

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/194092

発行日 令和2年2月27日 (2020.2.27)

(43) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018.10.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/31 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/31 Z N A	4 B 0 5 0
<b>C 1 2 N 15/56 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/56	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 9/24 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/24	
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

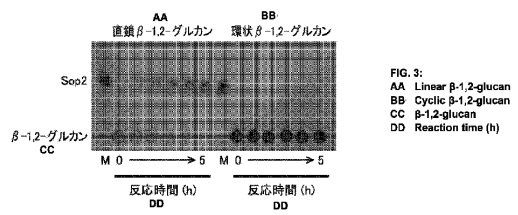
出願番号 特願2019-513665 (P2019-513665)	(71) 出願人 000125370
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/016001	学校法人東京理科大学
(22) 国際出願日 平成30年4月18日 (2018.4.18)	東京都新宿区神楽坂一丁目3番地
(31) 優先権主張番号 特願2017-82216 (P2017-82216)	(71) 出願人 304027279
(32) 優先日 平成29年4月18日 (2017.4.18)	国立大学法人 新潟大学
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地
	(74) 代理人 100106002
	弁理士 正林 真之
	(74) 代理人 100136939
	弁理士 岸武 弘樹
	(72) 発明者 中島 将博
	東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エキソ-β-1, 2-グルカナーゼ及びソホロースの製造方法

(57) 【要約】

直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用してソホロースを生成するエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ、並びに、( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質、( b ) 配列番号 1 において 1 ~ 1 8 番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質、( c ) ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質、及び ( d ) ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質、から選択されるいずれか 1 種であるエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを提供する。また、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用してソホロースを生成するエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

## 【請求項 2】

以下の酵素学的性質を有する請求項 1 に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

## (i) 基質特異性及び作用特性

直鎖 - 1, 2 - グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

## (ii) 至適 pH

30 の条件下で、pH 6.5。

## (iii) 至適温度

pH 6.5 の条件下で、40。

## (iv) 安定 pH

30、1 時間の条件下で、pH 5.5 ~ 10 で安定。

## (v) 温度安定性

pH 6.5、1 時間の条件下で、30 まで安定。

## 【請求項 3】

パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である請求項 1 又は 2 に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

## 【請求項 4】

下記 (a) ~ (d) から選択されるいずれか 1 種であるエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号 1 において 1 ~ 18 番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

(c) 前記 (a) 又は (b) のアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

(d) 前記 (a) 又は (b) のアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

## 【請求項 5】

パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である請求項 4 に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

## 【請求項 6】

請求項 4 又は 5 に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の形質転換体を培養し、培養物から請求項 4 又は 5 に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを回収する工程を含むエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの製造方法。

## 【請求項 10】

エキソ - 1, 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

## 【請求項 11】

前記エキソ - 1, 2 - グルカナーゼが以下の酵素学的性質を有する請求項 10 に記載のソホロースの製造方法。

10

20

30

40

50

## ( i ) 基質特異性及び作用特性

直鎖 - 1 , 2 - グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

## ( i i ) 至適 pH

30 の条件下で、pH 6 . 5 。

## ( i i i ) 至適温度

pH 6 . 5 の条件下で、40 。

## ( i v ) 安定 pH

30 、1時間の条件下で、pH 5 . 5 ~ 10 で安定。

## ( v ) 温度安定性

pH 6 . 5 、1時間の条件下で、30 まで安定。

10

## 【請求項 1 2】

前記エキソ - 1 , 2 - グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である請求項 1 0 又は 1 1 に記載のソホロースの製造方法。

## 【請求項 1 3】

下記 ( a ) ~ ( d ) から選択されるいずれか 1 種であるエキソ - 1 , 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1 , 2 - グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質。

( b ) 配列番号 1 において 1 ~ 1 8 番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

( c ) 前記 ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ - 1 , 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

20

( d ) 前記 ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列と 9 0 % 以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ - 1 , 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

## 【請求項 1 4】

前記エキソ - 1 , 2 - グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である請求項 1 3 に記載のソホロースの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

30

本開示は、エキソ - 1 , 2 - グルカナーゼ及びソホロースの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、セルロース系バイオマスを原料としてバイオエタノールを製造する際に、トリコデルマ ( *Trichoderma* ) 属菌が生産するセルラーゼが広く利用されている。トリコデルマ属菌によるセルラーゼの生産効率を向上させるためには、セルラーゼ生産を誘導する成分を培地に添加する必要がある。従来、セルラーゼ生産の誘導効果に優れた成分として、ソホロースが知られている。

## 【0003】

ソホロースは、2分子のグルコースが - 1 , 2 結合した希少二糖類であり、天然にはごく僅かしか存在しない。そこで、ソホロースを製造する方法が種々提案されている。

40

## 【0004】

例えば、特許文献 1 には、アスペルギルス ( *Aspergillus* ) 属菌に由来する - グルコシダーゼをグルコースに作用させ、ソホロースを製造する方法が開示されている。

非特許文献 1 には、リステリア・イノキュア ( *Listeria innocua* ) に由来する - 1 , 2 - オリゴグルカンホスホリラーゼをグルコース及びグルコース - 1 - リン酸に作用させ、ソホロースを製造する方法が開示されている。

特許文献 2 には、アクレモニウム ( *Acromonium* ) 属菌に由来するエンド型の - 1 , 2 - グルカナーゼを - 1 , 2 - グルカンに作用させ、ソホロースを製造する方

50

法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平5-212883号公報

【特許文献2】特開平2-49583号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】M. Nakajima et al., PLoS One, 9(3), e92353 (2014)

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかし、上述した従来の方法では、目的とするソホロース以外に他のオリゴ糖が多く生成してしまい、ソホロースの収率が低いという問題があった。

【0008】

本開示は、上記に鑑みてなされたものであり、ソホロースを製造する際に好適に用いられるエキソ-1,2-グルカナーゼ、及びエキソ-1,2-グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

20

【0009】

上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の実施態様が含まれる。

<1> 直鎖-1,2-グルカンに作用してソホロースを生成するエキソ-1,2-グルカナーゼ。

【0010】

<2> 以下の酵素学的性質を有する<1>に記載のエキソ-1,2-グルカナーゼ。

(i) 基質特異性及び作用特性

直鎖-1,2-グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

(ii) 至適pH

30の条件下で、pH6.5。

30

(iii) 至適温度

pH6.5の条件下で、40。

(iv) 安定pH

30、1時間の条件下で、pH5.5~10で安定。

(v) 温度安定性

pH6.5、1時間の条件下で、30まで安定。

【0011】

<3> パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である<1>又は<2>に記載のエキソ-1,2-グルカナーゼ。

40

【0012】

<4> 下記(a)~(d)から選択されるいずれか1種であるエキソ-1,2-グルカナーゼ。

(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1において1~18番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

(c) 前記(a)又は(b)のアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ-1,2-グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

(d) 前記(a)又は(b)のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、かつ、エ

50

キソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

【0013】

< 5 > パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である < 4 > に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ。

【0014】

< 6 > < 4 > 又は < 5 > に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼをコードするポリヌクレオチド。

【0015】

< 7 > < 6 > に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【0016】

< 8 > < 7 > に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

【0017】

< 9 > < 8 > に記載の形質転換体を培養し、培養物から < 4 > 又は < 5 > に記載のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを回収する工程を含むエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの製造方法。

【0018】

< 10 > エキソ - 1, 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

【0019】

< 11 > 前記エキソ - 1, 2 - グルカナーゼが以下の酵素学的性質を有する < 10 > に記載のソホロースの製造方法。

( i ) 基質特異性及び作用特性

直鎖 - 1, 2 - グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

( i i ) 至適 pH

30 の条件下で、pH 6.5。

( i i i ) 至適温度

pH 6.5 の条件下で、40 。

( i v ) 安定 pH

30、1時間の条件下で、pH 5.5 ~ 10 で安定。

( v ) 温度安定性

pH 6.5、1時間の条件下で、30 まで安定。

【0020】

< 12 > 前記エキソ - 1, 2 - グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である < 10 > 又は < 11 > に記載のソホロースの製造方法。

【0021】

< 13 > 下記 ( a ) ~ ( d ) から選択されるいずれか 1 種であるエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質。

( b ) 配列番号 1 において 1 ~ 18 番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

( c ) 前記 ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列において 1 個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

( d ) 前記 ( a ) 又は ( b ) のアミノ酸配列と 90 % 以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

【0022】

< 14 > 前記エキソ - 1, 2 - グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である < 13 > に記載のソホロースの製造方法。

【発明の効果】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 3 】

本開示によれば、ソホロースを製造する際に好適に用いられるエキソ - 1, 2 - グルカナーゼ、及びエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供することができる。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 4 】

【 図 1 】 組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより算出した結果を示す図である。

【 図 2 】 組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質の分子量を S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した結果を示す図である。

【 図 3 】 直鎖 - 1, 2 - グルカン又は環状 - 1, 2 - グルカンに組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 4 】 組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質の p H 依存性及び p H 安定性を示す図である。

【 図 5 】 組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質の温度依存性及び温度安定性を示す図である。

【 図 6 A 】 S o p 3 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 6 B 】 S o p 4 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 6 C 】 S o p 5 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 6 D 】 S o p 6 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 7 A 】 L a m 2 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 7 B 】 L a m 3 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 7 C 】 L a m 4 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 8 A 】 C e l 2 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 8 B 】 C e l 3 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 8 C 】 C e l 4 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 9 】 G e n 2 に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 1 0 A 】 S o p 5 R に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 1 0 B 】 S o p 6 R に組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

【 図 1 1 】 直鎖 - 1, 2 - グルカンに組換え B D I \_\_ 3 0 6 4 タンパク質を作用させた際のソホロースの反応収率を示す図である。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 2 5 】

以下、本発明の実施形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本明細書において「 ~ 」を用いて示された数値範囲は、「 ~ 」の前後に記載される数値

10

20

30

40

50

をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

アミノ酸配列の記載は左側がN末端側であり、アミノ酸残基は当分野で周知の1文字表記(例えば、グリシン残基であれば「G」)又は3文字表記(例えば、グリシン残基であれば「Gly」)を用いて表記する。

【0026】

<エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ>

本実施形態の第1の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼは、直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用してソホロースを生成するものである。第1の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの起源は特に制限されず、いかなる起源であってもよい。一例としては、パラバクテロイデス・ディスタソニス(Parabacteroides distasonis)由来のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼが挙げられる。

10

【0027】

第1の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼのより詳細な酵素学的性質は、例えば、以下のとおりである。

(i) 基質特異性及び作用特性

直鎖 - 1, 2 - グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

(ii) 至適pH

30 の条件下で、pH 6.5。

(iii) 至適温度

pH 6.5 の条件下で、40 。

20

(iv) 安定pH

30 、1時間の条件下で、pH 5.5 ~ 10で安定。

(v) 温度安定性

pH 6.5、1時間の条件下で、30 まで安定。

【0028】

また、本実施形態の第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼは、下記(a) ~ (d)から選択されるいずれか1種である。

(a) 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1において1 ~ 18番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

30

(c) 上記(a)又は(b)のアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

(d) 上記(a)又は(b)のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ - 1, 2 - グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

【0029】

第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの起源は特に制限されず、いかなる起源であってもよい。一例としては、パラバクテロイデス・ディスタソニス由来のエキソ - 1, 2 - グルカナーゼが挙げられる。

【0030】

上記(a)のタンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、配列番号2の塩基配列からなる遺伝子によりコードされている。以下、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質を「BDI\_3064タンパク質」とも記す。

40

【0031】

BDI\_3064タンパク質のより詳細な酵素学的性質は以下のとおりである。

(i) 基質特異性及び作用特性

直鎖 - 1, 2 - グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

(ii) 至適pH

30 の条件下で、pH 6.5。

(iii) 至適温度

50

pH 6.5 の条件下で、40 。

(iv) 安定 pH

30、1時間の条件下で、pH 5.5 ~ 10 で安定。

(v) 温度安定性

pH 6.5、1時間の条件下で、30 まで安定。

【0032】

上記(b)のタンパク質は、配列番号1において1~18番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質である。配列番号1の1~18番目のN末端領域は、シグナルペプチド予測サーバー SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)によりシグナルペプチドと判定される。したがって、上記(b)のタンパク質は、全長タンパク質からシグナルペプチドを除いた成熟タンパク質に対応すると考えられる。

10

【0033】

上記(c)のタンパク質は、上記(a)又は(b)のアミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ-1, 2-グルカナーゼ活性を有するタンパク質である。アミノ酸残基が置換、欠失、又は付加される位置は、エキソ-1, 2-グルカナーゼ活性が維持される限り特に制限されない。また、置換、欠失、又は付加されるアミノ酸残基の数は、エキソ-1, 2-グルカナーゼ活性が維持される限り特に制限されない。置換、欠失、又は付加されるアミノ酸残基の数は、例えば、1~70個であってもよく、1~55個であってもよく、1~40個であってもよく、1~25個であってもよく、1~10個であってもよい。

20

【0034】

任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換する場合、通常、置換前後でアミノ酸側鎖の性質が保存されていることが好ましい。アミノ酸側鎖の性質によってアミノ酸を分類する場合、例えば、親水性アミノ酸(D、E、K、R、H、S、T、N、Q)；疎水性アミノ酸(A、G、V、I、L、F、Y、W、M、C、P)；酸性アミノ酸(D、E)；塩基性アミノ酸(K、R、H)；脂肪族側鎖を有するアミノ酸(A、G、V、I、L)；芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(F、Y、W)；硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(M、C)；等に分類することができる(括弧内のアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す)。

30

【0035】

上記(d)のタンパク質は、上記(a)又は(b)のアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ-1, 2-グルカナーゼ活性を有するタンパク質である。上記(a)又は(b)のアミノ酸配列との配列同一性は、92%以上であってもよく、94%以上であってもよく、96%以上であってもよく、98%以上であってもよい。

【0036】

なお、「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列をアラインメントした場合の配列間の一致性を意味し、例えば、BLASTプログラム(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/cgi>)を使用して算出することができる。

40

【0037】

<ポリヌクレオチド>

本実施形態に係るポリヌクレオチドは、上述した第2の態様に係るエキソ-1, 2-グルカナーゼをコードするものである。

【0038】

本実施形態に係るポリヌクレオチドは、DNA、RNA、DNA/RNAキメラのいずれであってもよい。また、本実施形態に係るポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。一本鎖の場合、第2の態様に係るエキソ-1, 2-グルカナーゼをコードするセンス鎖であってもよく、センス鎖に対して相補的な配列を有するアンチセンス鎖であってもよい。二本鎖の場合、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA及びRNA

50



ハイブリッドのいずれであってもよい。

【0039】

<発現ベクター>

本実施形態に係る発現ベクターは、本実施形態に係るポリヌクレオチドを含むものである。本実施形態に係る発現ベクターは、本実施形態に係るポリヌクレオチドをベクター中のプロモーターの下流に機能的に連結することにより作製することができる。

【0040】

ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。プラスミドベクターとしては、大腸菌由来のプラスミドベクター、枯草菌由来のプラスミドベクター、酵母由来のプラスミドベクター等が挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40ベクター等が挙げられる。

10

【0041】

プロモーターとしては、trpプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター、CMVプロモーター、SRプロモーター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。

【0042】

本実施形態に係る発現ベクターは、必要に応じて、エンハンサー、選択マーカール等を、それぞれ機能可能な態様で含んでいてもよい。

20

【0043】

<形質転換体>

本実施形態に係る形質転換体は、本実施形態に係る発現ベクターが導入されたものである。

【0044】

発現ベクターが導入される宿主としては、細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等がある。細菌としては、エシェリヒア(Escherichia)属菌、バチルス(Bacillus)属菌等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、COS-7細胞、CHO細胞、CV-1細胞等が挙げられる。

宿主に発現ベクターを導入する方法としては、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、遺伝子銃法等が挙げられる。

30

【0045】

<エキソ - 1, 2 - グルカナーゼの製造方法>

本実施形態に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの製造方法は、本実施形態に係る形質転換体を培養し、培養物から上述した第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを回収する工程を含むものである。

【0046】

形質転換体を培養する培地及び培養条件は特に制限されず、宿主の種類に応じて適宜設定することができる。培養物から第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを回収する方法は特に制限されず、任意の方法を採用することができる。例えば、形質転換体を破碎した溶解液又は培養液をクロマトグラフィー(アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等)、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離などに供することで、第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを精製し、回収することができる。なお、第2の態様に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを回収する際には、必要に応じて結晶化を行ってもよい。結晶化方法としては、濃縮、温度低下、溶媒添加(エタノール、メタノール、アセトン等)などが挙げられる。

40

【0047】

<ソホロースの製造方法>

50

本実施形態に係るソホロースの製造方法は、本実施形態に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用させる工程を含むものである。

【0048】

基質となる直鎖 - 1, 2 - グルカンの重合度は特に制限されない。反応速度の観点から、直鎖 - 1, 2 - グルカンの平均重合度（平均DP）は、4以上であることが好ましい。

【0049】

基質となる直鎖 - 1, 2 - グルカンの調製方法は特に制限されず、任意の方法を採用することができる。

例えば、無機リン酸の存在下、スクロースホスホリラーゼ及び - 1, 2 - オリゴグルカンホスホリラーゼをスクロース及びグルコースに作用させることで、直鎖 - 1, 2 - グルカンを得ることができる（K. Abe et al., J. Appl. Glycosci., 62(2), 47-52(2015)）。

また、アセトバクター（Acetobacter）属菌の培養上清に含まれる直鎖 - 1, 2 - グルカンエタノール沈殿により回収し、脱塩することによっても、直鎖 - 1, 2 - グルカンを得ることができる（A. Amemura et al., J. Gen. Microbiol., 131, 301-307(1985)）。

【0050】

本実施形態に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼの使用形態は特に制限されず、菌体抽出液、精製酵素、組換え酵素等の種々の使用形態を採用することができる。また、本実施形態に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを固定化したバイオリクターカラムを用いて、固定化酵素リアクターとして反応を行うことも可能である。

【0051】

本実施形態に係るエキソ - 1, 2 - グルカナーゼを直鎖 - 1, 2 - グルカンに作用させる条件は特に制限されない。ソホロースの収率を向上させる観点から、pHはpH 5.5~7.0の範囲が好ましく、温度は25~35の範囲が好ましい。

【0052】

生成したソホロースは、クロマトグラフィー（サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等）、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離などに供することで、精製し、回収することができる。なお、ソホロースを回収する際には、必要に応じて結晶化を行ってもよい。結晶化方法としては、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトン等）などが挙げられる。

【0053】

以上のようにして製造されたソホロースは、例えば、トリコデルマ属菌によるセルラーゼの生産効率を向上させるために利用することができる。また、ソホロースは、良質な甘味を示すことに加え、動物は - 1, 2 - グリコシド結合を切断する酵素を持たないため、ほぼノンカロリーである。このため、製造されたソホロースを、ダイエット食品等の甘味料として利用することもできる。また、製造されたソホロースを、糖含有分子を製造する際の材料として利用することもできる。さらに、製造されたソホロースを用いて、未知の有用機能を探索することもできる。

【実施例】

【0054】

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0055】

以下の実施例で使用する直鎖 - 1, 2 - グルカン、環状 - 1, 2 - グルカン、重合度nの - 1, 2 - グルコオリゴ糖（以下、「Sopn」とも記す。）及びSopnの還元末端をアルコール化したSopnRは、それぞれ次のようにして合成した。

【0056】

平均重合度25及び77の直鎖 - 1, 2 - グルカンは、リステリア・イノキュア由来

10

20

30

40

50

の - 1, 2 - オリゴグルカンホスホリラーゼを用いて、既報に従って合成した (K. Abe et al., J. Appl. Glycosci., 62 (2), 47 - 52 (2015); M. Nakajima et al., PLoS One, 9 (3), e92353 (2014))。

【0057】

環状 - 1, 2 - グルカンは、以下のように合成した。

まず、リゾビウム・レグミノサルム・トリフォリイ (Rhizobium regum inosarum trifolii) (NBRC (IFO) 13338) を 500 mL の培地 (0.5 w/v % マンニトール、0.1 w/v % 酵母エキス、0.1 w/v % MgSO<sub>4</sub>、0.07 w/v % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.01 w/v % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) に播種し、25 °C で培養した。培地を遠心分離 (15000 rpm、10 分間) して培養上清を回収した後、濃縮した。次いで、アセトンを終濃度 30 v/v % となるように加えて上清を回収し、さらにアセトンを終濃度 90 v/v % となるよう加えて沈殿物を回収した。回収した沈殿物を水に溶解した後、精製イオン交換樹脂 (アンバーライト MB - 4、オルガノ (株)) で脱塩し、ゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: XK100 (GE Healthcare)、担体: HW - 40F (東ソー (株))) に供した。環状 - 1, 2 - グルカンを含む画分を回収し、凍結乾燥して 300 μL の水に再溶解した。

10

【0058】

得られた環状 - 1, 2 - グルカンは、直鎖 - 1, 2 - グルカんに作用するが環状 - 1, 2 - グルカンには作用しない - 1, 2 - グルコシダーゼ (KEGG 遺伝子 ID: BT\_3567) によって分解されず、エンド - 1, 2 - グルカナーゼによって分解されることを確認した。

20

【0059】

Sopn は、リステリア・イノキュア由来の - 1, 2 - オリゴグルカンホスホリラーゼを用いて、既報に従って合成した (M. Nakajima et al., PLoS One, 9 (3), e92353 (2014))。

【0060】

SopnR は、Sopn を水素化ホウ素ナトリウム (NaBH<sub>4</sub>) で処理することにより合成した。より具体的には、10 w/v % Sopn 溶液 (40 μL) に 1 M NaBH<sub>4</sub> (20 μL) を加え、室温で 5 分間以上静置した。この溶液に 3 M 酢酸 (15 μL) を加えた後、2 - プロパノールを 1 mL 加えて氷上に 5 分間静置し、生成した沈殿物を遠心分離 (15000 rpm、4 分間) により回収した。沈殿物を少量の水に溶解した後、2 - プロパノールを 1 mL 加え、得られた沈殿物を風乾することにより、SopnR を得た。

30

【0061】

<実施例 1: 組換え BDI\_3064 タンパク質の製造>

まず、パラバクテロイデス・ディスタソニス (DSM20701) のゲノム DNA (Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) を鋳型として、PCR 法により BDI\_3064 遺伝子を増幅した。PCR 用酵素としては、KOD-Plus - (東洋紡 (株)) を用いた。フォワードプライマー及びリバースプライマーの塩基配列は以下のとおりである。塩基配列中の下線部は、制限酵素 Nde I 及び Xho I の認識部位を示す。

40

フォワードプライマー: 5' - CAGCTTGCATATGGTGGAGAAACCTTAC - 3' (配列番号 3)

リバースプライマー: 5' - GCACTCGAGTTTTATGGATTGAATCTTTTG - 3' (配列番号 4)

【0062】

得られた PCR 増幅産物は、High PCR Product Purification kit (Roche Applied Science) を用いて精製した。

50

## 【0063】

次いで、pET30aベクター（Novagen）の制限酵素NdeI及びXhoIの切断部位にPCR増幅産物を挿入（ライゲーション）し、発現ベクターを得た。ライゲーション用キットとしては、Ligation high Ver. 2（東洋紡（株））を用いた。

## 【0064】

得られた発現ベクターにより発現されるタンパク質（組換えBDI\_\_3064タンパク質）のアミノ酸配列を配列番号5に示し、塩基配列を配列番号6に示す。配列番号5のC末端側の8個のアミノ酸残基（LeuGluHisHisHisHisHisHis）は、pET30aベクターに由来するタグペプチド部分である。

10

## 【0065】

次いで、得られた発現ベクターを大腸菌Rosetta 2（DE3）に導入して形質転換し、形質転換体を得た。この形質転換体を30μg/mLのカナマイシンを含むLB培地に播種し、37℃で培養した。培地の波長600nmにおけるOD値が0.8に達するまで培養した後、イソプロピル-β-D-ガラクトピラノシド（IPTG）を終濃度0.1mMとなるように加え、20℃で一晩培養した。

## 【0066】

次いで、培養後の形質転換体を遠心分離（5000rpm、10分間）により回収し、300mM NaClを含む50mM MOPSバッファー（pH7.0）で懸濁した。懸濁した形質転換体を超音波破碎した後、遠心分離（15000rpm、15分間）して上清を回収した。回収した上清を、平衡バッファー（50mM MOPSバッファー（pH7.0）、300mM NaCl）により平衡化したHisTrap FF crudeカラム（GE Healthcare）にアプライし、洗浄バッファー（50mM MOPSバッファー（pH7.0）、300mM NaCl、10mM イミダゾール）で洗浄した。洗浄後、10～300mMのイミダゾールの直線濃度勾配により、目的の組換えBDI\_\_3064タンパク質を溶出させた。その後、Amicon Ultra 30,000 molecular weight cut-off（Merck Millipore）を用いて組換えBDI\_\_3064タンパク質を濃縮し、50mM MOPSバッファー（pH7.0）にバッファー交換した。

20

## 【0067】

なお、以降の実験において、組換えBDI\_\_3064タンパク質のタンパク質濃度は、組換えBDI\_\_3064タンパク質の理論モル吸光係数（ $187855\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ）を用いて、波長280nmにおける吸光度に基づいて算出した。

30

## 【0068】

<実施例2：組換えBDI\_\_3064タンパク質の分子量の測定>

実施例1においてHisTrap FF crudeカラムにより精製した組換えBDI\_\_3064タンパク質を、UnoQカラム（Bio-Rad）により精製した。そして、UnoQカラムにより精製した組換えBDI\_\_3064タンパク質1.0mgを、平衡バッファー（20mM MESバッファー（pH6.5）、150mM NaCl）により平衡化したSuperdex 200（HiLoad 16/60、GE Healthcare）にアプライし、ゲル濾過クロマトグラフィーにより組換えBDI\_\_3064タンパク質の分子量を測定した。標準タンパク質としては、オボアルブミン（45kDa）、コンアルブミン（75kDa）、アルドラーゼ（158kDa）、フェリチン（440kDa）、及びサイログロブリン（669kDa）を用いた。

40

## 【0069】

ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を図1に示す。図1において、横軸は分配係数（Kav）を示し、縦軸は分子量（ $\log_{10}(\text{Da})$ ）を示す。図1に示すとおり、組換えBDI\_\_3064タンパク質の分子量は約114kDaと算出された。この結果から、組換えBDI\_\_3064タンパク質は単量体であることが分かる。

## 【0070】

50

次いで、精製前の粗タンパク質、HisTrap FF crudeカラムによる精製後のタンパク質、UnoQカラムによる精製後のタンパク質、及びゲル濾過クロマトグラフィーによる分離後のタンパク質について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度：11w/v%）により分子量を測定した。

#### 【0071】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図2に示す。図2において、Mは分子量マーカー（Precision Plus Protein unstained standards (Bio-Rad)）を示し、レーン1は精製前の粗タンパク質を示し、レーン2はHisTrap FF crudeカラムによる精製後のタンパク質を示し、レーン3はUnoQカラムによる精製後のタンパク質を示し、レーン4はゲル濾過クロマトグラフィーによる分取後のタンパク質を示す。図2に示すとおり、組換えBDI\_\_3064タンパク質の分子量は約80kDaであった。

10

#### 【0072】

<実施例3：組換えBDI\_\_3064タンパク質の作用特性の確認>

平均重合度25の直鎖-1, 2-グルカン及び環状-1, 2-グルカンのそれぞれを基質として、以下のように組換えBDI\_\_3064タンパク質の作用特性を確認した。

#### 【0073】

まず、0.2w/v% 直鎖-1, 2-グルカン又は0.2w/v% 環状-1, 2-グルカンを含む20mM MESバッファー（pH6.5）中に組換えBDI\_\_3064タンパク質を終濃度0.625mg/mLとなるように添加し、30で反応させた（反応液50μL）。反応開始から0分後、15分後、30分後、1時間後、2時間後、5時間後に反応液を5μLずつサンプリングし、各サンプルを100で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

20

#### 【0074】

次いで、各サンプルを薄層クロマトグラフィー（TLC）に供した。具体的には、各サンプルをTLCシリカゲル60 F<sub>254</sub>プレート（Merck）に1.0μLずつスポットし、風乾させた後、展開液（アセトニトリル：水=3：1（体積比））により展開した。次いで、プレートを5w/v% 硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオープンで熱した。

#### 【0075】

薄層クロマトグラフィーの結果を図3に示す。図3において、Mは25mMのSop2を0.4μLスポットしたものである。図3に示すとおり、直鎖-1, 2-グルカンを基質とした場合には時間経過に従って遊離したSop2の量が増加したが、環状-1, 2-グルカンを基質とした場合にはSop2が遊離しなかった。この結果から、組換えBDI\_\_3064タンパク質は、直鎖-1, 2-グルカンを2糖ずつエキソ的に分解するエキソ-1, 2-グルカナナーゼであることが分かる。

30

#### 【0076】

<実施例4：組換えBDI\_\_3064タンパク質のpH及び温度プロフィールの確認>

組換えBDI\_\_3064タンパク質のpH及び温度プロフィールは、以下のような手順で確認した。まず、組換えBDI\_\_3064タンパク質によりSop4を分解し、分解産物をアーモンド由来-グルコシダーゼ（オリエンタル酵母工業（株））で分解する。アーモンド由来-グルコシダーゼは、Sop2にのみ作用しグルコースまで分解するが、重合度nが3以上のSopnには作用しない。このため、組換えBDI\_\_3064タンパク質により生成したSop2のみがグルコースまで分解される。生成したグルコースをGOPOD（グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ）法で定量することにより反応速度を決定し、この反応速度を酵素活性とする。

40

#### 【0077】

pH依存性を確認する際には、3mM Sop4、3.25μg/mL 組換えBDI\_\_3064タンパク質、及び20mM 各種バッファー（クエン酸バッファー（pH3.0~5.5）、MESバッファー（pH5.5~6.5）、MOPSバッファー（pH6

50

．5～7．5)、HEPPSOバッファー(pH7．5～8．5)、ピシンバッファー(pH8．5～9．0)を混合した反応液を30℃で15分間反応させた後、100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

#### 【0078】

pH安定性を確認するには、3．25μg/mL組換えBDI\_\_3064タンパク質及び20mM各種バッファー(クエン酸バッファー(pH3．0～5．5)、MESバッファー(pH5．5～6．5)、MOPSバッファー(pH6．5～7．5)、HEPPSOバッファー(pH7．5～8．5)、ピシンバッファー(pH8．5～9．0))を混合した混合液を30℃で1時間インキュベートした。そして、3mM Sop4、20mM MESバッファー(pH6．5)、及びインキュベート後の混合液(反応液の1/10量)を混合した反応液を30℃で15分間反応させた後、100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

10

#### 【0079】

温度依存性を確認するには、3mM Sop4、3．25μg/mL組換えBDI\_\_3064タンパク質、及び20mM MESバッファー(pH6．5)を混合した反応液を各温度で15分間反応させた後、100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

#### 【0080】

温度安定性を確認するには、3．25μg/mL組換えBDI\_\_3064タンパク質及び20mM MESバッファー(pH6．5)を混合した混合液を各温度で1時間インキュベートした。そして、3mM Sop4、20mM MESバッファー(pH6．5)、及びインキュベート後の混合液(反応液の1/10量)を混合した反応液を30℃で15分間反応させた後、100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

20

#### 【0081】

そして、反応停止後の溶液と、1．0mg/mLアーモンド由来α-D-グルコシダーゼを含む200mM酢酸バッファー(pH5．0)とを等量混合し、50℃で2時間インキュベートした。このインキュベート後の溶液とGOPOD試薬(Megazyme)とを1:6の体積比で混合し、45℃で20分間インキュベートした。反応後、波長510nmにおける吸光度を測定することによりグルコース濃度を定量し、酵素活性を評価した。

30

#### 【0082】

組換えBDI\_\_3064タンパク質のpH依存性及びpH安定性の結果を図4に示す。図4において、実線はpH依存性を示し、破線はpH安定性を示す。図4に示すとおり、組換えBDI\_\_3064タンパク質は、30℃、1時間の条件下で、pH5．5～10で安定であった。至適pHは、30℃の条件下で、pH6．5であった。

#### 【0083】

また、組換えBDI\_\_3064タンパク質の温度依存性及び温度安定性の結果を図5に示す。図5において、実線は温度安定性を示し、破線は温度依存性を示す。図5に示すとおり、組換えBDI\_\_3064タンパク質の至適温度は、pH6．5の条件下で、40℃であった。また、組換えBDI\_\_3064タンパク質は、pH6．5、1時間の条件下で、30℃まで安定であった。

40

#### 【0084】

<実施例5:組換えBDI\_\_3064タンパク質の各種多糖に対する基質特異性の確認>  
各種多糖、0．1mg/mL組換えBDI\_\_3064タンパク質、及び50mM MESバッファー(pH6．5)を混合した反応液を30℃で24時間反応させた後、100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。多糖としては、平均重合度25の直鎖α-D-グルカン、リケナン、ラミナリン、アラビノガラクトン、パキマン、カルボキシメチル化カードラン(CM-カードラン)、カルボキシメチル化パキマン(CM-パキマン)、グルコマンナン、タマリンドキシログルカン、ポリガラクトン酸、カルボキシメチルセルロース(CM-セルロース)、ヒドロキシエチルセルロース、及びア

50

ラビナンを用いた。そして、直鎖 - 1, 2 - グルカンを基質とした場合には G O P O D 法により酵素活性を測定し、その他の多糖を基質とした場合には P A H B A H ( p - ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド ) 法により酵素活性を測定した。

【 0 0 8 5 】

直鎖 - 1, 2 - グルカンに対する比活性を 1 0 0 % としたときの、各多糖に対する相対活性 ( % ) を下記表 1 に示す。表 1 において、「 N . D . 」は相対活性が 0 . 2 % 未満であることを示す。

【 0 0 8 6 】

【表 1】

基質	濃度(w/v%)	結合様式	相対活性(%)
直鎖 $\beta$ -1,2-グルカン(平均DP=25)	0.2	$\beta$ -1.2	100 (0.10 U/mg)
リケナン	0.0125	$\beta$ -1.3/1,4	N.D. (<0.2 %)
ラミナリン	0.0125	$\beta$ -1.3/1,6	N.D.
アラビノガラクトン	0.006	$\beta$ -1.3/1,6	N.D.
パキマン	0.1	$\beta$ -1.3	N.D.
CM-カードラン	0.05	$\beta$ -1.3	N.D.
CM-パキマン	0.025	$\beta$ -1.3	N.D.
グルコマンナン	0.1	$\beta$ -1.4	N.D.
タマリンドキシログルカン	0.2	$\beta$ -1.4	N.D.
ポリガラクトン酸	0.1	$\beta$ -1.4	N.D.
CM-セルロース	0.1	$\beta$ -1.4	N.D.
ヒドロキシエチルセルロース	0.1	$\beta$ -1.4	N.D.
アラビナン	0.2	$\alpha$ -1,5	N.D.

10

20

【 0 0 8 7 】

表 1 の結果から、組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質は、各種多糖の中でも直鎖 - 1, 2 - グルカンに対して高い基質特異性を示すことが分かる。

【 0 0 8 8 】

< 実施例 6 : 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質の各種オリゴ糖に対する基質特異性の確認 >

まず、0 . 2 w / v % 各種オリゴ糖、0 . 3 2 5 m g / m L 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質、及び 5 0 m M M E S バッファー ( p H 6 . 5 ) を混合した反応液を 3 0 で反応させた。オリゴ糖としては、S o p 3、S o p 4、S o p 5、S o p 6、ラミナリビオース ( L a m 2 )、ラミナリトリオース ( L a m 3 )、ラミナリテトラオース ( L a m 4 )、セロビオース ( C e l 2 )、セロトリオース ( C e l 3 )、セロテトラオース ( C e l 4 )、及びゲンチオビオース ( G e n 2 ) を用いた。S o p 4、S o p 5、S o p 6 を基質とした場合には、反応開始から 0 分後、2 . 5 分後、5 分後、7 . 5 分後、1 0 分後、1 5 分後、3 0 分後、1 時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを 1 0 0 で 5 分間加熱することにより酵素反応を停止させた。その他のオリゴ糖を基質とした場合には、反応開始から 0 時間後、1 時間後、6 時間後、2 4 時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを 1 0 0 で 5 分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

30

40

【 0 0 8 9 】

次いで、各サンプルを薄層クロマトグラフィ ( T L C ) に供した。具体的には、各サンプルを T L C シリカゲル 6 0 F <sub>2 5 4</sub> プレート ( M e r c k ) に 1 . 0  $\mu$  L ずつスポットし、風乾させた後、展開液 ( アセトニトリル : 水 = 3 : 1 ( 体積比 ) ) により展開した。次いで、プレートを 5 w / v % 硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオープンで熱した。

【 0 0 9 0 】

50

薄層クロマトグラフィの結果を図6A～図9に示す。図6A～図6Dにおいて、MはマーカーとしてのSop<sub>n</sub> (n = 1～7)を示し、プレート上の数字はSop<sub>n</sub>の重合度である。図7A～図7Cにおいて、MはマーカーとしてのLam<sub>2</sub>、Lam<sub>3</sub>、Lam<sub>4</sub>、及びグルコース(Glc)を示す。図8A～図8Cにおいて、MはマーカーとしてのCel<sub>2</sub>、Cel<sub>3</sub>、Cel<sub>4</sub>、及びGlcを示す。図9において、MはマーカーとしてのGen<sub>2</sub>及びGlcを示す。図6A～図9に示すとおり、組換えBDI\_\_3064タンパク質は、各種オリゴ糖の中でもSop<sub>n</sub>に対して、特に重合度が4以上のSop<sub>n</sub>に対して高い基質特異性を示した。

【0091】

<実施例7：組換えBDI\_\_3064タンパク質の反応速度論的解析>

0.25～4.0mMのSop<sub>4</sub>に対して3.3μg/mLの組換えBDI\_\_3064タンパク質を30℃にて反応させた。分解産物をアーモンド由来β-D-グルコシダーゼで分解し、生成したグルコースをGOPOD法で定量し、Sop<sub>2</sub>当量に変換した。反応速度論量は、データ解析プログラム(KalaidaGraph ver.3.51、(株)ヒューリンクス)にて、実験値を下記式(1)のミカエリス-メンテン式にフィッティングすることにより算出した。式(1)中、K<sub>m</sub>はミカエリス定数を示し、k<sub>cat</sub>は触媒活性を示し、[S]は基質濃度を示し、[E]<sub>0</sub>は全酵素濃度を示す。

【0092】

【数1】

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

【0093】

0.3～4mMのSop<sub>5</sub>、及び0.05～0.5mMの直鎖β-1,2-グルカン(平均重合度77)に対しても同様に組換えBDI\_\_3064タンパク質を反応させ、反応速度論量を算出した。反応速度論量の算出結果を下記表2に示す。

【0094】

【表2】

基質	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
Sop <sub>4</sub>	53.6±2.76	1.80±0.180	29.7
Sop <sub>5</sub>	28.7±1.13	1.60±0.230	17.9
直鎖β-1,2-グルカン(平均DP=77)	0.479±0.081	1.03±0.240	0.466

【0095】

表2の結果から、重合数が少ないほどk<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>の値が大きく、反応が速くなることが分かる。

【0096】

<実施例8：組換えBDI\_\_3064タンパク質の分解方向の確認>

まず、0.2w/v% Sop<sub>5</sub>R又はSop<sub>6</sub>R、組換えBDI\_\_3064タンパク質、及び50mM MESバッファー(pH6.5)を混合した反応液を30℃で反応させた。組換えBDI\_\_3064タンパク質の濃度は、Sop<sub>5</sub>Rについては6.5μg/mL、Sop<sub>6</sub>Rについては33μg/mLとした。反応開始から0分後、2.5分後、5分後、7.5分後、10分後、15分後、30分後、1時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを100℃で5分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

【0097】

次いで、各サンプルを薄層クロマトグラフィ(TLC)に供した。具体的には、各サンプルをTLCシリカゲル60 F<sub>254</sub>プレート(Merck)に1.0μLずつスポットし、風乾させた後、展開液(アセトニトリル：酢酸：2-プロパノール：水=17：4



: 4 : 3 (体積比)) により 2 回展開した。次いで、プレートを 5 w / v % 硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオープンで熱した。

【 0 0 9 8 】

薄層クロマトグラフィーの結果を図 1 0 A 及び図 1 0 B に示す。図 1 0 A 及び図 1 0 B において、M 1 はマーカーとしての S o p n ( n = 1 ~ 7 ) を示し、M 2 はマーカーとしての S o p n R ( n = 2, 4, 6, 8 ) を示し、M 3 はマーカーとしての S o p n R ( n = 3, 5, 7, 9 ) を示し、プレート上の数字は S o p n 又は S o p n R の重合度である。図 1 0 A 及び図 1 0 B に示すとおり、S o p 5 R を基質とした場合と S o p 6 R を基質とした場合とのいずれも、共通の生成物として S o p 2 が確認された。この結果から、組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質は、直鎖 - 1, 2 - グルカン を非還元末端側から 2 糖ずつエキソ的に分解することが分かる。

10

【 0 0 9 9 】

< 実施例 9 : 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質を用いたソホロースの製造 ( 1 ) >

平均重合度 2 5 の直鎖 - 1, 2 - グルカンと組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質とを反応させた際のソホロースの反応収率を、1. 5 m L チューブスケール ( 反応液量 1 m L ) で求めた。

【 0 1 0 0 】

まず、0. 3 4 w / v % 直鎖 - 1, 2 - グルカン、3. 2 5 μ g / m L 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質、及び 2 0 m M M E S バッファー ( p H 6. 5 ) を混合した反応液 1 m L を 3 0 で反応させた。反応中に反応液の一部をサンプリングし、サンプルを 1 0 0 で 5 分間加熱して酵素反応を停止させた後、1 0 倍希釈した。次いで、希釈後の反応液と 1. 0 m g / m L アーモンド由来 - グルコシダーゼを含む 2 0 0 m M 酢酸バッファー ( p H 5. 0 ) とを等量混合し、5 0 で 2 時間インキュベーションを行った後、グルコース濃度を G O P O D 法で定量した ( このときのグルコース濃度を「第 1 のグルコース濃度」という ) 。また、希釈後の反応液と 2 0 0 m M 酢酸バッファー ( p H 5. 0 ) とを等量混合した混合液中のグルコース濃度を G O P O D 法で定量した ( このときのグルコース濃度を「第 2 のグルコース濃度」という ) 。そして、第 1 のグルコース濃度から第 2 のグルコース濃度を減算した値に基づいて、ソホロース濃度を算出した。

20

【 0 1 0 1 】

ソホロースの反応収率の測定結果を図 1 1 に示す。図 1 1 に示すとおり、反応開始から約 1 2 時間の段階で、ソホロースの反応収率は約 9 0 % という極めて高い値を示し、副産物としてのグルコースは殆ど生成しなかった。

30

【 0 1 0 2 】

< 実施例 1 0 : 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質を用いたソホロースの製造 ( 2 ) >

平均重合度 2 5 の直鎖 - 1, 2 - グルカンと組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質とを 5 0 0 m L スケールで反応させ、ソホロースを製造した。

【 0 1 0 3 】

まず、0. 3 4 w / v % 直鎖 - 1, 2 - グルカン、0. 1 5 m g / m L 組換え B D I \_ 3 0 6 4 タンパク質、及び 5 m M リン酸バッファー ( p H 6. 5 ) を混合した反応液 5 0 0 m L を 3 0 で反応させた。4 0 時間後、反応液を 1 0 0 で 5 分間加熱して酵素反応を停止させた。

40

【 0 1 0 4 】

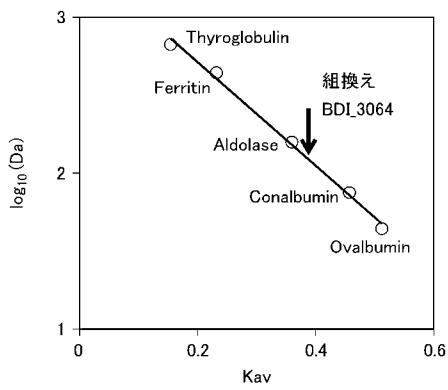
次いで、反応液をフィルター ( M i l l e x - G P、孔径 0. 2 2 μ m、M e r c k M i l l i p o r e ) に通すことにより沈殿したタンパク質を除去し、その後、精製イオン交換樹脂 ( アンバーライト M B - 4、オルガノ ( 株 ) ) で脱塩した ( この時点で凍結乾燥すると 1. 7 g ) 。脱塩後の反応液を濃縮した後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー ( カラム : X K 1 0 0 ( G E H e a l t h c a r e )、担体 : H W - 4 0 F ( 東ソー ( 株 ) ) ) に供し、ソホロースを含む画分を回収した。回収した液を凍結乾燥したところ、ソホロースの収量は 1. 2 g であった。

【 0 1 0 5 】

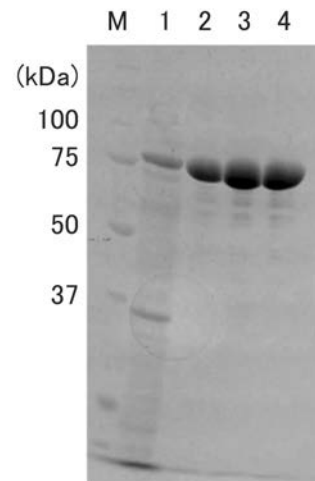
50

2017年4月18日に出願された日本出願2017-082216の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

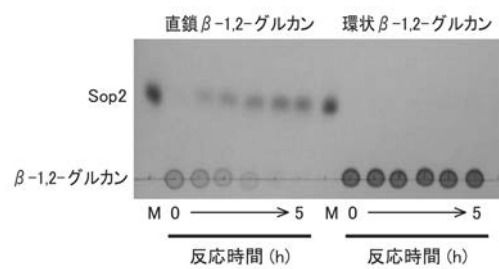
【 図 1 】



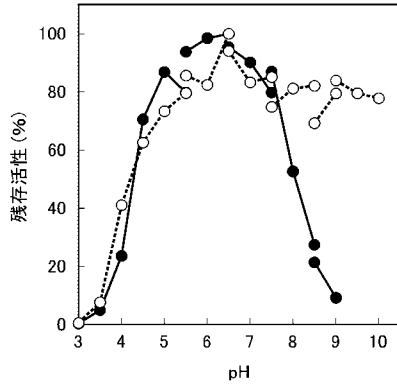
【 図 2 】



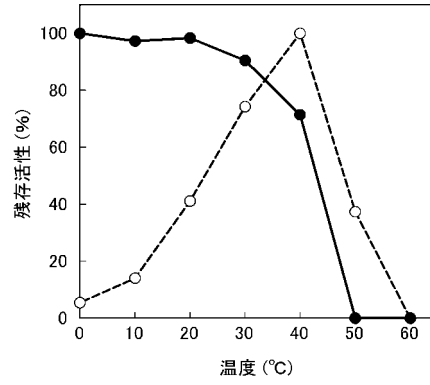
【 図 3 】



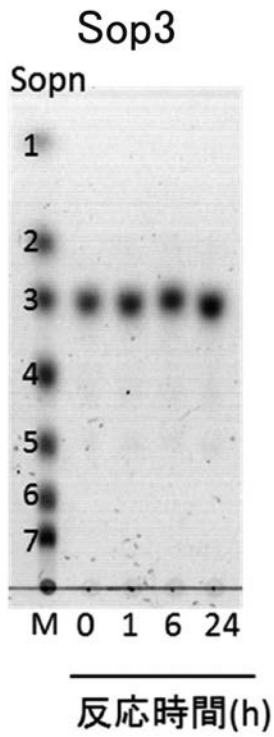
【 図 4 】



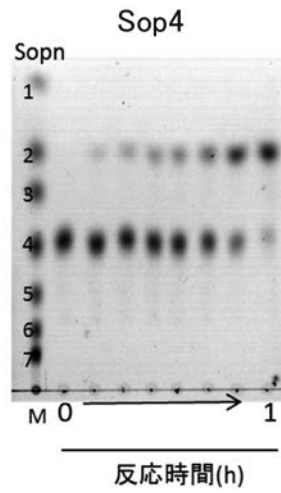
【 図 5 】



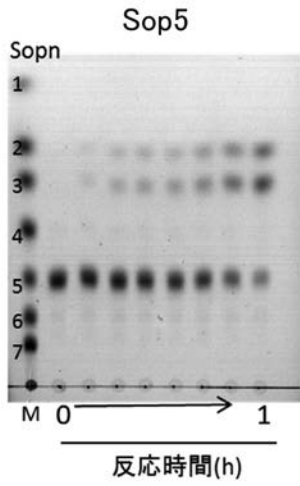
【 図 6 A 】



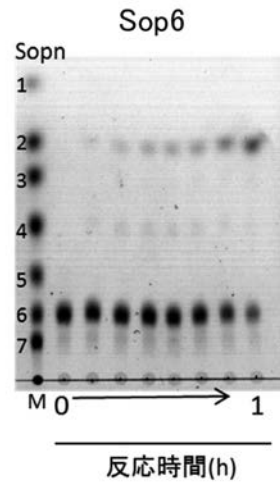
【 図 6 B 】



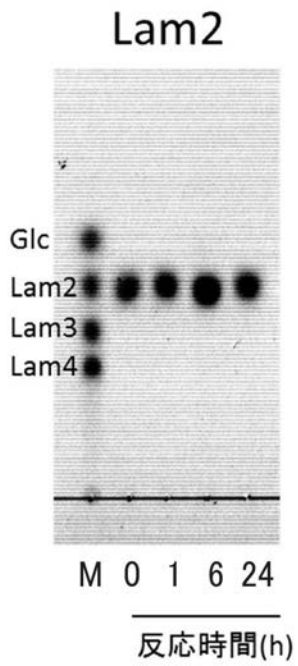
【 図 6 C 】



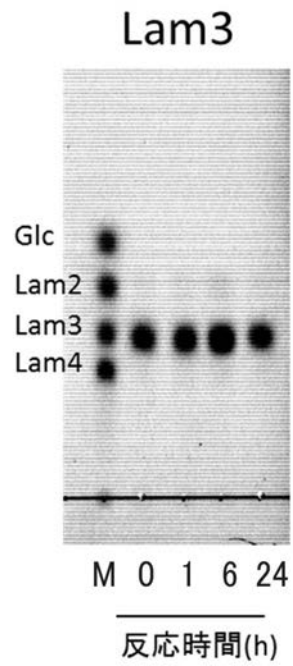
【 図 6 D 】



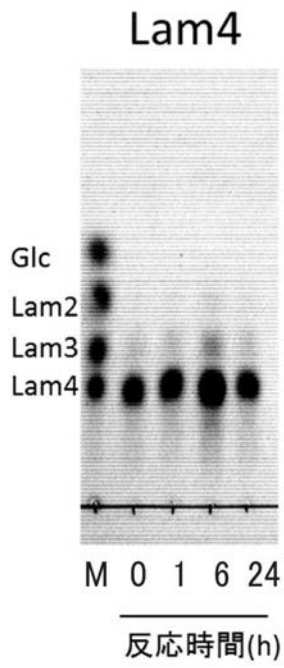
【 図 7 A 】



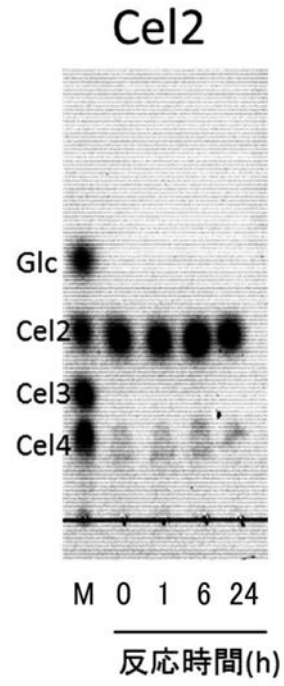
【 図 7 B 】



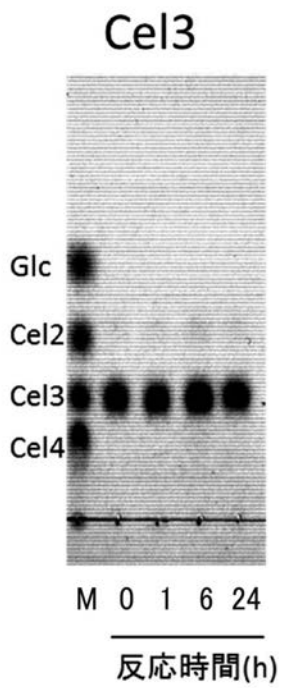
【 図 7 C 】



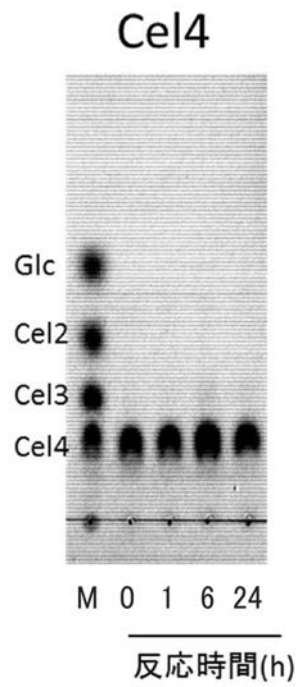
【 図 8 A 】



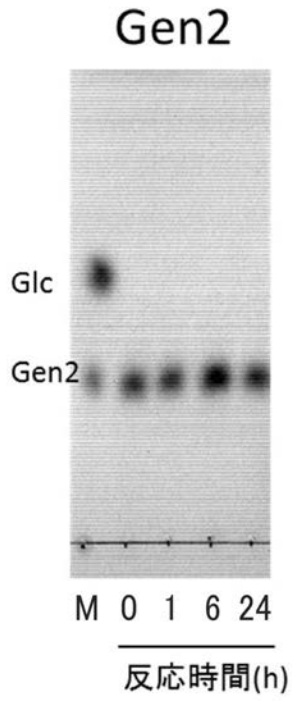
【 図 8 B 】



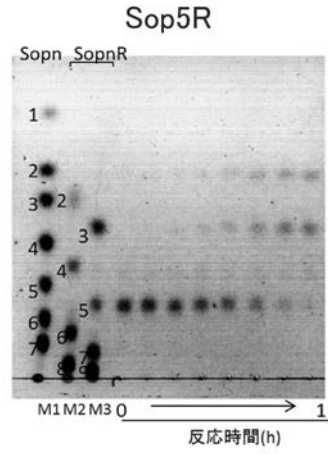
【 図 8 C 】



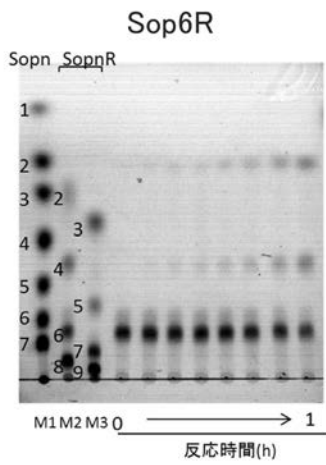
【 図 9 】



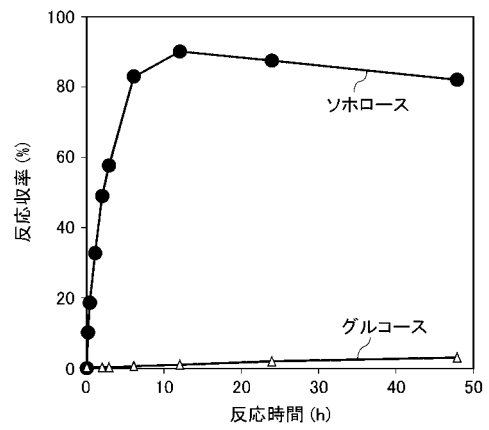
【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 B 】



【 図 1 1 】



【配列表】

2018194092000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/016001						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. C12N15/31(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P19/12(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N9/00-9/99, C12P1/00-41/00, C12N15/00-15/90 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CApus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">Category*</th> <th style="width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 25%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, accession no. ABR44770.1 [online], 31 January 2014, [search date 05 July 2018], internet: &lt;URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/&gt; entire text</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, accession no. ABR44770.1 [online], 31 January 2014, [search date 05 July 2018], internet: <URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/> entire text	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, accession no. ABR44770.1 [online], 31 January 2014, [search date 05 July 2018], internet: <URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/> entire text	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 09 July 2018 (09.07.2018)		Date of mailing of the international search report 17 July 2018 (17.07.2018)						
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/JP2018/016001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XU, Jian et al., "Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine", PLOS BIOLOGY, 2007, vol. 5, no. 7, e156, page 1575, left column, lines 2-3, page 1585, right column, lines 23-27	1-9
A	REESE, Elwyn T. et al., "β-D-1, 2-GLUCANASES IN FUNGI", Canadian Journal of Microbiology, 1961, vol. 7, no. 3, pp. 309-317, abstract	1-14
A	JP 59-154985 A (DAIKIN INDUSTRIES, LTD.) 04 September 1984, page 2, upper left column, lines 1-3, page 2, lower right column, lines 15-17 (Family: none)	1-14
A	田中信清 ほか, 新規 1,2-β-グルカン分解酵素の単離同定及び機能解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 05 March 2015, 2E32p05, section of "method, result", non-official translation (TANAKA, Nobukiyo et al., "Isolation and identification of novel 1,2-β-glucan degradation enzyme, and functional analysis", Lecture Abstracts in 2015 Meeting of Japan Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)	1-14
A	ABE, Koichi et al., "Biochemical and structural analyses of a bacterial endo-β-1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family", Journal of Biological Chemistry, 07 March 2017, vol. 292, no. 18, pp. 7487-7506, page 7488, right column, line 5 to page 7489, right column, line 26, fig. 5	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 6 0 0 1													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))															
Int.Cl. C12N15/31(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P19/12(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. C12N 9/00-9/99, C12P 1/00-41/00, C12N 15/00-15/90															
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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018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	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2018年														
日本国実用新案登録公報	1996-2018年														
日本国登録実用新案公報	1994-2018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)															
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/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													
X	Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, Accession No. ABR44770.1 [online], 2014.01.31, [検索日 2018.07.05], インターネット: <URL : <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/</a> > 全文	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>「&amp;」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 09.07.2018		国際調査報告の発送日 17.07.2018													
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) 西 賢二	4B 1194												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 6 0 0 1
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	XU, Jian et al., Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine, PLOS BIOLOGY, 2007, Vol.5, No.7, e156 1575 頁左欄 2-3 行目, 1585 頁右欄 23-27 行目	1-9
A	REESE, Elwyn T. et al., $\beta$ -D-1,2-GLUCANASES IN FUNGI, Canadian Journal of Microbiology, 1961, Vol.7, No.3, p.309-317 Abstract	1-14
A	JP 59-154985 A (ダイキン工業株式会社), 1984.09.04, 2 頁左上欄 1-3 行目, 同頁右下欄 15-17 行目 (ファミリーなし)	1-14
A	田中信清 ほか, 新規 1,2- $\beta$ -グルカン分解酵素の単離同定及び機能解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2015.03.05, 2E32p05 方法、結果の項	1-14
A	ABE, Koichi et al., Biochemical and structural analyses of a bacterial endo- $\beta$ -1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family, Journal of Biological Chemistry, 2017.03.07, Vol.292, No.18, p.7487-7506 7488 頁右欄 5 行目-7489 頁右欄 26 行目, 図 5	1-14

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	19/12	(2006.01)	C 1 2 P	19/12		

(81) 指定国・地域 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, JO, 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

(72) 発明者 田口 速男  
東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

(72) 発明者 清水 久佳  
東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

(72) 発明者 中井 博之  
新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050番地 国立大学法人新潟大学農学部内

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD02 EE01 KK15 LL05  
4B064 AF03 CA19 CB07 CC24 CD19 DA16  
4B065 AA26X AB01 AC14 BA02 BB18 BB21 CA20 CA60

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)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184条の10第1項(実用新案法第48条の13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。