

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/094359

発行日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成25年6月27日 (2013. 6. 27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B050
C07K 14/195 (2006.01)	C07K 14/195	4H045
C07K 14/435 (2006.01)	C07K 14/435	
C12N 9/02 (2006.01)	C12N 9/02	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2013-550187 (P2013-550187)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2012/080241
 (22) 国際出願日 平成24年11月21日 (2012.11.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-277363 (P2011-277363)
 (32) 優先日 平成23年12月19日 (2011.12.19)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-14817 (P2012-14817)
 (32) 優先日 平成24年1月27日 (2012.1.27)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

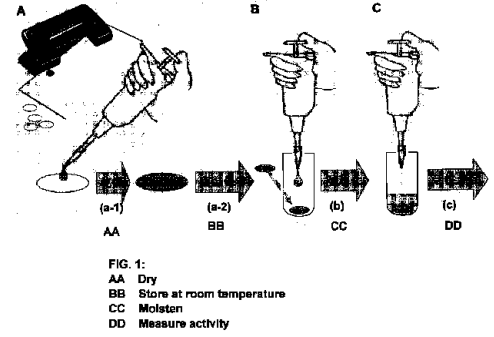
(71) 出願人 301021533
 独立行政法人産業技術総合研究所
 東京都千代田区霞が関1-3-1
 (72) 発明者 星野 英人
 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター内
 (72) 発明者 上垣 浩一
 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター内
 Fターム(参考) 4B024 AA11 BA08 BA12 CA01 CA20
 GA11 HA01 HA11
 4B050 CC03 CC07 DD05 DD11 DD13
 DD20 EE10 LL03
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セルロース／キチン系高分子発光材料

(57) 【要約】

本発明は、BAFを用いた新たな技術を提供することを主な課題とする。

斯かる課題を解決する発明として、次が提供される。発光ドメインとセルロース及び／又はキチン結合ドメインを含むキメラ蛋白質であって、前記発光ドメインがルシフェラーゼ及び蛍光発光蛋白質からなる群から選ばれる少なくとも1種の発光蛋白質を含む、キメラ蛋白質。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

発光ドメインとセルロース及び／又はキチン結合ドメインを含むキメラ蛋白質であって、前記発光ドメインがルシフェラーゼ及び蛍光発光蛋白質からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の発光蛋白質を含む、キメラ蛋白質。

【請求項 2】

発光ドメインとセルロース及び／又はキチン結合ドメインが直接又は第 1 リンカーを介して結合されてなる、請求項 1 に記載のキメラ蛋白質。

【請求項 3】

前記発光ドメインがルシフェラーゼ及び蛍光発光蛋白質を含み、ルシフェラーゼから蛍光発光蛋白質へのエネルギー移動 (BRET) が生じ得るものである、請求項 1 又は 2 に記載のキメラ蛋白質。

10

【請求項 4】

ルシフェラーゼと蛍光発光蛋白質が第 2 リンカーを介して結合されてなる、請求項 3 に記載のキメラ蛋白質。

【請求項 5】

蛍光発光蛋白質が、GFP、YFP、BFP、CFP、OFP、DsREDまたはRFPである請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のキメラ蛋白質。

【請求項 6】

蛍光発光蛋白質がYFPまたはRFPである、請求項 5 に記載のキメラ蛋白質。

20

【請求項 7】

第 1 リンカー及び／又は第 2 リンカーがプロテアーゼ切断配列を含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のキメラ蛋白質。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれかに記載のキメラ蛋白質をコードするDNAまたはその相補鎖。

【請求項 9】

請求項 1～7 のいずれかに記載のキメラ蛋白質をセルロース又はキチンを含む粒子、ビーズ、シート又はフィルムに結合させてなる、発光材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2011年12月19日に出願された日本国出願第2011-277363号明細書および2012年1月27日に出願された日本国出願第2012-014817号明細書（それらの開示全体が参照により本明細書中に援用される）に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、セルロース及び／又はキチンに結合可能なキメラ蛋白質及び該キメラタンパク質をコードするDNA又はその相補鎖、発光材料に関する。

【背景技術】

【0003】

40

高分子の加水分解酵素は、基質に対する結合ドメインを持つことが多く、例えばセルラーゼはセルロース結合ドメインを有し、キチナーゼはキチン結合ドメインを有することが知られている。特許文献1（特許第4604185号）は、耐熱性であって、キチンとセルロースの両方に結合するドメインを開示している。

【0004】

さらに、特許文献2は、BAF (BRET-based Auto-illuminated Fluorescent-protein) 技術に基づき、生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET) の効率の高いルシフェラーゼと蛍光タンパク質の融合蛋白質を開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

50

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】特許第4604185号

【特許文献2】特開2008-283959

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

本発明は、発光ドメインを用いた新たな技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明は、以下のセルロース及び/又はキチンに結合可能なキメラ蛋白質及び該キメラタンパク質をコードするDNA又はその相補鎖、発光材料を提供するものである。 10

項1：発光ドメインとセルロース及び/又はキチン結合ドメインを含むキメラ蛋白質であって、前記発光ドメインがルシフェラーゼ及び蛍光発光蛋白質からなる群から選ばれる少なくとも1種の発光蛋白質を含む、キメラ蛋白質。

項2：発光ドメインとセルロース及び/又はキチン結合ドメインが直接又は第1リンカーを介して結合されてなる、項1に記載のキメラ蛋白質。

項3：前記発光ドメインがルシフェラーゼ及び蛍光発光蛋白質を含み、ルシフェラーゼから蛍光発光蛋白質へのエネルギー移動(BRET)が生じ得るものである、項1又は2に記載のキメラ蛋白質。

項4：ルシフェラーゼと蛍光発光蛋白質が第2リンカーを介して結合されてなる、項3に記載のキメラ蛋白質。 20

項5：蛍光発光蛋白質が、GFP、YFP、BFP、CFP、OPF、DsREDまたはRFPである項1～4のいずれか1項に記載のキメラ蛋白質。

項6：蛍光発光蛋白質がYFPまたはRFPである、項5に記載のキメラ蛋白質。

項7：第1リンカー及び/又は第2リンカーがプロテアーゼ切断配列を含む、項1～6のいずれか1項に記載のキメラ蛋白質。

項8：項1～7のいずれかに記載のキメラ蛋白質をコードするDNAまたはその相補鎖。

項9：項1～7のいずれかに記載のキメラ蛋白質をセルロース又はキチンを含む粒子、ビーズ、シート又はフィルムに結合させてなる、発光材料。 30

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本発明のキメラ蛋白質は、セルロース、キチンなどの生体高分子材料の粒子、ビーズ、シート、フィルムなどの材料に結合させ、乾燥した状態で長期間活性を保持することができる。発光蛋白質は、一般に乾燥すると失活するので、本発明のキメラ蛋白質は、発光材料として優れている。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図1】キメラ蛋白質塗布・結合紙片の風乾後の耐乾燥性能(室温保存)評価操作手順を示す。各工程は、以下の通りである。(A)キメラ蛋白質の水溶液を、パンチで切り抜いた円形濾紙片へ滴下し、キメラ蛋白質を濾紙へ結合させる。(a-1)濾紙片を乾燥させる。(a-2)濾紙片を、室温で保存する。(B)バッファーを添加する。(b)これにより、濾紙片を湿潤化する。(C)ルシフェリン水溶液を濾紙片を含むバッファーへ添加する。(c)得られた湿潤濾紙片について、ルシフェラーゼの活性測定をする。 40

【図2】CBD-BAF結合紙片の室温乾燥保存性能を示す。(A)室温で乾燥保存したCBD-BAF-Ym3結合紙片(濾紙)を、バッファー及びルシフェリン水溶液で反応した例を示す。(a)明視野像、(b)マージ像、及び(c)化学発光像をそれぞれ示す。明視野像(a)において、濾紙片中心の円形領域は、CBD-BAF-Ym3の塗布領域を示す。マージ像(b)と化学発光像(c)において、CBD-BAFの塗布領域で緑色の発光が認められた。(B)保存期間を通じた、発光強度の測定結果を示す(N=5)。横軸は、濾紙片の室温乾燥状態での保存期 50

間(週)を示す。縦軸は、測定した発光強度($\times 10^8$ RLU)を示す。乾燥状態の濾紙は、室温27 で保存した。

【図3】hCBD-eBAF-Ym3結合紙片の長期間の室温乾燥保存性能を示す。(A)hCBD-eBAF-Ym3の構造の模式図を示す。N末端側から順に、セルロース及びノ又はキチン結合ドメインであるhCBD及び発光ドメインであるeBAF-Ym3を有する。(B)保存期間を通じた、発光強度の測定結果を示す(N=5)。横軸は、濾紙片の室温乾燥状態での保存期間(週)を示す。縦軸は、測定した発光強度(RLU)を示す。乾燥状態の濾紙は、室温22~27 で保存した。なお、保存期間52週は、保存期間1年間を示す。

【図4】プロテアーゼ認識配列を有するhCBD-eBAF-R₃結合紙片の長期間の室温乾燥保存性能を示す。(A)hCBD-eBAF-R₃の構造の模式図を示す。N末端側から順に、セルロース及びノ又はキチン結合ドメインであるhCBD、プロテアーゼ認識配列であるHRV-3C切断配列を導入したリンカー、及び発光ドメインであるeBAF-R₃を有する。(B)保存期間を通じた、発光強度の測定結果を示す(N=3)。横軸は、濾紙片の室温乾燥状態での保存期間(週)を示す。縦軸は、測定した発光強度(RLU)を示す。乾燥状態の濾紙は、室温22~26 で保存した。なお、保存期間52週は、保存期間1年間を示す。

【図5】プロテアーゼ認識配列を有するhCBD-eBAF-R₄結合紙片の長期間の室温乾燥保存性能を示す。(A)hCBD-eBAF-R₄の構造の模式図を示す。N末端側から順に、セルロース及びノ又はキチン結合ドメインであるhCBD、プロテアーゼ認識配列であるHRV-3C切断配列を導入したリンカー、及び発光ドメインであるeBAF-R₄を有する。(B)保存期間を通じた、発光強度の測定結果を示す(N=3)。横軸は、濾紙片の室温乾燥状態での保存期間(週)を示す。縦軸は、測定した発光強度(RLU)を示す。乾燥状態の濾紙は、室温26 で保存した。なお、保存期間52週は、保存期間1年間を示す。

【図6】プロテアーゼ活性検出モデル系の実施例の手順を示す。(A)(a-1)キメラ蛋白質水溶液を濾紙片へ滴下し、濾紙へ結合させる。これを乾燥させ(i)キメラ蛋白質結合濾紙片(i)を作製した。(a-2)反応バッファー(ii)を加えてこれを十分湿潤させた後、バッファーを除去し、プロテアーゼを含むバッファー溶液(iii)を改めて添加した。(a-3)得られた試料を4 にて64時間静置し、プロテアーゼ反応を行なった。(B)(b-1)反応前の状態を模式的に示す。バッファー中で、キメラ蛋白質結合濾紙(紙片)は微量遠心チューブの底に沈む。バッファー中には、プロテアーゼ(p)が存在する。(b-2)定温静置により、反応を進行させる。(b-3)反応後の状態を模式的に示す。プロテアーゼにより切断されたBAF部分は、水層中へ遊離する。(b-4)反応後の試料の上清を分取又は分離し、発光(又は蛍光)を測定する。

【図7】プロテアーゼ活性検出モデル系の実施例の結果を示す。(A)モデル系の機構を模式的に示す。(a-1)キメラ蛋白質が濾紙に結合した状態を、模式的に示す。キメラ蛋白質は、N末端側から順に、セルロース及びノ又はキチン結合ドメインであるhCBD、プロテアーゼ認識配列であるHRV-3C切断配列を導入したリンカー、及び発光ドメインであるBAFを有する。HRV-3C切断配列は、LEVLFQ/GP(/は、切断部位を示す。)である。(a-2)HRV-3Cプロテアーゼの作用によりキメラ蛋白質は切断され、BAF部分は水層へ遊離する。(B)回収した上清(水層)の化学発光測定結果を示す。縦軸は、測定した相対発光強度(RLU)を示す。切断酵素(HRV-3Cプロテアーゼ)を添加した試料(+)の水層は、切断酵素を添加しない試料(-)の水層に対して、3000倍の発光が測定された。(C)SDS-PAGE電気泳動の結果を示す。試料は、左から切断酵素(プロテアーゼ)を添加しない試料(-)の水層、切断酵素を添加した試料(+)の水層、及びhCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3精製標品(hCBD-BAF、コントロール)である。検出されたバンドは、(i)hCBD-BAF、(ii)切断され濾紙から水層中へ遊離したBAF部分、及び(iii)HRV-3C酵素をそれぞれ示す。(D)水層のBAFのGFP蛍光を示す。左は切断酵素(プロテアーゼ)を添加しない試料の水層、右は切断酵素を添加した試料の水層である。

【図8】キチン結合ドメインの配列の例を示す。(A)Pyrococcus furiosus由来のキチン結合ドメイン2(chBD2)のアミノ酸配列およびこれをコードする塩基配列の例を示す。(B)chBD2のアミノ酸配列において、Glu(E279)がThr(T)に及びAsp(D281)がAsn(N)に

10

20

30

40

50

置換されたChBD2(TN)のアミノ酸配列およびこれをコードする塩基配列の例を示す。

【図9】プロテアーゼ認識配列を有するキメラ蛋白質結合キチン素材の長期間の室温乾燥保存性能を示す。(A)カニ甲羅に由来するキチン素材に、hCBD-eBAF-Ym3、hCBD-eBAF-R₃及びhCBD-eBAF-R₄の各々のキメラ蛋白質を塗布した。図9Aは、各種キメラ蛋白質を塗布した領域を各々示す。(B)(b-1)3日間保存した発光蛋白質-キチンハイブリッド素材の蛍光灯下での明視野像を示す。(b-2)3日間保存した該ハイブリッド素材の、励起光照射による蛍光像を示す。(b-3)10か月保存した後の蛍光像を示す。

【図10】プロテアーゼ認識配列を有するhCBD-RLuc結合紙片の長期間の室温乾燥保存性能を示す。(A)hCBD-RLucの構造の模式図を示す。N末端側から順に、セルロース及び/又はキチン結合ドメインであるhCBD、プロテアーゼ認識配列であるHRV-3C切断配列を導入したリンカー、及び発光ドメインであるRLucを有する。(B)保存期間を通じた、発光強度の測定結果を示す(N=3)。横軸は、濾紙片の室温乾燥状態での保存期間(週)を示す。縦軸は、測定した発光強度(RLU)を示す。乾燥状態の濾紙は、室温26℃で保存した

【図11】eBAF-Ym3の発光スペクトル及びhCBD-eBAF-Ym3結合キチン素材の、ルシフェリン(発光基質)添加時の化学発光活性を示す(緑色)。キチンには、カニ甲羅に由来するキチン素材を用いた。(A)eBAF-Ym3の発光スペクトルを示す。横軸は、発光波長(Wavelength(nm))を示す。縦軸は、測定した相対発光強度(Relative Intensity)を示す。(B)hCBD-eBAF-Ym3結合キチンハイブリッド素材の一例について、(b-1)明視野像、(b-2)化学発光像、及び(b-3)重ね合わせ像(解説図)を示す。(b-3)において、矢印でhCBD-eBAF-Ym3を塗布した領域を指し示す。

【図12】eBAF-R₃の発光スペクトル及びhCBD-eBAF-R₃結合キチン素材の、ルシフェリン(発光基質)添加時の化学発光活性を示す(オレンジ色)。キチンには、カニ甲羅に由来するキチン素材を用いた。(A)eBAF-R₃の発光スペクトルを示す。横軸は、発光波長(Wavelength(nm))を示す。縦軸は、測定した相対発光強度(Relative Intensity)を示す。(B)hCBD-eBAF-R₃結合キチンハイブリッド素材の一例について、(b-1)明視野像、(b-2)化学発光像及び(b-3)重ね合わせ像を示す。

【図13】eBAF-R₄の発光スペクトル及びhCBD-eBAF-R₄結合キチン素材の、ルシフェリン(発光基質)添加時の化学発光活性を示す(白色)。キチンには、カニ甲羅に由来するキチン素材を用いた。(A)eBAF-R₄の発光スペクトルを示す。横軸は、発光波長(Wavelength(nm))を示す。縦軸は、測定した相対発光強度(Relative Intensity)を示す。(B)hCBD-eBAF-R₄結合キチンハイブリッド素材の一例について、(b-1)明視野像、(b-2)化学発光像、及び(b-3)重ね合わせ像を示す。

【図14】hCBD-eBAF-Ym3結合キチンハイブリッド素材の発光。キチン素材として、セミの抜け殻を用いた。(A)hCBD-eBAF-Ym3結合素材とコントロールとの対比を示す。(a-1)明視野像及び(a-2)化学発光像を示す。左がhCBD-eBAF-Ym3結合キチン素材、右がバッファのみを含む容器(コントロール)を示す。(B)hCBD-eBAF-Ym3を結合したセミの抜け殻の全体像を示す。(b-1)明視野像及び(b-2)化学発光像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明のキメラ蛋白質は、セルロースおよび/またはキチンに結合するドメイン(セルロース/キチン結合ドメイン)と発光ドメインを有する蛋白質である。

【0011】

(1)セルロース/キチン結合ドメイン

セルロース/キチン結合ドメインは、セルロースに結合できるドメイン(セルロース結合ドメイン)、キチンに結合できるドメイン(キチン結合ドメイン)、セルロース及びキチンの両方に結合できるドメインのいずれであってもよい。

【0012】

セルロース結合ドメインとしては、セルラーゼが有するドメインが挙げられる。微生物、植物、動物などの各種生物由来のセルロース結合ドメインが多数知られており、これら

10

20

30

40

50

の公知のセルロース結合ドメインを広く使用することができる。

【0013】

キチン結合ドメインとしては、キチナーゼが有するドメインが挙げられる。微生物、植物、動物などの各種生物由来のキチン結合ドメインが多数知られており、これらの公知のキチン結合ドメインを広く使用することができる。

【0014】

キチン結合ドメインの具体例として、耐熱性菌由来のキチナーゼが有するキチン結合ドメインが挙げられる。耐熱性菌としては、*Thermococcus*属または*Pyrococcus*属に属する菌が挙げられ、具体的な耐熱性菌としては、*Pyrococcus furiosus*、*Thermococcus litoralis*、*Pyrococcus* sp.KOD1、*Thermotoga maritima*が挙げられる。配列番号10に示すアミノ酸配列は、好ましい態様の1つである*Pyrococcus furiosus*由来のキチン結合ドメイン2 (ChBD2)である。当該領域は、*Pyrococcus furiosus*由来のキチナーゼの、258番目のアミノ酸～352番目のアミノ酸の領域に相当する。

10

【0015】

また、セルロース/キチン結合ドメイン(キチンとセルロースの両方に結合できるドメイン)としては、特開2007-075046に開示されるような耐熱性菌由来のセルロース/キチン結合ドメインが挙げられる。具体的には、上記の耐熱性菌由来の耐熱性キチン結合ドメインに変異を導入して得られる耐熱性セルロース/キチン結合ドメインが挙げられる。

【0016】

セルロース/キチン結合ドメインの具体例として、*Pyrococcus furiosus*由来のキチン結合ドメイン2 (ChBD2)のアミノ酸配列(配列番号10)において、二つの酸性アミノ酸(E279とD281)を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であって、セルロース結合活性を有するポリペプチドをコードするアミノ酸配列が例示される。酸性アミノ酸が置換される他のアミノ酸としては、Gln、Asn、Ala、Ser、Thr、Cys、Met、などに代表される疎水性の低い中性アミノ酸が挙げられ、好ましくはGln、Asn、Ala、Ser、Thr、Cys、より好ましくはGln、Asn、Ala、Ser、Thrが挙げられる。なお、Glu(E279)の置換にはThr(T)がより好ましく、Asp(D281)の置換にはAsn(N)がより好ましい。具体例として、ChBD2のアミノ酸配列において、Glu(E279)がThr(T)に及びAsp(D281)がAsn(N)に置換されたChBD2(TN)配列が挙げられる(図8、配列番号11)。

20

【0017】

(2) 発光ドメイン

発光ドメインは、各種ルシフェラーゼ、蛍光発光蛋白質、あるいはこれらの融合蛋白質(例えばBAF)が挙げられる。ルシフェラーゼとしては、ホタル、イリオモテボタル、ウミボタル、鉄道虫、ヒカリコメツキムシ、渦鞭毛藻、ウミシイタケなどに由来する各種ルシフェラーゼが挙げられ、蛍光発光蛋白質としては、GFP、YFP、BFP、CFP、OF P、DsRED、RFPなどが挙げられる。

30

【0018】

ルシフェラーゼ又は蛍光発光蛋白質は、単独で発光ドメインとして用いてもよいが、好ましくはルシフェラーゼと蛍光発光蛋白質を直接又は適当な長さのスペーサーを介して結合し、ルシフェラーゼと蛍光発光蛋白質の間にエネルギー移動(BRET)が生じる蛋白質、即ちBAF蛋白質(もしくは単にBAF)が発光ドメインとして好ましい。BAFをコードするDNAの製造法は、例えば特許文献2に例示されており、ルシフェラーゼ遺伝子と蛍光発光蛋白質遺伝子を適当な第2リンカーに対応するDNA配列を介して結合させて得ることができる。本明細書において、発光ドメインがBAFであるキメラ蛋白質を、「CBD-BAF」と呼ぶ場合がある。

40

【0019】

(3) キメラ蛋白質

本発明のキメラ蛋白質は、セルロース/キチン結合ドメインをコードするDNAと発光ドメインをコードするDNAを直接又は第1リンカーに対応するDNA配列を介して連結したキメラ蛋白質をコードするDNAを含む遺伝子構築物またはベクターを宿主細胞(例

50

えば大腸菌)に導入して形質転換体とし、この形質転換体を培養することにより得ることができる。

【0020】

(4) リンカー

第1リンカーは、アミノ酸からなり、セルロース/キチン結合ドメインと発光ドメインの各々の機能を損なわない限り特に限定されない。第1リンカーのアミノ酸の数は、1個以上であればよく、2~100個、例えば4~80個、好ましくは5~60個、より好ましくは6~40個程度、さらに好ましくは7~30個、特に8~16個程度が挙げられる。

【0021】

第2リンカーは、アミノ酸からなり、ルシフェラーゼから蛍光発光蛋白質へのエネルギー移動を妨げないものであれば特に限定されない。第2リンカーのアミノ酸の数は、通常8~26個、好ましくは8~16個、より好ましくは10~14個、特に12個である。リンカーのアミノ酸数が7個以下或いは27個以上になるとエネルギー移動効率は大きく低下する。

【0022】

リンカー(第1リンカー又は第2リンカー)にプロテアーゼ認識配列を導入しておけば、サンプル中のプロテアーゼの有無を本発明のキメラ蛋白質を用いて検出することができる。あるいは、リンカーにサンプル中の物質が結合し、それにより発光活性が変化するようなアミノ酸配列を導入することにより、そのようなリンカー結合物質を含むサンプルを検出ないし定量することができる。このようなプロテアーゼ認識配列、リンカー結合物質などは公知であり、当業者であれば適宜選択することができる。プロテアーゼとプロテアーゼ認識配列との組み合わせの具体例としては、HRV-3Cプロテアーゼ及びアミノ酸配列LEVL FQ/GP(/:切断部位)が挙げられるが、これに限定されない。

【0023】

(5) その他

本明細書において、ルシフェラーゼは、天然のルシフェラーゼを使用してもよく、安定性や発光特性などの性質が改善されたルシフェラーゼを使用してもよい。

【0024】

本明細書において、蛍光発光蛋白質は、天然の蛍光発光蛋白質を使用してもよく、安定性や発光特性などの性質が改善された蛍光発光蛋白質を使用してもよい。

【0025】

例えば発光ドメインとしてウミシイタケルシフェラーゼを使用する場合、ウミシイタケルシフェラーゼとしては天然のウミシイタケルシフェラーゼ(例えばRluc)を使用してもよく、安定性や発光特性などの性質が改善されたウミシイタケルシフェラーゼ(例えばRluc8、Rluc8/A123S/D162E/I163L)を使用してもよい。本明細書において、「ルシフェラーゼ」は、天然型のルシフェラーゼとルシフェラーゼの特性を変化させた任意の改変型ルシフェラーゼの両者を含むものである。同様に、本明細書において、「蛍光発光蛋白質」は、天然型の蛍光発光蛋白質と、蛍光発光蛋白質の特性を変化させた任意の改変型蛍光発光蛋白質との両者を含むものである。

【0026】

蛍光発光蛋白質としては、グリーン蛍光発光蛋白質(GFP)、黄色蛍光発光蛋白質(YFP)、青色蛍光発光蛋白質(BFP)、シアン蛍光発光蛋白質(CFP)、オレンジ蛍光発光蛋白質(OF P)、DsRED、赤色蛍光発光蛋白質(RFP)などが例示される。なお、GFPには、Aequorea属のクラゲ(例えば、Aequorea victoria、Aequorea coerulescensなど。)などに由来する天然型のグリーン蛍光発光蛋白質(例えば、AvGFP、AcGFPなど。)及びEGFPなどの種々のGFP誘導体が含まれる。YFPについても、EYFP、Topaz、Venus、Citrineなどのアミノ酸置換した変異体が広く含まれる。DsREDには、Discosoma属の珊瑚に由来する天然型の蛍光発光蛋白質及びそのアミノ酸配列を改変(置換、付加、欠失、挿入など)した変異体、さらには多量体型である天然型のDsREDを改変した単量体型(例

10

20

30

40

50

えば、mCherryなど。)が広く含まれる。DsREDとしては、単量体型のDsREDが好ましい。RFPには、イソギンチャク(例えば、*Entacmaea quadricolor*。)などに由来する天然型の赤色蛍光発光蛋白質(ただし、赤色を発するDsREDは含まれないと理解される。)及びそのアミノ酸配列を改変した変異体が広く含まれる(例えば、TurboRFPなど)。他の蛍光発光蛋白質についても同様に、天然型の蛍光発光蛋白質や、アミノ酸配列を改変(置換、付加、欠失、挿入など)した変異体が広く含まれる。

【0027】

蛍光発光蛋白質として、pHに依存してRLU(Relative light unit、相対発光強度)ないし蛍光波長が変化するもの(例えばYFPなど)を使用すれば、これら蛍光発光蛋白質の存在する場所のpHを測定することができ、本発明のキメラ蛋白質はpHインジケータとして使用することができる。また、GFPなどのpHによりRLUないし波長があまり変化しないものは、pHに依存することなく、本発明のキメラ蛋白質あるいはそれにより標識された蛋白質等の物質を定量等することができる。

10

【0028】

本発明のDNAは、本発明のキメラ蛋白質をコードするDNAである。

【0029】

本発明のキメラ蛋白質は、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。宿主細胞としては哺乳動物細胞を含む動物細胞、植物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞、植物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。好ましい宿主細胞としては、大腸菌などを用いることができる。

20

【0030】

本発明キメラ蛋白質の特徴の一つは、セルロース又はキチンから構成されるシート、フィルム、粒子、ビーズなどの任意の材料に付着ないし結合させ、乾燥させたときに、その発光活性が長期間保持されることにある。従って、本発明のキメラ蛋白質は、発光材料として有用である。また、本発明のキメラ蛋白質は、長期保存中にも発光活性が低下しないため、標準物質としても有用である。

【0031】

本明細書において、セルロースとしては、天然セルロース、再生セルロースのいずれも使用できる。天然セルロースとしては、針葉樹や広葉樹から得られる精製パルプ、コットンリントーヤコットンリントより得られるセルロース、バロニアやシオグサなどの海草より得られるセルロース、ホヤより得られるセルロース、バクテリアの生産するセルロース等が挙げられる。再生セルロースとしては、天然セルロース繊維をいったん溶解した後、セルロースの組成のままで繊維状に再生したものが挙げられる。

30

【0032】

キチンは、例えばカニの甲羅から製造することができる。好ましい実施形態では、本発明で使用するキチンは、水洗したカニ殻を、塩酸などの酸で処理して無機質(カルシウムなど)を除き、次いで苛性ソーダで処理して有機質(例えば蛋白質)を除去し、さらにアルコール処理して脂質を除去し、不溶の残分として得られたキチンを使用することができる。カニ甲羅素材を粉砕して粒子状としてもよい。

40

また、キチンとして、セミ類の抜け殻を用いることもできる。セミ類の抜け殻は、キチンが内表面に露出しているため、無処理で使用することができる。

【実施例】

【0033】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。本実施例において、「CBD-BAF」及び「hCBD-BAF」は、「キメラ蛋白質」に含まれるものと理解される。

【0034】

実施例 1

プラスミドの作製

50

(1) pCII-CBD-eBAF-Ym3及びpCII-CBD(TN)-eBAF-Ym3

CBD-eBAF-Y発現ベクターを作製するために、CBD(wt)又はCBD(TN)をコードする遺伝子をPCRにより増幅した。PCRに用いられたプライマーは次の通りである：

chBD2-F-NdeI, 5' -GGAATTCATATGACTACCCCTGTCCAGTCTC-3' ;

chBD2-R-NdeI, 5' -CGATATCCATATGAATTACTTGTCCGTTTATTTCTAG-3' 。

PCR断片をNdeIで消化し、pCII-eBAF-Ym3のNdeI部位へ組み込み、pCII-CBD-eBAF-Ym3及びpCII-CBD(TN)-eBAF-Ym3を構築した。

【0035】

なお、eBAF-Ym3は、特許文献1に記載されている。eBAF-YのRLuc8部分に、A123S、D162E、I163Lの変異を導入したBAF蛋白質のことである。ここでのCBDとCBD(TN)をコードする遺伝子は、超高熱菌のゲノムに由来する配列である。

10

【0036】

(2) pCII-hCBD-eBAF-Y

大腸菌での効率的な蛋白質発現のために、大腸菌でのコドン最適化を目的としたCBD遺伝子の人工合成を行った(CBD(TN)のみ)。当該人工合成CBD(TN)遺伝子(以下hCBDと呼称して区別するが、アミノ酸配列はCBD(TN)と同一である)を、上記pCII-CBD(TN)-eBAF-Ym3のCBD(TN)部分と置換したpCII-hCBD-eBAF-Ym3を構築した。またこの時、後々の組換えに備え、人工遺伝子設計に際し、hCBD配列の3'側にAsp718-BamHI-NdeI部位を付加した。その結果、連結部分の塩基配列は、5'-GGTACCGGGGATCCCATATG-3'となり、G-T-G-G-S-Hのアミノ酸配列でhCBDとeBAF-Ym3をインフレームに連結することになる(NdeI部位のATGはeBAF-Ym3の開始Metに相当)。

20

【0037】

(3) pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3

pCII-hCBD-eBAF-Ym3のAsp718-BamHI部位に、AspHRV3CsBam-Sens:5'-GTACCGGTGGTTCGCGGGTCTGTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTCCGCGGGTtccggtg-3'とAspHRV3CsBam-Anti:GATCCACCGGAACCGCGGAGGGCCCCCTGGAACAGAAGTTCAGACCCGCGGAACCACCGからなる合成2重鎖DNAを挿入し、HRV-3Cプロテアーゼの切断配列を挿入した。Asp718部位からBamHI部位までに対応するアミノ酸配列は、G-T-G-G-S-A-G-L-E-V-L-F-Q-G-P-S-A-G-S-G-G-Sであり、中央のLEVLQ/GPが当該プロテアーゼの切断配列である(/:切断部位)。

30

【0038】

(4) pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeI

pCII-eBAF-Yで代表される各種BAFの大腸菌発現ベクターにおいて、2008年に開発済の40種類を超える各種BAFは全てNdeI-XbaI部位でクローニングされている。一方でpCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3は、hCBD部分がNdeI部位で挿入されており、BAFの置換体を作製するためにhCBD部分の5'側のNdeI部位が新たなBAF置換体作製の障害になる。そのため、hCBDdeINdeIoligo-Sens:5'-TCATCATCATCATCAcATGACCACTCCGGTG-3'、hCBDdeINdeIoligo-Anti:5'-CACCGGAGTGGTCATgTGATGATGATGA-3'を用いて、1塩基の塩基置換変異導入により、NdeI部位を破壊した、pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeIを作製した。なお、この一塩基変異導入にはストラタジーン社のQuickExchange systemを用いた。

pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeIを用いて発現させたキメラ蛋白質濾紙に吸着/結合させて乾燥した後の発光活性の試験結果を図3に示す。

40

【0039】

(5) pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃及びpCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄

pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeIをNdeI及びXbaIを用いて消化し、eBAF-Ym3部分を除去して、その代わりにBAF-R₃又はBAF-R₄を挿入した。かくして、pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃及びpCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄を作製した。なお、BAF-R₃及びBAF-R₄は、それぞれ赤色蛍光蛋白質として、TurboRFP及びmCherryを含んでいる。BAF-R₃及びBAF-R₄は、特許文献1に記載の方法に準じて作製した。

【0040】

pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃及びpCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄を用いて発現させたキメラ蛋

50

白質濾紙に吸着 / 結合させて乾燥した後の発光活性の試験結果を図 4、図 5 に示す。

【 0 0 4 1 】

(6) pC11-hCBD-RLuc

上記 (5) と同様にして、pC11-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeI から eBAF-Ym3 部分を除去して、その代わりに RLuc (ウミシイタケルシフェラーゼ) を挿入した。得られた pC11-hCBD-HRV3Cs-RLuc を用いて発現させたキメラ蛋白質濾紙に吸着 / 結合させて乾燥させ、室温保存した後の発光活性の試験結果を図 1 0 に示す。

【 0 0 4 2 】

リコンビナント蛋白質の調製

各キメラ蛋白質について、リコンビナント蛋白質を His タグ融合蛋白質として、大腸菌 B L21 株において低温ショック誘導性プロモーターシステム (TAKARA) により発現させた。リコンビナント蛋白質は、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製した。

【 0 0 4 3 】

各種キメラ蛋白質結合濾紙の作製

穴あけパンチで作製した直径 6mm の丸形濾紙 (ADVANTEC) 片をパラフィルム上に置き、当該濾紙片に His タグ精製した各種キメラ蛋白質の高濃度水溶液を数 μ l ずつ滴下、次いで乾燥の工程を繰り返した。十分量のキメラ蛋白質を結合後、大量の精製水にて、当該濾紙片を洗浄し、未結合の CBD-BAF を除去した。洗浄後の濾紙片をパラフィルム上で風乾することで、各種キメラ蛋白質結合濾紙を作製した。図 1 に、方法の概要を模式的に示す。キメラ蛋白質としては、CBD-eBAF-Ym3、hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeI (以下、「hCBD-eBAF-Ym3」と記載する場合があります。)、hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃ (以下、「hCBD-eBAF-R₃」と記載する場合があります。)、hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄ (以下、「hCBD-eBAF-R₄」と記載する場合があります。) 及び hCBD-HRV3Cs-RLuc (以下、「hCBD-RLuc」と記載する場合があります。) を用いた。

【 0 0 4 4 】

キメラ蛋白質結合濾紙の発光像観察

リング型パンチで切り抜き、中央部に CBD-eBAF-Ym3 を結合させた。その後、洗浄した濾紙片に対し、ルシフェリン溶液を添加して、黄緑色発光を視認観察した。塗布部からの拡散が見られないことを確認後、LAS-4000 にて、High Resolution mode (感度最低) で 4 秒間露光により、発光画像を取得した。結果を、図 2 A に示す。

なお、本実施例のみ、セルロース / キチン結合ドメインとして CBD (chBD2(TN) 型で、変異導入部分以外は天然型の超好熱性細菌由来の遺伝子 (塩基) 配列) を有する、CBD-eBAF-Ym3 を使用した。本実施例以外は、全て chBD2(TN) のアミノ酸配列をコードするが、大腸菌でのコドン使用に最適化した人工合成遺伝子を使用した (「hCBD」と呼ぶ場合がある。)。

【 0 0 4 5 】

キメラ蛋白質結合濾紙の室温乾燥保存後の発光量測定

CBD-eBAF-Ym3 蛋白質結合濾紙をプラスチックペトリディッシュに入れ、フタをした後、室温 (26 ~ 27) 暗所にて保存した。測定直前に、当該乾燥濾紙片をルミノメータ用測定チューブ (Nunc) に入れ、発光反応バッファー (60 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0) 200 μ l を加えて、十分湿潤させた。当該チューブに、1 μ M ルシフェリン溶液 200 μ l を添加し、発光測定を行った。発光量は Luminescencer-PSN (アトー) を用いて、10 秒間の積算により測定した。結果を図 2 B に示す。

hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3 NdeI、hCBD-eBAF-R₃、hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄ 及び hCBD-HRV3Cs-RLuc についても、同様に保存後の発光量を測定した。結果を、図 3 ~ 5 及び図 1 0 にそれぞれ示す。

【 0 0 4 6 】

プロテアーゼ活性検出系の実施

系の概要を、図 6 及び図 7 A に模式的に示す。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3を、pCII-hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3含有大腸菌を用いて、発現誘導し、次いでこれを精製した。得られたhCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3を用いて、当該蛋白質結合乾燥濾紙片を調製した。

【0048】

濾紙片を2.0 ml 微量遠心チューブに入れ、1xHRV-3C バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7.5) 100 μ lを加えて、十分湿潤させた後、一旦バッファーを完全に除去した。バッファー湿潤濾紙片を含む当該チューブに、1xHRV-3C バッファー溶液もしくは4UのHRV-3Cプロテアーゼ (Novagen) を含む1xHRV-3C バッファー溶液120 μ lを改めて添加し、4にて64時間静置した。反応後、当該微量遠心チューブを遠心し、上清40 μ lを別チューブに分取した。回収上清4 μ lずつをSDS-PAGEに供し、電気泳動による分離後、CBB染色を行った。尚、コントロールとして、未反応のhCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3精製標品を用いた。結果を図7Cに示す。

10

【0049】

また、回収上清2 μ lを発光反応バッファー (60 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0) 200 μ lに希釈し、等量の0.5 μ Mルシフェリン溶液を加えて発光測定を3回行った。発光量はLuminescencer-PSN (アトー)を用いて、10秒間の積算により測定した。結果を、図7Bに示す。

【0050】

また、回収上清を青色LEDトランスイルミネーターとオレンジ色アクリル板を用いて、蛍光観察を行った。画像取得は、デジタルカメラ (Nikon D-70) を用いた写真撮影により行った。結果を図7Dに示す。

20

【0051】

各種hCBD-BAF蛋白質結合キチン素材の作製

カニ甲羅を塩酸処理 (脱カルシウム)、NaOH処理 (除タンパク)、次いでアルコール処理 (除脂質) を順次施し、キチン素材 (カニ甲羅キチン素材) を得た。得られたキチン素材に、3種のhCBD-BAF蛋白質 (hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3、hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃及びhCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄) を、領域を分けて塗布 (図9A) して、これを乾燥した。室温にて3日間保存した後、505nmの緑色LEDイルミネータを照射し、オレンジ色フィルターを透過する光をデジカメで撮影した。図9Bの (b-1) は蛍光灯下での明視野像、(b-2) は蛍光像をそれぞれ示す。図9Bの (b-1) 及び (b-2) は、同一アングルから撮影した写真である。陰性対照と未塗布部分が緑色なのは、照射緑色光が反射しているためである。さらに、同一試料を室温にて10か月乾燥保存した後の蛍光像を、図9Bの (b-3) に示す。

30

hCBD-BAFに用いた各種BAFのスペクトル測定

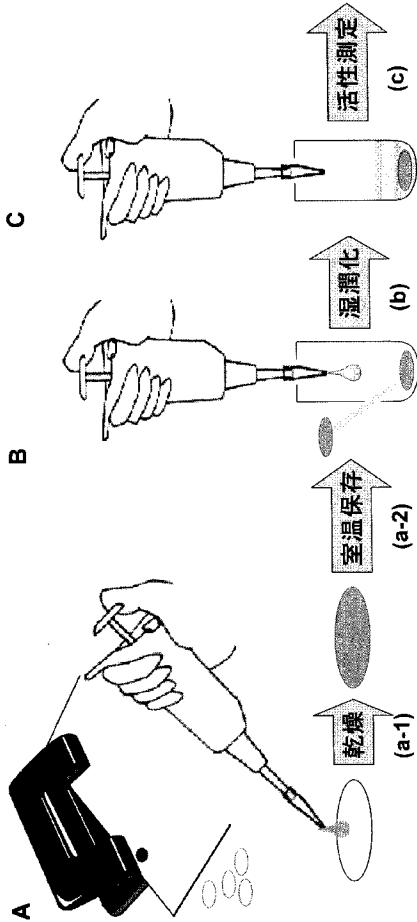
3種のhCBD-BAF蛋白質 (hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3、hCBD-HRV3Cs-eBAF-R₃及びhCBD-HRV3Cs-eBAF-R₄) に用いた各種BAF蛋白質単体 (eBAF-Ym3、eBAF-R₃及びeBAF-R₄) について、特許文献2に記載の方法に準じてスペクトル測定を行なった。結果を、図11~13に示す。

セミ抜け殻へのCBD-BAF蛋白質の結合及び発光観察

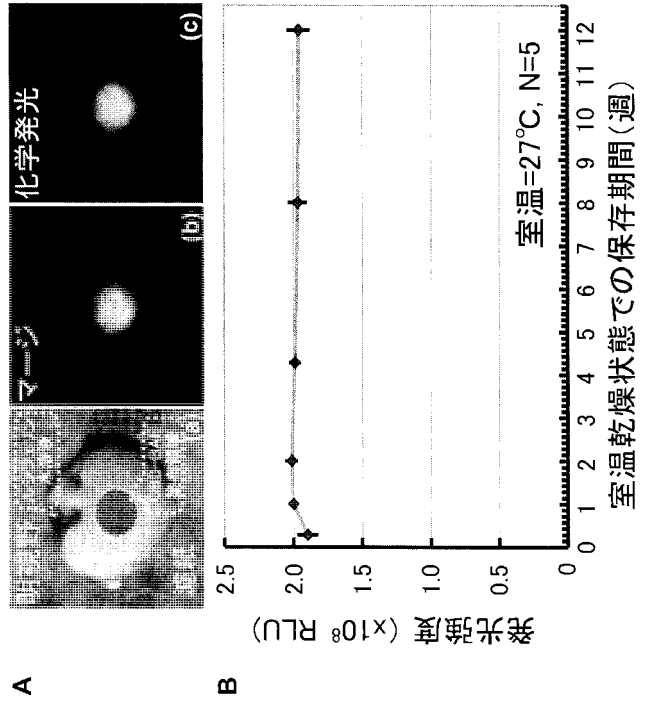
キチン素材として、セミ抜け殻を用いた。セミ抜け殻に直接hCBD-HRV3Cs-eBAF-Ym3を塗布した。当該ハイブリッド材料を前述の反応バッファーに浸し、ルシフェリン溶液を添加した後、発光の様子をデジタルカメラで記録した。結果を図14に示す。

40

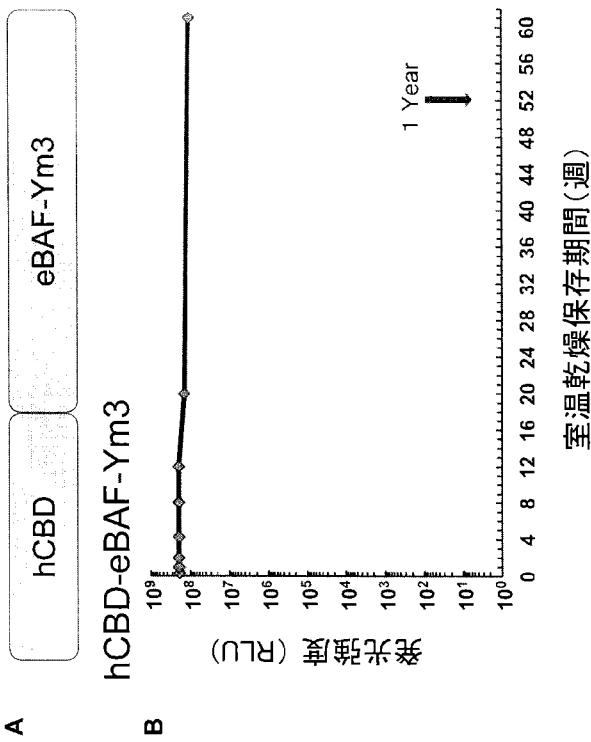
【 図 1 】



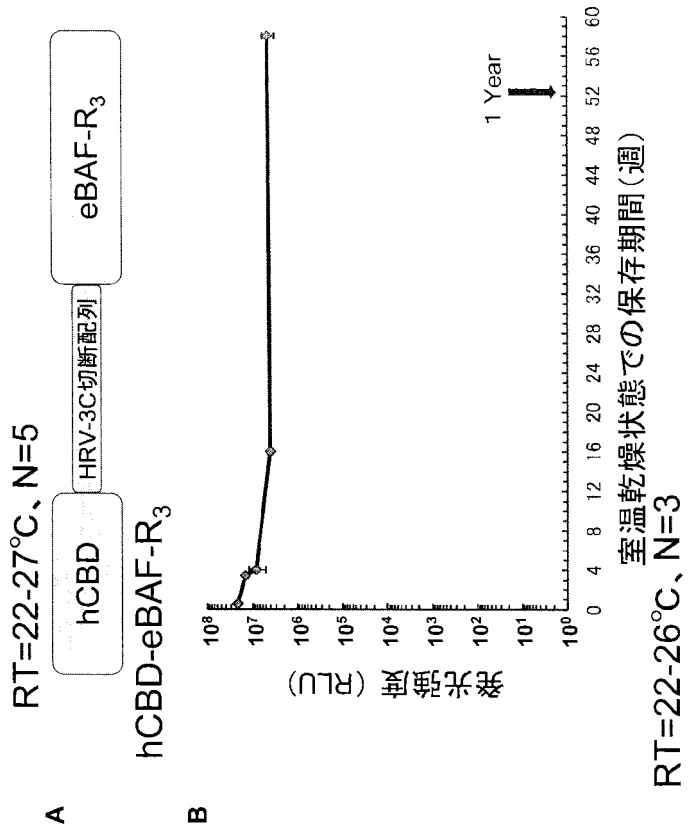
【 図 2 】



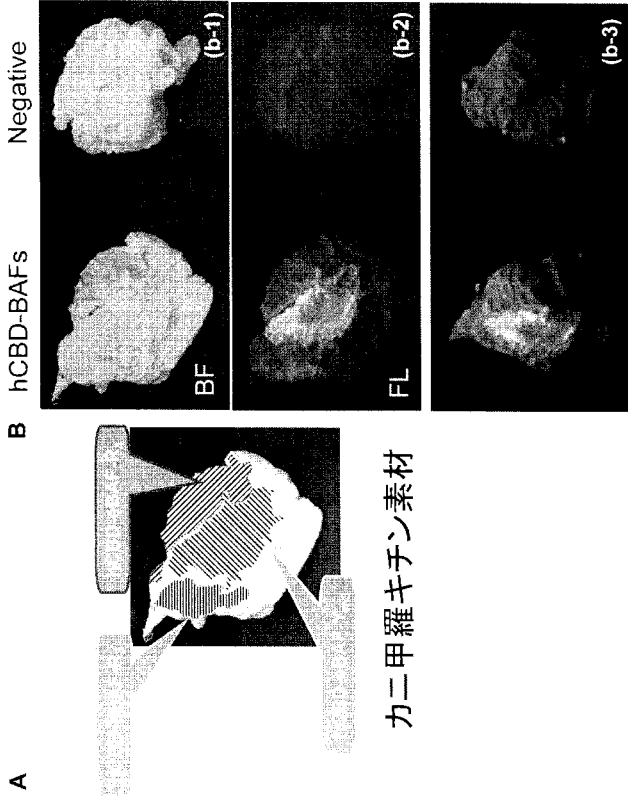
【 図 3 】



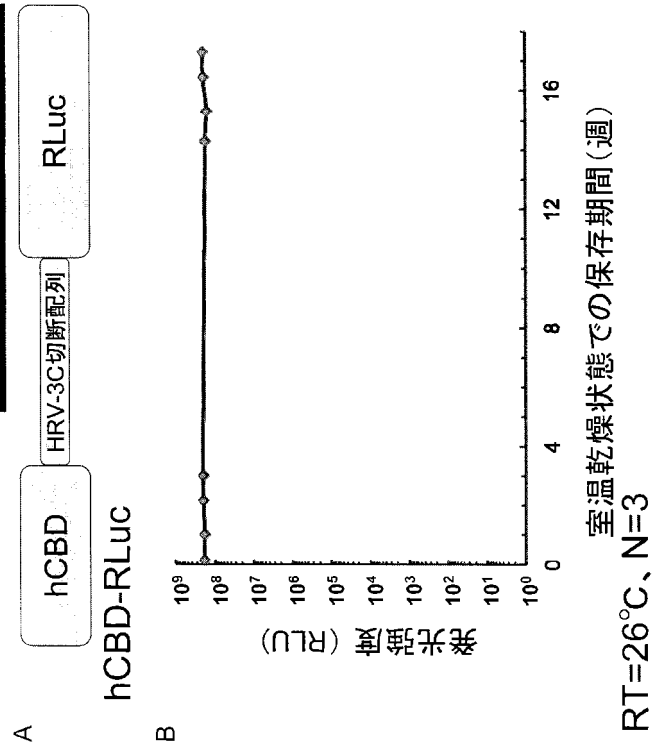
【 図 4 】



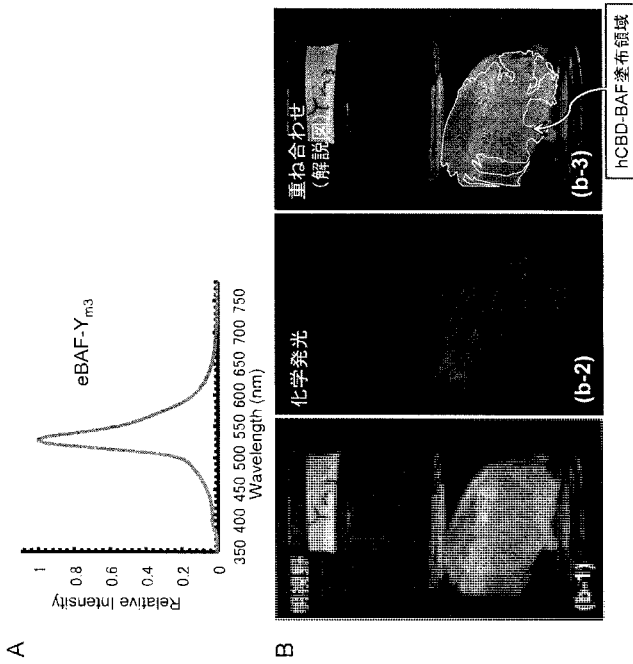
【 図 9 】



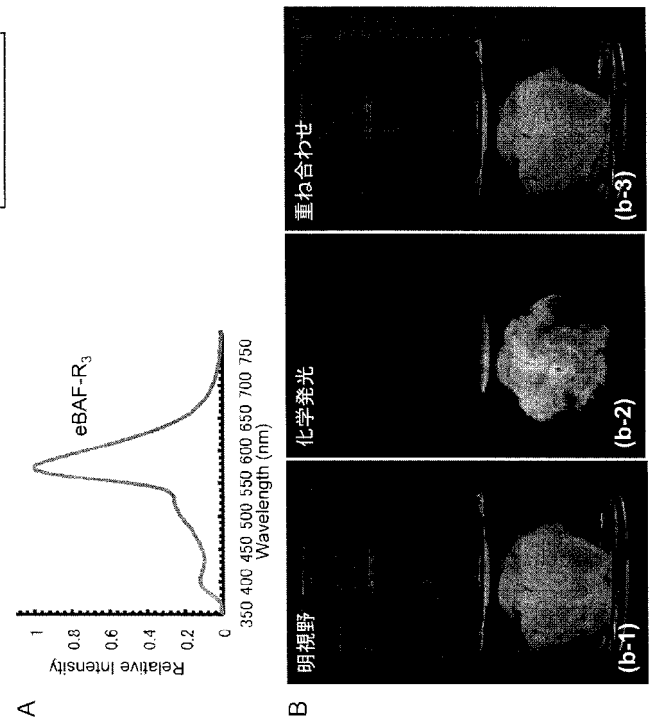
【 図 10 】



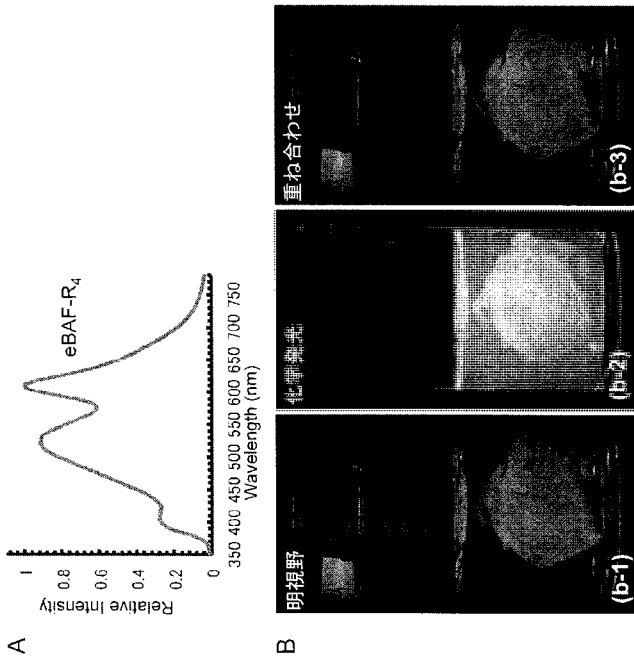
【 図 11 】



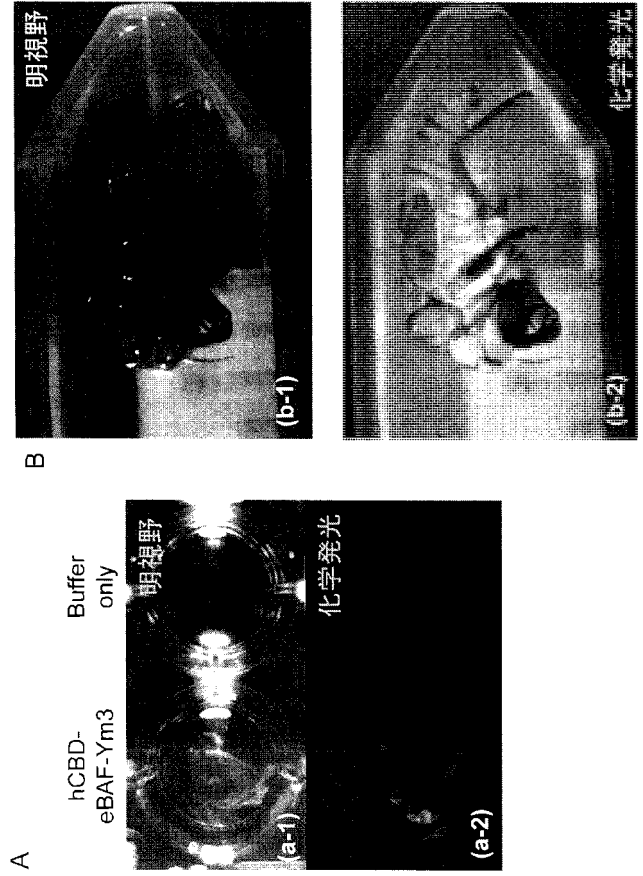
【 図 12 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2013094359000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, C07K14/195, C07K14/435, C07K19/00, C12N9/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KIM,S.Y. et al., Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling, Plant Physiol., 2006, Vol.142,No.3, p.984-992	<u>1-2,5-9</u> 3-4
X Y	ICHIOKA,F. et al., Identification of Rab GTPase-activating protein-like protein (RabGAPLP) as a novel Alix/AIP1-interacting protein, Biosci.Biotechnol.Biochem., 2005, Vol.69,No.4, p.861-865	<u>1-2,5-9</u> 3-4
X Y	YANO,S. et al., N-terminal region of chitinase I of Bacillus circulans KA-304 contained new chitin-binding domain, Biosci.Biotechnol. Biochem., 2011.02, Vol.75,No.2, p.299-304	<u>1-2,5-9</u> 3-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 12 February, 2013 (12.02.13)	Date of mailing of the international search report 19 February, 2013 (19.02.13)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080241

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2009-85831 A (Canon Inc.), 23 April 2009 (23.04.2009), entire text (Family: none)	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2010-4774 A (Kansai Chemical Engineering Co., Ltd.), 14 January 2010 (14.01.2010), entire text (Family: none)	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2001-507569 A (Novo Nordisk A/S), 12 June 2001 (12.06.2001), entire text & WO 1998/018905 A1 & EP 975745 A1 & US 6060274 A & AU 4699797 A & CN 1235635 A & AT 386799 T & DE 69738526 D & DE 69738526 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2002-507410 A (Prolume, Ltd.), 12 March 2002 (12.03.2002), entire text & WO 1999/049019 A2 & EP 1064360 A2 & US 2002/0004942 A1 & US 2003/0066096 A1 & US 2006/0053505 A1 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & AT 388224 T & DE 69938293 D & DE 69938293 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2003-526364 A (Prolume, Ltd.), 09 September 2003 (09.09.2003), entire text & WO 2001/068824 A2 & EP 1265990 A2 & US 2003/0092098 A1 & US 2005/0266491 A1 & US 2005/0272111 A1 & IL 151746 D & CA 2403327 A & AU 4744501 A & AT 319814 T & DE 60117761 D & DE 60117761 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
Y	JP 2008-283959 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 27 November 2008 (27.11.2008), entire text (Family: none)	3-4
Y	JP 2007-75046 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 29 March 2007 (29.03.2007), entire text (Family: none)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 8 0 2 4 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C07K14/195, C07K14/435, C07K19/00, C12N9/02			
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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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) CA/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	KIM, S. Y. et al., Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling, Plant Physiol., 2006, Vol. 142, No. 3, p. 984-992	1-2, 5-9 3-4	
X Y	ICHIOKA, F. et al., Identification of Rab GTPase-activating protein-like protein (RabGAPLP) as a novel Alix/AIP1-interacting protein, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, Vol. 69, No. 4, p. 861-865	1-2, 5-9 3-4	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 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 12.02.2013		国際調査報告の発送日 19.02.2013	
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) 高堀 栄二	4 N 9 2 8 1
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 8 0 2 4 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> Y	YANO, S. et al., N-terminal region of chitinase I of Bacillus circulans KA-304 contained new chitin-binding domain, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011.02, Vol. 75, No. 2, p. 299-304	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2009-85831 A (キヤノン株式会社) 2009.04.23, 全文 (ファミリーなし)	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2010-4774 A (関西化学機械製作株式会社) 2010.01.14, 全文 (ファミリーなし)	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2001-507569 A (ノボ ノルディスク アクティージェルスカブ) 2001.06.12, 全文 & WO 1998/018905 A1 & EP 975745 A1 & US 6060274 A & AU 4699797 A & CN 1235635 A & AT 386799 T & DE 69738526 D & DE 69738526 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2002-507410 A (プロルーム・リミテッド) 2002.03.12, 全文 & WO 1999/049019 A2 & EP 1064360 A2 & US 2002/0004942 A1 & US 2003/0066096 A1 & US 2006/0053505 A1 & CA 2324648 A & AU 3210399 A & AT 388224 T & DE 69938293 D & DE 69938293 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
<u>X</u> Y	JP 2003-526364 A (プロルーム・リミテッド) 2003.09.09, 全文 & WO 2001/068824 A2 & EP 1265990 A2 & US 2003/0092098 A1 & US 2005/0266491 A1 & US 2005/0272111 A1 & IL 151746 D & CA 2403327 A & AU 4744501 A & AT 319814 T & DE 60117761 D & DE 60117761 T	<u>1-2, 5-9</u> 3-4
Y	JP 2008-283959 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008.11.27, 全文 (ファミリーなし)	3-4
Y	JP 2007-75046 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2007.03.29, 全文 (ファミリーなし)	1-9

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/24 (2006.01) C 1 2 N 9/24

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA41 BA53 CA10 CA40 DA89 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。