

(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
2020年1月9日(09.01.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/009231 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/55 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C02F 1/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01) *C12N 9/20* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/026848

(22) 国際出願日: 2019年7月5日(05.07.2019)

(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 2018-129504 2018年7月6日(06.07.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 堀 克敏(HORI Katsutoshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO Shusaku et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3-1 グランフロント大阪 タワーC Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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))

(54) Title: NOVEL LIPASE CAPABLE OF DECOMPOSING OIL OR FAT CONTAINING TRANS-FATTY ACID

(54) 発明の名称: トランス脂肪酸含有油脂を分解する新規リパーゼ

(57) Abstract: The present disclosure provides a technique for decomposing an oil or fat containing a trans-fatty acid. A novel lipase according to the present disclosure has an activity to decompose an oil or fat containing a trans-fatty acid. The lipase according to the present disclosure comprises a polypeptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4, 11, 16 or 18, or a polypeptide encoded by a nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1, 7, 15 or 17, or a polypeptide having at least 70% sequence homology with the above-mentioned polypeptides. The lipase has an ability to decompose an oil or fat even at a high temperature, and is found to have excellent thermal stability. The lipase according to the present disclosure is useful for an oil treatment, such as the treatment of wastewater, a detergent, and a technique for modifying a fat or for producing an oil or fat.

(57) 要約: 本開示は、トランス脂肪酸含有油脂を分解する技術を提供する。本開示の新規リパーゼは、トランス脂肪酸含有油脂を分解する活性を有した。本開示のリパーゼは、配列番号4、11、16または18に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、もしくは配列番号1、7、15または17の核酸配列によってコードされるポリペプチド、またはそれらと少なくとも70%の配列同一性を有するポリペプチドからなる。このリパーゼは、高温でも油脂を分解する能力を有し、熱安定性に優れている局面も見いだされた。本開示のリパーゼは、例えば排水処理、洗剤、脂肪改変・油脂生産技術などの油処理に有用である。

WO 2020/009231 A1

明 細 書

発明の名称：トランス脂肪酸含有油脂を分解する新規リパーゼ 技術分野

[0001] 本開示は、トランス脂肪酸含有油脂を分解する新規リパーゼ、およびその応用（例えば、排水処理、油処理）に関する。別の局面では、本開示は、高温でも油脂を分解する新規リパーゼおよびその応用に関する。

背景技術

[0002] 一般家庭、外食産業、工業用設備などで発生する汚れの代表的なものとして、油汚れが挙げられる。油汚れは、台所、流し、厨房、パイプ、排水溝、換気扇、洗濯などといった場面で生じる洗浄が困難な汚れである。油汚れは、悪臭や害虫の発生源となり、環境汚染も生じさせ得るものであるため、油処理における画期的な技術の確立が、公衆衛生面および環境面の両面から切望されている。

[0003] 外食産業の厨房排水に含まれる油分を固液分離により除く処理設備であるグリーストラップは悪臭や害虫の発生源であること、分離した油の回収や運搬、清掃等のメンテナンスに労苦やコストがかかることなどを考慮すると、グリーストラップ内の油を消滅させるような画期的な技術の確立が、外食産業を中心とする産業界から切望されている。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0004] 本発明者らは、鋭意研究した結果、トランス脂肪酸含有油脂を分解するリパーゼを見出した。このリパーゼは、高温でも油脂を分解する能力を有し、熱安定性に優れている局面も見いだされた。本開示は、本開示のリパーゼの応用、例えば油処理等にも関する。

[0005] したがって、本開示は、以下を提供する。

（項目１）

（a）配列番号４、１１、１６または１８に示すアミノ酸配列を含むポリペ

プチド；

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチド；

(c) (a) または (b) に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号 1、7、15 または 17 に示す核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(e) (d) に示す核酸配列において、1 ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；

(f) (d) または (e) に示す核酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；

(g) (d) ~ (f) のいずれか 1 つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされ、かつ生物学的活性を有するポリペプチド；

(h) (d) ~ (g) のいずれか 1 つの核酸配列の対立遺伝子変異体によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；または

(i) (a) ~ (h) に示すアミノ酸配列の断片を含む、ポリペプチド、である、ポリペプチド。

(項目 2)

前記生物学的活性は、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力である、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 3)

45 ~ 70 °C が油脂を分解する能力の至適温度である、項目 1 または 2 に記載のポリペプチド。

(項目 4)

35～55℃が油脂を分解する能力の至適温度である、項目1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 5)

65℃以上で、好ましくは85℃以下において熱安定性を有する、項目1～4のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 6)

75℃以上で、好ましくは80℃以下において熱安定性を有する、項目1～5のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 7)

15℃において油脂を分解する能力を有する、項目1～6のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 8)

ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) に由来するポリペプチドである、項目1～7のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 9)

(A) 配列番号1、7、15または17に示す核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(B) (A) に示す核酸配列において、1ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(C) (A) または (B) に示す核酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有する核酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(D) (A) ～ (C) のいずれか1つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列を含み、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(E) (A) ～ (D) のいずれか1つの核酸配列の対立遺伝子変異体であっ

て、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；
または

(F) 配列番号 4、11、16 または 18 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(G) (F) のアミノ酸配列において、1 アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(H) (F) または (G) に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；または

(I) (F) ～ (H) に示す核酸配列の断片を含む、ポリヌクレオチド、
である、ポリヌクレオチド。

(項目 10)

前記生物学的活性は、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力である、項目 9 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 11)

45 ～ 70℃ が油脂を分解する能力の至適温度であるポリペプチドをコードする、項目 9 または 10 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 12)

35 ～ 55℃ が油脂を分解する能力の至適温度であるポリペプチドをコードする、項目 9 ～ 11 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 13)

65℃ 以上で、好ましくは 85℃ 以下において熱安定性を有するポリペプチドをコードする、項目 9 ～ 12 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 14)

75℃ 以上で、好ましくは 80℃ 以下において熱安定性を有するポリペプチドをコードする、項目 9 ～ 13 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 1 5)

前記ポリヌクレオチドは、15℃において油脂を分解する能力を有するポリペプチドをコードする、項目9～14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 1 6)

ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) に由来するポリヌクレオチドである、項目9～15のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

(項目 1 7)

項目9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系。

(項目 1 8)

項目1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、項目9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞もしくは無細胞発現系、または項目17に記載の細胞もしくは無細胞発現系を含む油分解剤。

(項目 1 9)

さらなる油処理成分を含む、項目18に記載の油分解剤。

(項目 2 0)

項目1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または項目9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系、項目17に記載の細胞もしくは無細胞発現系、または項目18に記載の油分解剤と、さらなる油処理成分とを備える、油分解のためのキット。

(項目 2 1)

項目1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または項目9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系、項目17に記載の細胞または無細胞発現系または項目18もしくは19に記載の油分解剤を処理対象に作用させることを包含する、油分解除去方法。

(項目 2 2)

前記処理対象はトランス脂肪酸またはトランス脂肪酸含有油脂を含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

項目 1～8 のいずれか一項に記載のポリペプチド、項目 9～16 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞もしくは無細胞発現系、または項目 17 に記載の細胞もしくは無細胞発現系を含む洗剤。

(項目 24)

脂肪改変・油脂生産技術(エステル交換等)における、項目 1～8 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または項目 9～16 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系、項目 17 に記載の細胞または無細胞発現系または項目 18 もしくは 19 に記載の油分解剤の使用。

[0006] 本開示において、上記 1 または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されうることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

発明の効果

[0007] 本開示のリパーゼを使用して、従来除去が困難であったトランス脂肪酸含有油脂の処理が容易になった。また、従来の微生物や酵素では使用が難しかった高温環境下や低温環境下でも油脂除去や油処理ができるようになった。したがって、本開示の新規リパーゼは、洗剤、皮革工業、食品工業、油脂による環境汚染の浄化、生ごみ処理、コンポスト化処理、排水処理などの廃棄物処理および堆肥化、消化剤などの医薬品、脂性肌のための化粧品などの技術分野に有用である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図 1 は、油脂を添加した場合の本開示のリパーゼをコードする遺伝子の発現レベルを示す。KH-1 株をトリオレイン、オレイン酸、エライジン酸またはトリエライジンを含む無機塩培地中で、28℃で6時間培養した後、KH-1 株からRNAを抽出し、定量RT-PCRによって、本開示のリパ

ーゼ遺伝子の発現レベルを定量した。O l eはオレイン酸培養を示し、T O l eはトリオレイン培養を示し、E Dはエライジン酸培養を示し、T E Dはトリエライジン培養での結果を示す。発現レベルは、r p o D遺伝子の発現量で正規化し、オレイン酸培養またはトリオレインでの発現レベルを1としたときの相対値として示す。(A)はトリオレインでの発現レベルを1としたときの相対値を示し、(B)はオレイン酸での発現レベルを1としたときの相対値を示す。上段のグラフは第1のリパーゼ遺伝子の代表的配列のものの発現レベルを示し、下段のグラフは第2のリパーゼ遺伝子の代表的配列のものの発現レベルを示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図2]図2は、28℃で培養したKH-1株培養上清からの本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものの精製を示す。28℃で培養したKH-1株の培養上清を、疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出画分をCBB染色により解析した結果を示す。左から、溶出された画分の番号を示し、左側に分子量を示す。

[図3]図3は、15℃で培養したKH-1株培養上清からの本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものの精製を示す。15℃で培養したKH-1株の培養上清を、疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出画分をCBB染色により解析した結果を示す。左から、溶出された画分の番号を示し、左側に分子量を示す。

[図4]図4は、左から、第1のリパーゼの代表的配列のものの至適温度(A)、熱安定性(B)、至適pH(C)およびpH安定性(D)を示す。(A)～(D)のグラフの縦軸は、相対的なリパーゼ活性を示し、(A)および(B)の横軸は温度を示し、(C)および(D)の横軸はpHを示す。(C)および(D)において、「○」は酢酸緩衝液を使用してpH3.0～5.0の範囲で解析した結果を示し、「▲」はリン酸ナトリウム緩衝液を使用してpH5.0～7.0の範囲で解析した結果を示し、「□」はTris-HCl緩衝液を使用してpH7.0～9.0の範囲で解析した結果を示し、「△」はCAPS緩衝液を使用してpH9.0～11.0の範囲で解析した結果

を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図5]図5は、左から、第2のリパーゼの代表的配列のものの至適温度（A）、熱安定性（B）、至適pH（C）およびpH安定性（D）を示す。（A）～（D）のグラフの縦軸は、相対的なリパーゼ活性を示し、（A）および（B）の横軸は温度を示し、（C）および（D）の横軸はpHを示す。（C）および（D）において、「○」は酢酸緩衝液を使用してpH3.0～5.0の範囲で解析した結果を示し、「▲」はリン酸ナトリウム緩衝液を使用してpH5.0～7.0の範囲で解析した結果を示し、「□」はTris-HCl緩衝液を使用してpH7.0～9.0の範囲で解析した結果を示し、「△」はCAPS緩衝液を使用してpH9.0～11.0の範囲で解析した結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図6]図6は、第1および第2のリパーゼの代表的配列のものを含む培養上清と油用洗剤および一般洗剤との、換気扇汚れの分解活性を比較した結果を示す。左上のフィルターは、油が付着した処理前のフィルターであり、上段の中央および右側は、KH-1培養上清にそれぞれ30分間および1時間浸漬させたフィルターを示す。中段の中央および右側は、油用洗剤にそれぞれ2時間および4時間浸漬させたフィルターを示す。下段の中央および右側は、一般洗剤にそれぞれ2時間および4時間浸漬させたフィルターを示す。

[図7]図7は、第1のリパーゼの代表的配列のものおよび第2のリパーゼの代表的配列のものとNovozym（登録商標）51032リパーゼ（Novozymes）との、換気扇汚れの分解活性の比較を示す。（A）左側は、Novozym51032リパーゼ（N-51032）に30分間浸漬させた後の換気扇フィルターの写真を示し、右側は、換気扇フィルターを浸漬させた後のNovozym51032リパーゼの溶液の写真を示す。（B）左側は、第1のリパーゼの代表的配列のものに30分間浸漬させた後の換気扇フィルターの写真を示し、右側は、換気扇フィルターを浸漬させた後の第1のリパーゼの代表的配列のものの溶液の写真を示す。（C）左側は、第2のリパーゼの代表的配列のものに30分間浸漬させた後の換気扇フィルターの写真を

示し、右側は、換気扇フィルターを浸漬させた後の第2のリパーゼの代表的配列のものの溶液の写真を示す。

[図8]図8は、第1のリパーゼの代表的配列のものによるラードおよびショートニングの分解活性を示す。第1のリパーゼの代表的配列のものは、28℃で培養したKH-1株から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。(A)は緩衝液または第1のリパーゼの代表的配列のものとインキュベートしたラードを示し、(B)は緩衝液または第1のリパーゼの代表的配列のものとインキュベートしたショートニングを示し、(C)は抽出した油脂を薄層クロマトグラフィーによって分離した結果を示す。

[図9]図9は、第2のリパーゼの代表的配列のものによるラードおよびショートニングの分解活性を示す。第2のリパーゼの代表的配列のものは、15℃で培養したKH-1株から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。(A)は緩衝液または第2のリパーゼの代表的配列のものとインキュベートしたラードを示し、(B)は緩衝液または第2のリパーゼの代表的配列のものとインキュベートしたショートニングを示し、(C)は抽出した油脂を薄層クロマトグラフィーによって分離した結果を示す。

[図10]図10は、KH-1株およびBR3200 (BioRemove3200、Novozymes) によるトランス脂肪酸含有排水の処理試験を示す。(A)はトランス脂肪酸含有排水を与え、KH-1株およびBR3200を24時間または48時間培養した後の、排水中の油脂を薄層クロマトグラフィーによって分離した結果を示し、(B)はKH-1株培養後およびBR3200培養後の排水中の油分濃度を示す。

[図11]図11は、第1のリパーゼの代表的配列のものによる、37℃条件下でのトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。左側はトリオレインの分解を示し、右側はトリエライジンの分解を示す。TOIはトリオレインを示し、TEDはトリエライジンを示す。各プレートの上側にトリグリセリド (トリオレインまたはトリエライジン) のシグナルを示し、下側に遊離脂肪酸 (オレイン酸またはエライジン酸) のシグナルを示す。対照として酵

素を含まない緩衝液だけによる処理結果も示す。

[図12]図12は、第2のリパーゼの代表的配列のものによる、37℃条件下でのトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。左側はトリオレインの分解を示し、右側はトリエライジンの分解を示す。T O l eはトリオレインを示し、T E Dはトリエライジンを示す。各プレートの上側にトリグリセリドのシグナルを示し、下側に遊離脂肪酸のシグナルを示す。対照として酵素を含まない緩衝液だけによる処理結果も示す。

[図13]図13は、本開示のリパーゼによる、15℃条件下でのトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。K H-1株培養上清から、B u t y l S e p h a r o s eカラムによって、第1のリパーゼの代表的配列のものおよび第2のリパーゼの代表的配列のものを精製し、トリエライジンまたはトリオレインと混合し、15℃で24時間処理した。左側はトリオレインの処理を示し、右側はトリエライジンの処理を示す。各プレートにおいて、左側は第2のリパーゼの代表的配列のものを含む溶液による処理を示し、右側は第1のリパーゼの代表的配列のものを含む溶液による処理を示す。各プレートの上側にトリグリセリド（トリオレインまたはトリエライジン）のシグナルを示し、下側に遊離脂肪酸（オレイン酸またはエライジン酸）のシグナルを示す。

[図14]図14は、本開示の第1および第2のリパーゼによる、トリオレインの脂肪改変を示す。第1および第2のリパーゼの代表的配列のもの、または緩衝液単独をメタノールおよびトリオレインと混合して反応させたもの、ならびにオレイン酸メチル評品をT L C分析により解析した結果を示す。各シグナルは、上から順に、オレイン酸メチルエステル、トリオレイン、オレイン酸およびジアシルグリセロールに対応する。

[図15]図15は、本開示の第1および第2のリパーゼによる、トランス脂肪酸の脂肪改変を示す。（A）第1および第2のリパーゼの代表的配列のもの、または緩衝液単独をメタノールおよびパルミテライジン酸と混合して反応させたもの、ならびにパルミテライジン酸メチル評品をT L C分析により解

析した結果を示す。各シグナルは、上から順に、パルミテライジン酸メチルエステルおよびパルミテライジン酸に対応する。（B）第1および第2のリパーゼの代表的配列のもの、または緩衝液単独をメタノールおよびバクセン酸と混合して反応させたもの、ならびにバクセン酸メチル評品をTLC分析により解析した結果を示す。各シグナルは、上から順に、バクセン酸メチルエステルおよびバクセン酸に対応する。

[図16]図16は、本発明の第1のリパーゼの改変体の油脂分解活性を示す。左側はトリオレイン（TOIe）の分解を示し、右側はトリエライジン（TED）の分解を示す。各写真において、左側のレーンが緩衝液単独による処理の結果を示し、右側のレーンは第1のリパーゼの改変体による処理の結果を示す。各写真において、上部の矢印は分解されていない油脂に対応し、下部の矢印は遊離脂肪酸に対応する。

[図17]図17は、本発明の第2のリパーゼの改変体の油脂分解活性を示す。左側はトリオレイン（TOIe）の分解を示し、右側はトリエライジン（TED）の分解を示す。各写真において、左側のレーンは緩衝液単独による処理の結果を示し、右側のレーンは第2のリパーゼの改変体による処理の結果を示す。各写真において、上部の矢印は分解されていない油脂に対応し、下部の矢印は遊離脂肪酸に対応する。

発明を実施するための形態

[0009] 以下、本開示を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾

する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0010] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0011] （用語の定義）

本明細書において「リパーゼ」とは、エステラーゼの一種であり、中性脂肪(グリセロールエステル)を加水分解して、脂肪酸とグリセロールに分解する反応を可逆的に触媒する酵素をいう。本開示のリパーゼは、酵素番号（EC番号）でEC3.1.1.3に分類される、トリグリセロールリパーゼに分類される。

[0012] 本明細書において、リパーゼ活性は、パルミチン酸と4-ニトロフェノールとのエステルである4-ニトロフェニルパルミテート（4-NPP）を基質として用いて酵素反応を行い、エステルの加水分解により生じたp-ニトロフェノールの量を410nmの吸光度を測定することによって決定できる。まず、4-NPP（18.9mg）を3%（v/v）Triton X-100（12mL）に加え、70℃で溶解して基質溶液とする。基質溶液1mL、イオン交換水0.9mLおよび150mM GTA緩衝液（150mM 3,3-dimethylglutaric acid, 150mM Tris, および150mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediolにNaOHまたはHClを加えてpH7.0に調製）1mLをセルに入れ、28℃で5分間保温する。これに培養上清を0.1mL添加して、攪拌しながら410nmの値を測定する。リパーゼ活性は、1μモルの4-ニトロフェノールを生産する酵素量を1ユニット（U）と定義して活性測定を行い、培養上清1mL当たりのユニットを算出する。

[0013] 油脂と脂肪酸の分解・消費能力は、培地中に残存する油脂および加水分解により生じた遊離脂肪酸を薄層クロマトグラフィーにより解析することで測定できる。具体的な定量手順を示すと、まず、培養上清に等量のクロロホルムを加えることによって、油脂を抽出する。この抽出物5μLを、クロロホルム、アセトンおよびメタノールを、体積比でそれぞれ96:4:1の比率

で含む展開溶媒を使用し、シリカゲルコートプレート上に展開する。プレートをモリブデン酸 n 水和物により処理し、油脂を発色させる。

[0014] 本明細書において、「トランス脂肪酸含有油脂」とは、トランス脂肪酸を含有する油脂を指す。「トランス脂肪酸」は、本技術分野において通常使用される意味で使用され、トランス型の二重結合を有する不飽和脂肪酸を意味する。トランス脂肪酸は、天然には共役リノール酸やバクセン酸として微量に存在するが、油脂工業においては不飽和脂肪酸の水素化によって飽和脂肪酸を製造する際に多量に生産され、マーガリンおよびショートニングなどの食品にも含まれる。トランス脂肪酸には、エライジン酸、パルミテライジン酸（パルミトエライジン酸）、バクセン酸などが包含されるが、本明細書中で言及する場合、トランス脂肪酸の種類に特に制限はない。トランス脂肪酸含有油脂中に存在するトランス脂肪酸の比率は、特に限定されない。

[0015] 本明細書において、「トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力」とは、微生物によるトランス脂肪酸含有油脂の資化をもたらすための活性を指す。本明細書において、「トランス脂肪酸含有油脂を資化する」は、本技術分野において通常使用される意味で使用され、微生物がトランス脂肪酸含有油脂を炭素源などの栄養源として取り込むことを意味する。「資化」する場合、グリセロールと遊離脂肪酸とに加水分解することのほか、他の物質の一部に変化することにも含まれる。

[0016] 本明細書において、「トランス脂肪酸含有油脂を分解する能力」とは、トランス脂肪酸含有油脂を、グリセロールと遊離脂肪酸とに加水分解する活性を指す。

[0017] 本明細書において、（各温度での）「油脂を分解する能力」は、以下のよう
に測定する。すなわち、本明細書中に記載の方法によりリパーゼを精製し、測定すべき温度設定での恒温下でリパーゼと p -ニトロフェニルパルミテートとを混合し、410nmにおける吸光度を計測することによって測定することができる。代替的に、本明細書中に記載の方法により、KH-1株またはその誘導株の培養上清を回収し、リパーゼを含む培養上清または粗精製

リパーゼ液を恒温下で p-ニトロフェニルパルミテートと混合し、410 nm における吸光度を計測することによって測定することができる。

[0018] 本明細書において、油脂を分解する能力の「至適温度」とは、本技術分野において通常使用される意味で使用され、油脂を分解する活性が一定レベルの所望以上（例えば、その酵素がもつ最大レベルの80%以上の活性が保持される温度範囲を言うが、別の実施形態では、最大のレベルをさすこともある。）にある温度を指す。具体的には、本開示の第1のリパーゼは、油脂を分解する活性のピークが約60℃であり、約45～70℃の範囲でピークの80%以上の活性を保持する。本開示の第2のリパーゼは、油脂を分解する活性のピークが約50℃であり、約35～55℃の範囲でピークの80%以上の活性を保持する。本開示のリパーゼの至適温度について言及する文脈において、本開示の第1のリパーゼの至適温度は、45～75℃、好ましくは50～70℃、より好ましくは55～65℃、さらに好ましくは58～63℃、最も好ましくは60℃であることを意図する。本開示の第2リパーゼの至適温度は、35～55℃、好ましくは40～55℃、より好ましくは45～50℃であることを意図する。他の実施形態では、本開示のリパーゼは、至適温度を変更するように改変することもでき、その至適温度の下限としては、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃など（あるいは、これらの間の温度で1℃ずつ変更したもの）であってもよく、上限としては、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃（あるいは、これらの間の温度で1℃ずつ変更したもの）であってもよい。

[0019] 本明細書において、「熱安定性」とは、「温度安定性」、「耐熱性」などの用語と同様の意味を有し、本技術分野において通常使用される意味で使用され、酵素が高温で活性を保持することを意味する。一般に、酵素は、50℃程度の温度で分子構造の変化などの要因により、失活することが知られている。これとは対照的に、本開示の第1のリパーゼの場合、一例として、30℃で30分処理後の酵素活性を100%とした場合の相対的な酵素活性は

、約30～約85℃程度の温度の範囲で30分処理後でも100%以上であり、90℃で30分処理後であっても約30%の酵素活性を保持するため、本開示のリパーゼは、高い熱安定性を有するといえる。本開示の第2のリパーゼの場合、70℃で30分処理後の酵素活性を100%とした場合の相対的な酵素活性は、一例として、約15～約75℃程度の温度の範囲で30分処理後でも90%以上を、80℃でも80%程度を保持する。本明細書において、「熱安定性を保持する」など同様の表現は、30℃程度での30分処理後の酵素活性を100%とした場合の相対的な酵素活性が、概ね50%以上保持されることを意味する。

[0020] 本明細書において、油脂を分解する能力の「至適pH」とは、本技術分野において通常使用される意味で使用され、油脂を分解する活性が一定レベル以上（例えば、その酵素がもつ最大レベルの80%以上の活性が保持されるpH範囲を言うが、別の実施形態では、最大のレベルをさすこともある。）のときのpHを指す。本開示の第1および第2のリパーゼは、いずれも油脂を分解する活性のピークが約pH9であり、約pH7.5～pH9.5の範囲でピークの80%以上の活性を保持する。第1および第2のリパーゼの至適pHについて言及する文脈において、本開示の（第1および第2の両方）リパーゼの至適pHは、pH7.5～pH9.5、好ましくはpH8.0～pH9.3、より好ましくはpH9であることを意図する。

[0021] 本明細書において、「ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*)」とは、生物分類学上のブルクホルデリア（バークホルデリア）属アルボリス種を意味する。本明細書におけるブルクホルデリア アルボリス種KH-1株は、少なくとも2種類のリパーゼ（すなわち本開示の「第1のリパーゼ」の代表的配列および「第2のリパーゼ」の代表的配列）をコードする遺伝子を有する。本開示のリパーゼは、ブルクホルデリア アルボリス種に属するKH-1株またはその誘導株によって生産されるものを包含するが、これに限定されない。

[0022] 本明細書において、「無細胞発現系」とは、本技術分野において通常使用

される意味で使用され、細胞から抽出される生体分子の転写翻訳機構を使用して、*in vitro*で目的の組換えタンパク質を生産する系を指す。本開示のリパーゼを生産するための無細胞発現系としては、特に限定されないが、大腸菌などの原核生物由来の無細胞発現系を利用することができる。

[0023] 本明細書において、「油処理成分」とは、油脂の資化および分解を補助する成分を意味する。具体的には、バイオサーファクタントなどの、油脂の分散化を促進する成分、油脂を脂肪酸とグリセロールとに分解する成分のほか、脂肪酸を分解するもの、グリセロールを分解するもののほか、油を吸着して処理の対象物から除去するものなどを包含する。一局面では、油処理成分には、KH-1株が産生するバイオサーファクタントなどが含まれる。

[0024] 本明細書において「油分解剤」とは、本開示のブルクホルデリア アルボリス種KH-1細菌株またはこの細菌株によって産生される本開示の第1または第2のリパーゼを有効成分とする、油脂の分解が可能な製剤を指す。本開示において、油分解剤は、油処理成分と併用して使用されてもよい。この場合の油分解剤と油処理成分との併用使用のタイミングは、同時に使用しても、いずれか片方を先に使用することにしてもよい。さらに、油分解剤には、使用する細菌株または細菌株由来のリパーゼの活性を高める成分（例えば炭素源、窒素源）、界面活性剤、乾燥保護剤、細菌を長期間維持するための成分、防腐剤、賦形剤、強化剤、酸化防止剤等を更に含有させてもよい。

本開示で提供される油分解剤は液体又は固体ないし乾燥体の状態で提供される。液体形状としては、細菌の培養液（必要に応じて濃縮又は希釈してもよい）、培養上清、培養液由来の酵素成分を支持体に吸着させたもの、培養液から酵素を分離精製して溶媒に懸濁させたものなどを例示できる。また、固体については、グリセロールなどの保護剤を含む溶媒に懸濁し凍結させたもの、担体に固定化させたもの（担体に共有結合、静電相互作用・疎水性相互作用などにより吸着させたもの、担体に分子架橋させたものなど）、遠心分離やプレス圧縮等により脱水したもの、さらには乾燥した乾燥体などを例示できる。好ましい実施形態では、油分解剤は、代表的には、液体形状、粉

末、顆粒の形状で提供され、洗剤としてまたは洗剤の成分として他の成分とともに含有されて提供され得る。

[0025] 本明細書で使用される（リパーゼ等の）「誘導体」、「類似体」または「変異体」は、好ましくは、限定を意図するものではないが、対象となるタンパク質（例えば、リパーゼ）に実質的に相同な領域を含む分子を含み、このような分子は、種々の実施形態において、同一サイズのアミノ酸配列にわたり、または当該分野で公知のコンピュータ相同性プログラムによってアライメントを行ってアラインされる配列と比較した際、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%同一であるか、あるいはこのような分子をコードする核酸は、（高度に）ストリンジेंटな条件、中程度にストリンジेंटな条件、またはストリンジेंटでない条件下で、構成要素タンパク質をコードする配列にハイブリダイズ可能である。これは、それぞれ、アミノ酸置換、欠失および付加によって、タンパク質を改変した産物であり、その誘導体がなお元のタンパク質の生物学的機能を、必ずしも同じ度合いでなくてもよいが示すタンパク質を意味する。例えば、本明細書において記載されあるいは当該分野で公知の適切で利用可能な *in vitro* アッセイによって、このようなタンパク質の生物学的機能を調べることも可能である。本明細書で使用される「機能的に活性な」または「機能的活性を有する」は、本明細書において、本開示のポリペプチド、すなわちフラグメントまたは誘導体が関連する態様に従って、生物学的活性などの、タンパク質の構造的機能、制御機能、または生化学的機能を有することを指す。

[0026] 本開示において、リパーゼのフラグメントとは、リパーゼの任意の領域を含むポリペプチドであり、本開示の目的（例えば、トランス脂肪酸含有油脂の分解）として機能する限り、必ずしも天然のリパーゼの生物学的機能のすべてを有していなくてもよい。

[0027] 本明細書において「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長

さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）が包含される。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプチド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。本明細書において、「アミノ酸」は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称である。本開示の実施形態に係るタンパク質または酵素が「特定のアミノ酸配列」を含むとき、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が化学修飾を受けていてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が塩、または溶媒和物を形成していてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸がL型、またはD型であってもよい。それらのような場合でも、本開示の実施形態に係る蛋白質は、上記「特定のアミノ酸配列」を含むといえる。蛋白質に含まれるアミノ酸が生体内で受ける化学修飾としては、例えば、N末端修飾（例えば、アセチル化、ミリスチル化等）、C末端修飾（例えば、アミド化、グリコシルホスファチジルイノシトール付加等）、または側鎖修飾（例えば、リン酸化、糖鎖付加等）等が知られている。アミノ酸は、本開示の目的を満たす限り、天然のものであっても非天然のものであってもよい。

[0028] 本明細書において「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」を含む。「オリゴヌクレオチド誘導体」または「ポリヌクレオチド誘導体」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、ま

たはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2' -O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' -P5' ホスホロアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2' -O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' -メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体などが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzer et al., Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608(1985);Rossolini et al., Mol .Cell.Probes 8:91-98(1994))。本明細書において「核酸」はまた、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチド、およびポリヌクレオチドと互換可能に使用される。本明細書において「ヌクレオチド」は、天然のものでも非天然のものでもよい。

[0029] 本明細書において「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいい、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」をさすことがある。

[0030] 本明細書において遺伝子の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいい、一般に「相同性」を有するとは、同一性または類似性の程度が高いことをいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。従って本明細書において「相同体」または「相同遺伝子産物」は、本明細書にさらに記載する複合体のタンパク質構成要素と同じ生物学的機能を発揮する、別の種、好ましくは微生物、より好ましくは細菌におけるタンパク質を意味する。このような相同体はまた、「オルソログ遺伝子産物」とも称されることもある。本開示の目的に合致する限り、このような相同体、相同遺伝子産物、オルソログ遺伝子産物等も用いることができることが理解される。

[0031] アミノ酸は、その一般に公知の3文字記号か、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される1文字記号のいずれかにより、本明細書中で言及され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に認知された1文字コードにより言及され得る。本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。同一性の検索は例えば、NCBIのBLAST2.7.1 (2017.10.19発行)を用いて行うことができる。本明細書における「同一性」の値は通常は上記BLASTを用い、デフォルトの条件でアラインした際の値をいう。ただし、パラメータの変更により、より高い値が出る

場合は、最も高い値を同一性の値とする。複数の領域で同一性が評価される場合はそのうちの最も高い値を同一性の値とする。「類似性」は、同一性に加え、類似のアミノ酸についても計算に入れた数値である。

[0032] 本開示の一実施形態において「数個」は、例えば、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個であってもよく、それらいずれかの値以下であってもよい。1または数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入、または他のアミノ酸による置換を受けたポリペプチドが、その生物学的活性を維持することは知られている (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1984 Sep;81(18): 5662-5666., Zoller et al., Nucleic Acids Res. 1982 Oct 25;10(20):6487-6500., Wang et al., Science. 1984 Jun 29;224(4656):1431-1433.)。欠失等がなされたタンパク質は、例えば、部位特異的変異導入法、ランダム変異導入法、またはタンパク質ファージライブラリを用いたバイオパニング等によって作製できる。部位特異的変異導入法としては、例えばKOD-Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO CO., LTD.)を使用できる。欠失等を導入した変異型タンパク質から、野生型と同様の活性のあるタンパク質を選択することは、FACS解析やELISA等の各種キャラクタリゼーションを行うことで可能である。

[0033] 本開示の一実施形態において同一性等の数値である「70%以上」は、例えば、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または100%であってもよく、それら起点となる数値のいずれか2つの値の範囲内であってもよい。上記「同一性」は、2つもしくは複数間のアミノ酸配列において相同なアミノ酸数の割合を、上述したような公知の方法に従って算定される。具体的に説明すると、割合を算定する前には、比較するアミノ酸配列群のアミノ酸配列を整列させ、同一アミノ酸の割合を最大にするために必要である場合はアミノ酸配列の一部に間隙を導入する。整列のための方法、割合の算定方法、比較方法、およびそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該分野で従来からよく知られている(例えば、上述したBLAST等)。本明細書において「同一性」および「

類似性」は、特に断りのない限りNCBIのBLASTによって測定された値で表すことができる。BLASTでアミノ酸配列を比較するときのアルゴリズムには、Blastpをデフォルト設定で利用できる。測定結果はPositivesまたはIdentitiesとして数値化される。

[0034] 本明細書において「ストリンジェント（な）条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本開示のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodiumcitrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムである）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。「ストリンジェントな条件」は、例えば、以下の条件を採用することができる。(1) 洗浄のために低イオン強度および高温を用いる（例えば、50℃で、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム）、(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる（例えば、42℃で、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、および750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム）、または(3)20%ホルムアミド、5×SSC、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、および20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中で、37℃で一晩インキュベーションし、次に約37-50℃で1×SSCでフィルターを洗浄する。なお、ホルムアミド濃度は50%またはそれ以上であってもよい。洗浄時間は、5、15、30、60、もしくは120分、またはそれら以上であってもよい。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに影響

する要素としては温度、塩濃度など複数の要素が考えられ、詳細はAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照することができる。「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、65～68℃、または0.015 M塩化ナトリウム、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミド、42℃である。ハイブリダイゼーション、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-38, DNA Cloning 1:Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press(1995)などの実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。中程度のストリンジェントな条件は、例えば、DNAの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することができ、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3番、Vol. 1、7.42-7.45 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に示され、そしてニトロセルロースフィルターに関し、5×SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)の前洗浄溶液、約40-50℃での、約50%ホルムアミド、2×SSC-6×SSC（または約42℃での約50%ホルムアミド中の、スターク溶液 (Stark's solution) などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液)のハイブリダイゼーション条件、および約60℃、0.5×SSC、0.1% SDSの洗浄条件の使用が含まれる。従って、本開示において使用されるポリペプチドには、本開示で特に記載されたポリペプチドをコードする核酸分子に対して、高度または中程度でストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子によってコードされるポリペプチドも包含される。

[0035] 本開示のリパーゼは、好ましくは「精製された」または「単離された」ものであり得る。本明細書において「精製された」物質または生物学的因子（

例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その物質または生物学的因子に天然に随伴する因子の少なくとも一部が除去されたものをいう。従って、通常、精製された生物学的因子におけるその生物学的因子の純度は、その生物学的因子が通常存在する状態よりも高い（すなわち濃縮されている）。本明細書中使用される用語「精製された」は、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本開示で用いられる物質または生物学的因子は、好ましくは「精製された」物質である。本明細書で使用される「単離された」物質または生物学的因子（例えば、核酸またはタンパク質など）とは、その物質または生物学的因子に天然に随伴する因子が実質的に除去されたものをいう。本明細書中使用される用語「単離された」は、その目的に応じて変動するため、必ずしも純度で表示される必要はないが、必要な場合、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、よりさらに好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%の、同型の生物学的因子が存在することを意味する。本開示で用いられる物質は、好ましくは「単離された」物質または生物学的因子である。

[0036] 本明細書において「フラグメント」または「断片」は、同義で使用され、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントまたは断片の長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、このような

フラグメントまたは断片は、例えば、全長のものが油脂分解分子として機能する場合、そのフラグメントまたは断片自体もまた油脂分解分子としての機能を有する限り、本開示の範囲内に入ることが理解される。

[0037] 本明細書において「生物学的機能」とは、ある遺伝子またはそれに関する核酸分子もしくはポリペプチドについて言及するとき、その遺伝子、核酸分子またはポリペプチドが生体内または生体外において有し得る特定の機能をいい、これには、例えば、油脂の分解（例えば、トランス脂肪酸含有油脂の分解）等を挙げることができるがそれらに限定されない。本開示においては、例えば、トランス脂肪酸含有油脂の分解のほか、シス脂肪酸含有油脂の分解、二重結合を含まない飽和脂肪酸含有油脂の分解などを挙げることができるがそれらに限定されない。本明細書において、生物学的機能は、対応する「生物学的活性」によって発揮され得る。本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリヌクレオチド、タンパク質など）が、有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、トランス脂肪酸含有油脂の分解活性）を発揮する活性が包含される。「生物学的活性」は、生体内で発揮される活性であっても、分泌などによって生体外で発揮される活性であってもよい。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。従って、「活性」は、結合（直接的または間接的のいずれか）を示すかまたは明らかにするか；応答に影響する（すなわち、いくらかの曝露または刺激に応答する測定可能な影響を有する）、種々の測定可能な指標をいい、例えば、本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに直接結合する化合物の親和性、または例えば、いくつかの刺激後または事象後の上流または下流のタンパク質の量あるいは他の類似の機能の尺度も含まれ得る。

[0038] 本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻

訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一態様である。したがって、本明細書において「発現産物」とは、このようなポリペプチドもしくはタンパク質、またはmRNAを含む。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。例えば、リパーゼの発現レベルは、任意の方法によって決定することができる。具体的には、リパーゼのmRNAの量、リパーゼタンパク質の量、そしてリパーゼタンパク質の生物学的な活性を評価することによって、リパーゼの発現レベルを知ることができる。リパーゼのmRNAやタンパク質の量は、本明細書の他の箇所に詳述したような方法あるいは他の当該分野において公知の方法によって決定することができる。

[0039] 本明細書において「機能的等価物」とは、対象となるもとの実体に対して、目的となる機能が同じであるが構造が異なる任意のものをいう。従って、本開示の「リパーゼ」の機能的等価物は、本開示のリパーゼ自体ではないが、その変異体または改変体（例えば、アミノ酸配列改変体等）であって、そのリパーゼの持つ生物学的作用を有するもの、ならびに、作用する時点において、そのリパーゼの持つ生物学的作用を持つ変異体もしくは改変体に変化することができるもの（例えば、その変異体もしくは改変体をコードする核酸、およびその核酸を含むベクター、細胞等を含む）が包含されることが理解される。本開示において、リパーゼの機能的等価物は、格別に言及してなくても、リパーゼと同様に用いられうることを理解される。機能的等価物は、データベース等を検索することによって、見出すことができる。本明細書において「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410(1990))、FASTA(Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448(1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197(1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453(1970))

))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ（マイクロアレイアッセイ）、PCRおよびin situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本開示において使用される遺伝子には、このような電子的検索、生物学的検索によって同定された対応遺伝子も含まれるべきであることが意図される。

[0040] 本開示の機能的等価物としては、アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加されたものを用いることができる。本明細書において、「アミノ酸配列において、1もしくは複数個のアミノ酸の挿入、置換もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の技術的方法により、あるいは天然の変異により、天然に生じ得る程度の複数個の数のアミノ酸の置換等により改変がなされていることを意味する。改変アミノ酸配列は、例えば1〜30個、好ましくは1〜20個、より好ましくは1〜9個、さらに好ましくは1〜5個、特に好ましくは1〜2個のアミノ酸の挿入、置換、もしくは欠失、またはその一方もしくは両末端への付加がなされたものであることができる。改変アミノ酸配列は、好ましくは、そのアミノ酸配列が、配列番号4〜6、11〜14、16または18のアミノ酸配列において1または複数個（好ましくは1もしくは複数個または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15個）の保存的置換を有するアミノ酸配列であってもよい。ここで「保存的置換」とは、タンパク質の機能を実質的に改変しないように、1または複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸残基で置換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該分野において公知である。具体例を挙げると、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリ

ン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

[0041] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、酵素や油脂分解剤、緩衝液、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分（例えば、酵素や油脂分解剤）をどのように使用するか、あるいは、試薬あるいは使用後の廃液をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、酵素や油脂分解剤等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。

[0042] 本明細書において「指示書」は、本開示のリパーゼを使用する方法を使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示のリパーゼの使用方法を指示する文言が記載されている。この指示書は、必要な場合は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省または農林水産省等、米国であれば食品医薬品局（FDA）、農務省（USDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、紙媒体で提供され得るが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

[0043] （好ましい実施形態）

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は

以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用されあるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0044] (酵素)

本開示は、新規のポリペプチドを提供する。

本開示は、代表的に、ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) 種KH-1株またはその誘導株から得られる第1のリパーゼの代表的配列および第2のリパーゼの代表的配列ならびにそれらの誘導体を提供する。

1つの局面において、本開示のポリペプチドは、

(a) 配列番号4、11、16または18に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(b) (a) のアミノ酸配列において、1アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチド；

(c) (a) または (b) に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号1、7、15または17に示す核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(e) (d) に示す核酸配列において、1ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；

(f) (d) または (e) に示す核酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；

(g) (d) ~ (f) のいずれか1つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズす

る核酸配列によってコードされ、かつ生物学的活性を有するポリペプチド；
(h) (d) ~ (g) のいずれか 1 つの核酸配列の対立遺伝子変異体によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；または
(i) (a) ~ (h) に示すアミノ酸配列の断片を含む、ポリペプチド、
である、ポリペプチドであり得る。

別の局面では、本開示は、新規のポリペプチドをコードする核酸配列を提供する。本開示のポリヌクレオチドは、

(A) 配列番号 1、7、15 または 17 に示す核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(B) (A) に示す核酸配列において、1 ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列を含むポリヌクレオチド；

(C) (A) または (B) に示す核酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有する核酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(D) (A) ~ (C) のいずれか 1 つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列を含み、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(E) (A) ~ (D) のいずれか 1 つの核酸配列の対立遺伝子変異体であって、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；
または

(F) 配列番号 4、11、16 または 18 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(G) (F) のアミノ酸配列において、1 アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(H) (F) または (G) に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌ

クレオチド；または

(I) (F) ~ (H) に示す核酸配列の断片を含む、ポリヌクレオチド、である、ポリヌクレオチドであり得る。

本開示のポリペプチドが有する生物学的活性は、本開示の第1または第2のリパーゼが有する任意の特性の少なくとも1つであり得るが、例えば、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力またはその両方を包含し得る。

したがって、1つの実施形態では、本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力またはその両方を有し得る。

1つの好ましい実施形態では、本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、15℃、あるいは10℃において油脂を分解する能力を有する。

別の好ましい実施形態では、本開示の第1のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、45~75℃、50~70℃、好ましくは55~65℃、58~63℃、あるいは60℃が油脂を分解する能力の至適温度である。本開示の第2のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、35~55℃、40~55℃、好ましくは45~55℃、45~50℃、あるいは50℃が油脂を分解する能力の至適温度である。

1つの実施形態では、本開示の第1のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、50℃以上、55℃以上、60℃以上、65℃以上、70℃以上、あるいは75℃以上で熱安定性を有し得、この熱安定性は、50℃以下、55℃以下、60℃以下、65℃以下、70℃以下、75℃以下、80℃以下、85℃以下、あるいは88℃以下まで保持され得る。本開示の第1のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、好ましくは、65℃以上で

熱安定性を有し得、この熱安定性は、85℃以下まで保持され得る。本開示の第2のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、40℃以上、45℃以上、55℃以上、60℃以上、65℃以上、70℃以上、あるいは75℃以上で熱安定性を有し得、この熱安定性は、40℃以下、45℃以下、50℃以下、55℃以下、60℃以下、65℃以下、70℃以下、75℃以下、80℃以下、あるいは85℃以下において保持され得る。本開示の第2のリパーゼである、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、好ましくは、50℃以上で熱安定性を有し、この熱安定性は80℃以下において保持され得る。

1つの具体的な実施形態では、本開示のポリペプチドまたはポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) 種に由来するものであってもよいが、これに限定されない。好ましい実施形態では、*Burkholderia arboris* KH-1 株またはその誘導株に由来する酵素であってもよいがこれに限定されない。

さらなる局面において、本開示は、上記のいずれかのポリペプチド、またはポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系を含む、油分解剤を提供する。

本開示の細胞は、本開示の第1または第2のリパーゼのポリペプチドを含むか、本開示の第1または第2のリパーゼのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが発現可能に組み込まれているものである。無細胞発現系は、本開示の第1または第2のリパーゼのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが発現可能に提供され、適宜の仕組みによりポリペプチドが発現し、油分解効果を発揮する。

1つの実施形態では、上記油分解剤は、さらなる油処理成分を含む。

別の局面では、本開示は、本開示のポリペプチド、または本開示の細胞もしくは無細胞発現系、または油分解剤と、さらなる油処理成分とを備える、油分解または油脂処理のためのキットを提供する。本開示のキットに含まれる油分解剤および油処理成分は、本明細書において他の箇所に説明される任

意の種類のを任意の組合せで用いることができることが理解される。

別の局面では、本開示は、本開示のポリペプチド、または本開示の細胞もしくは無細胞発現系、または本開示の油分解剤を処理対象に作用させることを包含する、油分解除去方法を提供する。本開示の油分解除去方法において、前記処理対象は、トランス脂肪酸含有油脂を含むことが好ましいが、これに限定されない。トランス脂肪酸含有油脂を含まない対象であっても、本開示のリパーゼを用いる場合、非常に効率よく油分解を行うことができることが本明細書において示されている。

別の局面では、本開示は、本開示のポリペプチド、本開示の細胞もしくは無細胞発現系、または本開示の油分解剤を含む、洗剤を提供する。

さらに別の局面では、本開示のポリペプチド、本開示の細胞もしくは無細胞発現系、または本開示の油分解剤を使用した、脂肪改変・油脂生産技術（エステル交換等）における応用を提供する。脂肪改変・油脂生産技術（エステル交換等）としては、エステル体、例えばメチルエステルやエチルエステルを生じる反応、油脂含有脂肪酸の置換反応、ジアシルグリセロールやモノアシルグリセロールの生産などが挙げられる。

[0045] 本開示のポリペプチドには、配列番号4～6、配列番号11～14、16または18のアミノ酸配列を有するポリペプチドだけでなく、それらの改変体も包含されることが意図される。このようなポリペプチドとしては、配列番号4～6、配列番号11～14、16または18のアミノ酸配列に対して、1アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドが挙げられる。特定の実施形態では、本発明の第1のリパーゼの代表的配列において、配列番号4に示すアミノ酸配列における、1位、3位、6位、137位、220位、227位、243位、276位および316位に対応するアミノ酸が置換される。別の実施形態では、本発明の第2のリパーゼの代表的配列において、配列番号11に示すアミノ酸配列における、13位、26位、45位、75位、100位、138位、168位、171位、214位、230位、234位、

248位、250位、331位および360位のアミノ酸が置換される。

[0046] 本開示はさらに、新規のポリペプチドをコードする核酸配列も提供し、この核酸配列には、配列番号1～3、配列番号7～10、15または17に示す核酸配列だけでなく、それらの改変体も包含されることが意図される。このような核酸配列としては、配列番号1～3、配列番号7～10、15または17の核酸配列に対して、1ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列が挙げられる。

上記アミノ酸配列または核酸配列において変異が導入され得る位置は、当業者であれば、ホモロジーサーチ、モチーフ検索、ドメイン解析、アラインメント、二次構造予測などといった手法によって容易に決定することができる。アミノ酸配列または核酸配列において変異が導入され得る位置は、その位置において変異を有する改変体が本開示のリパーゼの活性を保持する限り、いずれの位置であってもよく、複数の位置に変異が導入されてもよい。具体的には、本開示の第1のリパーゼの場合、配列番号6（全長のアミノ酸配列）のいずれの位置に変異を有していてもよく、1つの例としては、配列番号6の131位のS、308位のD、330位のHに対応する残基以外における変異が望ましいがこれに限定されない。

[0047] （酵素の生産）

本開示の第1または第2のリパーゼは、一例として、ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) 種KH-1株（受託番号 NITE BP-02731）またはその誘導株から精製することができる。具体的には、本開示の第1のリパーゼは、

（a）KH-1株またはその誘導株を1%キャノーラ油を含む培地中で28℃で24時間以上培養する工程、

（b）（a）の培養上清を、0.45 μm孔のフィルターによって滅菌し、カラム体積の約10倍量の0.5M NaClおよび2mM CaCl₂を含む20mM Tris-HCl（pH7.0）緩衝液（以後、Tris緩衝

液と記載する)によりあらかじめ平衡化させたButyl-S Sepharose 6 Fast Flow (GEヘルスケア)にアプライし、約1時間静置して疎水性タンパク質をカラムに吸着させる工程、

(c) (b)のカラムをカラム体積の約10倍量のTris緩衝液で洗浄し、その後カラム体積の約1倍量のNaClを含まないTris緩衝液で5回洗浄し、カラム担体に弱く結合したタンパク質を溶出させる工程、および

(d) (c)のカラムを、カラム体積の約1倍量の0.5%のTriton X-100を含むTris緩衝液で4回洗浄し、カラムに強く結合したタンパク質を溶出させる工程

を含む方法によって精製することができる。

本開示の第2のリパーゼは、

(a) KH-1株またはその誘導株を1%キャノーラ油を含む培地中で15℃で48時間以上培養する工程、

(b) (a)の培養上清を、0.45 μm孔のフィルターによって滅菌し、カラム体積の約10倍量の0.5M NaClおよび2mM CaCl₂を含む20mM Tris-HCl (pH7.0)緩衝液(以後、Tris緩衝液と記載する)によりあらかじめ平衡化させたButyl-S Sepharose 6 Fast Flow (GEヘルスケア)にアプライし、約1時間静置して疎水性タンパク質をカラムに吸着させる工程、

(c) (b)のカラムをカラム体積の約10倍量のTris緩衝液で洗浄し、その後カラム体積の約1倍量のNaClを含まないTris緩衝液で5回洗浄し、カラム担体に弱く結合したタンパク質を溶出させる工程、および

(d) (c)のカラムを、カラム体積の約1倍量の0.5%のTriton X-100を含むTris緩衝液で4回洗浄し、カラムに強く結合したタンパク質を溶出させる工程

を含む方法によって精製することができる。

酵素の精製方法において、KH-1株またはその誘導株の培養条件、カラムクロマトグラフィーの条件等の詳細な条件は、当業者によって適宜調整さ

れる。

[0048] 本開示の第1および第2のリパーゼは、微生物を使用する分泌生産系によって生産することもできる。具体的には、本開示の第1または第2のリパーゼは、

(a) 本開示の第1または第2のリパーゼの成熟体をコードする核酸分子（例えば、配列番号1、7、15または17またはその改変配列）をpBIC1プラスミド（タカラバイオ社）内に遺伝子導入し、ブレビバチルス（*Brevibacillus*）細菌内で発現させる工程、および

(b) ブレビバチルス（*Brevibacillus*）細菌から分泌されたタンパク質をNi-Sepharoseにより精製する工程

を含む方法によって生産することができる。または、本開示のリパーゼ組換えタンパク質は、*Corynebacterium glutamicum*を使用するCORYNEX（登録商標）システム（味の素）、*Pichia pastoris*発現系（ThermoFisher）、昆虫細胞を使用するバキュロウイルス発現系（ThermoFisher）、麴菌を使用するタンパク質分泌発現系（大関）、pETシステムによる大腸菌のペリプラズム分泌生産系（メルク）などの発現系によって生産することができる。この微生物を使用するリパーゼの生産方法において、リパーゼを発現させる方法、リパーゼを発現させる宿主、宿主から分泌されたリパーゼの精製方法等の詳細な条件は、当業者によって適宜調整される。さらに、本開示のリパーゼは、微生物の分泌生産系以外にも、菌体内発現系、無細胞発現系等の種々の発現系を使用して発現させることもできる。

[0049] （酵素の使用）

本開示のリパーゼは、油脂の処理に有用であり、油脂を含む排水や廃液などの処理に使用することができる。この実施形態では、本開示のリパーゼは、排水処理において使用される。本開示のリパーゼは、排水処理用に使用される場合、工場排水、厨房排水、住宅排水などの用途において使用され得る。

この他の例としては、本開示のリパーゼは、洗剤として使用される。本開示のリパーゼは、洗剤として使用される場合、洗濯用洗剤、台所用洗剤、掃除用洗剤、工業用洗剤などの用途において使用され得る。本開示のリパーゼを含む洗剤は、パイプクリーナーなどの排水溝洗剤に特に有用である。

他の実施形態では、本開示のリパーゼは、脂肪改変・油脂生産技術において使用される。本開示のリパーゼは、脂肪改変・油脂生産技術において使用される場合、食品用、工業用、燃料用などの用途において使用され得る。

他の実施形態では、本開示のリパーゼは、環境汚染対策として使用され得る。本開示のリパーゼは、環境汚染対策において使用される場合、油による土壤汚染、地下水汚染、海洋汚染などでの汚染物質の除去に使用され得る。

他の実施形態では、本開示のリパーゼは、廃棄物処理および堆肥化において使用される。本開示のリパーゼは、廃棄物処理および堆肥化において使用される場合、消滅型を含む生ごみ処理、コンポスト化、農産物・食品廃棄物の飼料化、加圧浮上分離装置やグリーストラップから出る油性汚泥の減容化などの用途において使用され得る。

他の実施形態では、本開示のリパーゼは、医薬品として使用される。本開示のリパーゼは、医薬品として使用される場合、消化剤、脂肪分解促進剤などの用途において使用され得る。

他の実施形態では、本開示のリパーゼは、化粧品として使用される。本開示のリパーゼは、化粧品として使用される場合、脂性肌を改善、予防または処置するための化粧品などの用途において使用され得る。

本開示のリパーゼが使用される場合、単離された酵素を含む成分として使用してもよく、細菌自体を含む成分として使用してもよい。

[0050] (一般技術)

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U., Vahaboglu, H. 2003. Expression stability of six housekeeping genes: A p

proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. J. Med. Microbiol. 52:403-408.、Marie-Ange Teste, Manon Duquenne, Jean M Francois and Jean-Luc Parrou 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Molecular Biology 10:99、石井誠治、奥村弘、松原チヨ、二宮扶実、吉岡浩、2004年、「熱感応性ポリマーを用いた水中油分の簡易測定方法」Vol 46、No.12、「用水と排水」などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

[0051] （注記）

本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

[0052] 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

[0053] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

[0054] 以下に実施例を記載する。以下の実施例で用いる生物の取り扱い、必要な場合、名古屋大学や監督官庁およびカルタヘナ法において規定される基準を遵守した。試薬類は具体的には実施例中に記載した製品を使用した。他

メーカー（Sigma-Aldrich、富士フイルム和光純薬、ナカライテスク、R&D Systems、USCN Life Science INC、Thermo Fisher Scientific、関東化学、フナコシ、東京化成、Merck等）の同等品でも代用可能である。

[0055] （実施例1：推定リパーゼの発現解析）

本実施例では、KH-1株において見出された推定リパーゼ遺伝子の各温度での発現解析を示す。

[0056] （実験手法）

KH-1株を、1%キャノーラオイルを含む無機塩培地（ Na_2HPO_4 3.5 g/L、 KH_2PO_4 2.0 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.34 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.8 mg/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.4 mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.4 mg/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.7 mg/L、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mg/L、および NaMoO_4 0.25 mg/L）3 Lに、HITACHI U-2810分光光度計（日立製作所、東京）を使用して、菌体光学密度による最終濃度が $\text{OD}_{660} = 0.03$ となるように植菌し、5 L容積ファーマンター（250 rpm、200 ml/minの空気還流下）中で、28℃または15℃で培養した。経時的にサンプリングした各培養物から、ハイピュアRNAアイソレーションキット（Roche）を使用して全RNAを抽出した。2 μg の全RNAを鋳型とし、Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time（タカラバイオ社）を使用して、ゲノムDNAを除去し、cDNAを合成した。その後、キットに付属の希釈溶液を使用してcDNA原液を3倍に希釈した。本開示の第1のリパーゼおよび第2のリパーゼをコードする遺伝子に特異的な合成プライマーを使用して、Applied Biosystems StepOnePlus™（Applied Biosystems）により、定量リアルタイムRT-PCRを行った。PCR反応は、PowerUp™ SYBR（

登録商標) Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ($10\mu\text{l}$)、各プライマー (終濃度 $0.5\mu\text{M}$)、cDNA ($1\mu\text{l}$) を含む $20\mu\text{l}$ 溶液中で実施した。PCR 反応はファストサイクリングモードを使用し、 95°C で 2 分の変性を 1 サイクル行った後、 95°C で 3 秒間、 60°C で 30 秒間のサイクルを 40 回反復するプログラムで行った。発現レベルは、RNA ポリメラーゼシグマファクター (rpod) の発現レベルで正規化した。データは、溶融曲線が単一のピークを有することを確認した後、比較 Ct 法 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法) により解析した。LB 培地で培養した場合に発現した各リパーゼ遺伝子を対照として 1 に設定したときの、相対的な発現レベルを示す。

[0057] (結果)

油脂存在下での KH-1 株の培養によって、2 種類のリパーゼ (第 1 のリパーゼの代表的配列のものおよび第 2 のリパーゼの代表的配列のもの) をコードする遺伝子の発現誘導が認められた。以下の表 1 に示すように、第 1 のリパーゼの代表的配列のものをコードする遺伝子は、 28°C で培養した場合に約 24 時間で発現レベルのピークを示し、 15°C で培養した場合には約 60 時間で発現レベルのピークを示した。第 2 のリパーゼの代表的配列のものをコードする遺伝子は、 28°C で培養した場合に約 24 時間で発現レベルのピークを示し、 15°C で培養した場合には約 96 時間で発現レベルのピークを示した。

[表1]

表 1. 各培養温度におけるキャノーラオイル含有無機塩培地での、本発明のリパーゼをコードする遺伝子の発現量 (LB 培地での発現量を 1 とした場合の相対値)

	第 1 のリパーゼ	第 2 のリパーゼ
28°C	136 ± 39 (24 時間)	198 ± 26 (24 時間)
15°C	57 ± 12 (60 時間)	134 ± 28 (96 時間)

括弧内は、発現レベルがピークを示した培養時間である。

[0058] (実施例 2 : 変異体の実験)

本実施例では、本開示のリパーゼの変異体を使用した実験を示す。

[0059] (実験手法)

本開示の第1のリパーゼの代表的配列のもののアミノ酸配列（配列番号4）ならびに第2のリパーゼの代表的配列のもののアミノ酸配列（配列番号11）に、リパーゼで活性部位として知られている部位以外のアミノ酸残基について、配列同一性が70～99%になるようにそれぞれ変異を導入したポリペプチドを作製する。この変異体ポリペプチドを使用してトランス脂肪酸含有油脂の分解活性を測定する。

[0060] (実施例3：本開示の第1および第2のリパーゼのトランス脂肪酸およびトランス脂肪酸含有油脂による発現誘導)

本実施例では、トランス脂肪酸（エライジン酸）およびトランス脂肪酸含有油脂（トリエライジン）を添加した場合の本開示の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものをコードする遺伝子の発現レベルを、シス脂肪酸（オレイン酸）およびシス脂肪酸含有脂肪酸（トリオレイン）と比較した。

[0061] (実験手法)

KH-1株をトリオレインプレートで2日間培養した。その後KH-1株を綿棒で擦り取り、PBSに懸濁し、次いでPBSで2回洗浄を行った。油脂のストック溶液として、終濃度2%のオレイン酸、トリオレイン、エライジン酸またはトリエライジンを含む、終濃度5%のTriton X-100溶液を調製し、70℃で溶解を行った。20mlの無機塩培地に、各油脂のストック溶液を体積比で1/10となるように添加し、ここに洗浄したKH-1株を植菌した（終濃度は、0.2%の油脂、0.5%のTriton X-100であり、菌株は、OD₆₆₀=0.1である）。28℃で6時間の培養を行った後、KH-1株を回収し、回収したKH-1株から全RNAを抽出した。2μgの全RNAを鋳型として使用して上記に従いcDNAを合成した後、3倍に希釈したcDNAを鋳型として定量RT-PCRを行った。発現レベルは、rpod遺伝子の発現量で正規化し、オレイン酸培養またはトリオレインでの発現レベルを1としたときの相対値で比較を行った。

[0062] (結果および考察)

第1のリパーゼの代表的配列のものをコードする遺伝子の発現レベルが、トリエライジン処理後に100倍程度増大した（図1Aおよび1B上段）。この結果は、トランス脂肪酸またはトランス脂肪酸含有油脂が、第1のリパーゼの誘導剤となる可能性を示唆する。第2のリパーゼの代表的配列のものをコードする遺伝子の発現についても、トリエライジン処理後に10～20倍程度増大し（図1Aおよび1B下段）、この結果は、トランス脂肪酸またはトランス脂肪酸含有油脂が、第2のリパーゼに対しても誘導剤となる可能性を示唆する。

[0063] （実施例4：KH-1株を28℃で培養した上清からの第1のリパーゼの精製）

本実施例では、28℃でのKH-1株培養上清からの第1のリパーゼの代表的配列のものの精製を示す。

[0064] （実験手法）

4 mlのButyl-S Sepharose 6 Fast Flow（GEヘルスケア）を、0.5 M NaClおよび2 mM CaCl₂を含む20 mM Tris-HCl（pH 7.0）緩衝液40 mlで平衡化した。KH-1株を28℃で培養した後の培養上清を、0.45 μmのフィルターにより滅菌し、カラムにアプライした。1時間放置して疎水性タンパク質を吸着させた後、40 mlの前出の緩衝液で洗浄した。その後、NaClを含まない4 mlの前出の緩衝液で5回洗浄し、カラム担体に緩く結合するタンパク質を溶出させた。さらに0.5%のTriton X-100を含む4 mlの前出の緩衝液で4回洗浄し、カラム担体に強く疎水性結合したタンパク質の溶出を行った。各溶出サンプルを0.45 μmのフィルターでろ過し、そのうちの20 μlに、4 μlの5×SDS-PAGEサンプル緩衝液を添加した。100℃で5分間熱処理を行った後、遠心分離し、20 μlの上清をポリアクリルアミドゲル（5-12%グラディエントゲル）にアプライし、20 mAで90分間電気泳動を行った。次いでCBB染色を行うことによって、サンプルに含まれるタンパク質を分離解析した。

[0065] 溶出リパーゼに対するN末端アミノ酸配列の分析を行った。溶出画分を30 kDaカットのスピнкаラムで濃縮した後、スピнкаラムタイプの界面活性剤除去カラムDetergent Out™ (Takara) にサンプルをアプライし、製造元のプロトコールに従って2 mM CaCl₂を含む20 mM Tris-HCl (pH 7.0) の緩衝液に置換して、溶出時に使用したTriton X-100を除去した。得られた脱界面活性剤リパーゼサンプルをSDS-PAGEで分離し、目的のタンパク質をPVDF膜にブロッキングした後、エドマン分解によりN末端アミノ酸配列を決定した。

[0066] (結果)

28℃の培養上清から精製されたタンパク質は、約30 kDaの分子量を示した(図2)。そして、KH-1の28℃での培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーにより精製されたリパーゼは、ほぼ単一のバンドであり、ほとんど単一のタンパク質からなることが示された。

[0067] 28℃での培養上清から精製されたタンパク質のN末端配列は、Ala-Asp-Asn-Tyr-Alaと解読され、第1のリパーゼをコードする遺伝子の産物であることが確認された。

[0068] (考察)

第1のリパーゼの代表的配列のものの成熟タンパク質のアミノ酸配列は、RASTの遺伝子情報から得られた遺伝子配列から推定された産物の45位からの配列と一致するものであり、1~44位のアミノ酸残基はプレ配列として細胞内からの分泌後に切断されることが示唆された。

[0069] (実施例5：KH-1株を15℃で培養した上清からの第2のリパーゼの精製)

本実施例では、15℃でのKH-1株培養上清からの第2のリパーゼの代表的配列のものの精製を示す。

[0070] (実験手法)

実施例4と同様の手法によって、KH-1株を15℃で培養した後の培養上清から、リパーゼを精製した。精製した蛋白質画分をSDS-PAGEで

分離後、目的のバンドをゲルから切り出し、脱色・洗浄後、トリプシンを含むトリス緩衝液（pH 8.0）を加え、35℃で20時間、酵素消化に処した。回収したサンプル溶液を、脱塩・濃縮後にLC-MS/MS（Thermo Fisher Scientific Inc., USA）で解析した。

[0071] （結果）

15℃の培養上清から精製されたタンパク質は、約40kDaの分子量を示した（図3）。そして、KH-1の15℃での培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーにより精製されたリパーゼは、ほぼ単一のバンドであり、ほとんど単一のタンパク質からなることが示された。

[0072] 15℃での培養上清から精製された蛋白質の質量分析の結果から、Asn-Val-Thr-Tyr-Hisの断片が検出され、それよりN末端側の配列は検出されなかった。トリプシン消化の特異性を考慮すると、この配列またはさらに2残基N末側に延ばしたThr-Arg-Asn-Val-Thr-Tyr-HisをN末端配列とする第2のリパーゼをコードする遺伝子の産物であると推定された。

[0073] （考察）

第2のリパーゼの代表的配列のものの成熟タンパク質のアミノ酸配列は、RASTの遺伝子情報から得られた遺伝子配列から推定された産物の49位または51位からの配列と一致するものであり、1～48または50位のアミノ酸残基はプレ配列として細胞内からの分泌後に切断されることが示唆された。

[0074] （実施例6：本開示のリパーゼの熱安定性、至適温度、至適pHおよびpH安定性）

本実施例では、本開示の第1および第2のリパーゼの熱安定性、至適温度、至適pHおよびpH安定性を示す。

[0075] （実験手法）

本開示の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものを、それぞれ28℃または15℃で培養したKH-1株から疎水性カラムクロマトグラフィー

によって精製し、5 U／m l に調製した。各リパーゼ活性は、以下の（A）～（D）の条件でのp-ニトロフェニルパルミテートの加水分解を測定することによって定量した。（A）10～80℃の間の温度に調整した緩衝液と本開示の第1または第2のリパーゼの代表的配列のものとを混合し、直後に各温度でリパーゼ活性を測定した。（B）本開示の第1または第2のリパーゼを、30～95℃の間の温度で30分間インキュベートし、その後各リパーゼ活性を37℃で測定した。（C）酢酸緩衝液（pH 3.0～5.0）、リン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0～7.0）、Tris-HCl緩衝液（pH 7.0～9.0）またはCAPS緩衝液（pH 9.0～11.0）と本開示の第1または第2のリパーゼの代表的配列のものとを混合し、その後リパーゼ活性を測定した。pH 9.0でのリパーゼ活性を100%とした場合の相対強度として示す。（D）（C）において使用した各緩衝液と本開示の第1または第2のリパーゼの代表的配列のものの溶液とを、1：1の体積比で混合し、28℃で24時間放置し、その後リパーゼ活性をpH 7.0にて測定した。

[0076] （結果）

本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものの至適温度は60℃であり、30℃～85℃の間の広範な温度範囲で熱安定性を示した（図4）。本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものの至適温度は50℃であり、15℃～80℃の間の広範な温度範囲で熱安定性を示した（図5）。本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものの至適pHはpH 9.0、安定なpHはpH 9.0～9.5であった。本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものの至適pHはpH 9.0であり、安定なpHはpH 7.5～10.5であった。

[0077] （考察）

本開示の第1および第2のリパーゼの至適温度および熱安定性の結果から、本開示のリパーゼは、高温でも高い活性を保持するリパーゼであることが示された。

[0078] （実施例7：KH-1株培養上清と洗剤との換気扇汚れ分解活性の比較）

本実施例では、KH-1株培養上清と油用洗剤および一般洗剤との、換気扇汚れの分解活性を比較した。

[0079] (実験手法)

KH-1株培養上清として、KH-1株を1%キャノーラ油を含む培地中で28℃で24時間培養したときの培養物の上清を使用した。油用洗剤および一般洗剤として、それぞれ天然酵素洗剤ニコエコ台所用（ニコエコ、長野、説明書に従って143倍に水で希釈）およびファミリー（登録商標）（花王、東京、説明書に従い、666倍に希釈）を使用した。油汚れが沈着した換気扇フィルターを2cm角に切りプレートに入れ、各プレートにKH-1株培養上清（KH-1）、油用洗剤または一般洗剤を5mlずつ添加し、30分間～4時間浸漬させた。

[0080] (結果)

実施例7の結果を図6に示す。一般洗剤と油用洗剤は、4時間の浸漬洗浄でも油汚れを完全に落とすことはできなかったが、KH-1株培養上清は、1時間の浸漬洗浄によって、フィルターを新品と同程度になるまで洗浄することができた。

[0081] (考察)

この培養条件により得られた培養上清中の主要なリパーゼは、本開示の酵素であると考えられるため、この油汚れの分解活性は、本開示の酵素によるものであると考えられる。

[0082] (実施例8：KH-1株由来の本開示の酵素とN-51032酵素との換気扇汚れ分解活性の比較)

本実施例では、KH-1株由来の本開示の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものとNovozym51032リパーゼ（Novozymes）との、換気扇汚れの分解活性を比較した。

[0083] (実験手法)

KH-1株由来の本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものおよび第2のリパーゼの代表的配列のものは、それぞれKH-1株の培養上清を、上記

に従い疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製することによって得た。Novozym 51032 リパーゼ (N-51032) は、Novozymes 社から購入した。各リパーゼを、2 mM CaCl_2 および 0.25% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に、15 U/ml の濃度となるように溶解した。油汚れが沈着した換気扇フィルターを 2 cm 角に切りプレートに入れ、各プレートに各リパーゼの溶液を 5 ml ずつ添加し、30 分間浸漬させた。

[0084] (結果)

リパーゼ溶液に浸漬させた後の換気扇フィルターおよび浸漬させた後のリパーゼ溶液を図 7 に示す。本開示の第 1 および第 2 のリパーゼの代表的配列のものに浸漬させた換気扇フィルターはいずれも、Novozym 51032 リパーゼに浸漬させた換気扇フィルターよりも油汚れが顕著に分解されていた。

[0085] (実施例 9：本開示の第 1 のリパーゼによるラードおよびショートニングの分解)

本実施例では、本開示の第 1 のリパーゼの代表的配列のものによるラードおよびショートニングの分解活性を示す。

[0086] (実験手法)

KH-1 株の培養上清から本開示の第 1 のリパーゼの代表的配列のものを、2 mM CaCl_2 および 0.5% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶出緩衝液を使用して、疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。2 ml の本開示のリパーゼの溶液 (50 U/ml) をプレートに入れ、ここに 0.7 g のラード (A) または 0.5 g のショートニング (B) を添加した。適宜攪拌し溶液となじませながら、28℃で24時間放置した。前出の溶出緩衝液のみで処理したものを対照とした。

[0087] (C) 2.5% Triton X-100 中に、終濃度が 2% となるようにラードまたはショートニングを溶解して、ストック溶液を作成した。ラー

ドおよびショートニングを65℃で融解させたストック溶液0.2mlを1.8mlの上記リパーゼ含有緩衝液に加えた。Triton X-100および各油脂の終濃度は、それぞれ0.25%および0.2%である。28℃で24時間インキュベートを行い、等量のクロロホルムにより油脂を抽出し、5μlの抽出物を薄層クロマトグラフィーに供した。

[0088] (結果)

実施例9の結果を図8に示す。本実施例における実験結果から、緩衝液単独で処理したラードおよびショートニングは、処理後も固体の状態であったのに対し、第1のリパーゼの代表的配列のもので処理した油脂は溶解された(図8(A)および(B))。薄層クロマトグラフィーの結果からも、ラードおよびショートニング中のトリグリセリドが遊離脂肪酸に分解されたことが実証された(図8(C))。本開示の第1のリパーゼは、ラードおよびショートニングを加水分解し、可溶化する活性を有することが示された。

[0089] (実施例10：本開示の第2のリパーゼによるラードおよびショートニングの分解)

本実施例では、本開示の第2のリパーゼによるラードおよびショートニングの分解活性を示す。

[0090] (実験手法)

15℃で96時間培養したKH-1株の培養上清から本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものを、2mM CaCl_2 および0.5% Triton X-100を含む20mM Tris-HCl (pH7.0) 溶出緩衝液を使用して、疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製した。2mlの本開示のリパーゼの溶液(50U/ml)をプレートに入れ、ここに0.7gのラード(A)または0.5gのショートニング(B)を添加した。適宜攪拌し溶液となじませながら、28℃で24時間放置した。前出の溶出緩衝液のみで処理したものを対照とした。

[0091] (C) 2.5% Triton X-100中に、終濃度が2%となるようにラードまたはショートニングを溶解して、ストック溶液を作成した。ラー

ドおよびショートニングを65℃で融解させたストック溶液0.2mlを1.8mlの上記リパーゼ含有緩衝液に加えた。Triton X-100および各油脂の終濃度は、それぞれ0.25%および0.2%である。28℃で24時間インキュベートを行い、等量のクロロホルムにより油脂を抽出し、5μlの抽出物を薄層クロマトグラフィーに供した。

[0092] (結果)

実施例10の結果を図9に示す。本実施例における実験結果から、緩衝液単独で処理したラードおよびショートニングは、処理後も固体の状態であったのに対し、第2のリパーゼの代表的配列のもので処理した油脂は溶解された(図9(A)および(B))。薄層クロマトグラフィーの結果からも、ラードおよびショートニング中のトリグリセリドが遊離脂肪酸に分解されたことが実証された(図9(C))。本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものは、ラードおよびショートニングを加水分解し、可溶化する活性を有することが示された。

[0093] (実施例11：KH-1株によるトランス脂肪酸含有排水の処理試験)

本実施例では、KH-1株が含むリパーゼおよびBioRemove3200(BR3200、Novozymes)によるトランス脂肪酸含有排水の処理試験を示す。

[0094] (実験手法)

(A) 排水サンプルに、無機塩培地相当のN(窒素)およびP(リン)を添加した。KH-1株は、LB培地において培養し、培養後洗浄を行い、OD=0.1になるように接種しリパーゼを分泌する条件に供した。BR3200(BioRemove3200、Novozymes)は、通常使用される濃度の10倍の量になるように添加した。この排水サンプルを28℃で24時間または48時間培養した。その後サンプルを、クロロホルム、アセトンおよびメタノールを、体積比でそれぞれ96:4:1の比率で含む展開溶媒を使用し、シリカゲルコートプレート上に展開した。油脂の分解は、薄層クロマトグラフィーを使用して、モリブデン酸n水和物による発色によっ

て検出した。

[0095] (B) 24 および 48 時間処理後の排水サンプルに対してノルマルヘキサン抽出相当の油分濃度を測定試薬キットにより測定した。

[0096] (結果)

KH-1 株が分泌するリパーゼは、24 時間処理により排水サンプル中の油分を、BR3200 の 50% 程度まで分解することができることが明らかになった (図 10)。さらに、48 時間処理では、KH-1 株が分泌するリパーゼは、排水サンプル中の油分を、BR3200 の 1/7 程度まで分解することができた。

[0097] (実施例 12 : 本開示の第 1 のリパーゼによる各油脂の分解)

本実施例では、本開示の第 1 のリパーゼの代表的配列のものによるトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。

[0098] (実験手法)

本開示の第 1 のリパーゼの代表的配列のものは、KH-1 株を 1% のキャノーラ油を含む無機塩培地で、28℃で培養した培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製したものを使用した。トリオレインおよびトリエライジンを、終濃度が 2% となるように 5% の Triton X-100 を含む蒸留水に溶解し、ストック溶液とした (10×ストック溶液)。本開示の第 1 のリパーゼの代表的配列のものの溶液 (終濃度 30 U/ml の 20 mM Tris 緩衝液 (2 mM CaCl_2 と 0.5% Triton X-100 を含む; pH 7.0) 中) またはリパーゼを含まない同緩衝液のそれぞれ 100 μ l をチューブに分注し、上記の油脂 10×ストック溶液を、体積比で 1/10 となるように添加した。各油脂の終濃度は 0.2%、Triton X-100 の終濃度は 0.5% となる。これらの溶液を 37℃で 24 時間インキュベートした。その後、クロロホルム、アセトンおよびメタノールを、体積比でそれぞれ 96 : 4 : 1 の比率で含む展開溶媒を使用し、シリカゲルコートプレート上に展開した。油脂の分解は、薄層クロマトグラフィーを使用して、モリブトン酸 n 水和物による発色によって検出した。

[0099] (結果)

本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものは、トリオレインおよびトリエライジンのいずれも加水分解する活性を有した(図11)

[0100] (考察)

本開示の第1のリパーゼの代表的配列のものは、シス体のトリグリセリドであるトリオレインと、トランス体のトリグリセリドであるトリエライジンとの両方を加水分解する活性を有することが明らかとなった。

[0101] (実施例13: 本開示の第2のリパーゼによる各油脂の分解)

本実施例では、本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものによるトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。

[0102] (実験手法)

本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものは、KH-1株を1%のキャノーラ油を含む無機塩培地で、15℃で培養した培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製したものを使用した。本開示の第2のリパーゼ溶液(終濃度0.3 U/mlの20 mM Tris緩衝液(2 mM CaCl_2 と0.5% Triton X-100を含む; pH 7.0)中)またはリパーゼを含まない同緩衝液のそれぞれ100 μ lをチューブに分注し、上述の油脂の10×ストック溶液を、体積比で1/10となるように添加した。各油脂の終濃度は0.2%、Triton X-100の終濃度は0.5%となる。これらの溶液を37℃で22時間インキュベートした。その後、クロロホルム、アセトンおよびメタノールを、体積比でそれぞれ96:4:1の比率で含む展開溶媒を使用し、シリカゲルコートプレート上に展開した。油脂の分解は、薄層クロマトグラフィーを使用して、モリブトン酸n水和物による発色によって検出した。

[0103] (結果)

本開示の第2のリパーゼの代表的配列のものは、シス体のトリグリセリドであるトリオレインと、トランス体のトリグリセリドであるトリエライジンとの両方を加水分解する活性を有した(図12)。

[0104] (実施例 1 4 : 低温下での本開示のリパーゼによる各油脂の分解)

本実施例では、15℃条件下での本開示の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものによるトリオレインおよびトリエライジンの分解を示す。

[0105] (実験手法)

第1のリパーゼの代表的配列のものとして、KH-1株を1%のキャノーラ油を含む無機塩培地で、28℃で培養した培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製したものを使用した。第2のリパーゼの代表的配列のものとして、KH-1株を15℃で同様に培養した培養上清から疎水性カラムクロマトグラフィーによって精製したものを使用した。トリオレインまたはトリエライジンは、終濃度が0.1%となるように、上記10×ストック溶液を1/20添加し、第1または第2のリパーゼ溶液と混合した。第1のリパーゼの代表的配列のものは4-NPPを基質として終濃度6U/ml、第2のリパーゼの代表的配列のものは4-NPPを基質として終濃度6U/mlとした。これらの溶液を15℃で72時間インキュベートした。その後、クロロホルム、アセトンおよびメタノールを、体積比でそれぞれ96:4:1の比率で含む展開溶媒を使用し、シリカゲルコートプレート上に展開した。油脂の分解は、薄層クロマトグラフィーを使用して、モリブトン酸n水和物による発色によって検出した。

[0106] (結果および考察)

シス体のトリグリセリドであるトリオレインは、第1および第2のリパーゼの代表的配列のもののいずれの処理によっても、オレイン酸に分解された。トランス体のトリグリセリドであるトリエライジンは、第1および第2のリパーゼのいずれの処理によっても、エライジン酸に分解された(図13)。この結果から、本開示の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものは、低温(15℃)の条件下であっても、シス脂肪酸含有油脂およびトランス脂肪酸含有油脂のいずれも分解する活性を有することが実証された。

[0107] (実施例 1 5 : トリオレインの脂肪改変および脂肪酸メチルエステルの油脂生産技術)

本実施例では、本発明の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものによる、シス体の脂肪酸の脂肪改変を示す。

[0108] (実験方法)

1%のキャノーラ油を含むBS培養液中でKH-1株を48時間ファーメンター培養し、その上清からButyl Sepharoseカラムを使用して第1および第2のリパーゼの代表的配列のものを精製した。第1および第2のリパーゼの溶液を、5 U/mlに調整した。トリオレインは0.5%となるようにメタノールに溶解してストック溶液とした。そのストック溶液80 μ lと各酵素溶液20 μ lとの混合液をスクリーキャップ付きチューブに分注し、37°Cのインキュベーターで96時間静置した。なお、リパーゼを含有しない緩衝液と混合したものを対照区とした。その後、各溶液に100 μ lの水および50 μ lのクロロホルムを添加し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、12,000 gで5分間遠心分離した。10 μ lの下層のクロロホルム層を、ヘキサン、ジエチルエーテルおよび酢酸を、体積比でそれぞれ80 : 20 : 1の比率で含む展開溶媒を使用してTLC解析に供した。

[0109] (結果)

実施例15の結果を図14に示す。本発明の第1のリパーゼおよび第2のリパーゼのいずれも、シス体のトリグリセリドであるトリオレインのエステル交換反応を触媒し、オレイン酸メチルエステルを生成した。

[0110] (実施例16：トランス脂肪酸の脂肪改変および脂肪酸メチルエステルの油脂生産技術)

本実施例では、本発明の第1および第2のリパーゼの代表的配列のものによる、トランス脂肪酸の脂肪改変を示す。

[0111] (実験方法)

1%のキャノーラ油を含むBS培養液中でKH-1株を48時間ファーメンター培養し、その上清からButyl Sepharoseカラムを使用して第1および第2のリパーゼの代表的配列のものを精製した。第1および第2のリパーゼの溶液を、5 U/mlに調整した。(A) パルミテライジン酸お

よび（Ｂ）バクセン酸の各トランス脂肪酸モノマーは、各脂肪酸モノマーが 0.5%となるようにメタノールに溶解してストック溶液とした。各トランス脂肪酸ストック溶液80 μ lと各酵素溶液20 μ lとの混合液を、スクリュウキャップ付きチューブに分注し、37℃のインキュベーターで72時間静置した。なお、リパーゼを含有しない緩衝液と混合したものを対照区とした。その後、各溶液に100 μ lの水および50 μ lのクロロホルムを添加し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、12,000 g で5分間遠心分離した。5 μ lの下層のクロロホルム層を、ヘキサン、ジエチルエーテルおよび酢酸を、体積比でそれぞれ80:20:1の比率で含む展開溶媒を使用してTLC解析に供した。

[0112] （結果）

実施例16の結果を図15に示す。本発明の第1のリパーゼおよび第2のリパーゼのいずれも、トランス脂肪酸であるパルミテライジン酸およびバクセン酸のエステル交換反応を触媒し、それぞれパルミテライジン酸メチルエステルおよびバクセン酸メチルエステルを生成した。これにより、これらの酵素は、エライジン酸以外のトランス脂肪酸の反応にも有用であることが明らかになった。

[0113] （実施例17：本発明の第1のリパーゼの改変体の油脂分解活性）

本実施例では、本発明の第1のリパーゼの改変体の油脂分解活性を解析した。

[0114] （実験方法）

本発明の第1のリパーゼの代表的配列のもの（配列番号4）のアミノ酸配列において、1位、3位、6位、137位、220位、227位、243位、276位および316位に対応するアミノ酸が、それぞれセリン、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、バリン、スレオニン、ロイシン、グルタミンおよびリジンに置換された改変体（配列番号16）の発現コンストラクトは、ブレビバチルス発現系を使用した発現システム(BIC system: TaKaRa)にしたがって構築した。菌体は、2SY培地に終濃度で50 μ g/mlになるようネオマイシンを添加した培地で48時間30℃で培養した。培養した菌の

上清50mlをButyl Sepharoseカラムにアプライし、0.25% TritonX-100を含む20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂に溶出した。なお、リコンビナントリパーゼは成熟型配列のN末端に、AD+6xHis+DDDK (Enterokinase認識配列)が付加されている。油脂として、トリオレイン (TOIe) およびトリエライジン (TED) を使用して、以下の実験条件にしたがって、各油脂の分解活性をTLCにより解析した：

- ・油脂の種類：トリオレイン、トリエライジン
- ・反応液：20 mM Tris-HCl (pH7.0), 2mM CaCl₂, 0.5% Triton X100
- ・油脂終濃度：0.2%
- ・処理方法：エッペンドルフチューブに100μlの酵素溶液を入れ、10x各油脂ストックを1/5量添加した。
- ・処理温度：37℃
- ・処理時間：48時間
- ・油分抽出：半量のクロロホルムで抽出し10μlをアプライしてTLCを行った。
- ・展開プレート：シリカゲルコートプレート
- ・展開溶剤：chloroform:acetone: methanol=96:4:2
- ・検出：モリブトリン酸n水和物による発色 (2.4 g/60 ml EtOH)

[0115] (結果)

実施例17の結果を図16に示す。上記9か所の変異を有する改変体も、高い油脂分解活性を有していた。

[0116] (実施例18：本発明の第2のリパーゼの改変体の油脂分解活性)

本実施例では、本発明の第2のリパーゼの改変体の油脂分解活性を解析した。

[0117] (実験方法)

本発明の第2のリパーゼの代表的配列のもの (配列番号11) のアミノ酸配列において、13位、26位、45位、75位、100位、138位、1

68位、171位、214位、230位、234位、248位、250位、331位および360位のアミノ酸が、それぞれロイシン、ロイシン、アルギニン、イソロイシン、バリン、セリン、グルタミン酸、アルギニン、グリシン、アスパラギン、セリン、アルギニン、グリシン、アスパラギンおよびアラニンに置換された改変体（配列番号18）の発現コンストラクトは、ブレビバチルス発現系を使用した発現システム(BIC system: TaKaRa)にしたがって構築した。菌体は、TM培地に終濃度20mMになるようMgCl₂と終濃度50 μg/mlになるようネオマイシンを添加した培地で72時間30℃で培養した。培養した菌の上清50mlをButyl Sepharoseカラムにアプライし、0.25% TritonX-100を含む20 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂に溶出した。なお、リコンビナントリパーゼは推定のシグナル配列が切断された配列のN末端に、AD+6xHis+DDDK (Enterokinase認識配列)が付加されている。油脂として、トリオレイン(TOE)およびトリエライジン(TED)を使用して、以下の実験条件にしたがって、各油脂の分解活性をTLCにより解析した：

- ・油脂の種類：トリオレイン、トリエライジン
- ・反応液：20 mM Tris-HCl (pH7.0), 2mM CaCl₂, 0.5% Triton X100
- ・油脂終濃度：0.2%
- ・処理方法：エッペンドルフチューブに100 μlの酵素溶液を入れ、10x各油脂ストックを1/5量添加した。
- ・処理温度：37℃
- ・処理時間：48時間
- ・油分抽出：等量のクロロホルムで抽出し10 μlをアプライしてTLCを行った。
- ・展開プレート：シリカゲルコートプレート
- ・展開溶剤：chloroform:acetone: methanol=96:4:2
- ・検出：モリブトリン酸n水和物による発色 (2.4 g/60 ml EtOH)

[0118] (結果)

実施例 18 の結果を図 17 に示す。上記 15 か所の変異を有する改変体も、高い油脂分解活性を有していた。

[0119] (注記)

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は日本国特許庁に 2018 年 7 月 6 日に提出された特願 2018-129504 に対して優先権主張を伴うものであり、その内容はすべて本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

[0120] 本開示は、トランス脂肪酸含有油脂を分解することにおいて、食品工場などで問題となっているトランス脂肪酸含有排水の処理などにおいて、有用性を有する。

受託番号

[0121] N I T E B P - 0 2 7 3 1

配列表フリーテキスト

- [0122] 配列番号 1 本開示の第 1 のリパーゼの代表的核酸配列の成熟配列
配列番号 2 本開示の第 1 のリパーゼの代表的核酸配列においてプレ配列をコードするヌクレオチドを含む核酸配列
配列番号 3 本開示の第 1 のリパーゼの代表的核酸配列の全長配列
配列番号 4 本開示の第 1 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の成熟配列
配列番号 5 本開示の第 1 のリパーゼの代表的アミノ酸配列においてプレ配列を含むアミノ酸配列
配列番号 6 本開示の第 1 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の全長配列
配列番号 7 本開示の第 2 のリパーゼの代表的核酸配列の成熟配列
配列番号 8 本開示の第 2 のリパーゼの代表的核酸配列において短鎖プレ配

列をコードするヌクレオチドを含む核酸配列

配列番号 9 本開示の第 2 のリパーゼの代表的核酸配列において長鎖プレ配列をコードするヌクレオチドを含む核酸配列

配列番号 10 本開示の第 2 のリパーゼの代表的核酸配列の全長配列

配列番号 11 本開示の第 2 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の成熟配列

配列番号 12 本開示の第 2 のリパーゼの代表的アミノ酸配列において短鎖プレ配列を含むアミノ酸配列

配列番号 13 本開示の第 2 のリパーゼの代表的アミノ酸配列において長鎖プレ配列を含むアミノ酸配列

配列番号 14 本開示の第 2 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の全長配列

配列番号 15 本開示の第 1 のリパーゼの代表的核酸配列の成熟配列の改変配列

配列番号 16 本開示の第 1 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の成熟配列の改変配列

配列番号 17 本開示の第 2 のリパーゼの代表的核酸配列の成熟配列の改変配列

配列番号 18 本開示の第 2 のリパーゼの代表的アミノ酸配列の成熟配列の改変配列

請求の範囲

- [請求項1] (a) 配列番号4、11、16または18に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (b) (a) のアミノ酸配列において、1アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチド；
- (c) (a) または (b) に示すアミノ酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチド；
- (d) 配列番号1、7、15または17に示す核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド；
- (e) (d) に示す核酸配列において、1ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；
- (f) (d) または (e) に示す核酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有する核酸配列によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；
- (g) (d) ～ (f) のいずれか1つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされ、かつ生物学的活性を有するポリペプチド；
- (h) (d) ～ (g) のいずれか1つの核酸配列の対立遺伝子変異体によってコードされ、生物学的活性を有するポリペプチド；または
- (i) (a) ～ (h) に示すアミノ酸配列の断片を含む、ポリペプチド、
- である、ポリペプチド。
- [請求項2] 前記生物学的活性は、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力である、請求項1に記載のポリペプチド。

- [請求項3] 45～70℃が油脂を分解する能力の至適温度である、請求項1または2に記載のポリペプチド。
- [請求項4] 35～55℃が油脂を分解する能力の至適温度である、請求項1または2に記載のポリペプチド。
- [請求項5] 65℃以上において熱安定性を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項6] 75℃以上において熱安定性を有する、請求項1、2または4のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項7] 15℃において油脂を分解する能力を有する、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項8] ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) に由来するポリペプチドである、請求項1～7のいずれか一項に記載のポリペプチド。
- [請求項9] (A) 配列番号1、7、15または17に示す核酸配列を含むポリヌクレオチド；
- (B) (A) に示す核酸配列において、1ヌクレオチド以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含む核酸配列を含むポリヌクレオチド；
- (C) (A) または (B) に示す核酸配列と少なくとも70%以上の配列同一性を有する核酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；
- (D) (A) ～ (C) のいずれか1つに示す核酸配列またはその相補的配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列を含み、かつ生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；
- (E) (A) ～ (D) のいずれか1つの核酸配列の対立遺伝子変異体であって、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；または

(F) 配列番号 4、11、16 または 18 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；

(G) (F) のアミノ酸配列において、1 アミノ酸以上の置換、付加、欠失またはそれらの組合せを含むアミノ酸配列を含み、生物学的活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(H) (F) または (G) に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 以上の配列同一性を有し、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；または

(I) (F) ～ (H) に示す核酸配列の断片を含む、ポリヌクレオチド、

である、ポリヌクレオチド。

[請求項10] 前記生物学的活性は、トランス脂肪酸含有油脂の資化に関連する能力、またはトランス脂肪酸含有油脂を分解する能力である、請求項9に記載のポリヌクレオチド。

[請求項11] 45～70℃が油脂を分解する能力の至適温度であるポリペプチドをコードする、請求項9または10に記載のポリヌクレオチド。

[請求項12] 35～55℃が油脂を分解する能力の至適温度であるポリペプチドをコードする、請求項9または10に記載のポリヌクレオチド。

[請求項13] 65℃以上において熱安定性を有するポリペプチドをコードする、請求項9～11のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項14] 75℃以上において熱安定性を有するポリペプチドをコードする、請求項9、10または12のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項15] 前記ポリヌクレオチドは、15℃において油脂を分解する能力を有するポリペプチドをコードする、請求項9～14のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

[請求項16] ブルクホルデリア アルボリス (*Burkholderia arboris*) に由来するポリヌクレオチドである、請求項9～15のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

- [請求項17] 請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系。
- [請求項18] 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞もしくは無細胞発現系、または請求項17に記載の細胞もしくは無細胞発現系を含む油分解剤。
- [請求項19] さらに油処理成分を含む、請求項18に記載の油分解剤。
- [請求項20] 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞もしくは無細胞発現系、請求項17に記載の細胞もしくは無細胞発現系または請求項18に記載の油分解剤と、さらに油処理成分とを備える、油分解のためのキット。
- [請求項21] 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系、請求項17に記載の細胞または無細胞発現系または請求項18もしくは19に記載の油分解剤を処理対象に作用させることを包含する、油分解除去方法。
- [請求項22] 前記処理対象はトランス脂肪酸またはトランス脂肪酸含有油脂を含む、請求項21に記載の方法。
- [請求項23] 請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞もしくは無細胞発現系、または請求項17に記載の細胞もしくは無細胞発現系を含む洗剤。
- [請求項24] 脂肪改変・油脂生産技術における、請求項1～8のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項9～16のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または無細胞発現系、請求項17に記載の細胞または無細胞発現系または請求項18もしくは19に記載の油分解剤の使用。

[図1]

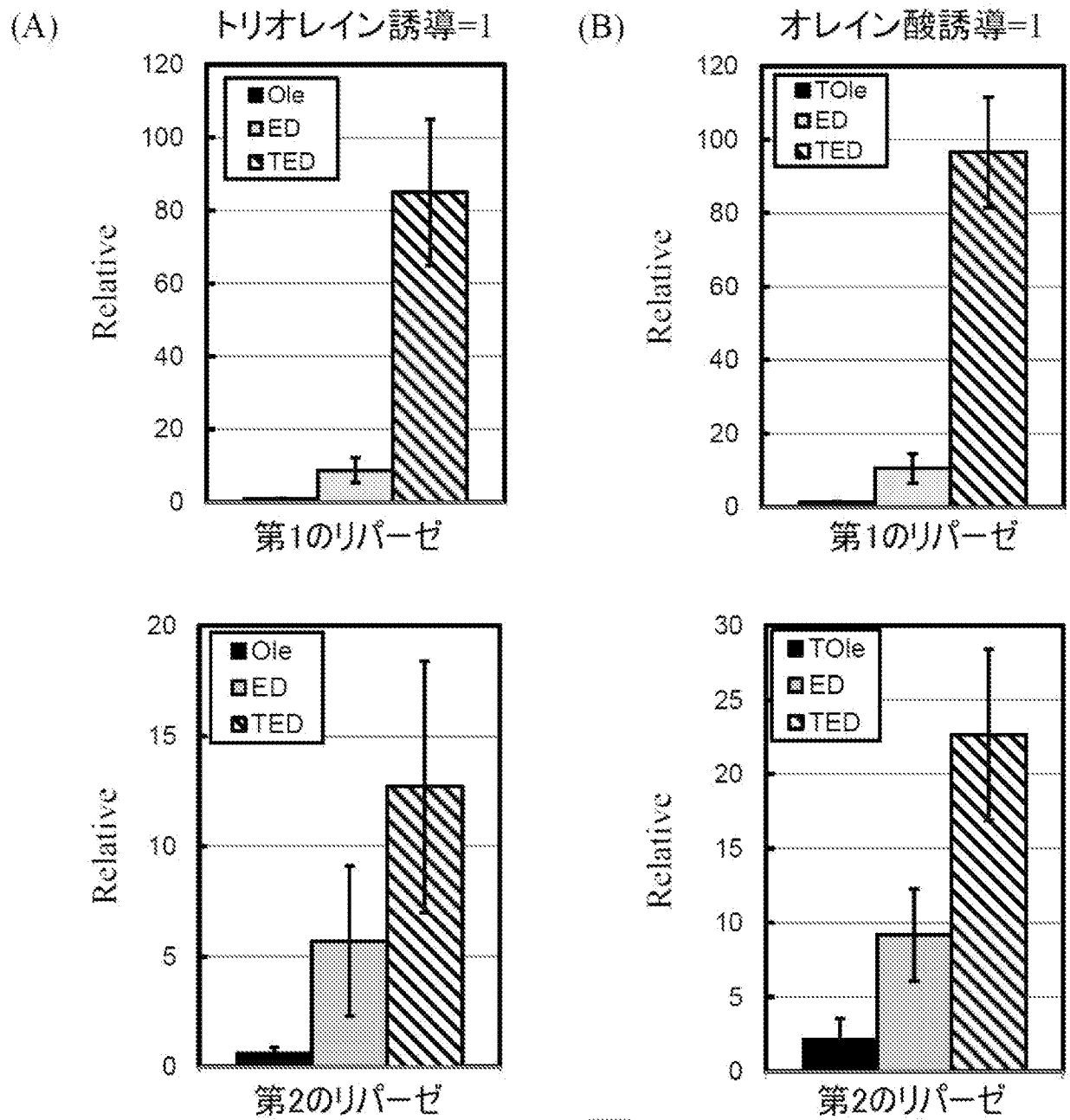


図1

[図2]

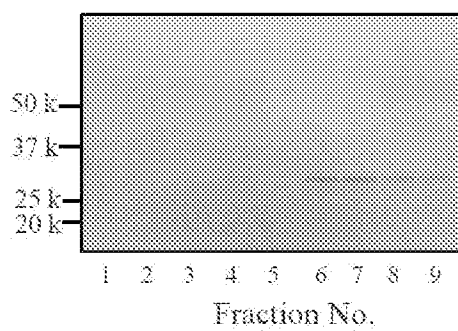


図2

[図3]

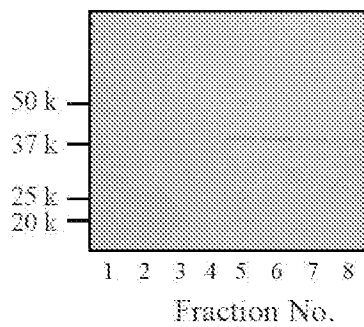


図3

[図4]

第1のリパーゼ

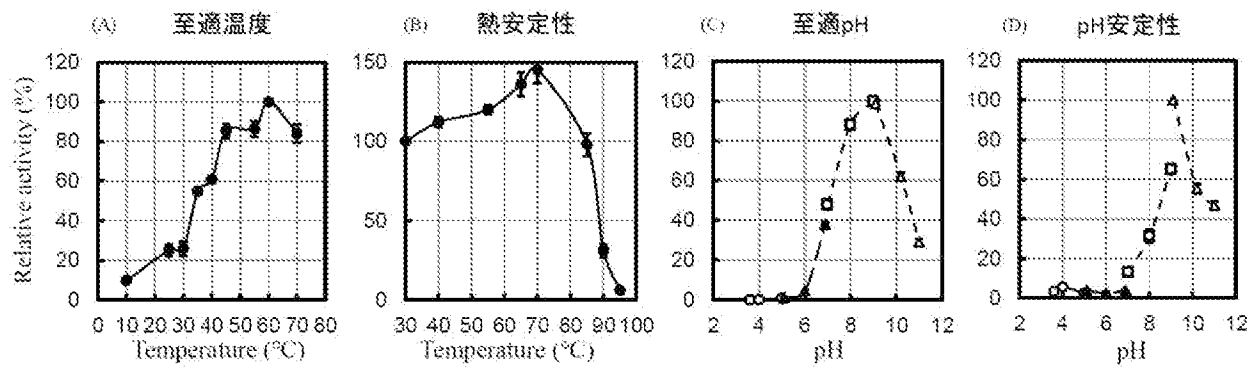


図4

[図5]

第2のリパーゼ

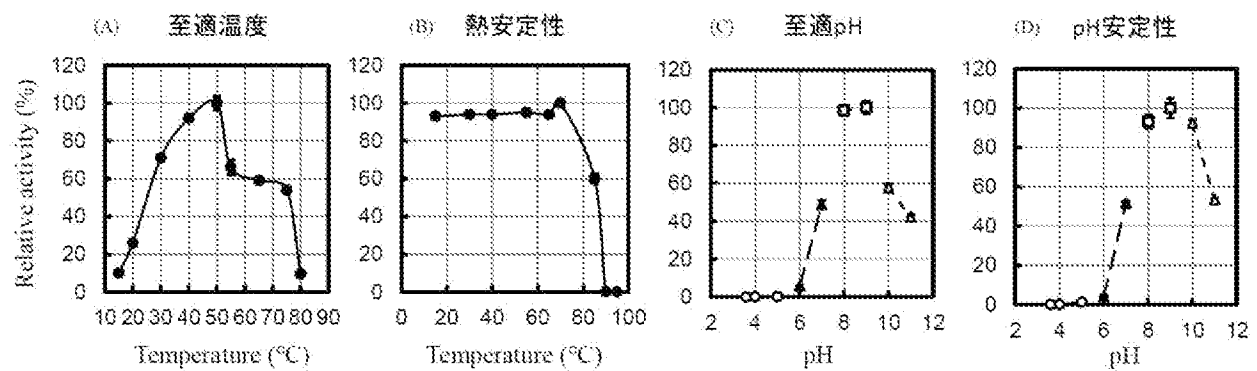


図5

[図6]

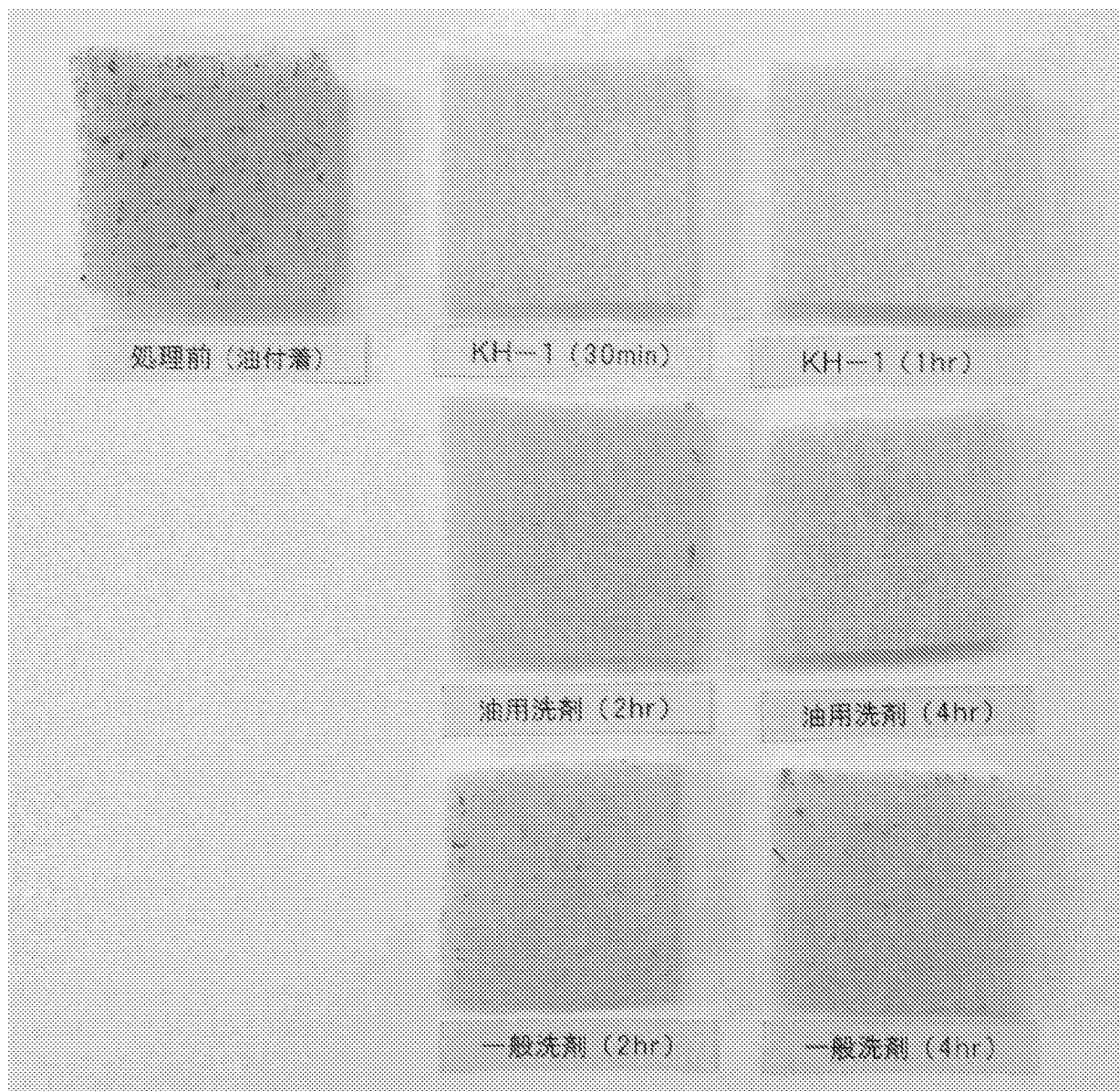
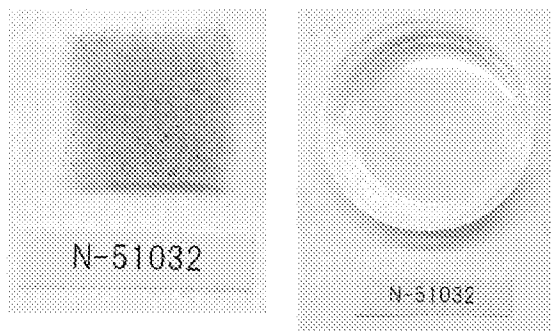


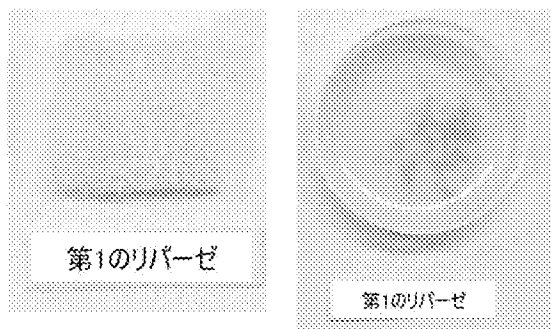
図6

[図7]

(A)



(B)



(C)

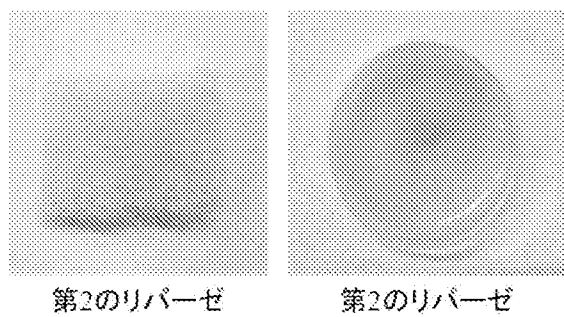
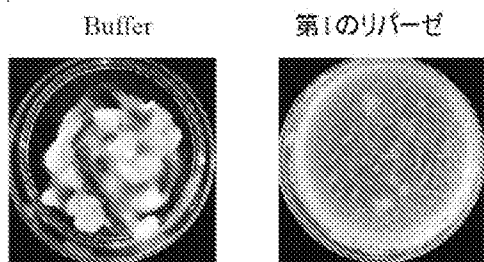


図7

[図8]

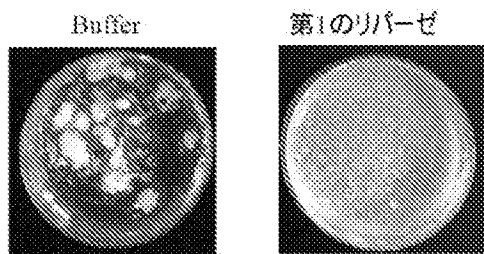
(A)

ラード



(B)

ショートニング



(C)

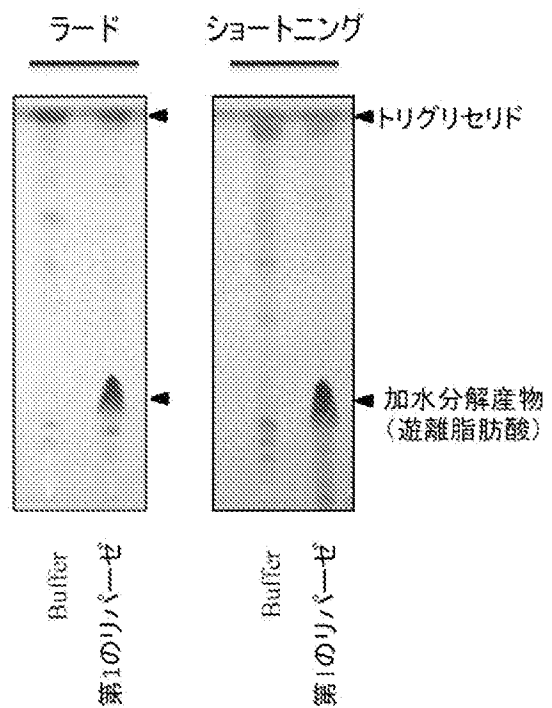


図8

[図9]

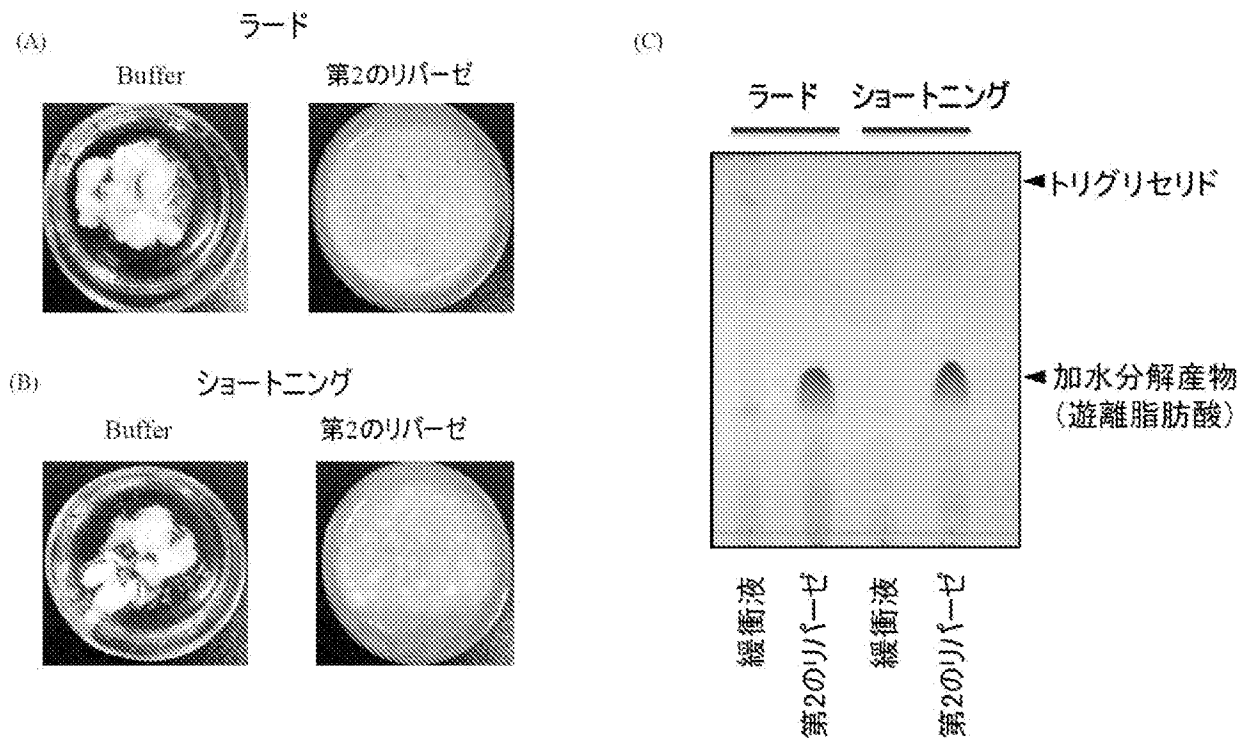


図9

[図10]

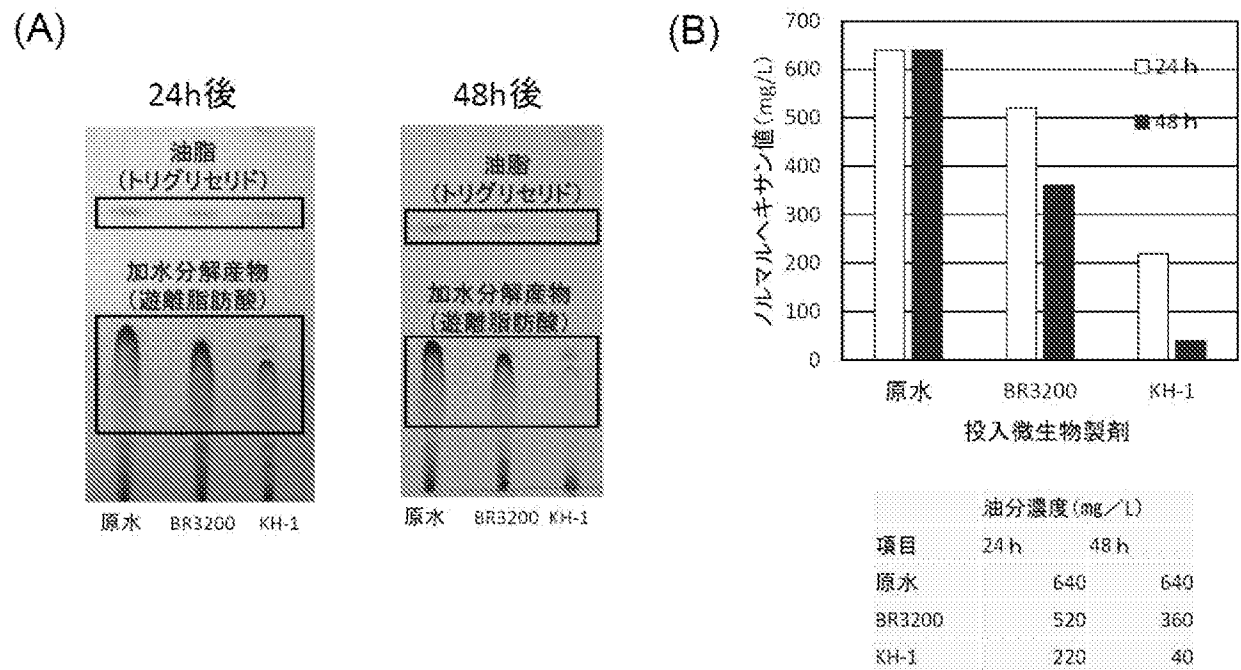


図10

[図11]

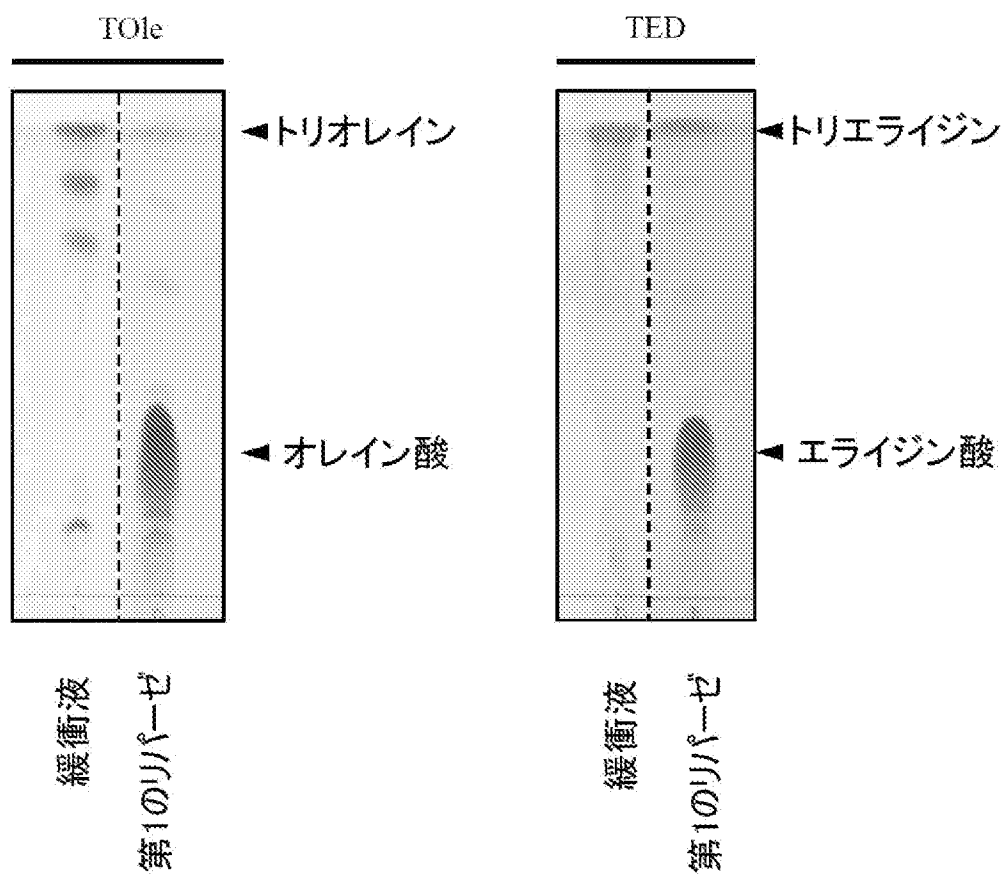


図11

[図12]

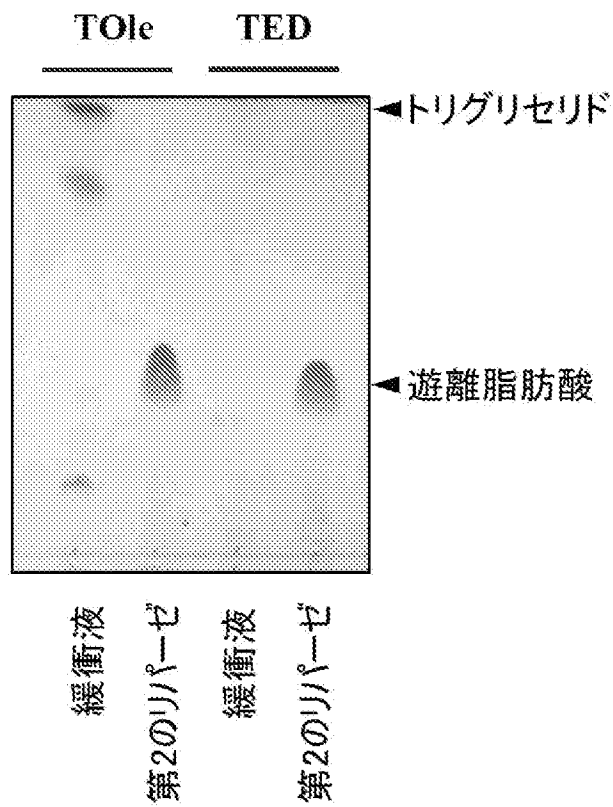


図12

[図13]

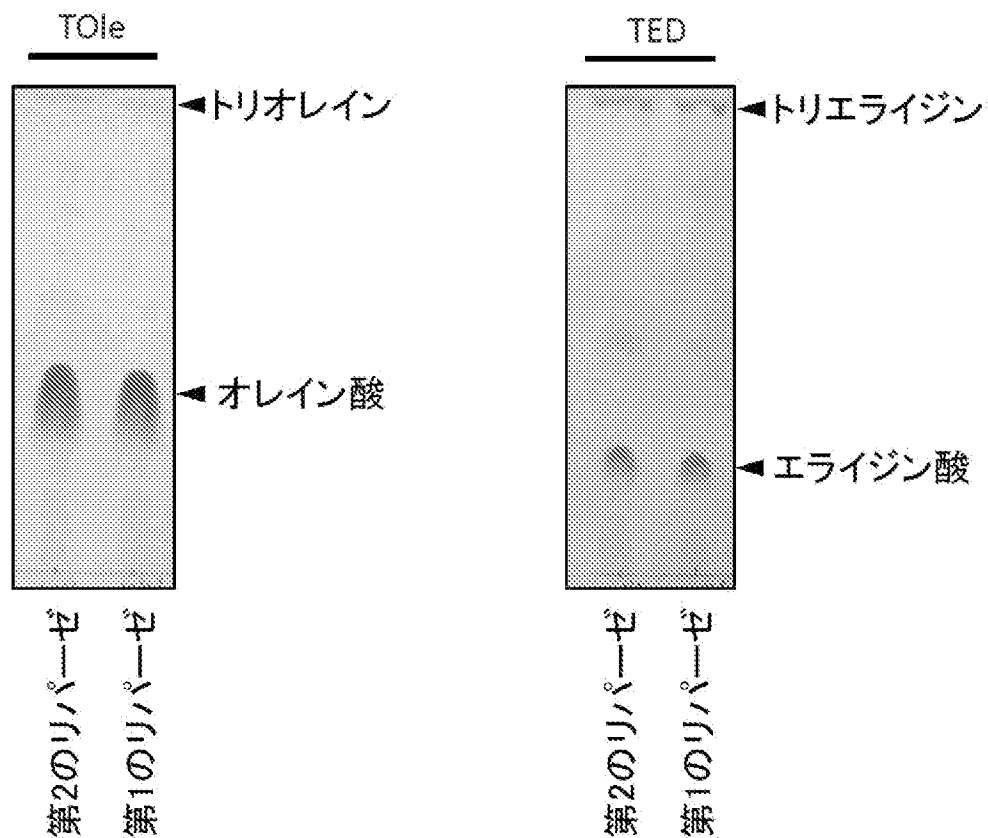


図13

[図14]

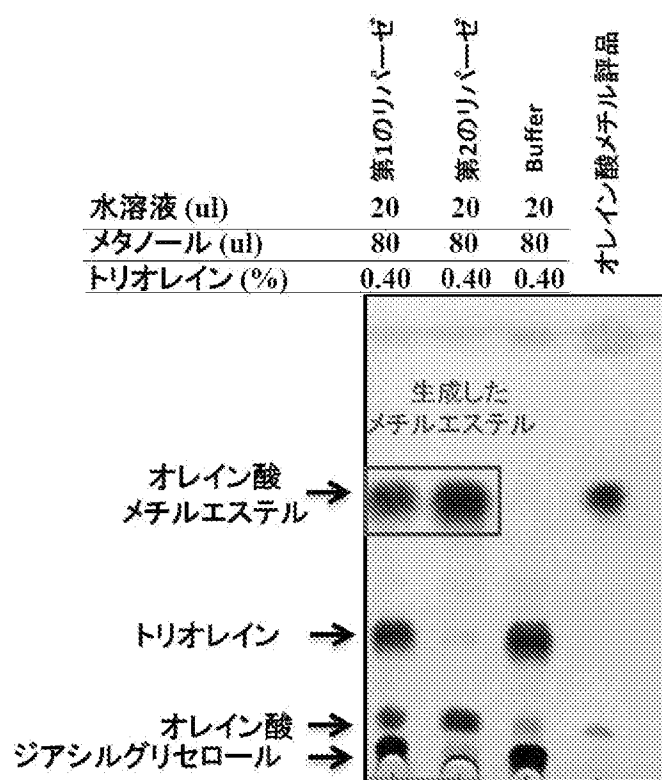


図14

[図15]

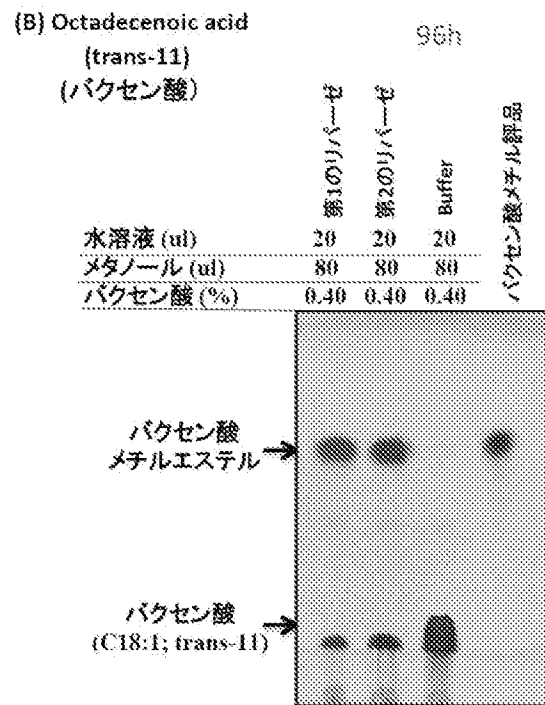
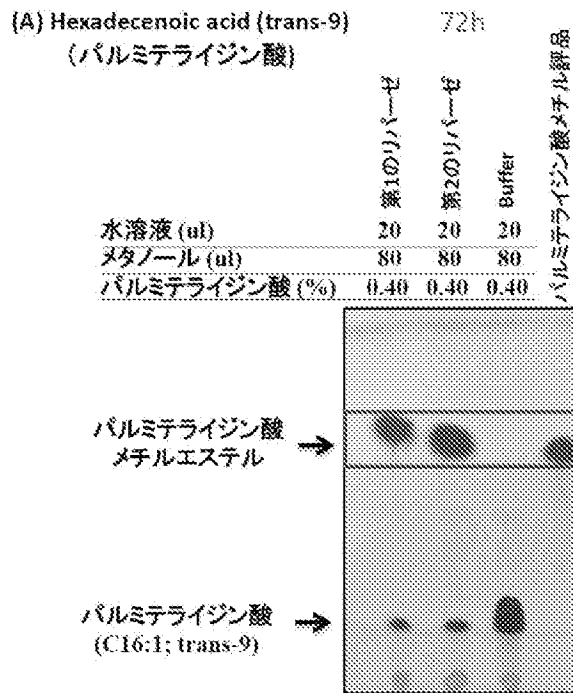


図15

[図16]

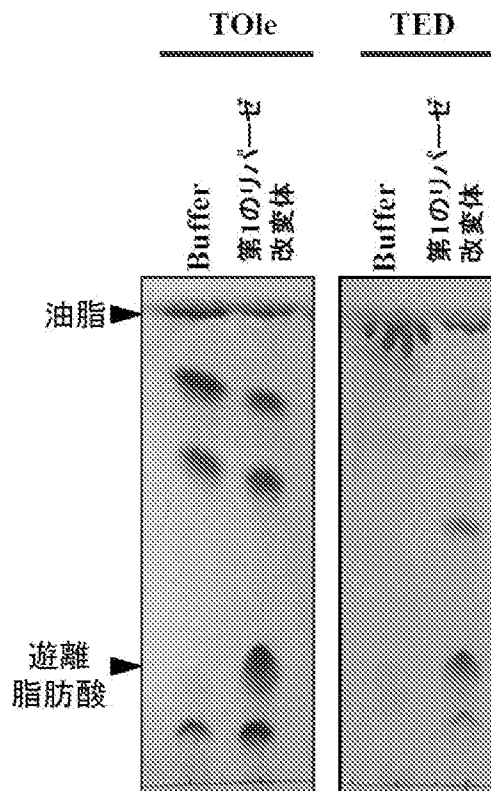


図16

[図17]

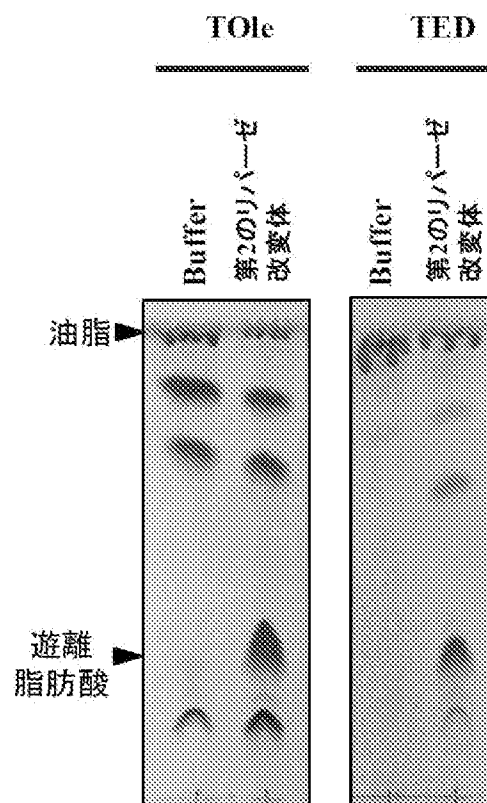


図17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/026848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/55 (2006.01) i, C02F1/00 (2006.01) i, C02F3/34 (2006.01) i,
C11D3/386 (2006.01) i, C12N1/15 (2006.01) i, C12N1/19 (2006.01) i,
C12N1/21 (2006.01) i, C12N5/10 (2006.01) i, C12N9/20 (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)

Int.Cl. C12N15/55, C02F1/00, C02F3/34, C11D3/386, C12N1/15, C12N1/19,
C12N1/21, C12N5/10, C12N9/20

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	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) , CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN), 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.
X	JP 2008-086277 A (ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION) 17 April 2008, abstract, claims 1-9, paragraphs [0013], [0021], fig. 1, SEQ ID NO: 1 (Family: none)	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 September 2019 (06.09.2019)

Date of mailing of the international search report
17 September 2019 (17.09.2019)

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/JP2019/026848

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKEDA, Y., et al., "Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant Burkholderia cepacia strain ST-200.", Extremophiles, 2006 Aug (Epub 2006 Feb 7.), vol. 10, no. 4, pp. 269-277. abstract, fig. 3, 4	1-16
X	LU, Y., et al., "Identification of bacteria producing a thermophilic lipase with positional non-specificity and characterization of the lipase", Annals of Microbiology, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 565-571 abstract, fig. 5, 6	1-16
X	"Accession: ALX14739 [GI: 973223210], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia cepacia JBK9]", NCBI Sequence Revision History [online], 08-JAN-2016 uploaded, NCBI Sequence Revision History [online], 14-MAY-2014 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/973223210?sat=4&satkey=156466452 > , [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ALX14739.1?report=girev+hist > entire database information	1-16
X	"Accession: BAX60541 [GI:1195660682], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia stabilis]", NCBI Sequence Revision History [online], 26-AUG-2017 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1195660682?sat=3&satkey=40844216 >, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAX60541.1?report=girev+hist > entire database information	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/026848

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Accession: SET69416 [GI: 1095299352], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia sp. NFACC38-1]", NCBI Sequence Revision History [online], 29-OCT-2016 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/SET69416.1/ >, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/SET69416.1?report=girev hist > entire database information	1-16
X	"Accession: KVK76798.1 [GI: 978175452], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia cepacia]", NCBI Sequence Revision History [online], 22-JAN-2016 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KVK76798 >, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KVK76798.1?report=girev hist > entire database information	1-16
X Y	MATSUOKA, H., et al., "Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, Burkholderia arboris SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, Candida cylindracea SL1B2, on triacylglycerol degradation.", Journal of bioscience and bioengineering. 2009 Apr, vol. 107, no. 4, pp. 401-408. abstract, page 405, right column, line 8 to page 406, left column, line 14, page 406, left column, line 42 to right column, line 10, page 407, right column, lines 10-16, fig. 5, 6	17-24 1-16
Y	丸山武紀, トランス脂肪酸の定量, 明日の食品産業, 2012, vol. 425, pp. 11-16 table 4, non-official translation (MARUYAMA, Takenori, "Quantification of trans fatty acid", Food industry for tomorrow)	1-16
A	JP 2010-227858 (NAGOYA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 14 October 2010, abstract, claims 1-4, paragraph [0008] (Family: none)	1-24
A	BORG DORF, R., et al., "Anwendung lipasekatalysierter Reaktionen bei der Herstellung spezieller cis- und trans-Octadecensäuren", Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, 1998, vol. 10 (Biokonversion nachwachsender Rohstoffe), pp. 197-202 fig. 2	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/026848

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/026848

<Continuation of Box No. III>

The invention pertaining to the polypeptide of claim 1 has four SEQ ID Nos. 4, 11, 16, and 18 as invention-specifying matters. The invention pertaining to the polynucleotide of claim 9 has four SEQ ID NOs. 1, 7, 15, and 17 as invention-specifying matters.

Although the four polypeptides and the four polynucleotides have the special technical feature of assimilating trans fatty acids, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure of any of documents 1-7, and thus cannot be said to be a special technical feature.

Thus, claims 1 and 9 each are considered to include four inventions, and claims 1-24 are classified into the four inventions below.

Invention 1: parts pertaining to SEQ ID NOs.: 4 and 1 among claims 1-24

Invention 2: parts pertaining to SEQ ID NOs.: 11 and 7 among claims 1-24

Invention 3: parts pertaining to SEQ ID NOs.: 16 and 15 among claims 1-24

Invention 4: parts pertaining to SEQ ID NOs.: 18 and 17 among claims 1-24

Document 1: JP 2008-086277 A (ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION)

Document 2: Extremophiles, 2006 Aug (Epub 2006 Feb 7.), vol. 10, no. 4, pp. 269-277

Document 3: Annals of Microbiology, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 565-571

Document 4: Accession: ALX14739 [GI: 973223210]

Document 5: Accession: BAX60541 [GI: 1195660682]

Document 6: Accession: SET69416 [GI: 1095299352]

Document 7: Accession: KVK76798. 1 [GI: 978175452]

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/55(2006.01)i, C02F1/00(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)i, C11D3/386(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/20(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. C12N15/55, C02F1/00, C02F3/34, C11D3/386, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/20

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), 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
X	JP 2008-086277 A (旭化成ファーマ株式会社) 2008.04.17, 要約, 請求項 1-9, [0013], [0021], 図 1, 配列番号 1 (ファミリーなし)	1-16

☒ 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	「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

06.09.2019

国際調査報告の発送日

17.09.2019

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)

中野 あい

4 B

3 7 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
X	TAKEDA Y., et al., "Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant Burkholderia cepacia strain ST-200.", Extremophiles, 2006 Aug (Epub 2006 Feb 7.), vol. 10, no. 4, pp. 269-277. Abstract, Fig. 3, 4	1-16
X	LU Y., et al., " Identification of bacteria producing a thermophilic lipase with positional non-specificity and characterization of the lipase", Annals of Microbiology, 2009, vol. 59 , no. 3, pp. 565-571 Abstract, Fig. 5, 6	1-16
X	"Accession: ALX14739 [GI: 973223210], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia cepacia JBK9]", NCBI Sequence Revision History [online], 08-JAN-2016 uploaded, NCBI Sequence Revision History [online], 14-MAY-2014 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/973223210?sat=4&satkey=156466452 >, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ALX14739.1?report=girevhist > データベース情報全体	1-16
X	"Accession: BAX60541 [GI: 1195660682], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia stabilis]", NCBI Sequence Revision History [online], 26-AUG-2017 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1195660682?sat=3&satkey=40844216 >, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAX60541.1?report=girevhist > データベース情報全体	1-16

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
X	“Accession: SET69416 [GI: 1095299352], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia sp. NFACC38-1]”, NCBI Sequence Revision History [online], 29-OCT-2016 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/SET69416.1/>, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/SET69416.1?report=girevhist> データベース情報全体	1-16
X	“Accession: KVK76798.1 [GI: 978175452], DEFINITION triacylglycerol lipase [Burkholderia cepacia]”, NCBI Sequence Revision History [online], 22-JAN-2016 uploaded, NCBI, <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KVK76798>, [03-SEP-2019 retrieved] which retrieved from the internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KVK76798.1?report=girevhist> データベース情報全体	1-16
X Y	MATSUOKA H., et al., “Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, Burkholderia arboris SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, Candida cylindracea SL1B2, on triacylglycerol degradation.”, Journal of bioscience and bioengineering. 2009 Apr, vol. 107, no. 4, pp. 401-408. Abstract, p. 405 右欄 8 行-p. 406 左欄 14 行, p. 406 左欄 42 行-右欄 10 行, p. 407 右欄 10-16 行, Fig. 5, 6	17-24 1-16
Y	丸山武紀, トランス脂肪酸の定量, 明日の食品産業, 2012, vol. 425, p. 11-16 表 4	1-16
A	JP 2010-227858 (国立大学法人名古屋工業大学) 2010.10.14, 要約, 請求項 1-4, [0008] (ファミリーなし)	1-24
A	BORG DORF, R., et al., “Anwendung lipasekatalysierter Reaktionen bei der Herstellung spezieller cis- und trans-Octadecensäuren”, Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe, 1998, vol. 10 (Biokonversion nachwachsender Rohstoffe), pp. 197-202 Fig. 2	1-24

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

第 III 欄の続き

請求項 1 のポリペプチドに係る発明は、配列番号 4、11、16、18 の 4 つを発明特定事項とする。また、請求項 9 のポリヌクレオチドに係る発明は、配列番号 1、7、15、17 の 4 つを発明特定事項とする。

上記 4 つのポリペプチド、4 つのポリヌクレオチドはトランス脂肪酸を資化するという特別な技術的特徴を有しているが、当該技術的特徴は、後述の文献 1－7 のいずれかの文献の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求項 1、9 にはそれぞれ 4 つの発明が含まれていると認められ、請求項 1－24 は以下の 4 つの発明に区分される。

- 発明 1 請求項 1－24 のうち、配列番号 4、1 に関する部分
- 発明 2 請求項 1－24 のうち、配列番号 11、7 に関する部分
- 発明 3 請求項 1－24 のうち、配列番号 16、15 に関する部分
- 発明 4 請求項 1－24 のうち、配列番号 18、17 に関する部分

- 文献 1 JP 2008-086277 A (旭化成ファーマ株式会社)
- 文献 2 Extremophiles, 2006 Aug (Epub 2006 Feb 7.), vol. 10, no. 4, pp. 269-277
- 文献 3 Annals of Microbiology, 2009, vol. 59, no. 3, pp. 565-571
- 文献 4 Accession: ALX14739 [GI: 973223210]
- 文献 5 Accession: BAX60541 [GI: 1195660682]
- 文献 6 Accession: SET69416 [GI: 1095299352]
- 文献 7 Accession: KVK76798.1 [GI: 978175452]