

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 23 日(23.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/111810 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 19/26 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/053833
- (22) 国際出願日: 2012 年 2 月 17 日(17.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-032947 2011 年 2 月 18 日(18.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人信州大学 (SHINSHU UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭三丁目 1 番 1
号 Nagano (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 下坂 誠
(SHIMOSAKA, Makoto) [JP/JP]; 〒3868567 長野県上
田市常田三丁目 1 5 番 1 号 国立大学法人信州
大学繊維学部内 Nagano (JP). 田口 悟朗 (TAGUCHI,
Goro) [JP/JP]; 〒3868567 長野県上田市常田三丁目
1 5 番 1 号 国立大学法人信州大学繊維学部内

Nagano (JP). 野川 優洋 (NOGAWA, Masahiro) [JP/JP];
〒3868567 長野県上田市常田三丁目 1 5 番 1 号
国立大学法人信州大学繊維学部内 Nagano (JP).

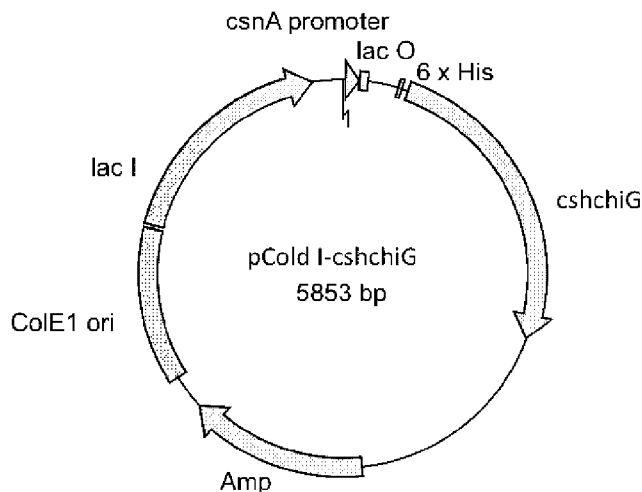
- (74) 代理人: 葛和 清司 (KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023
東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 4 番 1 号西新宿三
井ビルディング 1 7 階 葛和国際特許事務所
Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: CHITINASE GENE AND CHITINASE ENCODED BY GENE

(54) 発明の名称: キチン分解酵素遺伝子および該遺伝子によりコードされるキチン分解酵素

【図1】



(57) Abstract: Provided are: protein-expressing gene with chitinase activity and a protein with chitinase activity encoded by said gene; a method for breaking down chitin using said protein with chitinase activity; and a method for producing N-acetylglucosamine. The present invention pertains to: DNA comprising the base sequences represented by nucleotide numbers 1 to 1464 in the base sequence represented by SEQ ID NO: 1, or DNA comprising base sequences having at least 90% base sequence homology with said DNA, and characterized by encoding proteins having chitinase activity; a protein containing either the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, or an amino acid sequence in which one to several amino acids in said amino acid sequence have been substituted, deleted, inserted or added, and characterized by having chitinase activity; a method for breaking down chitin using said protein; and a method for producing N-acetylglucosamine.

(57) 要約: キチン分解酵素活性タンパク質発現遺伝子および該遺伝子によりコードされるキチン分解酵素活性タンパク質、並びに該キチン分解酵素活性

タンパク質を用いるキチンの分解方法およびN-アセチルグルコサミンの製造方法を提供する。配列番号1に示された塩基配列において、塩基番号1～1464に示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと90%以上の塩基配列相同性を有する塩基配列からなり、キチン分解酵素活性を有するタンパク質をコードするものであることを特徴とするDNA、配列番号2に示されたアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列のいずれかを含み、キチン分解酵素活性を有することを特徴とするタンパク質および、該タンパク質を用いるキチンの分解方法およびN-アセチルグルコサミンの製造方法に関する。



ロツパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

キチン分解酵素遺伝子および該遺伝子によりコードされるキチン分解酵素 技術分野

[0001] 本発明は新規なキチン分解酵素遺伝子およびその遺伝子によりコードされるキチン分解酵素に関するものである。より詳細には、エンド型キチナーゼのようにキチンをランダムに加水分解する活性を有し、しかも、これまで知られているエンド型キチナーゼでは2量体のジアセチル-N-キトビオースで停止していた分解反応を、単量体のN-アセチルグルコサミンまで分解することができる活性を有するキチン分解酵素遺伝子およびその遺伝子によりコードされるキチン分解酵素に関するものである。

[0002] また本発明は、該キチン分解酵素を用いるキチンの分解方法およびN-アセチルグルコサミンの製造方法に関するものである。

背景技術

[0003] キチンはカニ、エビなどの甲殻類の殻などに含まれる多糖であり、自然界においてセルロースに次ぐ豊富なバイオマスである。

このキチンは多糖の状態、医薬品、農薬、食品、化粧品などの素材として、様々な産業で利用されている。さらに、キチンを加水分解して得られるN-アセチルグルコサミンおよびそのオリゴ糖も、免疫賦活作用、エリシター作用など種々の生理活性を示し、同様に、医薬品、食品、化粧品などの有効成分として利用されている。

[0004] キチンの加水分解は、一般的に、強酸を用いた化学分解法が用いられているが、この方法は、多量の廃液を生じ環境に対する負荷が大きいことから、この問題を解決する方法として、キチン分解酵素を用いる方法が検討されている。

これまでに、種々のキチン分解酵素産生微生物が見出されており、それらの微生物あるいはその培養液や単離された酵素などを用いたキチン分解方

法が提案されている。（特許文献１～５）

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献１：特開２００４－３５７６２０号公報

特許文献２：特許第３０２６３１２号公報

特許文献３：特許第２３１１８５７３号公報

特許文献４：特許第４１１０２４３号公報

特許文献５：特開２００８－２５３２５２号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献１：Kazuaki Sato et al.; J. Gen. Appl. Microbiol., 55, 147~153 (2009)

非特許文献２：Kazuaki Sato et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(3), 90856-1~5 (2010)

非特許文献３：International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2129-2130 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、これまでに知られているキチン分解酵素は、概して反応性が低く、また、高分子のキチンを単糖のＮ－アセチルグルコサミンに分解するには、少なくとも２種類の酵素を用いて、２段階で分解する必要があった。

このため、分解能が強く、かつ、高分子のキチンから１段階でＮ－アセチルグルコサミンに分解できるような、分解特性に優れた酵素の開発が望まれていた。

[0008] キチン分解酵素については、エンド型のキチナーゼとエキソ型のＮ－アセチルグルコサミニダーゼの２種類があることが知られている。前者はキチンをランダムに分解し、最終生産物はＮ－アセチルグルコサミンの２糖（ジアセ

チルーN-キトビオース)である。後者は、非還元末端より順次N-アセチルグルコサミンを切り出す反応を触媒するが、基質は低分子のオリゴ糖に限られ高分子キチンに対しては作用しない。

したがって、キチンからN-アセチルグルコサミンを製造するためには、少なくともこの2種類の酵素を用いる必要があり、しかも複雑な酵素反応系となるため反応の制御が難しいという問題点があった。

[0009] 本発明者らは、先に、長野県上田市の上田城の堀水より、強力なキチン分解能を有する新属新種のキチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株 (NBRC 104970、NCIMB 14509、DSM 23277) を分離同定し、報告した。(非特許文献1～3)

[0010] 本発明者らは、本菌株が有するキチン分解酵素遺伝子の解析を鋭意行った。その結果、これまでに報告されているキチン分解酵素遺伝子とは塩基配列の相同性が低い遺伝子を見出すことができた。

さらに、該遺伝子によりコードされるタンパク質は、従来報告されているキチン分解酵素と異なる特性を有する新規な酵素であることを確認した。

すなわち、本発明のキチン分解酵素は、従来のエンド型キチナーゼと同様に、高分子キチンに作用してランダムに分解する活性を示す一方、従来のエンド型キチナーゼでは分解できなかった、N-アセチルグルコサミンの2糖(ジアセチルーN-キトビオース)をも分解できるという優れた特性を有している。

[0011] 本発明の目的は、新規なキチン分解酵素をコードする遺伝子およびその遺伝子によりコードされるキチン分解酵素を提供することである。

より詳細には、従来のキチン分解酵素では分解できなかった、1段階で高分子のキチンから単糖体のN-アセチルグルコサミンまで分解することができる、優れた分解特性を有する、新規なキチン分解酵素をコードする遺伝子、その遺伝子によりコードされるキチン分解酵素、並びに、該キチン分解酵素を用いたキチン分解方法およびN-アセチルグルコサミンの製造方法を提

供することである。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねる中、先に長野県上田市の上田城の堀水より分離同定した、新種のキチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株の遺伝子解析を行い、新規なキチン分解酵素遺伝子を単離し、そのDNAの塩基配列を同定することに成功した。さらに、該遺伝子により発現されるキチン分解酵素が、極めて優れたキチン分解能を示すことを確認し、さらに研究を進めた結果、本発明を完成するに至った。

[0013] より詳細には、本発明は、

[1] 配列番号1に示された塩基配列において、塩基番号1～1464に示される塩基配列またはその配列の1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるDNA配列を含む、キチン分解酵素をコードするDNA、および

[2] 配列番号3に示された塩基配列において、塩基番号1～1527に示される塩基配列またはその配列の1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示されるDNA配列を含む、キチン分解酵素をコードするDNA、および

[3] キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株由来のDNAであることを特徴とする、[1]または[2]に記載のDNA、
に関する。

[0014] また、本発明は、

[4] 配列番号2または4に示されたアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列のいずれかを含むことを特徴とする、キチン分解酵素、

[5] [1]または[2]に記載のDNAによってコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もし

くは付加したアミノ酸配列のいずれかを含むことを特徴とする、[4]に記載のキチン分解酵素、および、

[6] [1] または[2]に記載のDNAを導入した形質転換微生物またはキチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株から産生されるものであることを特徴とする、[5]に記載のキチン分解酵素、に関する。

[0015] また、本発明は、

[7] [4]～[6]のいずれか一項に記載のキチン分解酵素を活性成分として含有することを特徴とする、キチン分解剤、

[8] [6]に記載のキチン分解酵素を産生する微生物またはその培養液を含むものであることを特徴とする、[7]に記載のキチンの分解剤、および、

[9] キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株または、[1]に記載のDNAを導入した形質転換微生物またはその培養液を含むものであることを特徴とする、[8]に記載のキチンの分解剤、に関する。

[0016] また、本発明は、

[10] [7]～[9]のいずれか一項に記載のキチン分解剤を用いることを特徴とする、キチンの分解方法、および、

[11] [7]～[9]のいずれか一項に記載のキチン分解剤を用いることを特徴とする、N-アセチルグルコサミンの製造方法、に関する。

[0017] さらに、本発明は、

[12] [1]に記載のDNAを含む形質転換用プラスミド、および、

[13] プラスミドpCold I-cshchiGであることを特徴とする、[12]記載のプラスミド、に関する。

発明の効果

[0018] 本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、高分子キチンをエンド

型に分解する作用を有しており、しかも、従来のエンド型キチナーゼでは分解できなかった2量体のジアセチル-N-キトビオースも分解し、最終産物としてN-アセチルグルコサミンを生じさせる。よって、本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、高分子のキチンから、複雑な工程や操作を要する事なく、1段階で単糖体のN-アセチルグルコサミンまで分解することができ、効率的なN-アセチルグルコサミンの製造方法に極めて有用である。

また、N-アセチルグルコサミンは、加水分解することにより、容易にグルコサミンを製造することができることから、本発明のキチン分解酵素は、グルコサミンの効率的な製造方法としても極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図1は、C s h c h i G発現用プラスミドpCold I-cshchiGの構造を示すマップ図である。

[図2]図2は、大腸菌で発現させた酵素C s h c h i Gを精製後にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果である。図中、レーン1は分子量マーカー、レーン2は大腸菌BL21 (DE3) 株/pColdI-粗酵素抽出液、レーン3は大腸菌BL21 (DE3) 株/pColdI-cshchiG粗酵素抽出液、レーン4は精製後の組換えタンパク質C s h c h i Gの結果をそれぞれ示す。

[図3]図3は、精製酵素C s h c h i Gを用いて、N-アセチルグルコサミン (G l c N A c) の2~5量体および高分子キチンを長時間分解した結果生じた生成物を薄層クロマトグラフィーで分析した結果である。図中、Sは標準化合物、レーン1は (G l c N A c)₂反応前、レーン2は (G l c N A c)₂反応後、レーン3は (G l c N A c)₃反応前、レーン4は (G l c N A c)₃反応後、レーン5は (G l c N A c)₄反応前、レーン6は (G l c N A c)₄反応後、レーン7は (G l c N A c)₅反応前、レーン8は (G l c N A c)₅反応後、レーン9はコロイダルキチン反応前、レーン10はコロイダルキチン反応後の結果をそれぞれ示す。

[図4]図4は、精製酵素C s h c h i Gを用いて、N-アセチルグルコサミン (G l c N A c) の5量体を分解した際に生じる生成物の時間経過を薄層クロマトグラフィーで分析した結果である。図中、Sは標準化合物、レーン1は反応1分後、レーン2は反応5分後、レーン3は反応10分後、レーン4は反応15分後、レーン5は反応30分後、レーン6は反応60分後、レーン7は反応24時間後の結果をそれぞれ示す。

[図5]図5は、キチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株 (NBRC 104970、NCIMB 14509、DSMZ 23277) のNBRCの生物遺伝資源受託証を示す。

[図6]図6は、キチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株 (NBRC 104970、NCIMB 14509、DSMZ 23277) のNCIMBにおける検索結果 (<http://www.ncimb.com/results.php?parent=culture>) を示す。

[図7]図7は、キチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株 (NBRC 104970、NCIMB 14509、DSMZ 23277) のDSMZにおける検索結果 (<http://old.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm023277.html>) を示す。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、新規なキチン分解細菌由来の、新規なキチン分解酵素遺伝子およびその遺伝子によりコードされるキチン分解酵素に関する。

なお、本発明においては、該キチン分解酵素を単にキチナーゼと称することもある。

[0021] 本発明者らは、先に、長野県上田市の上田城の堀水より分離同定した、新規のキチン分解細菌キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株が産生するキチン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の解析に鋭意努力し、該キチン分解酵素遺伝子を単離し、そのDNAの塩基配列を同定することができた。

[0022] すなわち、まず、フォスミドベクターpCC1F0Sを用いて、該キチニフィラス

・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株の遺伝子ライブラリーを構築した。

次いで、キチナーゼに対する蛍光基質を添加した選択培地を用いて、ライブラリーの5, 000クローンの中から、10クローンを選択した。

さらに、この選択クローンからフォスミドDNAを調製し、ゲノム・シーケンサーFLXシステム (Genome Sequencer FLX system) を用いて核酸配列を解析した。

[0023] その解析において、既知のキチナーゼ酵素の遺伝子と相同性を示す15種の遺伝子を見出した。そのうち、ファミリー18のエンド型キチナーゼに相同性を示すものが12種、ファミリー19のエンド型キチナーゼが1種、ファミリー20のエキソ型キチナーゼが1種、キチン結合ドメインを含むものの酵素活性ドメインが欠失したものが1種であることを確認した。

[0024] そして、13種のエンド型キチナーゼの中で既知のキチナーゼ遺伝子との相同性が最も低いものが、配列番号1に示された塩基配列からなるDNAであった。このDNAを発現ベクターに挿入して大腸菌に形質転換し、この形質転換大腸菌が産生する組換えタンパク質を精製し、キチン分解活性を示すことを確認した。さらに、該キチン分解酵素活性タンパク質に必須なアミノ酸配列部分をコードする遺伝子が、配列番号1に示された塩基配列において、塩基番号1～1464に示される塩基配列からなるDNAであることを見出した。

[0025] 本遺伝子は、これまでに報告されているエンド型キチナーゼ遺伝子と比較しても塩基配列の相同性が低く、その構造において新規なものである。

また、該遺伝子によりコードされるタンパク質は、高分子キチンをエンド型に分解する作用を有しており、しかも、従来のエンド型キチナーゼでは分解できなかった、2量体のジアセチルーN-キトビオースも分解し、最終産物としてN-アセチルグルコサミンを生じさせる、極めて優れた酵素活性を示す。

[0026] このような反応性を示す酵素はこれまで全く報告されておらず、本酵素を

用いることにより、キチンから１段階でＮ－アセチルグルコサミンを製造することができることから、Ｎ－アセチルグルコサミンの製造において、極めて有用である。

[0027] 本発明の酵素は、キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanensis*) SAY3株の培養液から単離精製することもできるが、配列番号１に示された塩基配列を含むＤＮＡ、または、配列番号１に示された塩基配列において、塩基番号１～１４６４に示される塩基配列を含むＤＮＡを、適当な微生物に導入した形質転換微生物（以下、本発明のキチン分解酵素産生微生物という）に産生させることにより、効率的に得ることができる。また、配列番号１に示される塩基配列を含むＤＮＡは、配列番号３に示される塩基配列を含むＤＮＡとすることができる。

[0028] 本発明のキチン分解酵素遺伝子は、配列番号１または３に示される塩基配列を含む核酸（典型的にはＤＮＡ）、および該配列の１もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示され、かつキチン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする配列を含む核酸を包含する。かかる塩基配列は、例えば、配列番号１または３に示される塩基配列を、１～３０個、１～５０個、１～１００個または１～２００個の塩基で欠失、置換もしくは付加した塩基配列である。

また、配列番号１または３に示される塩基配列からなる核酸であってもよい。

[0029] また、本発明のキチン分解酵素遺伝子は、配列番号１または３で示される塩基配列と、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、または９９％以上の相同性を有し、かつキチン分解酵素活性を有するタンパク質をコードする配列を含む核酸（典型的にはＤＮＡ）であってもよい。また、配列番号１または３で示される塩基配列を有する核酸分子とストリンジントな条件でハイブリダイズする核酸分子も含まれる。

[0030] 本明細書で用いる「ストリンジントな条件」という用語は、当該技術分

野において周知のパラメータであり、本発明におけるストリンジेंटな条件は、例えば、65℃での、 $3.5 \times \text{SSC}$ (0.15 M 塩化ナトリウム/ 0.15 M クエン酸ナトリウム、 $\text{pH} 7$)、フィコール 0.02% 、ポリビニルピロリドン 0.02% 、ウシ血清アルブミン 0.02% 、 NaH_2PO_4 25 mM ($\text{pH} 7$)、 SDS 0.05% 、 EDTA 2 mM からなるハイブリダイゼーションバッファーによるハイブリダイゼーションを指す。ハイブリダイゼーション後、DNA が移された膜は、 $2 \times \text{SSC}$ にて室温において、次いで $0.1 \sim 0.5 \times \text{SSC} / 0.1 \times \text{SDS}$ にて 68°C までの温度において洗浄する。

あるいは、ストリンジेंटなハイブリダイゼーションは、市販のハイブリダイゼーションバッファーを用いて、製造者によって記載されたハイブリダイゼーションおよび洗浄条件で行ってもよい。

[0031] このような遺伝子転換微生物としては、遺伝子工学分野で用いられる微生物で、病原性のない微生物であればどのようなものでもよいが、遺伝子工学分野で汎用されている病原性のない大腸菌が好ましい。

[0032] また、形質転換に用いる DNA としては、上記、配列番号 1 に示された塩基配列において、塩基番号 1 ～ 1464 に示される塩基配列からなる DNA または、該 DNA と 90% 以上の塩基配列相同性を有する塩基配列からなり、キチン分解酵素活性を有するタンパク質をコードするものであることを特徴とする DNA を用いることができる。

[0033] 形質転換には、配列番号 1 に示される塩基配列を含む核酸（典型的には DNA）を用いてもよく、好ましくは配列番号 3 に示される塩基配列を含む核酸である。また、配列番号 1 または 3 に示される塩基配列、または該配列の 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示される塩基配列を含む核酸を用いてもよい。

[0034] また、配列番号 1 または 3 で示される塩基配列と、 60% 以上、 65% 以上、 70% 以上、 75% 以上、 80% 以上、 85% 以上、 90% 以上、 95% 以上、 98% 以上、または 99% 以上の相同性を有し、かつキチン分解酵

素活性を有するタンパク質をコードする配列を含む核酸（典型的にはDNA）を用いてもよい。また、配列番号1または3で示される塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸分子を用いてもよい。

[0035] 本発明のキチン分解酵素は、エンド型キチナーゼ活性を有しており、高分子キチンをエンド型に分解する作用を示し、しかも、従来のエンド型キチナーゼでは分解できなかった、2量体のジアセチル-N-キトビオースも分解できる酵素活性を示し、最終産物としてN-アセチルグルコサミンを生じさせる、極めて優れた活性特性を示すものである。

[0036] また、本発明のキチン分解酵素活性タンパク質は、配列番号2または4に示されたアミノ酸配列、または該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列のいずれかを含むことを特徴とするタンパク質である。かかるアミノ酸配列は、例えば、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列を、1～3個、1～5個、1～10個または1～20個のアミノ酸で置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列である。

本発明のキチン分解酵素活性タンパク質は、本発明のキチン分解酵素産生微生物を、適当な培養液中で培養し、その培養液等から通常の方法により分離、精製することにより得ることができる。

[0037] 本発明のキチン分解酵素は、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、および該アミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつキチン分解酵素活性を有するタンパク質を包含する。また、本発明のキチン分解酵素は、配列番号2または4で示されるアミノ酸配列と、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上の相同性を有し、かつキチン分解酵素活性を有するタンパク質を包含する。

また、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質で

あってもよい。

[0038] 本発明のキチン分解酵素は、高分子キチンをエンド型に分解する作用を有しており、本酵素を用いることにより、キチンから１段階でN-アセチルグルコサミンを製造することができることから、N-アセチルグルコサミンの製造において、極めて有用なものである。

[0039] 本発明のキチン分解酵素を用いて、キチンを適当な大きさのオリゴ糖に分解する場合、あるいは、N-アセチルグルコサミンを製造する場合、精製した酵素を用いてもよいが、酵素を含有する組成物として用いることもできる。

そのような組成物としては、例えば、上記本発明のキチン分解酵素産生微生物もしくはその培養液を含む組成物、または、上記本発明のキチン分解酵素産生微生物の培養液もしくはその粗精製液などを挙げることができる。

[0040] N-アセチルグルコサミンは、甘味料としても利用可能であり、また、軟骨補充効果を示すことも知られており、高齢者の関節の健康を目的としたサプリメントなどに使用されている。さらに、体内でヒアルロン酸に変換されることから、肌のうるおいを保つ成分としての効果にも注目されている。

本発明のキチン分解酵素活性タンパク質は、このように機能性健康食品あるいは医薬品組成物の有効成分として有用なN-アセチルグルコサミンを、これまでのように、複数の酵素を組み合わせることなく、一段階で、極めて簡便に、製造することができる。

実施例

[0041] 以下に、本発明の実施の態様について実施例および試験例を挙げて説明するが、本発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例 1

[0042] キチナーゼ遺伝子 (c s h c h i G) の単離

(1) キチニフィラス・シナノネンシス (Chitiniphilus shinanonensis) SAY3株ゲノムライブラリーの構築

キチニフィラス・シナノネンシス (Chitiniphilus shinanonensis) SAY3株

菌体よりDNA分離キット（Nexttec（登録商標） Genomic DNA Isolation kit for Bacteria（Nexttec））を用いてゲノムDNAを調製した。

ゲノムDNA溶液に対して、超音波破碎機（Sonics & Materials社、Vibra cell（登録商標））を用いてDNAの平均サイズを40kbp程度まで断片化した。

この断片化したDNAより、フォスミド（fosmid）ベクターpCC1F0Sを用いてフォスミド・ライブラリー作成キット（CopyControl（登録商標） Fosmid Library Production Kit（EPICENTRE BIOTECHNOLOGY））を用いてゲノムライブラリーを作成した。

[0043] （２）キチン分解酵素活性を示すクローンの選抜

SAY3株のゲノムライブラリーを構成する大腸菌EPI300株クローンをキチン分解酵素活性検出用合成基質4-メチルウンベリフェリル（4-methylumbelliferyl（4MU））-GlcNAc（1 mM）または4MU-（GlcNAc）₃（1 mM）を含有したM9合成培地（36μg/mlクロラムフェニコール含有）に塗布し、摂氏37度で一晩培養した。

キチン分解酵素活性を示すクローンは4MUを遊離することからこれを指標として、UV照射下でコロニー周辺に青色の蛍光を発するキチン分解酵素活性を示すクローンを選抜した。

[0044] （３）選抜クローンの塩基配列解読

シーケンス用テンプレートのフォスミドDNA（fosmid DNA）の調製は、キアゲン・ラージコンストラクトキット（QIAGEN Large-Construct Kit（QIAGEN））を用いて行った。

キチナーゼ活性を示した10個のクローンから調製した組換えフォスミドDNA（fosmid DNA）をそれぞれ 4×10^{-6} gずつ混合し、タカラバイオ株式会社による受託サービス（BAC / Fosmidなどの多クローン配列解析）に供した。

用いたシーケンサーは、ゲノム・シーケンス FLX（Genome Sequence FLX（ロシュダイアグノスティクス））である。

[0045] (4) 塩基配列の解析

DNAデータバンクオブジャパン (DNA Data Bank of Japan (DDBJ)) の BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>)、ナショナルセンター フォー バイオテクノロジー インフォメーション (National Center for Biotechnology Information (NCBI) の ORF ファインダー (ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>))、およびジェネティックス (GENETYX (株式会社ジェネティックス)) を用いて、上記 (3) で解読した塩基配列の中からキチン分解酵素関連遺伝子を探索した。

キチン分解酵素と考えられる ORF に関しては、シグナル配列推定プログラムシグナルP (SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)) を用いて、シグナル配列の有無を判定した。また、ピーファム (pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)) およびケイジー (cazy (<http://www.cazy.org/>)) を用いて、糖質加水分解酵素のファミリー (family) を推定した。

その結果、ファミリー 18 のエンド型キチナーゼが 12 種、ファミリー 19 のエンド型キチナーゼが 1 種、ファミリー 20 のエキソ型キチナーゼが 1 種と、キチン結合ドメインを含むものの酵素活性ドメインが欠失したポリペプチドが 1 種であると推定された。

[0046] (5) キチナーゼ遺伝子 (cshchiG) の選定

13 種のエンド型キチナーゼ遺伝子について、既知のエンド型キチナーゼとの相同性を比較した結果、最も相同性の低い遺伝子を cshchiG と名付けた。

実施例 2

[0047] キチナーゼ (cshchiG) 遺伝子構造の解析

実施例 1、(4) と同様にして、塩基配列を解析した結果、cshchiG 遺伝子のタンパク質コード領域は 1,464 塩基から構成され、487 個のアミノ酸残基からなる分子量 51.4 kDa のポリペプチドをコードするものである事を確認した。

推定アミノ酸配列を解析したところ、N 末端側からキチン結合ドメインが

2回繰り返して出現し、さらにfamily 18キチナーゼの活性ドメイン類似の配列が現れた。活性ドメインの配列類似性は、データベース上の最も類似性の高い、ストレプトミセス(*Streptomyces* sp.)のACTEキチナーゼに対しても38%と低いものであった。

実施例 3

[0048] 大腸菌を宿主としたcshchiG遺伝子の発現

常法に従い、キチニフィラス・シナノネンシス(*Chitinophilus shinanonensis*) SAY3株のゲノムDNAを鋳型に用いて、タンパク質相当部分をコードする遺伝子断片をPCR増幅した。

PCRプライマーに用いるために設計したオリゴヌクレオチド配列は以下の通りである。センスプライマー(配列番号5)には制限酵素BamHIの認識配列、アンチセンスプライマー(配列番号6)にはHindIII認識配列を5'末端側に付加した(下線部分)。

各プライマーの相同配列位置は、センスプライマーが配列番号1に示された塩基配列において塩基番号1~18に示される塩基配列であり、アンチセンスプライマーが塩基番号1447~1464に示される塩基配列である。

センスプライマー 5' - GCGGATCCATGGCCGCGCATGCCGCG -3'

アンチセンスプライマー 5' - GCAAGCTTTCAGAACTCGCCGAAGAT -3'

常法にしたがって、得られたPCR増幅DNA断片をBamHI、HindIIIで二重消化し、同じ酵素で二重消化した大腸菌用発現ベクターpCold I(タカラバイオ)と連結して、発現用プラスミドpCold I-cshchiGを作成した(図1)。

cshchiG遺伝子断片が、読み取り枠を合わせて正しく設計通りに発現ベクターに挿入されていることを塩基配列シーケンスにより確認した。

実施例 4

[0049] 組換えCshchiGタンパク質の発現と精製

上記実施例3で構築した発現用プラスミドpCold I-cshchiGを保持する大腸菌BL21(DE3)株を5mlのLB培地(50×10⁻⁶g/ml ampic

illin含有)を用いて、一晚摂氏37度で前培養した。

その前培養液1mlを50mlのLB培地(50×10⁻⁶g/ml ampicillin含有)に移植して摂氏37度、200rpmで振とう培養を行った。

濁度(O.D. 600)が0.4~0.5に達した時点でその培養液を摂氏15度、30分間静置した。

その後、終濃度0.5mMとなるようにイソプロピルー1-チオーベーター-D-ガラクトピラノシド(isopropyl-1-thio-beta-D-galactopyranoside(IPTG))を添加し、摂氏15度、200rpmで24時間、コールドショック発現を行った。

遠心(8000rpm、15分間、摂氏4度)により、回収した菌体を1mlの20mM トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl buffer)(pH8.0)に懸濁し、氷上で超音波破碎を計4分間(30秒間破碎、30秒間冷却を8サイクル)行った(Astrason Model 2020、MISONIX)。

破碎液を遠心(8000rpm、30分間、摂氏4度)した後、上清を可溶性タンパク質画分として得た。

可溶性画分に含まれる組換えタンパク質をN末端側に融合された6×His タグを利用して、アフィニティーカラム(His GlaviTrap(登録商標) affinity columns (GE Healthcare))により精製した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー(Coomassie Brilliant Blue (CBB))により染色し、組換えタンパク質が精製されていることを確認した(図2)。

ゲル中のバンドの泳動距離から推定した分子量は約54kDaであり、予想された組換えタンパク質の分子量54.3kDaによく一致した。このタンパク質をCshchiGと名付けた。

実施例 5

[0050] 組換え酵素CshchiGのキチン分解酵素活性

精製した組換えCshchiG酵素のキチン分解酵素活性を、反応中に高分子基質キチンの分解により新たに生成した還元糖量をシェールズ(Schales

）法により定量することにより評価した。

反応液（2 ml）は、0.25%コロイダルキチン、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.6）、適当量の酵素からなり、摂氏37度で30分間インキュベートして反応を進行させ、摂氏100度、3分間の熱処理により酵素反応を停止させた。

そこにシェールズ（Schales）試薬（フェリシアン化カリウム0.5 gを0.5 M炭酸ナトリウム溶液1リットルに溶解させたもの）を2.7 ml加え、摂氏100度、15分間処理して Fe^{3+} の還元反応を終了させた。

遠心（4,000 rpm、20分間）により基質沈殿を除去した上清部の吸光度（O.D. 420）を測定し、還元糖量を測定した。

コントロールには、上記反応液から酵素を除去したものをを用いた。活性（1 U）は、1分間に 1×10^{-6} molの N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に相当する還元糖量を生成する酵素量と定義した。

組換え酵素CshchiGは明らかにコロイダルキチン分解活性を示し、タンパク質量当たりの活性は0.21 U/mg-proteinであった。

実施例 6

[0051] 反応生成物の分析

基質には、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の2～5量体またはコロイダルキチンを用いた。反応液（ 50×10^{-6} l）は25 mM酢酸緩衝液（pH 5.6）、10 mM GlcNAcオリゴ糖（または0.025%コロイダルキチン）、適当量の酵素から成り、摂氏37度で一晩反応させた後、摂氏100度、5分間の熱処理で反応を停止させた。

その後、15,000 rpm、5分間の遠心で回収した上清 10×10^{-6} lをシリカゲル薄層プレート（TLC plastic sheets 20 x 20 cm silica gel 60 F₂₅₄: MERCK）にスポットした。

展開溶媒にはN-プロパノール：滅菌水：酢酸エチル：30%アンモニア水＝60：28：30：12（v/v）を用いた。

GlcNAcオリゴ糖の展開スポット検出には、アニリン-ジフェニルア

ミンアセトン溶液（10 g / l アニリン：10 g / l ジフェニルアミン-アセトン溶液：85%リン酸＝5：5：1（v / v））を用いた。

長時間反応の結果、GlcNAc 2～5量体からはGlcNAcのみのスポットが検出され、酵素CshchiGは最終生成物としてGlcNAc単量体を与えることがわかった。

また、高分子のコロイダルキチンを基質とした場合にもGlcNAcを生じることがわかった（図3）。

続いて、GlcNAc 5量体を基質に用いた上記反応液を作成し、経時的に反応を停止しTLCで生成物を分析した（図4）。

その結果、反応初期には5量体が、先ず2量体と3量体に分解され、その後3量体は2量体と単量体に、生じた2量体はさらに単量体に分解され、最終的に全て単量体にまで分解された。

反応初期にGlcNAc単量体が生じることなく、2量体と3量体を生じたことから、酵素CshchiGは明らかにエンド型の分解活性を示すことが確認された。

実施例 7

[0052] 酵素CshchiGの活性中心アミノ酸残基の決定

酵素CshchiGの活性中心アミノ酸残基を探索するため、点突然変異を導入した変異型組換え酵素を作成し、キチン分解活性を測定した。

ファミリー18キチナーゼにおいて、活性中心を構成するAsp X Asp X Gluの配列が保存されていること、および、左端のAspと右端のGluが活性発現に必須なアミノ酸残基であることが報告されている。

CshchiGタンパク質のアミノ酸配列を調べたところ、N末端から配列番号4の313番目よりAsp Leu Asp Pro Gluという類似のアミノ酸配列が保存されていた。そこで、点突然変異導入の手法により、Asp 313とAsp 315をそれぞれAsnに、Glu 317をGlnに置換した3種類の変異型酵素を作成した。既報によれば、キチナーゼ活性の発現には、AspとGluが有する側鎖のカルボキシル基が重要な役割を

果たしている。活性中心である A s p、G l u が、カルボキシル基にアミノ基が結合した A s n、G l n に置換された場合、活性は消失するはずである。なお、配列番号 4 の 3 1 3 番目、3 1 5 番目および 3 1 7 番目のアミノ酸は、それぞれ配列番号 2 の 2 9 2 番目、2 9 4 番目および 2 9 6 番目のアミノ酸に対応する。

[0053] 点突然変異の導入は、C s h c h i G 発現プラスミド pCold I-cshchiG D N A をテンプレートに用い、QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies 社) を用いて行った。作製後、c s h c h i G 遺伝子領域の塩基配列を解読し、設計した変異が正しく導入されていることを確認した。変異型 c s h c h i G 酵素の発現と精製は、野生型 c s h c h i G と同様に行った。

精製した野生型 c s h c h i G と 3 種の変異型酵素 D 3 1 3 N (A s p 3 1 3 を A s n に置換)、D 3 1 5 N (A s p 3 1 5 を A s n に置換)、E 3 1 7 Q (G l u 3 1 7 を G l n に置換) を用いて、各種キチン関連基質の分解活性を調査した。その結果、変異型酵素 E 3 1 7 Q においてのみ、いずれの基質に対してもほとんど活性が消失した (表 1)。

[0054] [表1]

表 1 変異型酵素 CshchiG のキチン関連基質に対する分解活性

酵素	分解活性 ($\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg-protein}$)		
	可溶性キトサン	pNP-(GlcNAc) ₂	pNP-(GlcNAc) ₃
野生型	14.9 (100)	0.73 (100)	0.53 (100)
変異型 D313N	8.6 (58)	0.34 (47)	0.42 (79)
変異型 D315N	2.9 (20)	0.91 (125)	2.94 (560)
変異型 E317Q	0.9 (6)	0.01 (1)	0.08 (15)

可溶性キトサンに対する分解活性は、反応によって新たに生じた還元糖量を定量し、N-アセチルグルコサミンの還元糖相当量で示した。

合成基質 p-ニトロフェニル (pNP) -G l c N A c 2 量体および 3 量体に対する分解活性は、p-ニトロフェノール遊離量で示した。

各基質に対する野生型酵素の活性を 1 0 0 % とした場合の相対活性を括弧

内に示した。

[0055] この結果は、酵素 *cshchiG* 中の *Glu317* (317番目のグルタミン酸) 残基が、キチナーゼ活性発現に必須な活性中心であることを証明するものである。

[0056] なお、本実施例において使用したキチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株は、

NBRC 104970として、NITE Biological Resource Center (NBRC)、〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8に、平成20年8月15日付で(図5)、

NCIMB 14509として、National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, United Kingdomに、2008年8月11日付で(図6、<http://www.ncimb.com/results.php?parent=culture>)、および

DSMZ 23277として、DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germanyに、2010年3月8日付で(図7、<http://old.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm023277.html>)、それぞれ寄託されている。

産業上の利用可能性

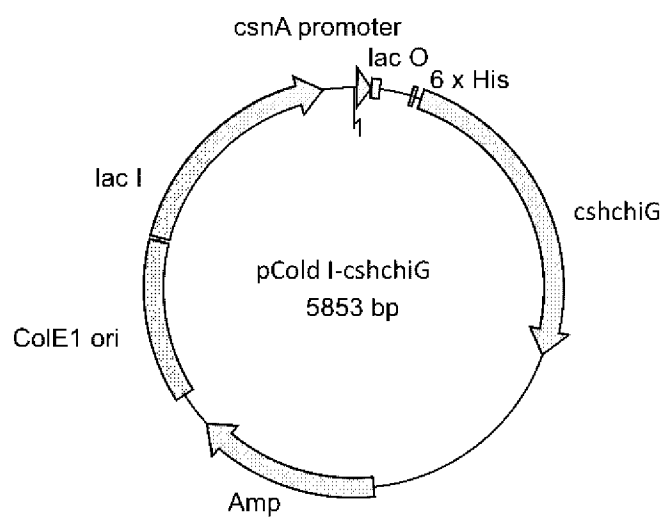
[0057] 本発明のキチン分解酵素活性タンパク質は、高分子キチンをエンド型に分解する、エンド型キチナーゼ活性を示し、しかも、従来のエンド型キチナーゼでは分解できなかった、2量体のジアセチル-N-キトビオースも分解できる酵素活性を有し、最終産物としてN-アセチルグルコサミンを生じさせる、極めて優れた活性特性を示すものであり、キチンの分解方法またはN-アセチルグルコサミンの製造方法において極めて有用である。

請求の範囲

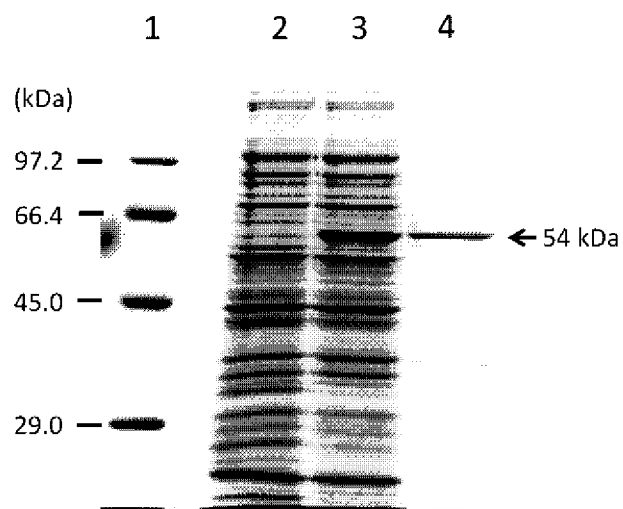
- [請求項1] 配列番号 1 に示された塩基配列において、塩基番号 1 ～ 1 4 6 4 に示される塩基配列またはその配列の 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示される DNA 配列を含む、キチン分解酵素をコードする DNA。
- [請求項2] 配列番号 3 に示された塩基配列において、塩基番号 1 ～ 1 5 2 7 に示される塩基配列またはその配列の 1 もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された配列で示される DNA 配列を含む、キチン分解酵素をコードする DNA。
- [請求項3] キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株由来の DNA であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の DNA。
- [請求項4] 配列番号 2 または 4 に示されたアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1 ～ 数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列のいずれかを含むことを特徴とする、キチン分解酵素。
- [請求項5] 請求項 1 または 2 に記載の DNA によってコードされるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において、1 ～ 数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加したアミノ酸配列のいずれかを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のキチン分解酵素。
- [請求項6] 請求項 1 または 2 に記載の DNA を導入した形質転換微生物またはキチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株から産生されるものであることを特徴とする、請求項 5 に記載のキチン分解酵素。
- [請求項7] 請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載のキチン分解酵素を活性成分として含有することを特徴とする、キチン分解剤。
- [請求項8] 請求 6 に記載のキチン分解酵素を産生する微生物またはその培養液を含むものであることを特徴とする、請求項 7 に記載のキチンの分解剤。

- [請求項9] キチニフィラス・シナノネンシス (*Chitiniphilus shinanonensis*) SAY3株または、請求項1に記載のDNAを導入した形質転換微生物またはその培養液を含むものであることを特徴とする、請求項8に記載のキチンの分解剤。
- [請求項10] 請求項7～9のいずれか一項に記載のキチン分解剤を用いることを特徴とするキチンの分解方法。
- [請求項11] 請求項7～9のいずれか一項に記載のキチン分解剤を用いることを特徴とする、N-アセチルグルコサミンの製造方法。
- [請求項12] 請求項1に記載のDNAを含む形質転換用プラスミド。
- [請求項13] プラスミドpCold I-cshchiGであることを特徴とする、請求項12に記載のプラスミド。

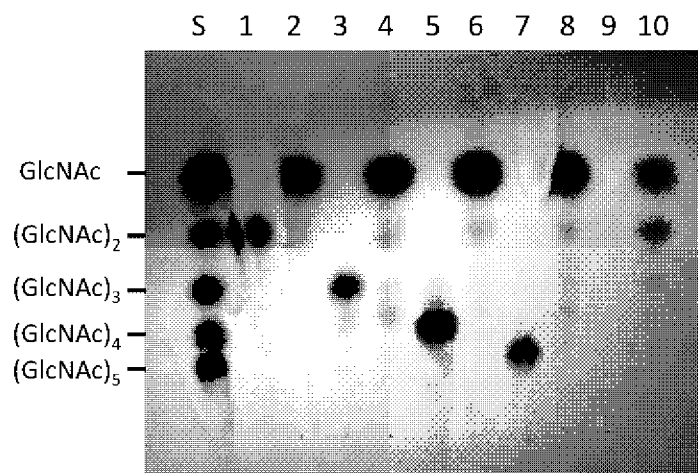
[図1]



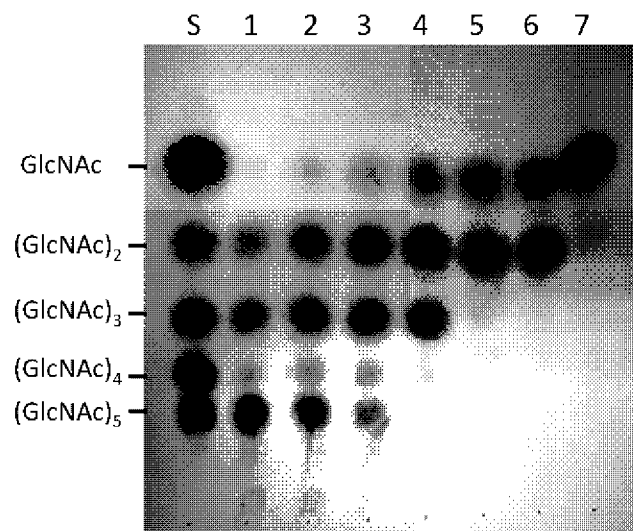
[図2]



[図3]



[図4]



[図5]



生物遺伝資源受託証
NOTICE OF ACCEPTANCE OF BIOLOGICAL GENETIC RESOURCES

平成21年 5月 7日
Date of Issue: May 7, 2009

寄託者

Depositor

Dr. Makoto Shimosaka

Faculty of Textile Science and Technology, Shiashu University

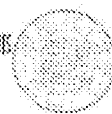
独立行政法人製品評価技術基盤機構

バイオテクノロジー本部長 奥田 慶一郎

Director-General, Keiichiro OKUDA

Department of Biotechnology,

National Institute of Technology and Evaluation



このたび貴殿よりお預かりいたしました生物遺伝資源につきましては、下記のとおり NBRC 番号を付与し、受託いたしましたのでお知らせいたします。バイオテクノロジー本部は、受託いたしました菌株を一般に公開し、分譲いたします。

This is to notify you that the following microbial strain(s) received from you has (have) been accepted with the following NBRC number(s). When requested, NITE-DOB shall distribute the deposited strain(s) without any restriction.

記

NOTICE

1. 受入年月日: 平成 20 年 8 月 15 日
Date of receipt: August 15, 2008

2. 生物遺伝資源の名称
Name of strain:

NBRC 番号
NBRC accession number

① *Chitiniphilus shinanonensis* (SAY3)

NBRC 104970



※ ISO9001 登録マークは、製品またはサービスそのものを保証するものではありません。
ISO9001 registration mark does not guarantee the quality of products or services themselves.

nite
National
Institute of
Technology and
Evaluation
独立行政法人 製品評価技術基盤機構

[図6]

NCIMB - Culture Collection - Search Results

08/05/03 23:44



products

services

culture collection

old collaborations

about us

site map

home

about the culture
collection

new accessions

ordering and

pricing

resuscitation of

cultures

qc cultures

patent deposits

safe deposits

abbreviations and

nomenclature

other resource

centres

catalogue search

advanced search

Search Results

Chitiniphilus shinanoensis

Accession Number: 14509
 Species Name: Chitiniphilus shinanoensis
 Other Collection: SAY 3
 Date of Accession: 11/08/2008
 Depositor Name: Makoto Shimosaka
 Depositor Company: Shinshu University, Division of Applied Biology
 Type Strain: Yes
 Isolated from: meat water of Ueda, Nagano, Japan
 Isolated by: Kazuaki Sato and Yuichi Kato
 Date of Isolation: 14/01/2008
 History: Shinshu University--> Depositor --> NCIMB
 K12: No
 ACDP: 1

Growth

Growth Medium: nutrient agar (oxoid cm3)

Growth Medium: 1

No:

Incubation Temp: 30C

Gas Regime:

aerobic

Colony Morphology

Gram Stain:

gram negative

NCIMB is a member of the
International Association of Culture Collections

NCIMB Ltd, Ferguson Building, Clarendon Street, Birkbeck, University of London, London WC1E 7HX, England.
 Tel: +44 (0)20 7710 1000 Fax: +44 (0)20 7710 1000

11/1/20

© 2004 DSMZ GmbH
All rights reserved

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P19/26(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, C12P19/26

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),

PubMed, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SHIMOSAKA, M. et al., DDBJ/EMBL/GenBank databases [online], Database accession No. AB649129, [retrieved on 2012-02-29], 2011.07.29, CDS 38434..39960, Retrieved from the Internet: http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/search/get_entry?mode=view&type=flatfile&database=ddbj&format=&accnumber=AB649129	1-13
P, X	HUANG L., et al., "Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, Chitiniphilus shinanonensis, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.12.16, Online Publication	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

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

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

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

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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 February, 2012 (29.02.12)Date of mailing of the international search report
13 March, 2012 (13.03.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/053833

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	HAO Z., et al., "Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1T, Gen. nov., sp. Nov., a chitin-degrading bacterium isolated from soil", Current microbiology, 2011.06, Vol. 62, No. 6, pp. 1732-1738, Online Publication	1-13
Y	HUANG L., et al., 'Cloning and analysis of genes coding for chitinolytic enzymes from the novel chitinolytic bacterium Chitiniphilus shinanonensis', Chitin and Chitosan Research, 01 July 2010 (01.07.2010), vol.16, no.2, page 199	1-13
Y	TSUJI H., et al., "Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from Pyrococcus furiosus - the role of conserved residues in the active site", FEBS Journal, 2010, Vol. 277, Issue 12, pp.2683-2695, Online Publication	1-13
A	SATO, K., et al., "Construction and analysis of a bacterial community exhibiting strong chitinolytic activity", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, Vol. 74, No. 3, pp.636-640, Online Publication	1-13
A	SATO, K., et al., "Chitiniphilus shinanonensis gen. nov., sp. nov., a novel chitin-degrading bacterium belonging to Betaproteobacteria", The Journal of general and applied microbiology, 2009, Vol. 55, No. 2, pp.147-153, Online Publication	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12P19/26(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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N9/24, C12P19/26

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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)

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
PX	SHIMOSAKA, M. et al., DDBJ/EMBL/GenBank databases [online], Database accession No. AB649129, [retrieved on 2012-02-29], 2011.07.29, CDS 38434..39960, Retrieved from the Internet: http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/search/get_entry?mode=view&type=flatfile&database=ddbj&format=&accnumber=AB649129	1-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高山 敏充

4 B

4 1 5 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
PX	HUANG L., et al., "Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, Chitiniphilus shinanonensis, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.12.16, Online Publication	1-13
PX	HAO Z., et al., "Chitinolytic bacter meiyuanensis SYBC-H1T, Gen. nov., sp. Nov., a chitin-degrading bacterium isolated from soil", Current microbiology, 2011.06, Vol. 62, No. 6, pp. 1732-1738, Online Publication	1-13
Y	HUANG L., et al., 'Cloning and analysis of genes coding for chitinolytic enzymes from the novel chitinolytic bacterium Chitiniphilus shinanonensis', キチン・キトサン研究, 2010.07.01, 第16巻第2号, 第199頁	1-13
Y	TSUJI H., et al., "Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from Pyrococcus furiosus - the role of conserved residues in the active site", FEBS Journal, 2010, Vol. 277, Issue 12, pp.2683-2695, Online Publication	1-13
A	SATO, K., et al., "Construction and analysis of a bacterial community exhibiting strong chitinolytic activity", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, Vol. 74, No. 3, pp.636-640, Online Publication	1-13
A	SATO, K., et al., "Chitiniphilus shinanonensis gen. nov., sp. nov., a novel chitin-degrading bacterium belonging to Betaproteobacteria", The Journal of general and applied microbiology, 2009, Vol. 55, No. 2, pp.147-153, Online Publication	1-13