそれぞれ植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩静置培養させた。培養したLB寒天培地上のコロニーを採取し、寒天培地と同濃度のアンピシリンを含むLB液体培地5 mLに植菌し、37 $^{\circ}$ C、160 rpmで振とう培養した。培養液の濁度がOD₆₀₀=0.4~0.6になったのを確認し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) の終濃度が0.1 mM及び1 mMになるように加え、IPTGを添加しないものをコントロールとして、3種類の条件で37 $^{\circ}$ C、160 rpmで一晩振とう培養した。

40

培養後、各培養液1 mLを13000 rpm、3分間遠心分離し、上清を除き、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 20 μ Lで少量の菌体を懸濁させた。この菌体懸濁液と2 \times SDSサンプル緩衝液20 μ Lを混合して調製したサンプルを3分間煮沸し、10 %ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、目的タンパク質の発現確認を行った。

50

【0023】

(4) 大量培養と酵素タンパク質の可溶化

大腸菌BL21(DE3)で植菌したLB寒天培地上に生えたコロニーを100 µg/mLのアンピシリンを含むLB液体培地5 mLにそれぞれ植菌し、37 °Cで一晩振とう培養し、これを前培養液とした。

上記と同濃度のアンピシリンと終濃度1%(w/v)となるようにグルコースを加えた2×YT培地400 mLを本培養液とし、前培養液400 µLを植菌し、37 °C、160 rpmで振とう培養した。培養液の濁度がOD600=0.4~0.6になったことを確認して、本培養液を10分間氷冷した。その後、IPTGを終濃度0.1 mMになるように加え、20 °Cで二晩振とう培養した。

培養後、培養液を4 °C、6000 rpm、25分間遠心分離し、上清を除くことで集菌し湿菌体を得た。湿菌体1 gあたり10 mLの割合で100 mM NaClを含む20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、懸濁した。この懸濁液を氷上で3分間超音波破碎 (OUT PUT 4、DUTY 40 : TOMMY U LTRASONMIC DISRUPTOR UD-201) し、その後、2分間氷上静置した。これを4回繰り返すことで菌体を完全に溶菌させた。超音波破碎した懸濁液を4 °C、13000 rpm、20分間遠心分離し、上清を回収した。回収した上清を再度、4 °C、13000 rpm、20分間遠心分離し、その上清を可溶性画分として回収した。

【 0 0 2 4 】

(5) Niアフィニティークロマトグラフィーによる精製

Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) を13.5 mLのオープンカラム (GE Healthcare) に3 mL詰め、ミリQ水で十分に洗浄した後、50 mM NaClと20 mM イミダゾールを含む10 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を流すことにより、担体を平衡化させた。超音波破碎により得られたEndo.AI.Ly、Exo.AI.Lyの可溶性画分に平衡化した担体をそれぞれ供し、4 °C、一晩スターラーで攪拌することで目的タンパク質の担体への吸着を行った。担体を含んだタンパク質溶液をオープンカラムに移し、流速2 mL/minで流した。これを素通し画分として回収した。平衡化用の緩衝液と同じ緩衝液20 mLでカラムを洗浄し、洗浄画分として回収した。その後、50 mM NaClと500 mM イミダゾールを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を20mL流し、1 mLずつ溶出画分として回収した。次いで、50 mM NaClと50 mM EDTAを含む10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を20 mL流し、溶出後洗浄画分として回収した。最後に、20 %エタノールで担体の洗浄と保管を行った。

溶出画分をSDS-PAGEに供し、Endo.AI.Ly、Exo.AI.Lyを含む画分をそれぞれ確認した。これらの画分をそれぞれまとめ、20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) で4 °Cで一晩透析した。

【 0 0 2 5 】

(6) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

透析後のEndo.AI.Ly、Exo.AI.Lyをそれぞれ含むタンパク質溶液をAKTAprime plus (GE Healthcare) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。陰イオン交換カラムには1 mLのHiTrap Q HP (GE Healthcare) を用いた。陰イオン交換クロマトグラフィーは全工程を流速1 mL/minで行った。10 mLの20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、透析後のEndo.AI.Ly、Exo.AI.Lyを含むタンパク質溶液をそれぞれ流すことで目的タンパク質の担体への吸着を行った。その後、5 mLの20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した。次いで、0~1.0 M NaClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) の直線的濃度勾配によって、担体に吸着したタンパク質を溶出させ、1 mLずつ溶出画分として回収した。溶出後、1.0 M NaClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 5 mLで洗浄した。溶出画分をSDS-PAGEに供することで目的タンパク質を含む画分を選別し、これらの画分を集めた。ゲル濾過クロマトグラフィーに供するため、Amicon Ultra-15 30k MWCO (MILLIPORE) を用いて溶液を10 mLまで濃縮した。

【 0 0 2 6 】

(7) ゲル濾過クロマトグラフィーによる精製

AKTAprime plus (GE Healthcare) を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィー後のEndo.AI.Ly、Exo.AI.Lyを含むタンパク質溶液それぞれにゲル濾過クロマトグラフィーを行った。カラムにはHiLoadTM16/60 SuperdexTM75 pg (GE Healthcare) を用いた。120 mLの100 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) を流速0.3 mL/minで流し、カラムを平

10

20

30

40

50

衡化した。上記(6)のEndo.AI.Ly、Exo.AI.Lyを含むタンパク質溶液それぞれをカラムに添加し200 mLの100 mM NaClを含む20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5)、流速1 mL/minにて、タンパク質溶液を3 mLずつ溶出させ、280 nmの吸光により検出された溶出画分を回収した。SDS-PAGEにて、目的タンパク質が単一バンドとして確認できた画分を集め、20 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) で4 、一晩透析を行った。

【 0 0 2 7 】

(8)濃度測定

Endo.AI.Ly、Exo.AI.Lyのタンパク質濃度は、波長280 nmにおける吸光度を測定し、下記式(1)を用いて、モル吸光計数 から計算した。

$$\text{式(1)}: \quad = (\text{Trp}) \times 5500 + (\text{Tyr}) \times 1490$$

10

【 0 0 2 8 】

2. 試験結果

(1)コンストラクトの構築

PCRで増幅したExo.AI.Ly遺伝子のアガロースゲル電気泳動の結果を図2に示した。制限酵素処理後、ライゲーション反応を行い、コロニーPCRにより目的遺伝子の導入されたコロニーを選択した。その後、プラスミド抽出をして、pET22b(+)ベクター(5.5 kb)にExo.AI.Ly遺伝子(2.4 kb)が導入されたpET22b(+)-Exo.AI.Ly(7.9 kb)を構築できたことをアガロースゲル電気泳動により確認した。また、pET25b(+)(5.5 kb)ベクターにEndo.AI.Ly遺伝子(1.5 kb)が導入されたプラスミドpET22b(+)-Endo.AI.Ly(7.0 kb)をアガロースゲル電気泳動により確認した。結果を図3に示した。いずれの発現用ベクターにつ

20

【 0 0 2 9 】

(2)Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの発現確認

IPTG誘導により目的タンパク質の発現を行った。発現したタンパク質のSDS-PAGEの結果を図4に示した。Endo.AI.LyおよびExo.AI.Lyの分子量はそれぞれ89 kDa、52 kDaであることから、図中の各分子量に相当する太いバンドは、目的タンパク質によるものであった。また、添加したIPTGの濃度変化によるバンドパターンへの大きな影響は見られなかったことから、これらの酵素はIPTGによる誘導がなくても発現していた。

【 0 0 3 0 】

(3)大量培養と酵素タンパク質の可溶化

大腸菌の大量培養を行い、得られた菌体を超音波破碎により溶菌した。遠心分離を行うことで不溶性画分と可溶性画分に分画して回収した。得られた各画分のSDS-PAGE結果を図5に示した。Endo.AI.LyおよびExo.AI.Lyの分子量はそれぞれ89 kDa、52 kDaであり、図中の各分子量に相当する太いバンドは目的タンパク質によるものであった。Endo.AI.Ly、Exo.AI.Ly共に可溶性画分に目的タンパク質が確認できたことから、十分な可溶化を確認した。

30

【 0 0 3 1 】

(4)Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの精製

Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyは、それぞれHis-Tagを付加した状態で発現させたので、Niアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製を行った。精製した結果のSDS-PAGE泳動図を図6に示した。両タンパク質共に不純物が十分に除去できていなかったため、更に陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。精製した結果のSDS-PAGE泳動図を図7に示した。両タンパク質共にタンパク質マーカーの45 kDa付近に比較的濃いバンドが残っていた。そのため、次いでゲル濾過クロマトグラフィーを行った。結果を図8に示した。これにより、両タンパク質共に単一のバンドを得ることができた。

40

精製して得られたタンパク質溶液の波長280 nmにおける吸光度を測定し、タンパク質のモル濃度を求めたところ、Endo.AI.Lyは4.0 μM、Exo.AI.Lyは3.7 μMであった。培地1 LあたりEndo.AI.Lyは4.7 mg、Exo.AI.Lyは10.0 mgの精製酵素を回収できた。

こうして、本実施形態の方法によれば、Exo.AI.Ly及びEndo.AI.Lyは、大腸菌を用いて大量に発現・精製できた。

50

次に、各酵素タンパク質の酵素活性を測定した。

【0032】

<Exo.AI.Ly及びEndo.AI.Lyの酵素活性評価と生成物の同定>

アルギン酸リアーゼはpolysaccharide lyases (PLs) に属し、Endo.AI.Ly、Exo.AI.LyはそれぞれPL7、PL15ファミリーに分けられる。アルギン酸リアーゼの切断様式には、エンド型とエキソ型の2種類が存在する。エンド型ではアルギン酸のグリコシド結合を β -elimination (脱離反応) によって切断し、不飽和オリゴ糖を生成する。一方、エキソ型ではアルギン酸やエンド型によって生成した不飽和オリゴ糖の非還元末端を認識し、 β -eliminationによって順に切断する。PL7ファミリーはエンド型のアルギン酸リアーゼが属し、PL15ファミリーはエキソ型のアルギン酸リアーゼが属する。従って、Endo.AI.Lyはエンド型、Exo.AI.Lyはエキソ型の切断様式を持つ。

10

そこで、アルギン酸ナトリウムを基質として、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyにより酵素反応を行い、得られた生成物を薄層クロマトグラフィーに供することで、切断様式の確認および分解度を評価した。

併せて、酵素反応で得られた生成物をLC/MSを用いて分析し、生成物の評価を行った。

【0033】

1. 試験方法

(1) 酵素活性の確認

上述した方法で調製したEndo.AI.LyおよびExo.AI.Lyの酵素溶液をそれぞれ0.25 mg/mLとなるよう希釈した。酵素反応用の基質として、アルギン酸の可溶性塩であるアルギン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich) を1.0%(w/v)となるようミリQで溶解して用いた。基質溶液4.0 mLに対し、希釈した酵素溶液を1.0 mL加え、基質濃度0.8%(w/v)、酵素濃度0.05 mg/mLの酵素反応液を調製した。25℃で酵素反応を行い、経時的に235 nmにおける吸光度を測定した。

20

【0034】

(2) 酵素反応

1.0%(w/v)アルギン酸ナトリウム水溶液の基質溶液10 mLに1.60 mg/mLのEndo.AI.Lyを1 mL加えたもの、3.82 mg/mLのExo.AI.Lyを1 mL加えたもの、及びEndo.AI.LyとExo.AI.Lyとを各1.0 mLずつ加えたものの計3通りの酵素の組み合わせによる反応液を37℃で3日間反応させた。その後、未反応のアルギン酸ナトリウムと酵素を除去するため、Amicon Ultra-15 3000 MWCO (MILLIPORE) を用いて限外濾過 (カットオフ分子量3000) した。限外濾過によりフィルターを通過した酵素反応液を凍結させ、凍結乾燥により、粉末状の酵素反応生成物を得た。酵素反応生成物の収量を測定し、酵素反応に加えた緩衝液 (20 mM Tris-HCl) 分の重量を差し引いた後、酵素反応生成物の収率を算出した。

30

【0035】

(3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による生成物の検出

上記(2)で得た酵素反応後の凍結乾燥処理で得られた粉末状のEndo.AI.Ly生成物、Exo.AI.Ly生成物、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Ly生成物をそれぞれ30 mg/mLになるようミリQ水に溶かし、TLC試料とした。

市販されている物品として、アルギン酸の単糖やオリゴ糖の標品が存在しないため、大体の位置指標 (マーカー) として、単糖にはグルコース、二糖にはマルトースを等量ずつ混合し、3.0 mg/mLとなるようミリQ水に溶かし調製したものを用いた。

40

マーカー、試料をそれぞれ5 μ LずつTLCプレート シリカゲル60F₂₅₄ (Merck) にスポットした。ブタノール：酢酸：ミリQ水=2：1：1(v/v)で調製した展開溶媒を展開槽に加え、スポットしたTLCプレートを浸し、6時間程度展開した。終了後、十分に乾燥させた後、再び展開を行った。その後、乾燥させDPA試薬を噴霧した。DPA試薬は以下のように調製した。ジフェニルアミン4.0 gをアセトンに溶かし、アセトンで100 mLにメスアップし、これをA液とした。次に、アニリンを4.0 mLをアセトン96 mLに加えて混合し、これをB液とした。85 %リン酸をC液とした。A液：B液：C液=5：5：1の比で混合し、DPA試薬を調製した。噴霧後、TLCプレートを乾燥させ、ホットプレート上で10分間加熱し、各酵素の生成物

50

を検出した。

【 0 0 3 6 】

(4) LC/MS分析による生成物の同定

上記(2)で得た酵素反応後の凍結乾燥処理で得られた粉末状のExo.AI.Ly生成物、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Ly生成物をLC/MSを用いて分析した。全質量数のシグナルの積算であるトータルイオンクロマトグラム(TIC)と、アルギン酸リアーゼの分解により生成するアルギン酸の単糖(DEH)の脱プロトン化した質量数を指定した選択的イオンモニタリング(SIM)のネガティブモード($m/z=175$)による測定を行った。

LC/MSの詳細な分析条件は、下記の通りであった。

(i) LC/MS条件

カラム：Shodex IC NI-424 (内径4.6 mm x 長さ100 mm)

移動相：0.1%ギ酸含有40 mMギ酸アンモニウム緩衝液

流速：0.5 mL/min

カラムオープン：40

LC-MS：アジレント1260HPLC + アジレント6120シングル四重極質量分析装置

イオン化法：ESI/APCIマルチモード，ネガティブ測定

MS条件：dry gas: 12.0 L/min, nebulizer: 35 psi, dry temperature: 250, vaporizer: 200, スキャン範囲：m/z 100からm/z 1000

(ii) DEHの同定

LC-MSのSIMモード(選択的イオンモニタリングモード)のネガティブ測定で、 m/z 175 (DEHの脱プロトン化したイオン $[M-H]^-$ に相当)を指定した。TIC(サンプル中に含まれる全ての化合物を検出)で検出されたピークとSIMモードで検出されたピークとの保持時間が完全に一致したため、Exo.AI.Lyの分解産物と、Exo.AI.Ly及びEndo.AI.Lyの分解産物がDEHであると同定した。

【 0 0 3 7 】

(5) 基質特異性の確認

1.0%(w/v)のポリ-D-マンヌロン酸(polyM)またはポリ-L-グルロン酸(polyG)を基質とする基質溶液10 mLに0.20 mg/mLのEndo.AI.Lyを1 mL加えたもの、0.20 mg/mLのExo.AI.Lyを1 mL加えたもの、及びEndo.AI.LyとExo.AI.Lyとを各1.0 mLずつ加えたものの計3通りの酵素の組み合わせによる反応液を37℃で3日間反応させた。

その後の処理は、上記「(2)酵素反応」及び「(3)薄層クロマトグラフィー(TLC)による生成物の検出」と同様の処理を行った。

【 0 0 3 8 】

2. 試験結果

(1) 酵素活性の確認

時間経過に伴う235 nmにおける吸光度の変化をグラフ化したものを図9に示した。更に、反応開始から24時間後、48時間後に吸光度をした結果、Endo.AI.Lyでは24時間後に40.7、48時間後に51.2であり、Exo.AI.Lyでは24時間後に1.37、48時間後に1.58であった。図9から、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyのどちらの反応液も酵素反応開始後、時間経過に伴い235 nmにおける吸光度が上昇したことから、各酵素は基質であるアルギン酸ナトリウムを不飽和糖に分解する活性があることが確認できた。また、Endo.AI.Lyでは24時間後、48時間後にも吸光度の上昇を示したが、Exo.AI.Lyでは下降を示した。これは、エンド型のEndo.AI.Lyではリアーゼの脱離反応により、不飽和糖を生成し続けているのに対し、エキソ型のExo.AI.Lyでは末端から順に不飽和ウロン酸残基を切断していき、精製した不飽和単糖が開環し、DEHになり、不飽和二重結合が開裂したためであると考えられた。

【 0 0 3 9 】

(2) 酵素反応

Endo.AI.Lyのみ、Exo.AI.Lyのみ、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの混合による3通りの酵素の組み合わせによる反応液を用意し、これらを3日間反応させ、限外濾過、凍結乾燥処理し、粉末状の生成物を得た。緩衝液(20 mM Tris-HCl)分の重量を差し引いた結果、生成

10

20

30

40

50

物の収量は、Endo.AI.Lyのみでは16.4 mg、Exo.AI.Lyのみでは64.0 mg、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの組み合わせでは83.8 mgであった。酵素反応に用いた基質は各100 mgであることから、収率はそれぞれ16.4 %、64.0 %、83.8 %であった。なお、Endo.AI.LYの添加量を同量とし、Exo.AI.Lyの添加量を2倍または3倍量としたところ、収率は上記とほぼ同様（85%程度）であった。

Saccharophagus degradans由来のエンド型アルギン酸リアーゼAlg7D (PL7) とエキソ型アルギン酸リアーゼAlg17C (PL17) によるアルギン酸ナトリウムを基質とした酵素反応の結果、DEHを45.5 %の収率で得られたと報告されている（非特許文献6）。しかし、本研究における、Endo.AI.LyとExo.AI.Lyの組み合わせによる酵素反応ではその約1.8倍高い値である83.8 %の収率でDEHを得ることができた。

10

【0040】

(3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による生成物の検出

Endo.AI.Lyのみ、Exo.AI.Lyのみ、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの混合による酵素反応で得られた生成物について、TLCを行うことでスポット検出し、生成物の分解度を確認した。TLCの結果を図10に示した。Endo.AI.Lyによる生成物は、二糖の指標であるマルトースよりも低い位置に2つ重なったようなスポットが確認できた。このことと、上記(1)での結果（すなわち、235 nmでの吸光度の上昇）から、Endo.AI.Lyの生成物はアルギン酸不飽和オリゴ糖であったと考えられた。Exo.AI.Lyの生成物は単糖の指標であるグルコースと同等の位置に単一のスポットを検出した。また、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの両方を用いた際の生成物もグルコースと同じ位置に濃いスポットを検出した。こちらはスポットのテーリングが認められた。テーリングを示した原因として、生成物であるDEHの濃度が高かったために、溶媒による展開がしきれていなかったためであると考えられた。

20

【0041】

(4) LC/MS分析による生成物の同定

Exo.AI.Lyのみによる生成物をLC/MSを用いて、TIC及びSIMモードで測定した結果を図11に示した。TICの結果において、1.8 min付近に認められる小さなピークは、移動相由来のものであった。このため、生成物のピークは3.2 min付近の1ピークであることが確認できた。また、DEHの脱プロトン化した質量数を指定したSIMモードでの測定結果において、3.2 min付近に1ピークのみ確認できた。SIMモードでは、質量数を指定した測定を行っていることから、DEHによるピークであると判断した。また、TICのピークと保持時間が完全に一致していることと、TICのピークが1ピークであることから、Exo.AI.Lyの生成物はDEHのみであると判断した。また、陰イオン分析用カラムとして、Shodex IC NI-424に代えて、Shodex IC I-524Aを用いたところ、LCにおいてグラジエント条件を使用することなく、同様の結果が得られた。このため、市販の陰イオン分析用カラムを用いれば、同様の結果が得られるものと考えられた。

30

次に、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyを用いたときの生成物をLC/MSを用いて、TIC及びSIMモードで測定した結果を図12に示した。この測定結果は、Exo.AI.Lyの生成物をTICとSIMモードで測定した結果（図11）とほぼ同じであることを確認した。従って、Endo.AI.Ly及びExo.AI.Lyの両方を用いた生成物もDEHのみであると判断した。

【0042】

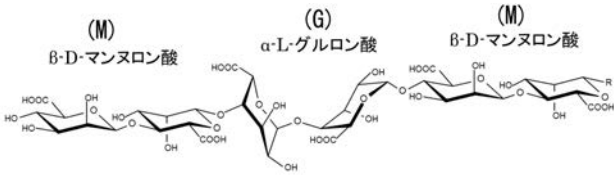
(5) 基質特異性の確認

Endo.AI.Ly、Exo.AI.Ly及び両酵素をpolyMまたはpolyGを基質として作用させたところ、いずれの基質についても同様の分解活性を示した。従来のアルギン酸リアーゼはpolyMまたはpolyGに対して、特異的な反応を示すことがある。しかしながら、本実施形態のアルギン酸リアーゼについては、両基質に対する特異性は認められず、ほぼ同等に反応することが分かった。

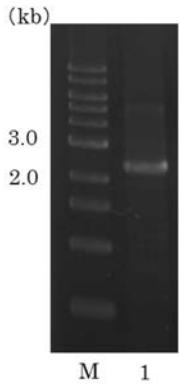
40

このように、本実施形態によれば、新規なエキソ型アルギン酸リアーゼ (Exo.AI.Ly) 及びエンド型アルギン酸リアーゼ (Endo.AI.Ly) を大量に作製し、当該酵素を用いてアルギン酸から不飽和ウロン酸単糖 (DEH) を製造する方法を提供できた。

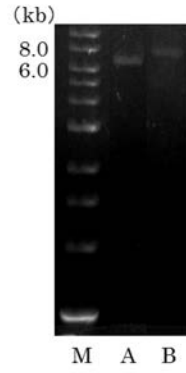
【 図 1 】



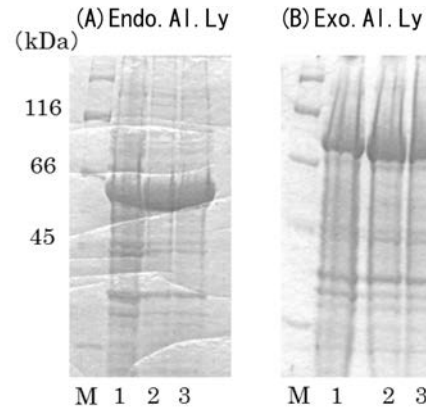
【 図 2 】



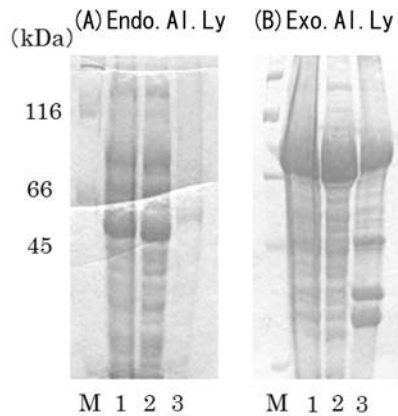
【 図 3 】



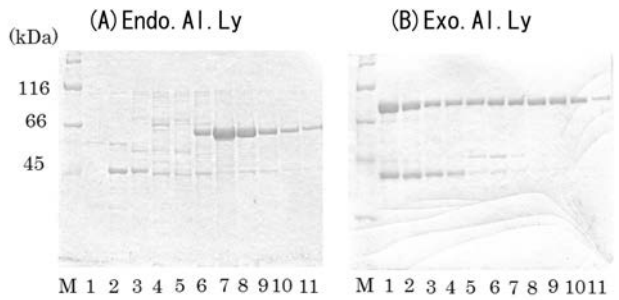
【 図 4 】



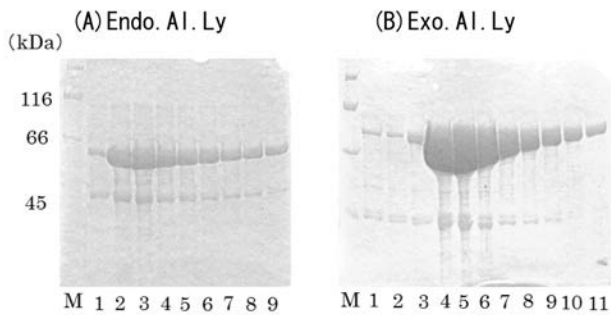
【 図 5 】



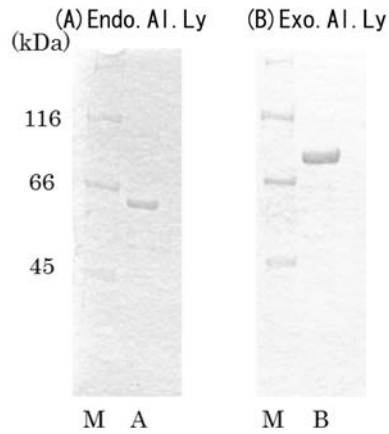
【 図 7 】



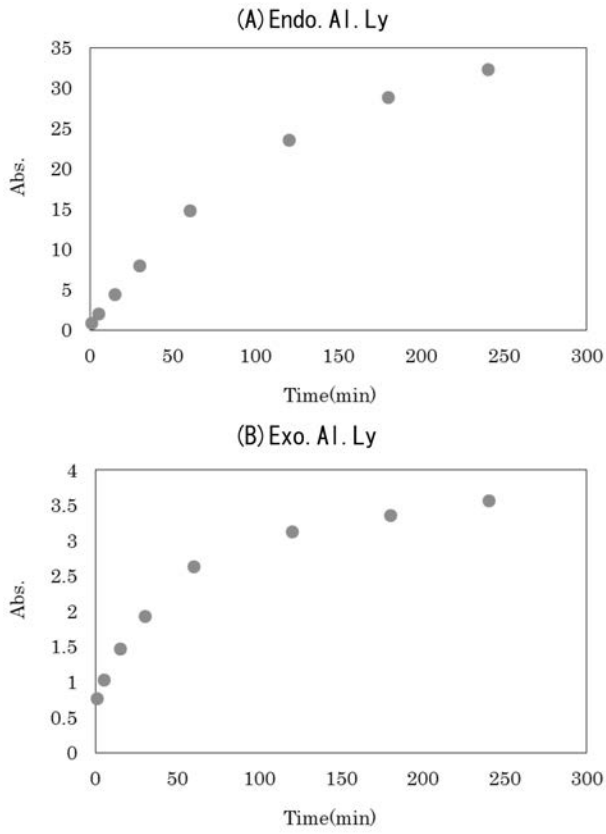
【 図 6 】



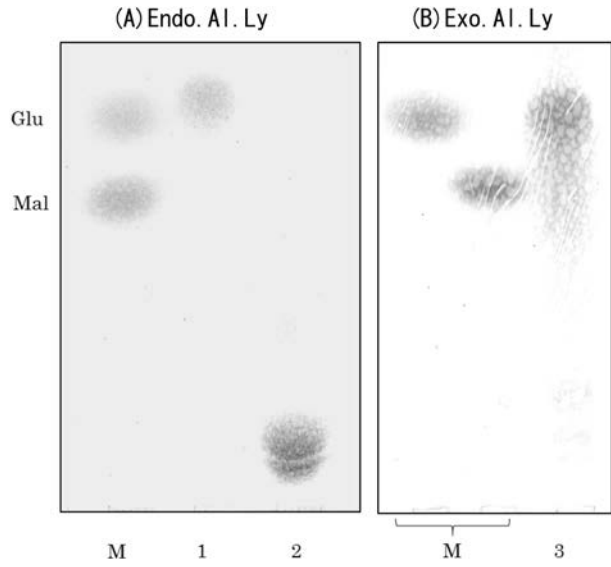
【 図 8 】



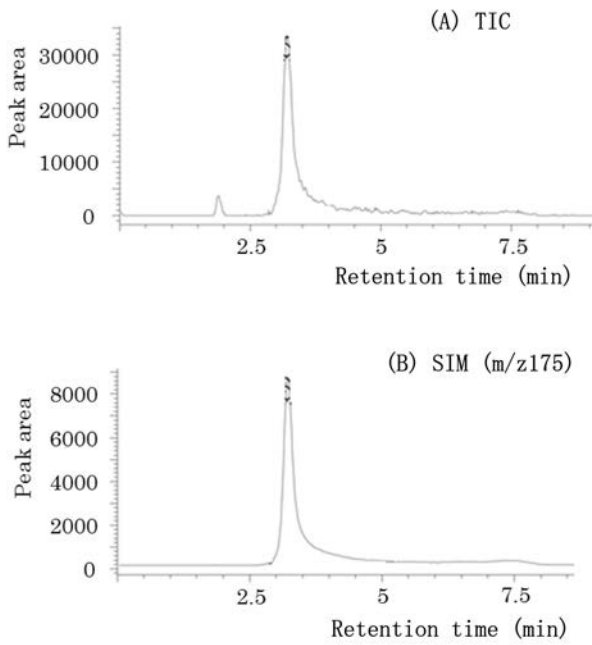
【 図 9 】



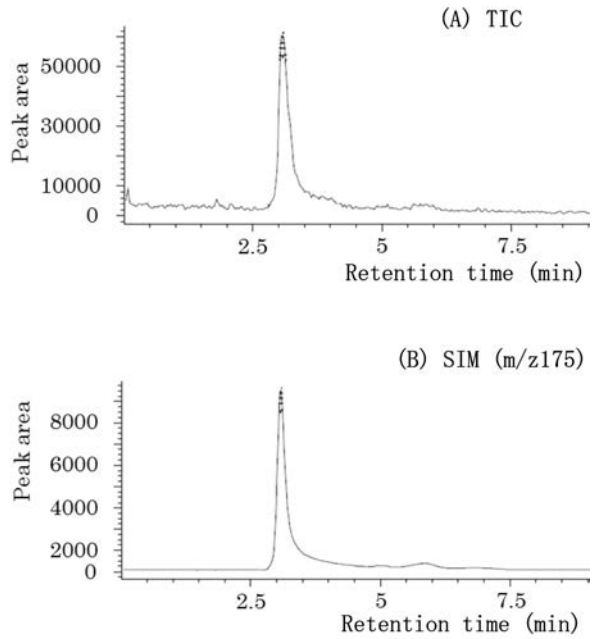
【 図 1 0 】



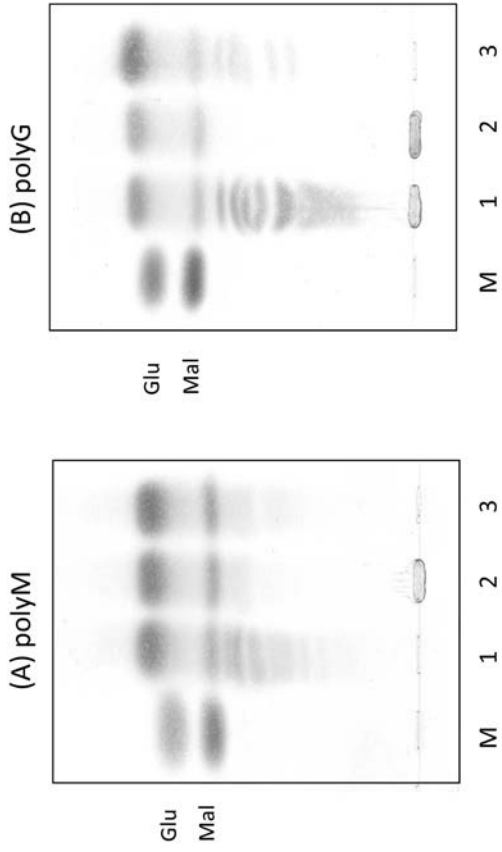
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 配列表 】

2017175694000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/013871
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P19/02(2006.01)i, G01N30/02(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/88(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) C12N15/09, C12N9/24, C12P19/02, G01N30/02, G01N30/26, G01N30/72, G01N30/88 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 2015/074025 A1 (DEL MAR PHARMACEUTICALS), 21 May 2015 (21.05.2015), example 1; claim 7; paragraph [0018] & WO 2013/128285 A2 & US 2014/0315318 A1 & US 2014/0017798 A1 & US 2015/0027206 A1 & EP 3071555 A1 & EP 2820408 A1 & JP 2016-538574 A & JP 2015-508174 A	10/10,11/1-9
Y/A	WANG, D.M., et al., Optimal production of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid from alginate for brown macro algae saccharification by combining endo- and exo-type alginate lyases, 2014, Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol.37, p.2105-2111, abstract, page 2107, left column, 5th paragraph to right column, 2nd paragraph	10,11/1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 19 June 2017 (19.06.17)		Date of mailing of the international search report 27 June 2017 (27.06.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013871

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 2015-536641 A (Synthetic Genomics, Inc.), 24 December 2015 (24.12.2015), entire text & WO 2014/047510 A1 entire text & WO 2015/143381 A2 & EP 2898083 A1 & EP 3119899 A1 & US 2014/0106414 A1 & US 2014/0206047 A1	1-11
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. GAD57170, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GAD57170 > 16-SEP-2015 uploaded, [retrieved on 12-MAY-2017] NISHI, S., et al., Definition: alginate lyase precursor [Loktanella cinnabarina LL-001]. entire text	1-11
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. GAD57174, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GAD57174 > 16-SEP-2015 uploaded, [retrieved on 12-MAY-2017] NISHI, S., et al., Definition: oligo alginate lyase [Loktanella cinnabarina LL-001]. entire text	1-11
A	Mami TAKAHASHI et al., "Kasso Bunkaikin Falsirhodobacter sp. alg1 kara Kakutoku shita Aruginan Lyase AlyFRB no Tokusei Hyoka", 2015, Dai 17 Kai Japanese Society for Marine Biotechnology Taikai Koen Yoshishu, page 68 O-1-5, entire text	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 3 8 7 1												
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P19/02(2006.01)i, G01N30/02(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N30/88(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. C12N15/09, C12N9/24, C12P19/02, G01N30/02, G01N30/26, G01N30/72, G01N30/88														
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2017年													
日本国実用新案登録公報	1996-2017年													
日本国登録実用新案公報	1994-2017年													
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) Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, PubMed														
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												
X / Y / A	WO 2015/074025 A1 (DEL MAR PHARMACEUTICALS) 2015.05.21, 実施例 1、請求項 7、[0018] & WO 2013/128285 A2 & US 2014/0315318 A1 & US 2014/0017798 A1 & US 2015/0027206 A1 & EP 3071555 A1 & EP 2820408 A1 & JP 2016-538574 A & JP 2015-508174 A	10 / 10、11 / 1-9												
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献													
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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													
「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	「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													
「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)	「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													
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献													
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願														
国際調査を完了した日 19.06.2017	国際調査報告の発送日 27.06.2017													
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100-8915 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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3963												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/013871
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
Y / A	WANG, D.M., et al., Optimal production of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid from alginate for brown macroalgae saccharification by combining endo- and exo-type alginate lyases, 2014, Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol.37, p.2105-2111 要約、第2107頁左欄第5段落-右欄第2段落	10、11 / 1-9
A	JP 2015-536641 A (シンセティック ゲノミクス、インク。) 2015.12.24, 全文 & WO 2014/047510 A1, 全文 & WO 2015/143381 A2 & EP 2898083 A1 & EP 3119899 A1 & US 2014/0106414 A1 & US 2014/0206047 A1	1-11
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. GAD57170, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GAD57170 > 16-SEP-2015 uploaded, [retrieved on 12-MAY-2017] NISHI, S., et al., Definition: alginate lyase precursor [Loktanella cinnabarina LL-001]. 全文	1-11
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. GAD57174, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GAD57174 > 16-SEP-2015 uploaded, [retrieved on 12-MAY-2017] NISHI, S., et al., Definition: oligo alginate lyase [Loktanella cinnabarina LL-001]. 全文	1-11
A	高橋真美, et al., 褐藻分解菌 <i>Falsirhodobacter</i> sp. <i>alg1</i> から獲得したアルギン酸リアーゼ AlyFRB の特性評価, 2015, 第17回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, p68 O-1-5 全文	1-11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
G 0 1 N 30/26 (2006.01)	G 0 1 N	30/26	A	
G 0 1 N 30/72 (2006.01)	G 0 1 N	30/72	C	
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N	30/88	N	
C 1 2 P 19/02 (2006.01)	C 1 2 P	19/02	Z N A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 田中 礼士
日本国三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 三重大学大学院生物資源学研究所内

(72) 発明者 モリ テツシ
日本国東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地 学校法人早稲田大学内

(72) 発明者 竹山 春子
日本国東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地 学校法人早稲田大学内

(72) 発明者 高橋 真美
日本国東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地 学校法人早稲田大学内

F ターム (参考) 4B029 AA02 BB16 BB20 CC01
4B050 CC03 DD02 EE10 FF02 FF11E FF12E FF14E LL05
4B064 AF02 CA19 CA21 CB07 CC24 DA16

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。