(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
2018年10月25日(25.10.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/194092 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/31 (2006.01)　*C12N 9/24* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)　*C12N 15/52* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)　*C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)　*C12P 19/12* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2018/016001

(22) 国際出願日：　2018年4月18日(18.04.2018)

(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 2017-082216　2017年4月18日(18.04.2017)　JP

(71) 出願人: 学校法人東京理科大学(**TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION**) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 Tokyo (JP). 国立大学法人新潟大学(**NIIGATA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐２の町８０５０番地 Niigata (JP).

(72) 発明者: 中島　将博 (**NAKAJIMA Masahiro**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 田口 速男(**TAGUCHI Hayao**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 清水 久佳(**SHIMIZU Hisaka**); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目３番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP). 中井 博之(**NAKAI Hiroyuki**); 〒9502181 新潟県新潟市西区五十嵐２の町８０５０番地 国立大学法人新潟大学 農学部内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 正林 真之(**SHOBAYASHI Masayuki**); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１－７－１２ サピアタワー 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) **Title:** EXO-β-1,2-GLUCANASE AND METHOD FOR PRODUCING SOPHOROSE

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

［図3］

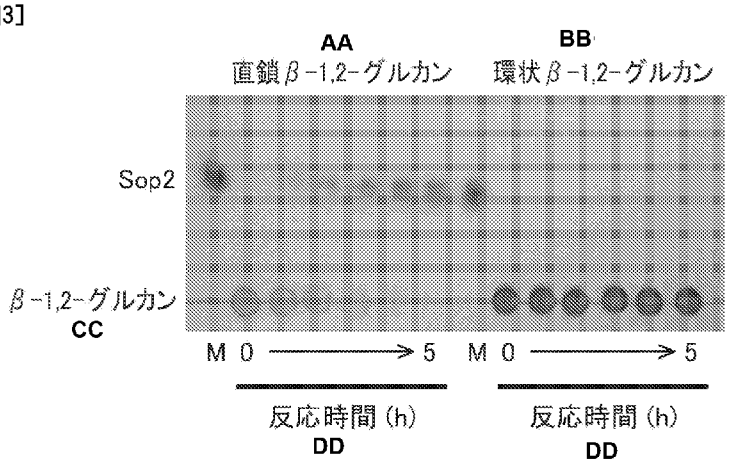


FIG. 3:
AA Linear β-1,2-glucan
BB Cyclic β-1,2-glucan
CC β-1,2-glucan
DD Reaction time (h)

(57) **Abstract:** Provided is exo-β-1,2-glucanase which is one member selected from among: exo-β-1,2-glucanase acting on linear β-1,2-glucan to form sophorose; (a) a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) a protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 by deletion of the amino acid residues at the 1-18 positions; (c) a protein comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of (a) or (b) by substitution, deletion or addition of one to several amino acid residues and having exo-β-1,2-glucanase activity; and (d) a protein showing a 90% or more sequence identity to the amino acid sequence of (a) or (b) and having exo-β-1,2-glucanase activity. Also provided is a method for producing sophorose with the use of exo-β-1,2-glucanase.

WO 2018/194092 A1

［続葉有］

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))

(57) 要約:直鎖β－１，２－グルカンに作用してソホロースを生成するエキソ－β－１，２－グルカナーゼ、並びに、（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質、（ｂ）配列番号１において１～１８番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質、（ｃ）（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列において１個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質、及び（ｄ）（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質、から選択されるいずれか１種であるエキソ－β－１，２－グルカナーゼを提供する。また、エキソ－β－１，２－グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

エキソ－β－１，２－グルカナーゼ及びソホロースの製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ及びソホロースの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、セルロース系バイオマスを原料としてバイオエタノールを製造する際に、トリコデルマ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ）属菌が生産するセルラーゼが広く利用されている。トリコデルマ属菌によるセルラーゼの生産効率を向上させるためには、セルラーゼ生産を誘導する成分を培地に添加する必要がある。従来、セルラーゼ生産の誘導効果に優れた成分として、ソホロースが知られている。

[0003] ソホロースは、２分子のグルコースがβ－１，２結合した希少二糖類であり、天然にはごく僅かしか存在しない。そこで、ソホロースを製造する方法が種々提案されている。

[0004] 例えば、特許文献１には、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属菌に由来するβ－グルコシダーゼをグルコースに作用させ、ソホロースを製造する方法が開示されている。

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

特許文献２には、アクレモニウム（Ａｃｒｅｍｏｎｉｕｍ）属菌に由来するエンド型のβ－１，２－グルカナーゼをβ－１，２－グルカンに作用させ、ソホロースを製造する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平５－２１２８８３号公報

特許文献2：特開平２－４９５８３号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：M. Nakajima et al., PLoS One, ９（３），ｅ９２３５３（２０１４）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかし、上述した従来の方法では、目的とするソホロース以外に他のオリゴ糖が多く生成してしまい、ソホロースの収率が低いという問題があった。

[0008] 本開示は、上記に鑑みてなされたものであり、ソホロースを製造する際に好適に用いられるエキソ－β－１，２－グルカナーゼ、及びエキソ－β－１，２－グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の実施態様が含まれる。

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

[0010] ＜２＞ 以下の酵素学的性質を有する＜１＞に記載のエキソ－β－１，２－グルカナーゼ。

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

[0011] ＜３＞　パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である＜１＞又は＜２＞に記載のエキソ－β－１，２－グルカナーゼ。

[0012] ＜４＞　下記（ａ）～（ｄ）から選択されるいずれか１種であるエキソ－β－１，２－グルカナーゼ。

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質。

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

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

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

[0013] ＜５＞　パラバクテロイデス・ディスタソニス由来である＜４＞に記載のエキソ－β－１，２－グルカナーゼ。

[0014] ＜６＞　＜４＞又は＜５＞に記載のエキソ－β－１，２－グルカナーゼをコードするポリヌクレオチド。

[0015] ＜７＞　＜６＞に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[0016] ＜８＞　＜７＞に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

[0017] ＜９＞　＜８＞に記載の形質転換体を培養し、培養物から＜４＞又は＜５＞に記載のエキソ－β－１，２－グルカナーゼを回収する工程を含むエキソ－β－１，２－グルカナーゼの製造方法。

[0018] ＜１０＞　エキソ－β－１，２－グルカナーゼを直鎖β－１，２－グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

[0019] ＜１１＞　前記エキソ－β－１，２－グルカナーゼが以下の酵素学的性質を

有する＜１０＞に記載のソホロースの製造方法。

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

[0020] ＜１２＞　前記エキソ－β－１，２－グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である＜１０＞又は＜１１＞に記載のソホロースの製造方法。

[0021] ＜１３＞　下記（ａ）～（ｄ）から選択されるいずれか１種であるエキソ－β－１，２－グルカナーゼを直鎖β－１，２－グルカンに作用させる工程を含むソホロースの製造方法。

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質。

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

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

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

[0022] ＜１４＞　前記エキソ－β－１，２－グルカナーゼがパラバクテロイデス・ディスタソニス由来である＜１３＞に記載のソホロースの製造方法。

発明の効果

[0023] 本開示によれば、ソホロースを製造する際に好適に用いられるエキソ－β－１，２－グルカナーゼ、及びエキソ－β－１，２－グルカナーゼを用いたソホロースの製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにより算出した結果を示す図である。

[図2]組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量をＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した結果を示す図である。

[図3]直鎖β－１，２－グルカン又は環状β－１，２－グルカンに組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図4]組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質のｐＨ依存性及びｐＨ安定性を示す図である。

[図5]組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の温度依存性及び温度安定性を示す図である。

[図6A]Ｓｏｐ３に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図6B]Ｓｏｐ４に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図6C]Ｓｏｐ５に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図6D]Ｓｏｐ６に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図7A]Ｌａｍ２に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図7B]Ｌａｍ３に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図7C]Ｌａｍ４に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応

液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図8A]Ｃｅｌ２に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図8B]Ｃｅｌ３に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図8C]Ｃｅｌ４に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図9]Ｇｅｎ２に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図10A]Ｓｏｐ５Ｒに組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図10B]Ｓｏｐ６Ｒに組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際の反応液を薄層クロマトグラフィーに供した結果を示す図である。

[図11]直鎖β－１，２－グルカンに組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を作用させた際のソホロースの反応収率を示す図である。

発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明の実施形態について説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

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

[0026] ＜エキソ－β－１，２－グルカナーゼ＞

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

タソニス（Ｐａｒａｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ｄｉｓｔａｓｏｎｉｓ）由来のエキソ－β－１，２－グルカナーゼが挙げられる。

[0027] 第１の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼのより詳細な酵素学的性質は、例えば、以下のとおりである。

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

[0028] また、本実施形態の第２の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼは、下記（ａ）～（ｄ）から選択されるいずれか１種である。

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質。

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

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

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

[0029] 第２の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼの起源は特に制限されず、いかなる起源であってもよい。一例としては、パラバクテロイデス・ディスタソニス由来のエキソ－β－１，２－グルカナーゼが挙げられる。

[0030] 上記（ａ）のタンパク質は、配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク

質であり、配列番号２の塩基配列からなる遺伝子によりコードされている。以下、配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質を「ＢＤＩ＿３０６４タンパク質」とも記す。

[0031] ＢＤＩ＿３０６４タンパク質のより詳細な酵素学的性質は以下のとおりである。

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

[0032] 上記（ｂ）のタンパク質は、配列番号１において１～１８番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質である。配列番号１の１～１８番目のＮ末端領域は、シグナルペプチド予測サーバーＳｉｇｎａｌＰ４．０（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＳｉｇｎａｌＰ－４．０／）によりシグナルペプチドと判定される。したがって、上記（ｂ）のタンパク質は、全長タンパク質からシグナルペプチドを除いた成熟タンパク質に対応すると考えられる。

[0033] 上記（ｃ）のタンパク質は、上記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列において１個若しくは数個のアミノ酸残基が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質である。アミノ酸残基が置換、欠失、又は付加される位置は、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性が維持される限り特に制限されない。また、置換、欠失、又は付加されるアミノ酸残基の数は、エキソ－β－１，２－

グルカナーゼ活性が維持される限り特に制限されない。置換、欠失、又は付加されるアミノ酸残基の数は、例えば、１～７０個であってもよく、１～５５個であってもよく、１～４０個であってもよく、１～２５個であってもよく、１～１０個であってもよい。

[0034] 任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換する場合、通常、置換前後でアミノ酸側鎖の性質が保存されていることが好ましい。アミノ酸側鎖の性質によってアミノ酸を分類する場合、例えば、親水性アミノ酸（Ｄ、Ｅ、Ｋ、Ｒ、Ｈ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｑ）；疎水性アミノ酸（Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｙ、Ｗ、Ｍ、Ｃ、Ｐ）；酸性アミノ酸（Ｄ、Ｅ）；塩基性アミノ酸（Ｋ、Ｒ、Ｈ）；脂肪族側鎖を有するアミノ酸（Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ）；芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（Ｆ、Ｙ、Ｗ）；硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（Ｍ、Ｃ）；等に分類することができる（括弧内のアルファベットはアミノ酸の一文字表記を示す）。

[0035] 上記（ｄ）のタンパク質は、上記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質である。上記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列との配列同一性は、９２％以上であってもよく、９４％以上であってもよく、９６％以上であってもよく、９８％以上であってもよい。

[0036] なお、「配列同一性」とは、２つのアミノ酸配列をアラインメントした場合の配列間の一致性を意味し、例えば、ＢＬＡＳＴプログラム（ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ／ｃｇｉ）を使用して算出することができる。

[0037] ＜ポリヌクレオチド＞

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

[0038] 本実施形態に係るポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ／ＲＮＡキメラのいずれであってもよい。また、本実施形態に係るポリヌクレオチドは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。一本鎖の場合、第２の態様に

係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼをコードするセンス鎖であってもよく、センス鎖に対して相補的な配列を有するアンチセンス鎖であってもよい。二本鎖の場合、二本鎖ＤＮＡ、二本鎖ＲＮＡ、ＤＮＡ及びＲＮＡハイブリッドのいずれであってもよい。

[0039] ＜発現ベクター＞

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

[0040] ベクターの種類としては、プラスミドベクター、ウイルスベクター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。プラスミドベクターとしては、大腸菌由来のプラスミドベクター、枯草菌由来のプラスミドベクター、酵母由来のプラスミドベクター等が挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ＳＶ４０ベクター等が挙げられる。

[0041] プロモーターとしては、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、Ｔ７プロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＳＲαプロモーター等があり、用いる宿主に応じて適宜選択することができる。

[0042] 本実施形態に係る発現ベクターは、必要に応じて、エンハンサー、選択マーカー等を、それぞれ機能可能な態様で含んでいてもよい。

[0043] ＜形質転換体＞

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

[0044] 発現ベクターが導入される宿主としては、細菌、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等がある。細菌としては、エシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属菌、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属菌等が挙げられる。哺乳動物細胞としては、ＣＯＳ－７細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＶ－１細胞等が挙げられる。

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

[0045] ＜エキソ－β－１，２－グルカナーゼの製造方法＞

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

[0046] 形質転換体を培養する培地及び培養条件は特に制限されず、宿主の種類に応じて適宜設定することができる。培養物から第２の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼを回収する方法は特に制限されず、任意の方法を採用することができる。例えば、形質転換体を破砕した溶解液又は培養液をクロマトグラフィー（アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等）、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離などに供することで、第２の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼを精製し、回収することができる。なお、第２の態様に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼを回収する際には、必要に応じて結晶化を行ってもよい。結晶化方法としては、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトン等）などが挙げられる。

[0047] ＜ソホロースの製造方法＞

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

[0048] 基質となる直鎖β－１，２－グルカンの重合度は特に制限されない。反応速度の観点から、直鎖β－１，２－グルカンの平均重合度（平均ＤＰ）は、４以上であることが好ましい。

[0049] 基質となる直鎖β－１，２－グルカンの調製方法は特に制限されず、任意の方法を採用することができる。

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

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

[0050] 本実施形態に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼの使用形態は特に制限されず、菌体抽出液、精製酵素、組換え酵素等の種々の使用形態を採用することができる。また、本実施形態に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼを固定化したバイオリアクターカラムを用いて、固定化酵素リアクターとして反応を行うことも可能である。

[0051] 本実施形態に係るエキソ－β－１，２－グルカナーゼを直鎖β－１，２－グルカンに作用させる条件は特に制限されない。ソホロースの収率を向上させる観点から、ｐＨはｐＨ５．５～７．０の範囲が好ましく、温度は２５～３５℃の範囲が好ましい。

[0052] 生成したソホロースは、クロマトグラフィー（サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等）、限外濾過膜分離、逆浸透膜分離などに供することで、精製し、回収することができる。なお、ソホロースを回収する際には、必要に応じて結晶化を行ってもよい。結晶化方法としては、濃縮、温度低下、溶媒添加（エタノール、メタノール、アセトン等）などが挙げられる。

[0053] 以上のようにして製造されたソホロースは、例えば、トリコデルマ属菌によるセルラーゼの生産効率を向上させるために利用することができる。また、ソホロースは、良質な甘味を示すことに加え、動物はβ－１，２－グリコ

シド結合を切断する酵素を持たないため、ほぼノンカロリーである。このため、製造されたソホロースを、ダイエット食品等の甘味料として利用することもできる。また、製造されたソホロースを、糖含有分子を製造する際の材料として利用することもできる。さらに、製造されたソホロースを用いて、未知の有用機能を探索することもできる。

実施例

[0054] 以下、本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0055] 以下の実施例で使用する直鎖β－１，２－グルカン、環状β－１，２－グルカン、重合度ｎのβ－１，２－グルコオリゴ糖（以下、「Ｓｏｐｎ」とも記す。）、及びＳｏｐｎの還元末端をアルコール化したＳｏｐｎＲは、それぞれ次のようにして合成した。

[0056] 平均重合度２５及び７７の直鎖β－１，２－グルカンは、リステリア・イノキュア由来のβ－１，２－オリゴグルカンホスホリラーゼを用いて、既報に従って合成した（Ｋ．　Ａｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．　Ａｐｐｌ．　Ｇｌｙｃｏｓｃｉ．，６２（２），４７－５２（２０１５）；Ｍ．　Ｎａｋａｊｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，９（３），ｅ９２３５３（２０１４））。

[0057] 環状β－１，２－グルカンは、以下のように合成した。

まず、リゾビウム・レグミノサルム・トリフォリイ（Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｒｅｇｕｍｉｎｏｓａｒｕｍ　ｔｒｉｆｏｌｉｉ）（ＮＢＲＣ（ＩＦＯ）１３３３８）を５００ｍＬの培地（０．５ｗ／ｖ％　マンニトール、０．１ｗ／ｖ％　酵母エキス、０．１ｗ／ｖ％　$MgSO_4$、０．０７ｗ／ｖ％　K_2HPO_4、０．０１ｗ／ｖ％　KH_2PO_4）に播種し、２５℃で培養した。培地を遠心分離（１５０００ｒｐｍ、１０分間）して培養上清を回収した後、濃縮した。次いで、アセトンを終濃度３０ｖ／ｖ％となるように加えて上清を回収し、さらにアセトンを終濃度９０ｖ／ｖ％となるよう加えて沈殿物を回収した。回収した沈殿物を水に溶解した後、精製イオン交換樹脂（アン

バーライトＭＢ－４、オルガノ（株））で脱塩し、ゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：ＸＫ１００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、担体：ＨＷ－４０Ｆ（東ソー（株））））に供した。環状β－１，２－グルカンを含む画分を回収し、凍結乾燥して３００μＬの水に再溶解した。

[0058] 得られた環状β－１，２－グルカンは、直鎖β－１，２－グルカンに作用するが環状β－１，２－グルカンには作用しないβ－１，２－グルコシダーゼ（ＫＥＧＧ遺伝子ＩＤ：ＢＴ＿３５６７）によって分解されず、エンド－β－１，２－グルカナーゼによって分解されることを確認した。

[0059] Ｓｏｐｎは、リステリア・イノキュア由来のβ－１，２－オリゴグルカンホスホリラーゼを用いて、既報に従って合成した（Ｍ．　Ｎａｋａｊｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，９（３），ｅ９２３５３（２０１４））。

[0060] ＳｏｐｎＲは、Ｓｏｐｎを水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$）で処理することにより合成した。より具体的には、１０ｗ／ｖ％　Ｓｏｐｎ溶液（４０μＬ）に１Ｍ　$NaBH_4$（２０μＬ）を加え、室温で５分間以上静置した。この溶液に３Ｍ　酢酸（１５μＬ）を加えた後、２－プロパノールを１ｍＬ加えて氷上に５分間静置し、生成した沈殿物を遠心分離（１５０００ｒｐｍ、４分間）により回収した。沈殿物を少量の水に溶解した後、２－プロパノールを１ｍＬ加え、得られた沈殿物を風乾することにより、ＳｏｐｎＲを得た。

[0061] ＜実施例１：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の製造＞

まず、パラバクテロイデス・ディスタソニス（ＤＳＭ２０７０１）のゲノムＤＮＡ（Ｌｅｉｂｎｉｚ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ＤＳＭＺ－Ｇｅｒｍａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ）を鋳型として、ＰＣＲ法によりＢＤＩ＿３０６４遺伝子を増幅した。ＰＣＲ用酵素としては、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－（東洋紡（株））を用いた。フォワードプライマー及びリバースプライマーの塩基配列は以下のとおりである。塩基配列中の下線部は、制限酵素Ｎｄｅ Ｉ及び

ＸｈｏＩの認識部位を示す。

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

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

[0062] 得られたＰＣＲ増幅産物は、Ｈｉｇｈ ＰＣＲ Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて精製した。

[0063] 次いで、ｐＥＴ３０ａベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ）の制限酵素ＮｄｅＩ及びＸｈｏＩの切断部位にＰＣＲ増幅産物を挿入（ライゲーション）し、発現ベクターを得た。ライゲーション用キットとしては、Ｌｉｇａｔｉｏｎ ｈｉｇｈ Ｖｅｒ．２（東洋紡（株））を用いた。

[0064] 得られた発現ベクターにより発現されるタンパク質（組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質）のアミノ酸配列を配列番号５に示し、塩基配列を配列番号６に示す。配列番号５のＣ末端側の８個のアミノ酸残基（ＬｅｕＧｌｕＨｉｓＨｉｓＨｉｓＨｉｓＨｉｓＨｉｓ）は、ｐＥＴ３０ａベクターに由来するタグペプチド部分である。

[0065] 次いで、得られた発現ベクターを大腸菌Ｒｏｓｅｔｔａ ２（ＤＥ３）に導入して形質転換し、形質転換体を得た。この形質転換体を３０μｇ／ｍＬのカナマイシンを含むＬＢ培地に播種し、３７℃で培養した。培地の波長６００ｎｍにおけるＯＤ値が０．８に達するまで培養した後、イソプロピル－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を終濃度０．１ｍＭとなるように加え、２０℃で一晩培養した。

[0066] 次いで、培養後の形質転換体を遠心分離（５０００ｒｐｍ、１０分間）により回収し、３００ｍＭ ＮａＣｌを含む５０ｍＭ ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ７．０）で懸濁した。懸濁した形質転換体を超音波破砕した後、遠心分離（１５０００ｒｐｍ、１５分間）して上清を回収した。回収した上清を、平衡バッファー（５０ｍＭ ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ７．０）、３００ｍ

Ｍ　ＮａＣｌ）により平衡化したＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦ　ｃｒｕｄｅカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にアプライし、洗浄バッファー（５０ｍＭ　ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ７．０）、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭイミダゾール）で洗浄した。洗浄後、１０～３００ｍＭのイミダゾールの直線濃度勾配により、目的の組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を溶出させた。その後、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　３０，０００　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｗｅｉｇｈｔ　ｃｕｔ－ｏｆｆ（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を濃縮し、５０ｍＭ　ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ７．０）にバッファー交換した。

[0067] なお、以降の実験において、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質のタンパク質濃度は、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の理論モル吸光係数（１８７８５$M^{-1}\cdot cm^{-1}$）を用いて、波長２８０ｎｍにおける吸光度に基づいて算出した。

[0068] ＜実施例２：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量の測定＞

実施例１においてＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦ　ｃｒｕｄｅカラムにより精製した組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を、ＵｎｏＱカラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）により精製した。そして、ＵｎｏＱカラムにより精製した組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質１．０ｍｇを、平衡バッファー（２０ｍＭ　ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ）により平衡化したＳｕｐｅｒｄｅｘ２００（Ｈｉｌｏａｄ　１６／６０、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にアプライし、ゲル濾過クロマトグラフィーにより組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量を測定した。標準タンパク質としては、オボアルブミン（４５ｋＤａ）、コンアルブミン（７５ｋＤａ）、アルドラーゼ（１５８ｋＤａ）、フェリチン（４４０ｋＤａ）、及びサイログロブリン（６６９ｋＤａ）を用いた。

[0069] ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を図１に示す。図１において、横軸は分配係数（Ｋａｖ）を示し、縦軸は分子量（log_{10}（Ｄａ））を示す。図１に示すとおり、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量は約１１４ｋ

Ｄａと算出された。この結果から、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は単量体であることが分かる。

[0070] 次いで、精製前の粗タンパク質、ＨｉｓＴｒａｐ ＦＦ ｃｒｕｄｅカラムによる精製後のタンパク質、ＵｎｏＱカラムによる精製後のタンパク質、及びゲル濾過クロマトグラフィーによる分離後のタンパク質について、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ゲル濃度：１１ｗ／ｖ％）により分子量を測定した。

[0071] ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図２に示す。図２において、Ｍは分子量マーカー（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｐｌｕｓ Ｐｒｏｔｅｉｎ ｕｎｓｔａｉｎｅｄ ｓｔａｎｄａｒｄｓ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ））を示し、レーン１は精製前の粗タンパク質を示し、レーン２はＨｉｓＴｒａｐ ＦＦ ｃｒｕｄｅカラムによる精製後のタンパク質を示し、レーン３はＵｎｏＱカラムによる精製後のタンパク質を示し、レーン４はゲル濾過クロマトグラフィーによる分取後のタンパク質を示す。図２に示すとおり、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分子量は約８０ｋＤａであった。

[0072] ＜実施例３：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の作用特性の確認＞

平均重合度２５の直鎖β－１，２－グルカン及び環状β－１，２－グルカンのそれぞれを基質として、以下のように組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の作用特性を確認した。

[0073] まず、０．２ｗ／ｖ％ 直鎖β－１，２－グルカン又は０．２ｗ／ｖ％ 環状β－１，２－グルカンを含む２０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）中に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を終濃度０．６２５ｍｇ／ｍＬとなるように添加し、３０℃で反応させた（反応液５０μＬ）。反応開始から０分後、１５分後、３０分後、１時間後、２時間後、５時間後に反応液を５μＬずつサンプリングし、各サンプルを１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0074] 次いで、各サンプルを薄層クロマトグフィー（ＴＬＣ）に供した。具体的には、各サンプルをＴＬＣシリカゲル６０ F_{254}プレート（Ｍｅｒｃｋ）に

１．０μＬずつスポットし、風乾させた後、展開液（アセトニトリル：水＝３：１（体積比））により展開した。次いで、プレートを５ｗ／ｖ％　硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオーブンで熱した。

[0075] 薄層クロマトグフィーの結果を図３に示す。図３において、Ｍは２５ｍＭのＳｏｐ２を０．４μＬスポットしたものである。図３に示すとおり、直鎖β－１，２－グルカンを基質とした場合には時間経過に従って遊離したＳｏｐ２の量が増加したが、環状β－１，２－グルカンを基質とした場合にはＳｏｐ２が遊離しなかった。この結果から、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、直鎖β－１，２－グルカンを２糖ずつエキソ的に分解するエキソ－β－１，２－グルカナーゼであることが分かる。

[0076] ＜実施例４：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質のｐＨ及び温度プロフィールの確認＞

組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質のｐＨ及び温度プロフィールは、以下のような手順で確認した。まず、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質によりＳｏｐ４を分解し、分解産物をアーモンド由来β－グルコシダーゼ（オリエンタル酵母工業（株））で分解する。アーモンド由来β－グルコシダーゼは、Ｓｏｐ２にのみ作用しグルコースまで分解するが、重合度ｎが３以上のＳｏｐｎには作用しない。このため、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質により生成したＳｏｐ２のみがグルコースまで分解される。生成したグルコースをＧＯＰＯＤ（グルコースオキシダーゼ／ペルオキシダーゼ）法で定量することにより反応速度を決定し、この反応速度を酵素活性とする。

[0077] ｐＨ依存性を確認する際には、３ｍＭ　Ｓｏｐ４、３．２５μｇ／ｍＬ組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び２０ｍＭ　各種バッファー（クエン酸バッファー（ｐＨ３．０～５．５）、ＭＥＳバッファー（ｐＨ５．５～６．５）、ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ６．５～７．５）、ＨＥＰＰＳＯバッファー（ｐＨ７．５～８．５）、ビシンバッファー（ｐＨ８．５～９．０））を混合した反応液を３０℃で１５分間反応させた後、１００℃で５分間加

熱することにより酵素反応を停止させた。

[0078] ｐＨ安定性を確認する際には、３．２５μｇ／ｍＬ 組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質及び２０ｍＭ 各種バッファー（クエン酸バッファー（ｐＨ３．０～５．５）、ＭＥＳバッファー（ｐＨ５．５～６．５）、ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ６．５～７．５）、ＨＥＰＰＳＯバッファー（ｐＨ７．５～８．５）、ビシンバッファー（ｐＨ８．５～９．０））を混合した混合液を３０℃で１時間インキュベートした。そして、３ｍＭ Ｓｏｐ４、２０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）、及びインキュベート後の混合液（反応液の１／１０量）を混合した反応液を３０℃で１５分間反応させた後、１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0079] 温度依存性を確認する際には、３ｍＭ Ｓｏｐ４、３．２５μｇ／ｍＬ 組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び２０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液を各温度で１５分間反応させた後、１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0080] 温度安定性を確認する際には、３．２５μｇ／ｍＬ 組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質及び２０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した混合液を各温度で１時間インキュベートした。そして、３ｍＭ Ｓｏｐ４、２０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）、及びインキュベート後の混合液（反応液の１／１０量）を混合した反応液を３０℃で１５分間反応させた後、１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0081] そして、反応停止後の溶液と、１．０ｍｇ／ｍＬ アーモンド由来β－グルコシダーゼを含む２００ｍＭ 酢酸バッファー（ｐＨ５．０）とを等量混合し、５０℃で２時間インキュベートした。このインキュベート後の溶液とＧＯＰＯＤ試薬（Ｍｅｇａｚｙｍｅ）とを１：６の体積比で混合し、４５℃で２０分間インキュベートした。反応後、波長５１０ｎｍにおける吸光度を測定することによりグルコース濃度を定量し、酵素活性を評価した。

[0082] 組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質のｐＨ依存性及びｐＨ安定性の結果を図４に示す。図４において、実線はｐＨ依存性を示し、破線はｐＨ安定性を

示す。図４に示すとおり、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定であった。至適ｐＨは、３０℃の条件下で、ｐＨ６．５であった。

[0083] また、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の温度依存性及び温度安定性の結果を図５に示す。図５において、実線は温度安定性を示し、破線は温度依存性を示す。図５に示すとおり、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の至適温度は、ｐＨ６．５の条件下で、４０℃であった。また、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定であった。

[0084] ＜実施例５：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の各種多糖に対する基質特異性の確認＞

各種多糖、０．１ｍｇ／ｍＬ 組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び５０ｍＭ ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液を３０℃で２４時間反応させた後、１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。多糖としては、平均重合度２５の直鎖β－１，２－グルカン、リケナン、ラミナリン、アラビノガラクタン、パキマン、カルボキシメチル化カードラン（ＣＭ－カードラン）、カルボキシメチル化パキマン（ＣＭ－パキマン）、グルコマンナン、タマリンドキシログルカン、ポリガラクツロン酸、カルボキシメチルセルロース（ＣＭ－セルロース）、ヒドロキシエチルセルロース、及びアラビナンを用いた。そして、直鎖β－１，２－グルカンを基質とした場合にはＧＯＰＯＤ法により酵素活性を測定し、その他の多糖を基質とした場合にはＰＡＨＢＡＨ（ｐ－ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド）法により酵素活性を測定した。

[0085] 直鎖β－１，２－グルカンに対する比活性を１００％としたときの、各多糖に対する相対活性（％）を下記表１に示す。表１において、「Ｎ．Ｄ．」は相対活性が０．２％未満であることを示す。

[0086]

[表1]

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

[0087] 表１の結果から、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、各種多糖の中でも直鎖β－１，２－グルカンに対して高い基質特異性を示すことが分かる。

[0088] ＜実施例６：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の各種オリゴ糖に対する基質特異性の確認＞

まず、０．２ｗ／ｖ％　各種オリゴ糖、０．３２５ｍｇ／ｍＬ　組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び５０ｍＭ　ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液を３０℃で反応させた。オリゴ糖としては、Ｓｏｐ３、Ｓｏｐ４、Ｓｏｐ５、Ｓｏｐ６、ラミナリビオース（Ｌａｍ２）、ラミナリトリオース（Ｌａｍ３）、ラミナリテトラオース（Ｌａｍ４）、セロビオース（Ｃｅｌ２）、セロトリオース（Ｃｅｌ３）、セロテトラオース（Ｃｅｌ４）、及びゲンチオビオース（Ｇｅｎ２）を用いた。Ｓｏｐ４、Ｓｏｐ５、Ｓｏｐ６を基質とした場合には、反応開始から０分後、２．５分後、５分後、７．５分後、１０分後、１５分後、３０分後、１時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。その他のオリゴ糖を基質とした場合には、反応開始から０時間後、１時間後、６時間後、２４時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0089] 次いで、各サンプルを薄層クロマトグフィー（ＴＬＣ）に供した。具体的には、各サンプルをＴＬＣシリカゲル６０　F_{254}プレート（Ｍｅｒｃｋ）に１．０μＬずつスポットし、風乾させた後、展開液（アセトニトリル：水＝３：１（体積比））により展開した。次いで、プレートを５ｗ／ｖ％　硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオーブンで熱した。

[0090] 薄層クロマトグフィーの結果を図６Ａ～図９に示す。図６Ａ～図６Ｄにおいて、Ｍはマーカーとしての Ｓｏｐｎ（ｎ＝１～７）を示し、プレート上の数字はＳｏｐｎの重合度である。図７Ａ～図７Ｃにおいて、Ｍはマーカーとしての Ｌａｍ２、Ｌａｍ３、Ｌａｍ４、及びグルコース（Ｇｌｃ）を示す。図８Ａ～図８Ｃにおいて、Ｍはマーカーとしての Ｃｅｌ２、Ｃｅｌ３、Ｃｅｌ４、及びＧｌｃを示す。図９において、Ｍはマーカーとしての Ｇｅｎ２及びＧｌｃを示す。図６Ａ～図９に示すとおり、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、各種オリゴ糖の中でもＳｏｐｎに対して、特に重合度が４以上のＳｏｐｎに対して高い基質特異性を示した。

[0091] ＜実施例７：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の反応速度論的解析＞

０．２５～４．０ｍＭのＳｏｐ４に対して３．３μｇ／ｍＬの組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を３０℃にて反応させた。分解産物をアーモンド由来β－グルコシダーゼで分解し、生成したグルコースをＧＯＰＯＤ法で定量し、Ｓｏｐ２当量に変換した。反応速度論量は、データ解析プログラム（ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ　ｖｅｒ．３．５１、（株）ヒューリンクス）にて、実験値を下記式（１）のミカエリス－メンテン式にフィッティングすることにより算出した。式（１）中、K_mはミカエリス定数を示し、k_{cat}は触媒活性を示し、［Ｓ］は基質濃度を示し、$[E]_0$は全酵素濃度を示す。

[0092] [数1]

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

[0093] ０．３～４ｍＭのＳｏｐ５、及び０．０５～０．５ｍＭの直鎖β－１，２－グルカン（平均重合度７７）に対しても同様に組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を反応させ、反応速度論量を算出した。反応速度論量の算出結果を下記表２に示す。

[0094] [表2]

基質	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot mM^{-1}$)
Sop4	53.6±2.76	1.80±0.180	29.7
Sop5	28.7±1.13	1.60±0.230	17.9
直鎖β-1,2-グルカン(平均DP=77)	0.479±0.081	1.03±0.240	0.466

[0095] 表２の結果から、重合数が少ないほどk_{cat}/K_mの値が大きく、反応が速くなることが分かる。

[0096] ＜実施例８：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の分解方向の確認＞

まず、０．２ｗ／ｖ％　Ｓｏｐ５Ｒ又はＳｏｐ６Ｒ、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び５０ｍＭ　ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液を３０℃で反応させた。組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質の濃度は、Ｓｏｐ５Ｒについては６．５μｇ／ｍＬ、Ｓｏｐ６Ｒについては３３μｇ／ｍＬとした。反応開始から０分後、２．５分後、５分後、７．５分後、１０分後、１５分後、３０分後、１時間後に反応液をサンプリングし、各サンプルを１００℃で５分間加熱することにより酵素反応を停止させた。

[0097] 次いで、各サンプルを薄層クロマトグフィー（ＴＬＣ）に供した。具体的には、各サンプルをＴＬＣシリカゲル６０　F_{254}プレート（Ｍｅｒｃｋ）に１．０μＬずつスポットし、風乾させた後、展開液（アセトニトリル：酢酸：２－プロパノール：水＝１７：４：４：３（体積比））により２回展開した。次いで、プレートを５ｗ／ｖ％　硫酸を含むエタノール溶液に浸漬した後、糖が検出されるまでオーブンで熱した。

[0098] 薄層クロマトグフィーの結果を図１０Ａ及び図１０Ｂに示す。図１０Ａ及び図１０Ｂにおいて、Ｍ１はマーカーとしてのＳｏｐｎ（ｎ＝１～７）を示し、Ｍ２はマーカーとしてのＳｏｐｎＲ（ｎ＝２、４、６、８）を示し、Ｍ

３はマーカーとしてのＳｏｐｎＲ（ｎ＝３、５、７、９）を示し、プレート上の数字はＳｏｐｎ又はＳｏｐｎＲの重合度である。図１０Ａ及び図１０Ｂに示すとおり、Ｓｏｐ５Ｒを基質とした場合とＳｏｐ６Ｒを基質とした場合とのいずれも、共通の生成物としてＳｏｐ２が確認された。この結果から、組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質は、直鎖β－１，２－グルカンを非還元末端側から２糖ずつエキソ的に分解することが分かる。

[0099] ＜実施例９：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を用いたソホロースの製造（１）＞

平均重合度２５の直鎖β－１，２－グルカンと組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質とを反応させた際のソホロースの反応収率を、１．５ｍＬチューブスケール（反応液量１ｍＬ）で求めた。

[0100] まず、０．３４ｗ／ｖ％　直鎖β－１，２－グルカン、３．２５μｇ／ｍＬ　組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び２０ｍＭ　ＭＥＳバッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液１ｍＬを３０℃で反応させた。反応中に反応液の一部をサンプリングし、サンプルを１００℃で５分間加熱して酵素反応を停止させた後、１０倍希釈した。次いで、希釈後の反応液と１．０ｍｇ／ｍＬ　アーモンド由来β－グルコシダーゼを含む２００ｍＭ　酢酸バッファー（ｐＨ５．０）とを等量混合し、５０℃で２時間インキュベートを行った後、グルコース濃度をＧＯＰＯＤ法で定量した（このときのグルコース濃度を「第１のグルコース濃度」という）。また、希釈後の反応液と２００ｍＭ　酢酸バッファー（ｐＨ５．０）とを等量混合した混合液中のグルコース濃度をＧＯＰＯＤ法で定量した（このときのグルコース濃度を「第２のグルコース濃度」という）。そして、第１のグルコース濃度から第２のグルコース濃度を減算した値に基づいて、ソホロース濃度を算出した。

[0101] ソホロースの反応収率の測定結果を図１１に示す。図１１に示すとおり、反応開始から約１２時間の段階で、ソホロースの反応収率は約９０％という極めて高い値を示し、副産物としてのグルコースは殆ど生成しなかった。

[0102] ＜実施例１０：組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質を用いたソホロースの製

造（２）＞

平均重合度２５の直鎖β－１，２－グルカンと組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質とを５００ｍＬスケールで反応させ、ソホロースを製造した。

[0103] まず、０．３４ｗ／ｖ％　直鎖β－１，２－グルカン、０．１５ｍｇ／ｍＬ　組換えＢＤＩ＿３０６４タンパク質、及び５ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ６．５）を混合した反応液５００ｍＬを３０℃で反応させた。４０時間後、反応液を１００℃で５分間加熱して酵素反応を停止させた。

[0104] 次いで、反応液をフィルター（Ｍｉｌｌｅｘ－ＧＰ、孔径０．２２μｍ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）に通すことにより沈殿したタンパク質を除去し、その後、精製イオン交換樹脂（アンバーライトＭＢ－４、オルガノ（株））で脱塩した（この時点で凍結乾燥すると１．７ｇ）。脱塩後の反応液を濃縮した後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（カラム：ＸＫ１００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、担体：ＨＷ－４０Ｆ（東ソー（株））に供し、ソホロースを含む画分を回収した。回収した液を凍結乾燥したところ、ソホロースの収量は１．２ｇであった。

[0105] ２０１７年４月１８日に出願された日本出願２０１７－０８２２１６の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

請求の範囲

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

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

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

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

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

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質。

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

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

（ｄ）前記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一

性を有し、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

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

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

[請求項7] 請求項６に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項8] 請求項７に記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

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

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

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

（ｉ）基質特異性及び作用特性

直鎖β－１，２－グルカンにエキソ的に作用してソホロースを生成する。

（ｉｉ）至適ｐＨ

３０℃の条件下で、ｐＨ６．５。

（ｉｉｉ）至適温度

ｐＨ６．５の条件下で、４０℃。

（ｉｖ）安定ｐＨ

３０℃、１時間の条件下で、ｐＨ５．５～１０で安定。

（ｖ）温度安定性

ｐＨ６．５、１時間の条件下で、３０℃まで安定。

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

造方法。

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

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列からなるタンパク質。

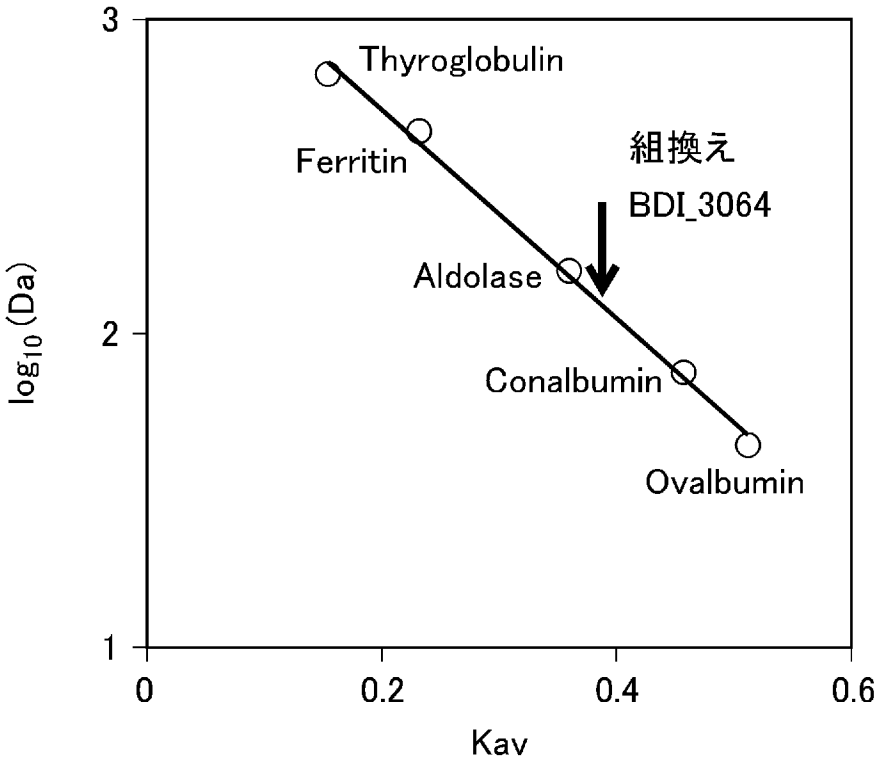
（ｂ）配列番号１において１～１８番目のアミノ酸残基を欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質。

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

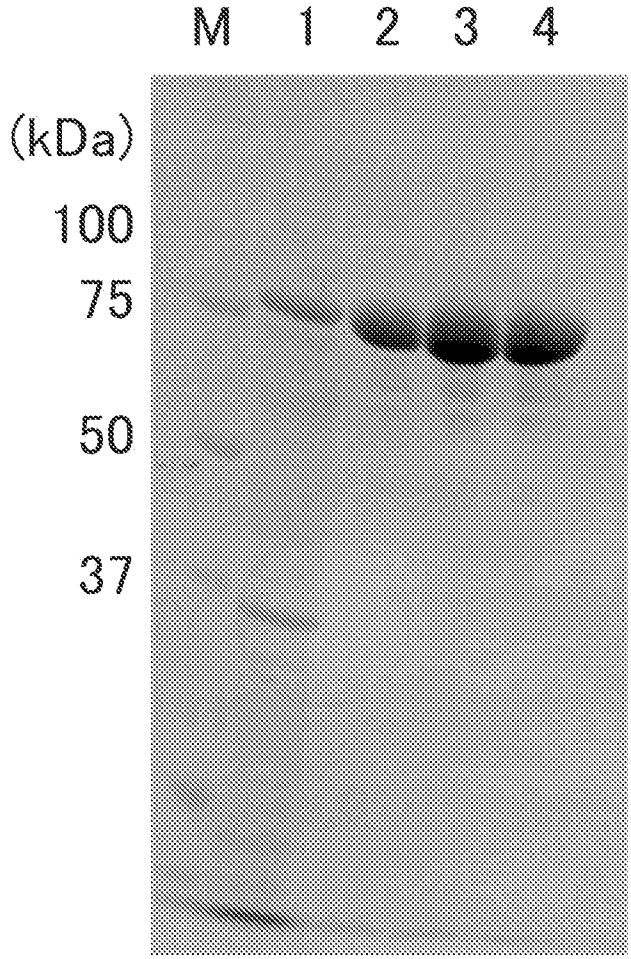
（ｄ）前記（ａ）又は（ｂ）のアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性を有し、かつ、エキソ－β－１，２－グルカナーゼ活性を有するタンパク質。

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

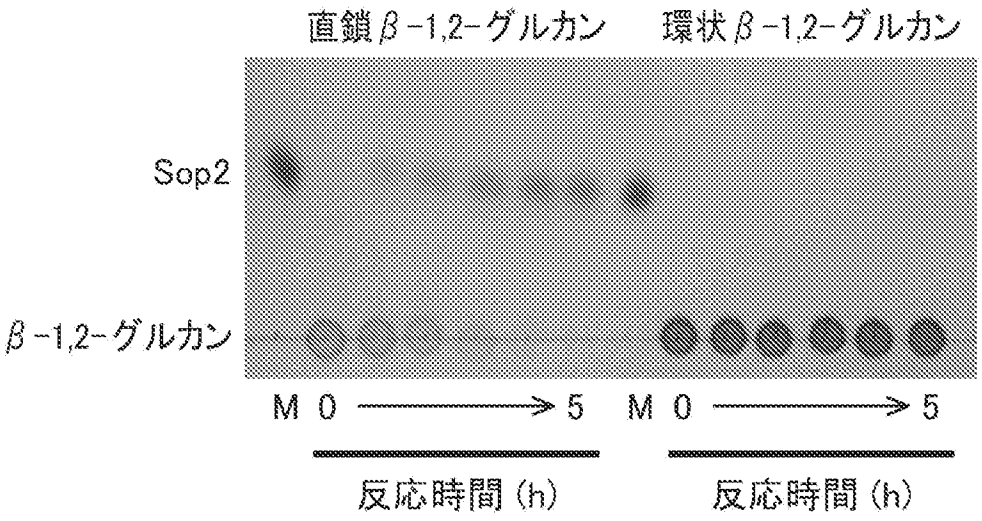
[図1]


3
2
1
0
0.2
0.4
0.6
Kav
log10 (Da)
Thyroglobulin
Ferritin
Aldolase
Conalbumin
Ovalbumin
組換え
BDI_3064

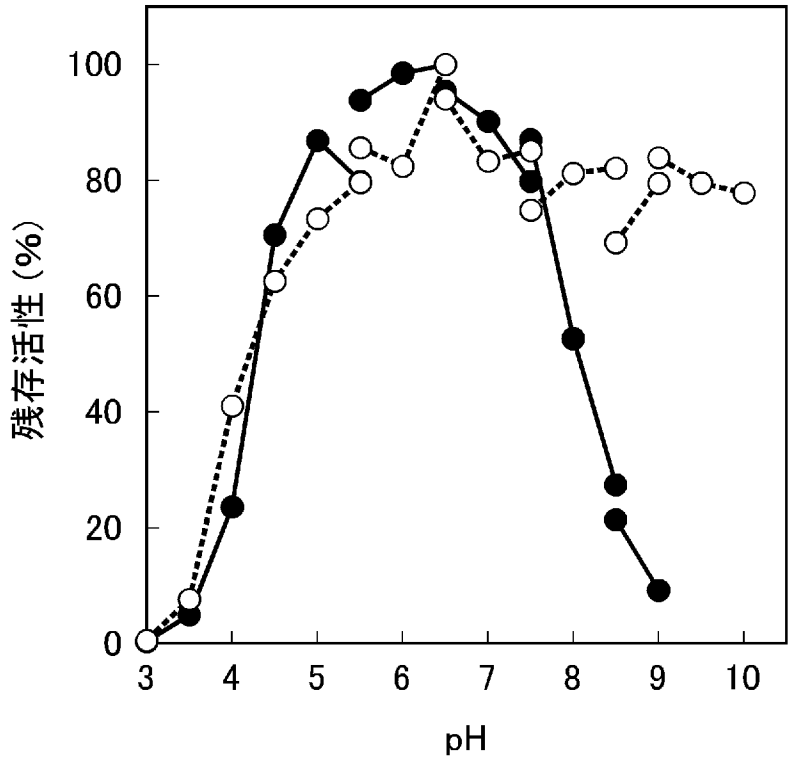
[図2]


M 1 2 3 4
(kDa)
100
75
50
37

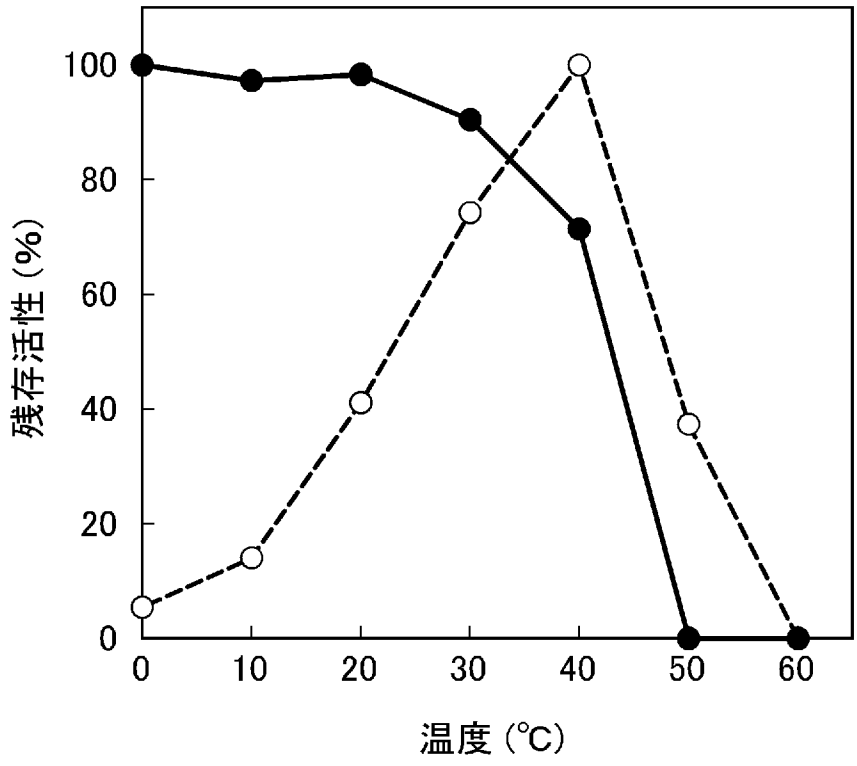
[図3]


直鎖β-1,2-グルカン
環状β-1,2-グルカン
Sop2
β-1,2-グルカン
M 0 → 5
M 0 → 5
反応時間 (h)
反応時間 (h)

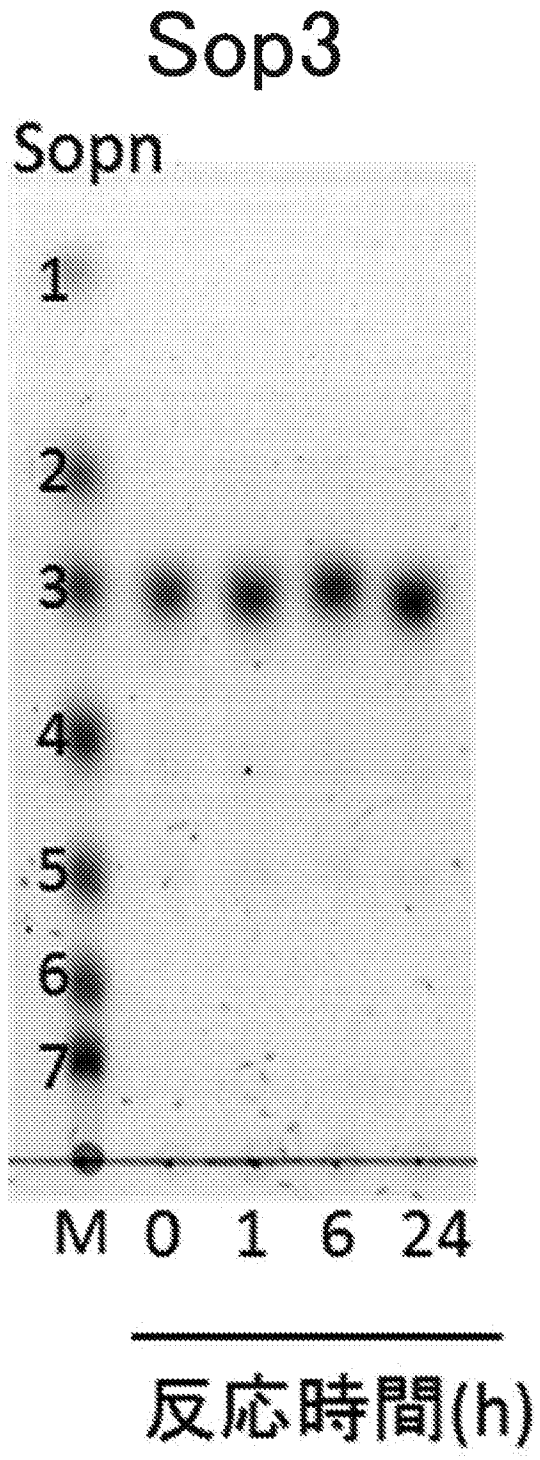
[図4]


100
80
60
40
20
0
残存活性（%）
3
4
5
6
7
8
9
10
pH

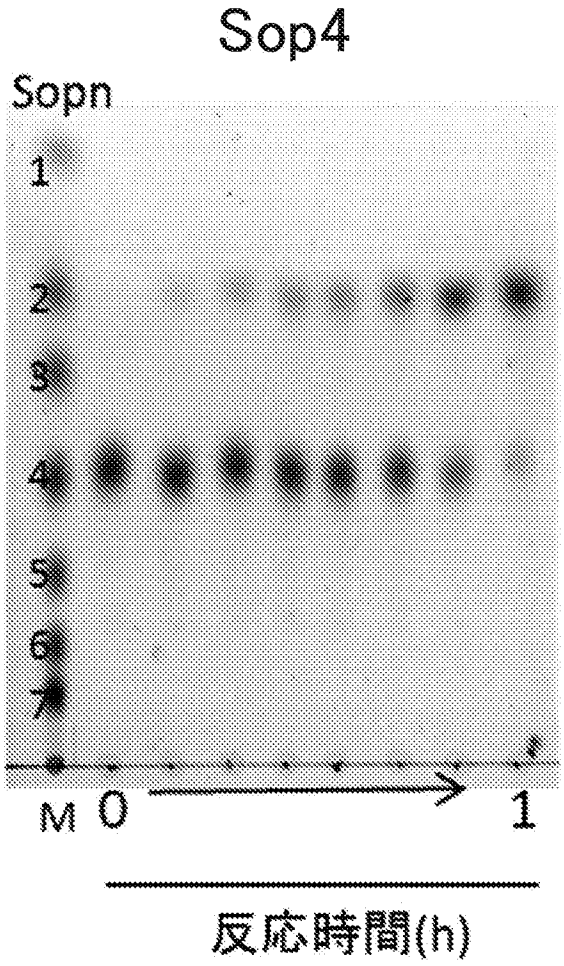
[図5]


100
80
60
40
20
0
残存活性（%）
0
10
20
30
40
50
60
温度（℃）

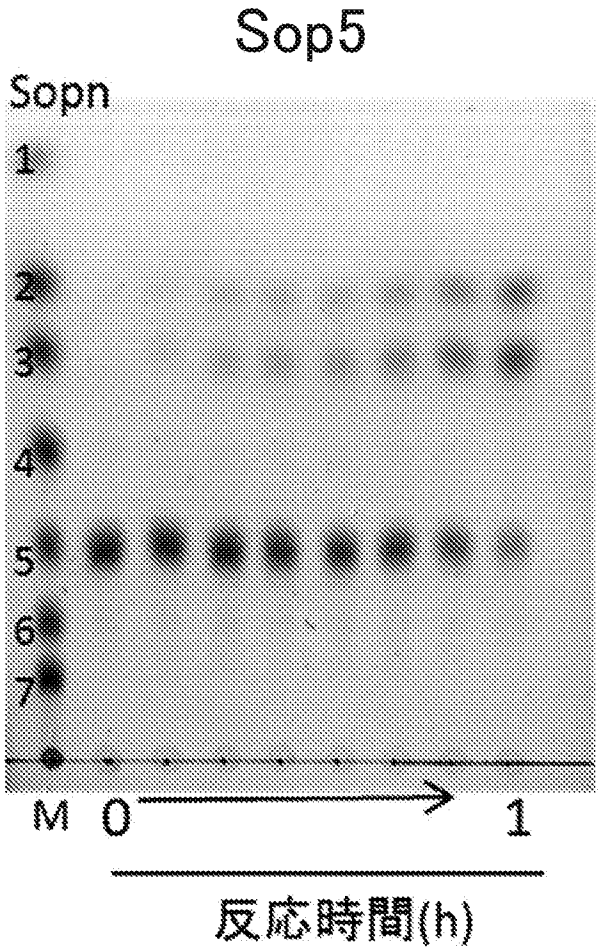
[図6A]



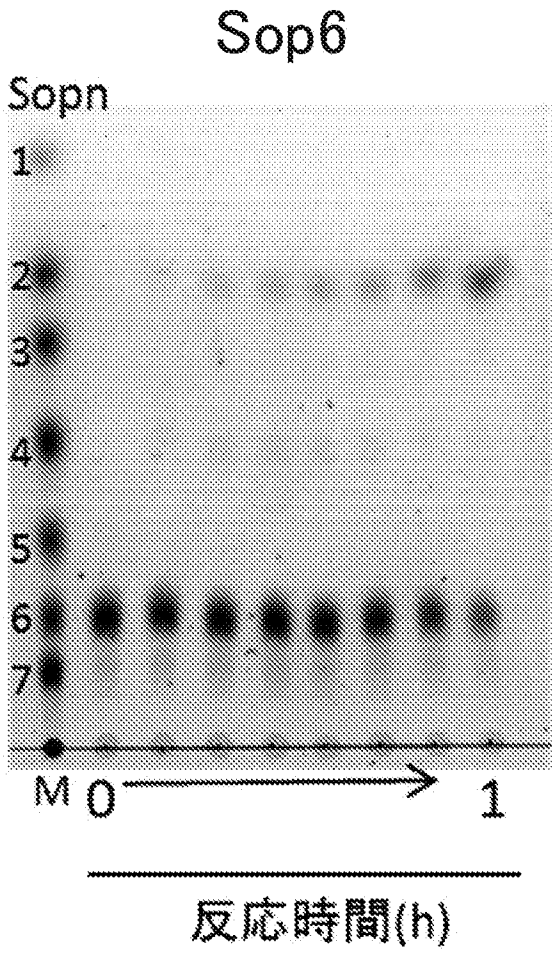
[図6B]



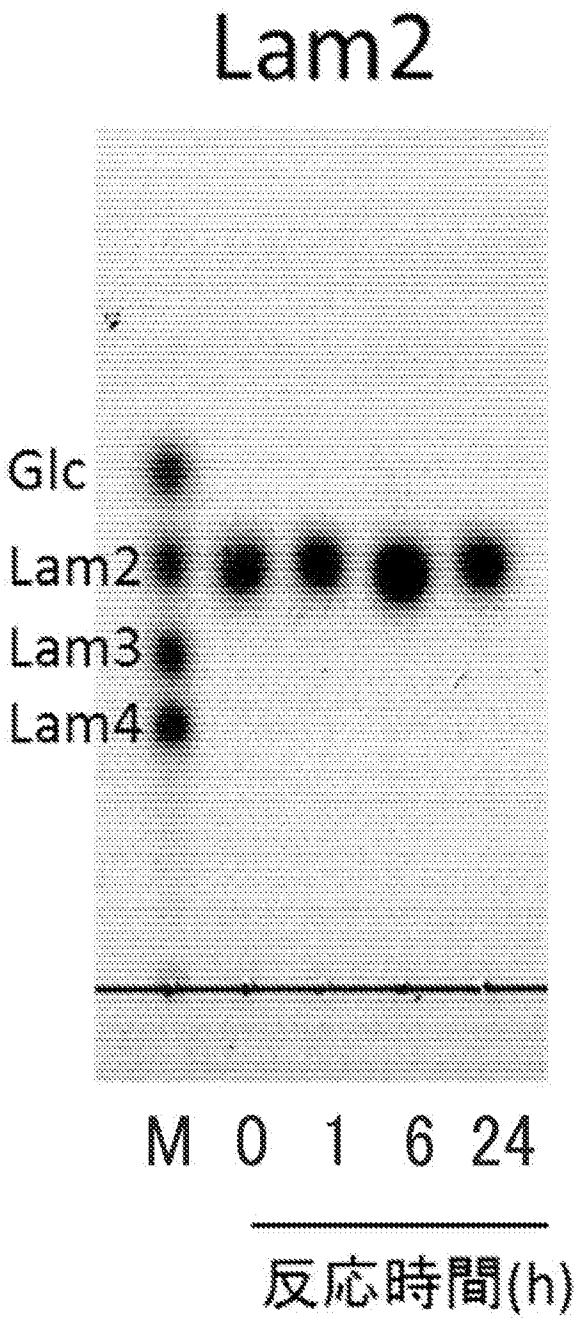
[図6C]



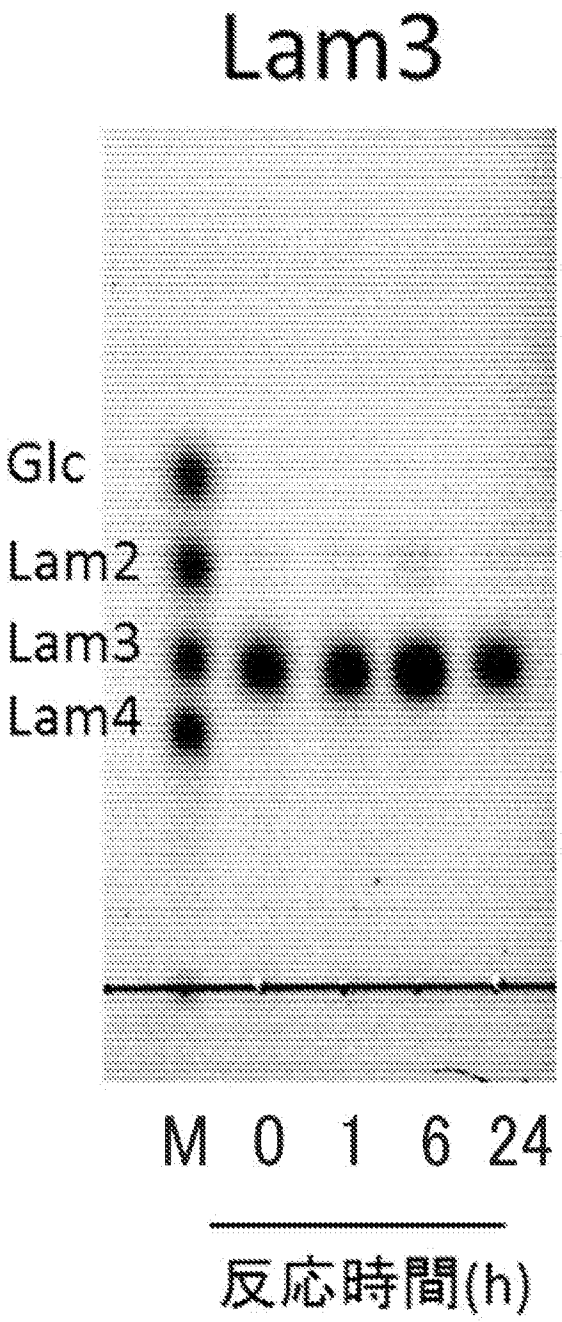
[図6D]



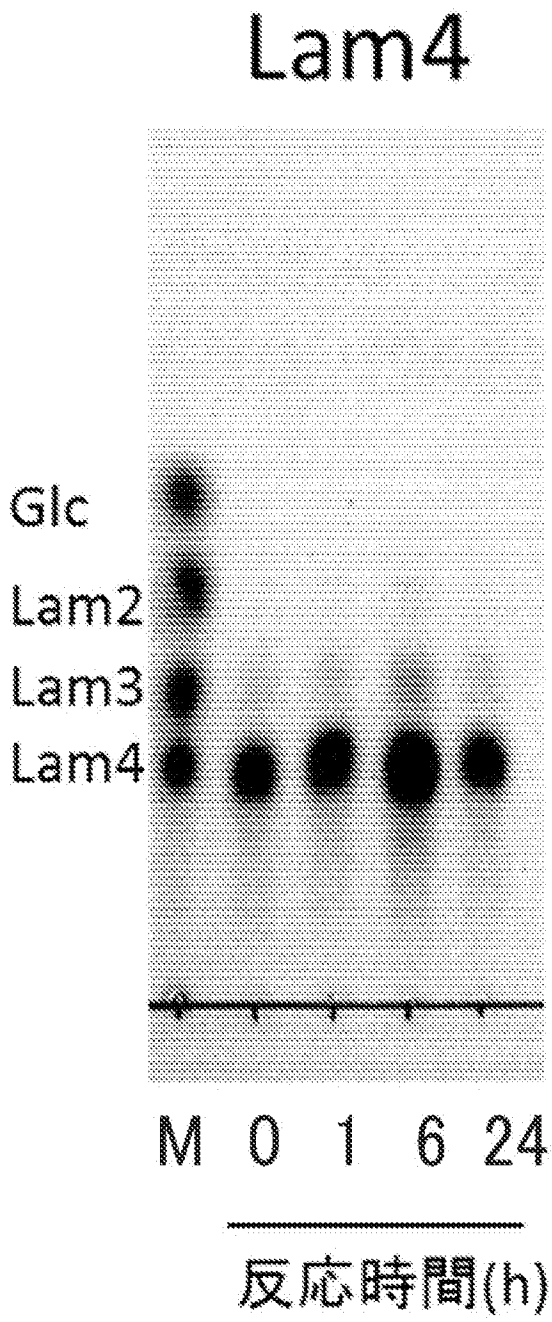
[図7A]



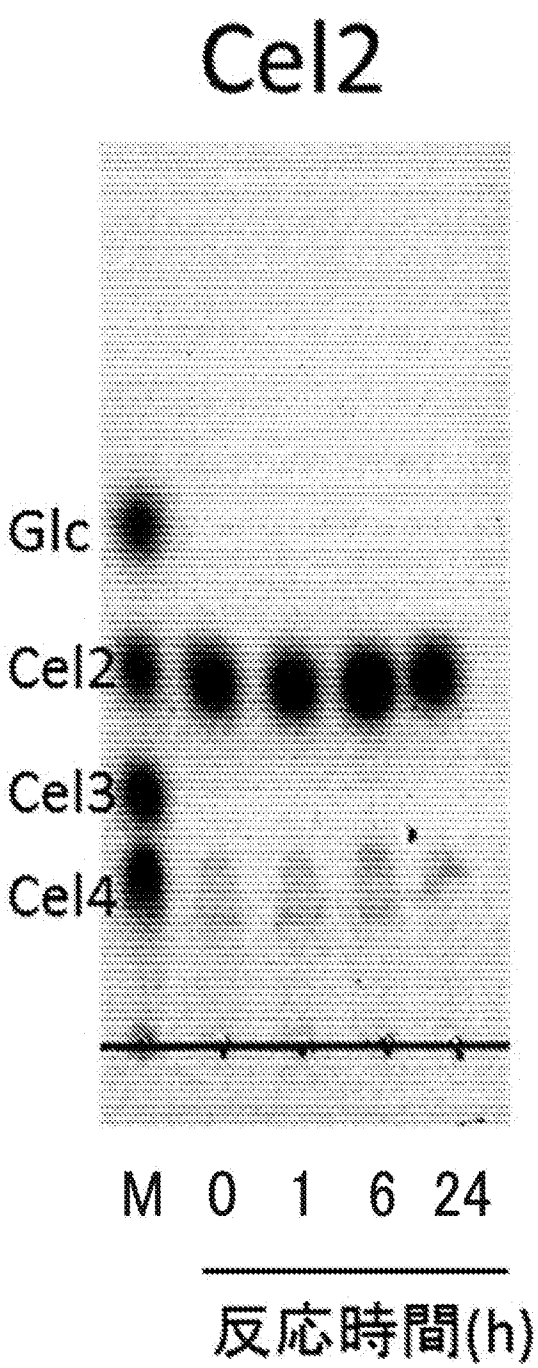
[図7B]



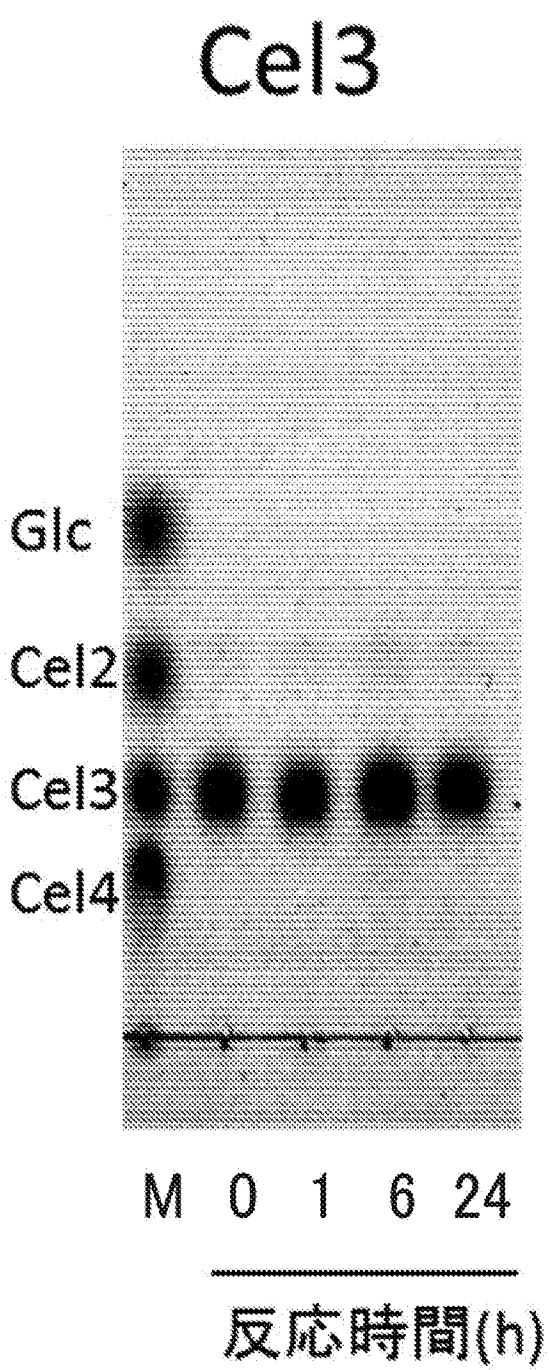
[図7C]



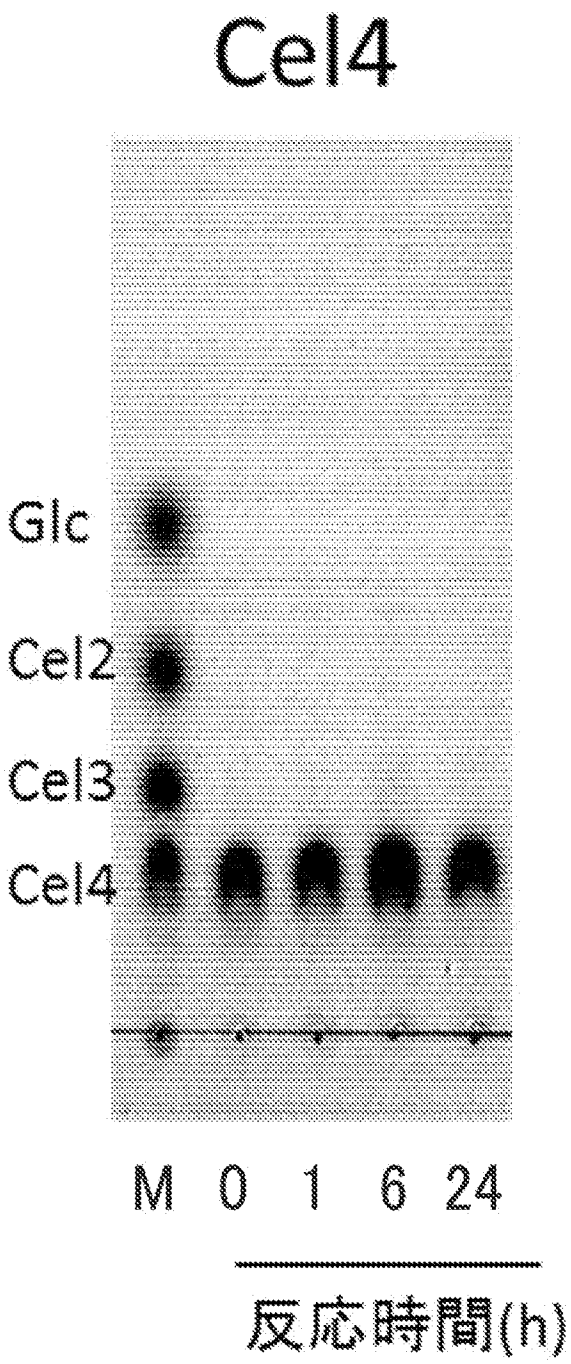
[図8A]



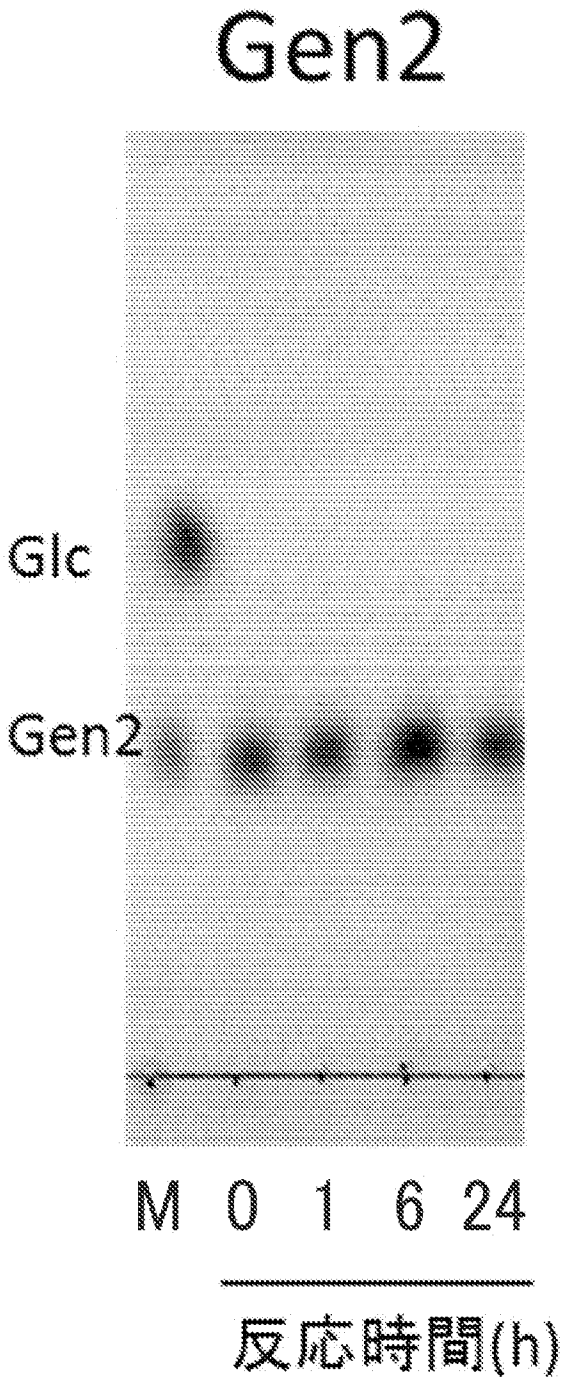
[図8B]



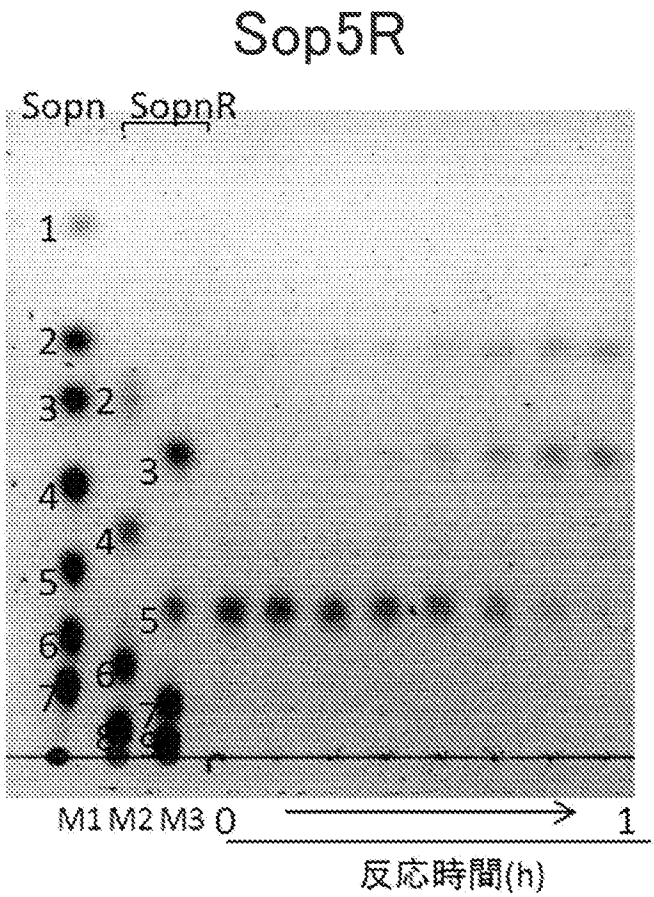
[図8C]



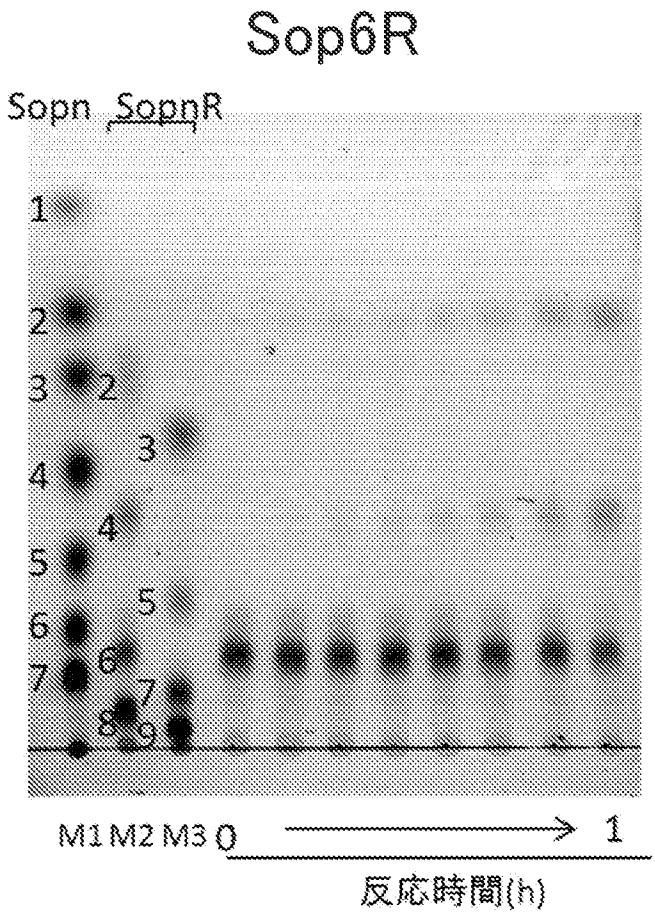
[図9]



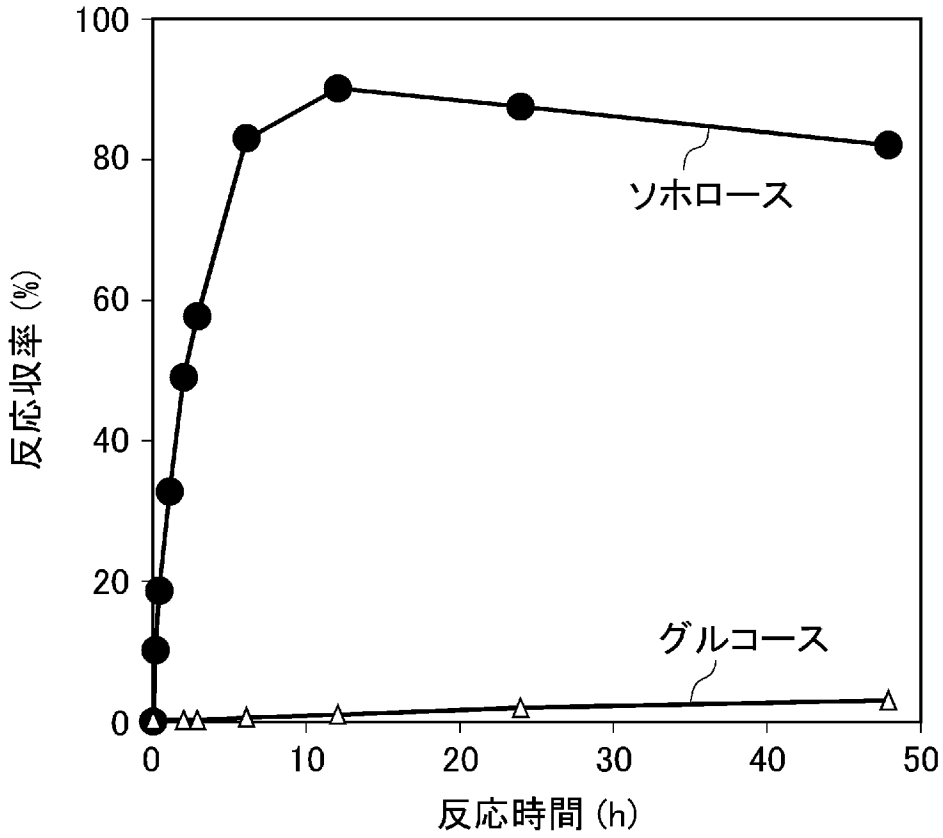
[図10A]



[図10B]


Sop6R
Sopn SopnR
1
2
3
4
5
6
7
8
9
M1 M2 M3 0
1
反応時間(h)

[図11]


100
80
60
40
20
0
反応収率 (%)
ソホロース
グルコース
0
10
20
30
40
50
反応時間 (h)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/016001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N15/31(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P19/12(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C12N9/00-9/99, C12P1/00-41/00, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, accession no. ABR44770.1 [online], 31 January 2014, [search date 05 July 2018], internet: <URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/> entire text	1-9

☒ 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 09 July 2018 (09.07.2018)	Date of mailing of the international search report 17 July 2018 (17.07.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/016001

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

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

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０１６００１

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/31(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i, C12N15/52(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P19/12(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N 9/00-9/99, C12P 1/00-41/00, C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	Conserved hypothetical protein [Parabacteroides distasonis ATCC 8503], Database Genbank, Accession No. ABR44770.1 [online], 2014.01.31, [検索日　2018.07.05], インターネット：<URL：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABR44770.1/> 全文	1-9

☑　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	国際調査報告の発送日
０９．０７．２０１８	１７．０７．２０１８

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　１１９４
西　賢二
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
A	XU, Jian et al., Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine, PLOS BIOLOGY, 2007, Vol.5, No.7, e156 1575 頁左欄 2-3 行目, 1585 頁右欄 23-27 行目	1-9
A	REESE, Elwyn T. et al., β-D-1,2-GLUCANASES IN FUNGI, Canadian Journal of Microbiology, 1961, Vol.7, No.3, p.309-317 Abstract	1-14
A	JP 59-154985 A（ダイキン工業株式会社), 1984.09.04, 2 頁左上欄 1-3 行目, 同頁右下欄 15-17 行目 （ファミリーなし）	1-14
A	田中信清　ほか, 新規 1,2-β-グルカン分解酵素の単離同定及び機能解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2015.03.05, 2E32p05 方法、結果の項	1-14
A	ABE, Koichi et al., Biochemical and structural analyses of a bacterial endo-β-1,2-glucanase reveal a new glycoside hydrolase family, Journal of Biological Chemistry, 2017.03.07, Vol.292, No.18, p.7487-7506 7488 頁右欄 5 行目-7489 頁右欄 26 行目, 図 5	1-14