

(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

2017年10月5日(05.10.2017)

(10) 国際公開番号

WO 2017/170918 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01) *C13K 1/02* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C13K 13/00* (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)

広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2017/013379

(74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所
(TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日:

2017年3月30日(30.03.2017)

(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,

(25) 国際出願の言語:

日本語

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

(26) 国際公開の言語:

日本語

CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,

(30) 優先権データ:

特願 2016-070690 2016年3月31日(31.03.2016) JP

ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,

(71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).

IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA,

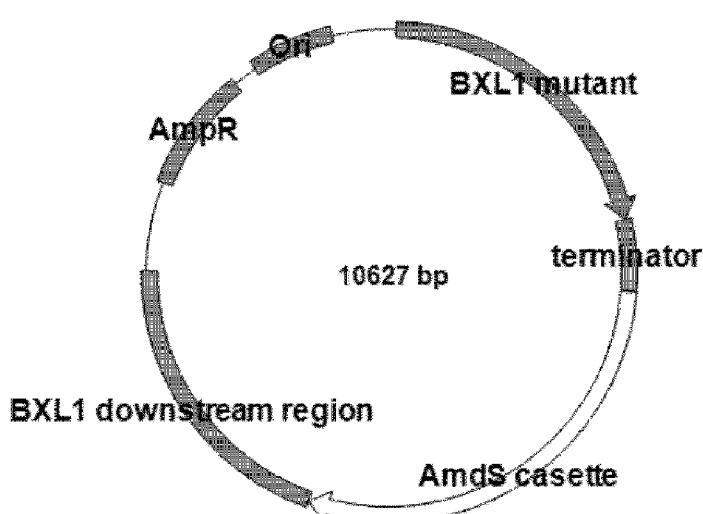
(72) 発明者: 小林 宏治(KOBAYASHI, Koji); 〒2488555
神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 平松
紳吾(HIRAMATSU, Shingo); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎
研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成(YAMADA, Katsuhige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手

LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,

(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,

(54) Title: TRICHODERMA FUNGUS HAVING MUTANT-TYPE BXL1 GENE AND METHOD FOR PRODUCING XYLOOLIGO-

SACCHARIDE AND GLUCOSE BY USING SAME

(54) 発明の名称: 変異型BXL1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌及びそれを使用したキシロオリゴ糖と
グルコースの製造方法

(57) Abstract: Disclosed are: a novel *Trichoderma reesei* fungus with which xylan in a biomass is not decomposed to xylose even when a cellulase derived from a *Trichoderma reesei* fungus is used for the hydrolysis of a cellulose-based biomass; and a method for producing glucose and xylooligosaccharide from a cellulose-containing biomass by using said *Trichoderma reesei* fungus. This *Trichoderma* fungus includes an N-terminal domain and a C-terminal domain of a β -xylosidase 1 (BXL1) gene, wherein a Fn3-like domain is disrupted. By using this *Trichoderma* fungus, β -xylosidase activity is deleted and β -glucosidase activity is increased. Thus, xylan in a biomass is not decomposed to xylose even when a cellulose-containing biomass is hydrolyzed, and glucose and xylooligosaccharide can be produced efficiently.

(57) 要約:

[統葉有]



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, — 明細書の別個の部分として表した配列リスト
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

- 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

要約 セルロース系バイオマスの加水分解にトリコデルマ・リーセイ属真菌由来のセルラーゼを使用しても、バイオマス中のキシランがキシロースにまで分解されない、新規なトリコデルマ・リーセイ属真菌、及びそれを用いた、セルロース含有バイオマスからのグルコースとキシロオリゴ糖の製造方法が開示されている。トリコデルマ属真菌は、 β -キシロシダーゼ 1 (BXL1) 遺伝子の N 末端ドメインと C 末端ドメインを有し、Fn3-like ドメインが破壊されている。このトリコデルマ属真菌を使用すると、 β -キシロシダーゼ活性が欠失し、 β -グルコシダーゼ活性が増加する。このため、セルロース含有バイオマスを加水分解してもバイオマス中のキシランがキシロースにまで分解されず、グルコースとキシロオリゴ糖を効率よく製造可能である。

明 細 書

発明の名称 :

変異型 BX L 1 遺伝子を有するトリコデルマ属真菌及びそれを使用したキシロオリゴ糖とグルコースの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、 β -キシロシダーゼ（BX L 1）活性が欠失した変異型BX L 1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌及びそれを使用した、セルロース系バイオマスからキシロオリゴ糖とグルコースを製造する方法に関する。

背景技術

[0002] キシロオリゴ糖は、キシロース単位が β -グリコシド結合により複数個結合したオリゴ糖の総称である。キシロオリゴ糖は、優れた整腸作用を示すことなどから機能性食品用の素材としても用いられている（非特許文献1）。

[0003] キシロオリゴ糖は、セルロース系バイオマスに含まれるキシランを加水分解することで得ることができ、加水分解の方法としては、水熱処理する方法（非特許文献2）、酸加水分解する方法（非特許文献3）、酵素処理する方法（特許文献1）が知られている。

[0004] 一方、バイオマスを酵素で加水分解する際に、糸状菌はセルロースやキシランを分解する酵素であるセルラーゼ生産能力が高いことから非常に適している。しかしながら、糸状菌の生産するセルラーゼをバイオマスに反応させるとキシロオリゴ糖は单糖のキシロースにまで分解されてしまうことが知られている。キシロオリゴ糖をキシロースに分解する酵素としては、 β -キシロシダーゼが知られており、トリコデルマ・リーセイの β -キシロシダーゼ1は二糖（キシロビオース）から七糖（キシロヘプトース）に反応し、キシロースを生成することが報告されている（非特許文献4）。

[0005] β -キシロシダーゼ1は、糖質加水分解酵素ファミリー3（GH3）に属している（非特許文献5）。GH3に属する酵素群には、高度に保存されている領域（ドメイン）が複数存在しているが、これらのうち、トリコデルマ

・リーセイの β -キシロシダーゼ1には、GH3のN末端ドメインとC末端ドメインが含まれている。また、トリコデルマ・リーセイの β -キシロシダーゼでは、264番目、311番目、464番目のアミノ酸残基が活性に必須的であると考えられている（非特許文献6、7）。その他、 β -キシロシダーゼ1はこれらのドメインの他に、Fn3-likeドメインを持つが、Fn3-likeドメインの機能は明らかになっていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第4675139号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ayyappan Aら, Compre. Rev. Food. Sci. Food Saf. 10, 2–16 (2011)

非特許文献2：Patricia Mら, Ind. Crops. Prod. 62, 460–465 (2014)

非特許文献3：Ozlem Aら, Carbohydr. Res. 344, 660–666 (2009)

非特許文献4：M. C. Hermannら, Biochem. J. 321, 375–381 (1997)

非特許文献5：Carbohydrate-Active Enzymes Database (<http://www.cazy.org/GH3.html>)

非特許文献6：L E Rasmussenら, Biotech. Bioeng. 94, 5, 869–876 (2006)

非特許文献7：E Margolles-Clarkら, Appl. Environ. Microbiol. 62, 10, 3840–3846 (1996)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] トリコデルマ・リーセイ属真菌由来のセルラーゼを使用するとキシランからキシロースにまで分解されてしまう課題があった。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは鋭意検討した結果、 β -キシロシダーゼ1のアミノ酸配列においてGH3のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、Fn3-likedomainが破壊されたトリコデルマ属真菌を使用すると、 β -キシロシダーゼ活性が消失し、 β -グルコシダーゼ活性が増加することを見出し、本発明に到った。

[0010] すなわち、本発明は以下の（1）～（9）を提供する。

（1）配列番号2に記載のアミノ酸配列から成る β -キシロシダーゼ1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列から成るポリペプチドであって β -キシロシダーゼ活性を持つポリペプチドにおける糖質加水分解酵素ファミリー3（GH3）のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、Fn3-likedomainを消失し、かつ β -キシロシダーゼ活性が消失した変異型 β -キシロシダーゼ1をコードする変異型BXL1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌。

（2）前記配列同一性が95%以上である（1）記載のトリコデルマ属真菌。

（3）前記変異型BXL1遺伝子は、配列番号2に記載のアミノ酸配列から成る β -キシロシダーゼ1におけるGH3のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、Fn3-likedomainを消失した変異型ポリペプチドをコードするものである（1）又は（2）記載のトリコデルマ属真菌。

（4）前記Fn3-likedomainの消失が、前記C末端ドメインよりも下流で前記Fn3-likedomainよりも上流の領域をコードする遺伝子領域内の塩基の消失若しくは挿入によるフレームシフト、又は塩基の置換によるストップコドン変異によるものである、（1）～（3）のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌。

（5）前記トリコデルマ属真菌が非組換え体である、（1）～（4）のいず

れか1項に記載のトリコデルマ属真菌。

(6) 前記トリコデルマ属真菌がトリコデルマ・リーセイである、(1)～(5)のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌。

(7) 前記トリコデルマ属真菌が、カーボン・カタボライト・リプレッシュョンが解除されている株である、(5)に記載のトリコデルマ属真菌。

(8) (1)～(7)のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌を培養する工程を含む、セルラーゼ組成物の製造方法。

(9) (8)記載の方法により製造されたセルラーゼ組成物を回収する工程と、得られたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する工程を含む、グルコースとキシロオリゴ糖の製造方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、 β -キシロシダーゼ1のアミノ酸配列において、G H 3のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、かつF n 3-l i k e ドメインが欠失した変異型B X L 1をコードする遺伝子を有するトリコデルマ属真菌を使用することにより、 β -キシロシダーゼ活性を消失し、 β -グルコシダーゼ活性を増加させることができる。さらに、そのトリコデルマ属真菌由來のセルラーゼ組成物を使用することで、グルコースとキシロオリゴ糖を効率良く製造することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]下記実施例において作製した、変異B X L 1遺伝子挿入のためのプラスミドの構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、トリコデルマ属真菌のB X L 1の機能未知ドメインであるF n 3-l i k e ドメインが欠失した変異型B X L 1をコードする遺伝子を有するトリコデルマ属真菌を使用することにより、 β -キシロシダーゼ活性を消失することができるという新知見に基づくものである。

[0014] 本発明において用いるトリコデルマ属真菌は、Trichoderma属に属し、タンパク質を生産する能力を有していれば特に制限はない。Tri

choderma 属に属するトリコデルマ属真菌は具体的にはトリコデルマ・ビレンス (*Trichoderma virens*)、トリコデルマ・ハルジアナム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・アトロビリデ (*Trichoderma atroviride*)、トリコデルマ・ガムシ (*Trichoderma gamsii*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) が挙げられる。この中で好ましくはトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) である。また、トリコデルマ属に由来し、変異剤あるいは紫外線照射などで変異処理を施し、タンパク質の生産性が向上した変異株を利用してもよい。好ましくはトリコデルマ・リーセイに由来する公知の変異株である QM6a 株 (NBRC31326)、QM9414 株 (NBRC31329)、PC-3-7 株 (ATCC66589)、QM9123 株 (NBRC31327)、RutC-30 株 (ATCC56765)、CL-847 株 (Enzyme. Microbiol. Technol. 10, 341-346 (1988))、MCG77 株 (Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 89 (1978))、MCG80 株 (Biotechnol. Bioeng. 12, 451-459 (1982)) 及びこれらの派生株などが挙げられる。

[0015] さらに、本発明で用いるトリコデルマ属真菌は、カーボン・カタボライト・リプレッショ�이解除されていることが好ましい。カーボン・カタボライト・リプレッショ이解除されている株は、セルラーゼなどのタンパク質の生産量が向上しているため、より多くのタンパク質を生産することが可能になる。さらに好ましくは、カーボン・カタボライト・リプレッサーを介してなされるカーボン・カタボライト・リプレッショ이解除されている株であることが好ましい。例えばカーボン・カタボライト・リプレッサー I 遺伝子 (*c re 1*) に変異が入って入ることによりカーボン・カタボライト・リプレッサー I を介してなされるカーボン・カタボライト・リプレッショ이解除される。*c re 1* 遺伝子がコードする CRE1 タンパク質はグルコースに

によるカタボライト・リプレッションにより、セルラーゼ遺伝子の発現を抑制することが知られている (FEBS Lett., 376, 103–107, 1995)。よってcre1遺伝子に変異が入るとセルラーゼ遺伝子の発現抑制が解除され、セルラーゼの生産量が高まる。そのため、cre1遺伝子に変異が入った株はよりタンパク質やセルラーゼ組成物の製造に適する。具体的なカーボン・cre1遺伝子の変異の例としては、PC-3-7株 (ATCC66589) のcre1遺伝子において、232番目のAがCに置換され、その結果アミノ酸配列の78番目のスレオニンがプロリンに置換されていることが挙げられる。この変異が入ることにより、セルラーゼの生産量が向上することが知られている (Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (3), 534–543, 2013)。また、Rut C-30株 (ATCC56765) ではcre1遺伝子が部分的に切断され、カーボン・カタボライト・リプレッションが解除されていることが知られている (BMC Genomics., 9, 327, 2008)。ここでcre1遺伝子に変異が入っている株とは、遺伝子変異剤、紫外線照射、などによりcre1遺伝子領域内の塩基の欠失若しくは挿入によるフレームシフト、又は塩基の置換によるストップコドン変異、又は塩基の切断が入っている株を含み、さらに組換えなどによりcre1遺伝子の全部又は一部を除去又は他の遺伝子と置換している株も含まれる。具体的には、PC-3-7株 (ATCC66589) やRut C-30株 (ATCC56765) さらに、PC-3-7株 (ATCC66589) やRut C-30株 (ATCC56765) の特徴を引き継いだ株が好ましく用いられ、さらに好ましくは、PC-3-7株 (ATCC66589) または、PC-3-7株 (ATCC66589) の特徴を受け継いだ株である。ここでPC-3-7 (ATCC66589) やRut C-30株 (ATCC56765) の特徴を引き継いだ株には、PC-3-7株 (ATCC66589) やRut C-30株 (ATCC56765) の特徴を引き継いだ株に新たに変異を加えた株や組換えにより機能を向上させた株も含まれる。

[0016] トリコデルマ・リーセイのBXL 1のアミノ酸配列を配列番号2に示し、このアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号1に示す。本発明において、F n 3 - I i k e ドメインを欠失させる前の親遺伝子として、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を好ましく用いることができるが、配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらに好ましくは99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列から成るポリペプチドであって β -キシロシダーゼ活性を持つポリペプチドをコードする遺伝子も親遺伝子として利用可能である（以下、配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列から成るポリペプチドであって β -キシロシダーゼ活性を持つポリペプチドのアミノ酸配列を便宜的に「配列番号2類似アミノ酸配列」と呼ぶ）。ここで、二者のアミノ酸配列の配列同一性は、一致するアミノ酸の数が最も多くなるように配列を整列し、一致しているアミノ酸の数を全体のアミノ酸の数（全体のアミノ酸の数が異なる場合には長い方のアミノ酸の数）で除したものを百分率で表したものであり、BLASTのような周知のソフトにより容易に算出できる。同様に二者の塩基配列の配列同一性は、一致する塩基の数が最も多くなるように配列を整列し、一致している塩基の数を全体の塩基の数（全体の塩基の数が異なる場合には長い方の塩基の数）で除したものを百分率で表したものであり、BLASTのような周知のソフトにより容易に算出できる。

[0017] 本発明のトリコデルマ属真菌は、 β -キシロシダーゼ活性が欠失している。 β -キシロシダーゼとはキシロースが β -1, 4-結合したキシロビオースを分解してキシロースを産生する酵素である。 β -キシロシダーゼの酵素活性（U：ユニット）は、例えばp-NP-XyIを基質として活性を測定することができる。本発明で β -キシロシダーゼ活性が欠失した、とはBXL 1遺伝子のF N 3 - I i k e ドメインを欠失する前の親株に比べて、 β -キシロシダーゼ活性が10分

の 1 以下に低下したことを探し、さらに好ましくは 20 分の 1 以下、さらに好ましくは 50 分の 1 以下、さらに好ましくは 80 分の 1 以下、最も好ましくは 100 分の 1 以下である。本発明では活性とは酵素液中に含まれるタンパク質 1 mg 当たりの U として算出する。

[0018] 本発明では、 β -キシリシダーゼ活性の欠失は BXL 1 の Fn3-1ike e ドメインの欠失により行なわれる。配列番号 2 に示すアミノ酸配列から成る BXL 1 における Fn3-1ike ドメインは、配列番号 2 の第 695 残基から第 759 残基までの領域を指す。配列番号 2 類似アミノ酸配列の場合には、配列番号 2 における第 695 残基から第 759 残基までの領域に対応する領域を指す。ここで、「対応する領域」とは、配列番号 2 のアミノ酸配列と配列番号 2 類似アミノ酸配列とを一致するアミノ酸の数が最も多くなるように配列を整列した場合に配列番号 2 の第 695 残基から第 759 残基までの領域に整列する領域を指す。配列番号 1 に示す塩基配列の場合の「対応する領域」も同様に、配列番号 1 の塩基配列と、もう一方の塩基配列とを一致する塩基の数が最も多くなるように配列を整列した場合に、配列番号 1 の塩基配列中の領域と整列される領域を意味する。なお、以下の説明では、トリコデルマ・リーセイの BXL 1 のアミノ酸配列を示す配列番号 2 のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列（配列番号 1）に基づいて説明するが、これらの説明は、配列番号 2 類似アミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列についても当てはまるものであり、その場合には、配列番号 2 又は配列番号 1 中の特定の領域は、配列番号 2 類似アミノ酸配列又はそれをコードする塩基配列における対応する領域を意味する。

[0019] 本発明では Fn3-1ike ドメインの欠失とは、そのドメインが全て無くなる、一部が無くなる、全てが異なるアミノ酸に変わる、一部が異なるアミノ酸に変わる、またはそれらの組み合わせのことを指す。さらに具体的には変異前の親（配列番号 2 又は配列番号 2 類似アミノ酸配列）の Fn3-1ike ドメインのアミノ酸配列と配列同一性が 80% 以下になることを指し、好ましくは 50% 以下であり、さらに好ましくは 20% 以下であり、さら

に好ましくは10%以下であり、さらに好ましくは5%以下であり、さらに好ましくは3%以下であり、さらに好ましくは1%以下であり、最も好ましくは0%である。

[0020] Fn3-lik eドメインの欠失の方法としては、変異剤あるいは紫外線照射などによる変異処理、もしくは遺伝子組換えすることにより行なわれる。具体的にはC末端ドメイン（後述）よりも下流で前記Fn3-lik eドメインよりも上流の領域をコードする遺伝子領域（配列番号1に示すトリコデルマ・リーセイのBXL1遺伝子塩基配列では1929番目から2082番目まで）内の塩基の欠失若しくは挿入によるフレームシフト、又は塩基の置換によるストップコドン変異によるものである。あるいは、Fn3-lik eドメインの塩基配列内での塩基配列内の塩基の欠失、挿入によるフレームシフト、または塩基の置換によるストップコドン変異によるものである。また、遺伝子組換えでのFn3-lik eドメインの欠失は、Fn3-lik eドメインのアミノ酸の一部あるいは全てが無くなるか変化するよう行われる。

[0021] 本発明の変異型BXL1遺伝子は、Fn3-lik eドメインをコードする遺伝子配列は欠失しているが、糖質加水分解酵素ファミリー3（GH3）GH3のN末端ドメインとC末端ドメインをコードする遺伝子配列を有している。GH3のN末端ドメインはBXL1（配列番号2）の84残基から375残基までのことを指し、GH3のC末端ドメインはBXL1（配列番号2）の414残基から642残基までのことを指す。GH3のN末端ドメインとC末端ドメインはβ-キシロシダーゼの活性に関与していると考えられており、前述した、β-キシロシダーゼの活性に関与しているとされる、264番目、311番目、464番目のアミノ酸残基も、GH3ファミリーのN末端領域またはC末端領域に含まれている。ドメインを有する、とはそのドメインのアミノ酸配列が配列番号2から全く変化しないことを指す。β-グルコシダーゼのアミノ酸配列に、Fn3-lik eドメインや、GH3ファミリーのN末端配列とC末端配列が保存されていることは、NCBI（

The National Center for Biotechnology Information) がオンラインで提供しているアミノ酸配列の解析ソフト “Conserved Domains” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) を利用することによって、確認することができる。

- [0022] 本発明では、変異型BXL1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌は、遺伝子組み換えの手法や、遺伝子変異処理などを用いた非組換えの手法を用いて得ることができる。具体的には、NTG処理などで変異処理を行ない、生育してきたコロニーを培養し、 ρ -ニトロフェニル- β -キシロピラノシドの分解活性を測定し、活性が低下した株を取得することで、変異BXL1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌を得ることができる。
非組換え体を使用して製造する場合には、組換え体を使用して製造する際に必要な拡散防止処置を行わずに済むメリットがある。
- [0023] 本発明では、本発明のトリコデルマ属真菌を培養するとセルラーゼ組成物を得ることできる。得られたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解し、グルコースとキシロオリゴ糖の製造することができる。
- [0024] 本発明におけるセルラーゼ組成物とは、 β -1, 4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する種々の加水分解酵素の混合物である。セルラーゼ組成物に含まれる加水分解酵素とは例えば、セロビオハイドラーーゼ、キシラナーーゼ、エンドグルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -キシロシダーゼ、アラビノフラノシダーゼ、キシランエステラーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、 α -グルクロニダーゼ、キトサナーゼ、キチナーゼ、マンナナーーゼ、マンノシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。
- [0025] 本発明で得られるセルラーゼ組成物は、上記の加水分解酵素のうち、 β -キシロシダーゼ活性が欠失しており、 β -グルコシダーゼ活性が増加している。
- [0026] β -グルコシダーゼは、グルコースが β -1, 4-結合したセロビオース

を分解してグルコースを産生する酵素である。β-グルコシダーゼの酵素活性（U：ユニット）は、例えばp-ニトロフェニル-β-グルコピラノシド（p N P - G I u）を基質として活性を測定することができる。本発明でβ-グルコシダーゼ活性が増加した、B X L 1 遺伝子のF n 3 - I i k e ドメインを欠失する前の親株と比べてβ-グルコシダーゼ活性が0. 2 %以上に増加したことを指し、さらに好ましくは0. 5 %以上、さらに好ましくは1 %以上、さらに好ましくは2 %以上である。

[0027] 本発明では、トリコデルマ属真菌の培養方法については特に限定はないが、セルラーゼ組成物が生産される方法であれば良く、トリコデルマ属細菌の周知の培養方法を採用することができる。使用する培地に含まれる炭素源および誘導剤としてはバイオマスが好ましく使用される。窒素源としては、例えば、ポリペプトン、肉汁、CSL、大豆かすなどが用いられる。その他、この培地には目的とするセルラーゼを生産する上で必要とされる成分を添加することができる。培養には、振とう培養、攪拌培養、攪拌振とう培養、静置培養、連続培養など、様々な培養方式を採用しうるが、好ましくは、振とう培養または攪拌培養である。培養温度は、通常、20°C～35°C、好ましくは25°C～31°Cであり、培養時間は、通常、3～10日、好ましくは4～9日である。

[0028] 本発明において培養時にはセルラーゼ組成物量を増加させるために誘導剤を添加しても良い。使用される誘導剤は特に限定はないが、バイオマスが好ましく使用される。本発明においてバイオマスは、再生可能な生物由来の有機性資源である。また、バイオマスの中でもセルロースとキシランを含むバイオマスが好ましく使用され、具体的には、パルプ、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、コーンハル、稻わら、麦わらなどの草本系バイオマス、樹木、廃建材などの木質系バイオマスなどを例として挙げることができる。これらの誘導剤は培養液に添加しやすいように、処理がされていても良い。具体的な処理方法には、酸処理、硫酸処理、希硫酸処理、アルカリ処理、水熱処理、亜臨界処理、微粉碎処理、蒸煮

処理など公知の手法を用いることができる。

[0029] 誘導剤であるバイオマスに含まれるキシラン含有量は、特に限定はされないがバイオマス固体分重量に対して5重量%以上が好ましく、より好ましくは10重量%以上、さらに好ましくは20%重量以上である。バイオマスに含まれるセルロース含有量、キシラン含有量の測定方法は特に限定されないが、具体的には以下の方法で測定することができる。まず、測定したいバイオマス試料を風乾後ウィレーミルなどにより粉碎し、適量を分取し、105°Cで乾燥後の重量減から水分率(wt%)を算出する。その後、試料の適量(約0.3g)を天秤ではかりとり、72%硫酸3mLを加え、30°Cでときどき攪拌しながら1時間放置する。この反応液を精製水84mLと混合した後、120°Cで1時間オートクレーブで加熱分解する。加熱分解後、分解液と残渣をろ別し、ろ液と残渣の洗液を加えて100mLにメスアップし、高速液体クロマトグラフ法により単糖(グルコース、キシロース等)の定量を行う。得られた単糖濃度(グルコース、キシロース)と、試料分解量(水分率から無水ベース重量を算出)から、試料中の含有量(セルロース、キシラン)を算出する。

[0030] 本発明において誘導剤として使用するバイオマスの量は特に制限はされないが、5重量%から20重量%が好ましく、より好ましくは8重量%から15重量%であり、さらに好ましくは8重量%から12重量%である。

[0031] 本発明で製造されたセルラーゼ組成物の使用方法は特に限定されないが、糖の製造に好ましく使用される。さらに好ましくはキシロオリゴ糖の製造に使用され、さらに好ましくはキシロオリゴ糖とグルコースの製造に使用される。

[0032] 本発明における「キシロオリゴ糖」とは、少なくともキシロースが2個以上 β -グリコシド結合で連結したキシロオリゴ糖のことを指す。キシロオリゴ糖の重合度は、特に限定されないが、水溶性が高い2糖(キシロビオース)から6糖(キシロヘキサオース)であることが好ましい。最も好ましくは、腸内細菌が炭素源として資化しやすい、キシロビオース、キシロトリオ-

ス、キシロテトラオースを含むことが好ましい。

- [0033] 本発明においてセルラーゼ組成物はトリコデルマ属真菌を培養して得られ、バイオマスの糖化反応に使用される。セルラーゼ組成物の調整方法は特に限定はされないが、培養液に含まれるトリコデルマ属真菌の菌体が除去、もしくは生育していないことが好ましい。これはセルラーゼ組成物とバイオマスを糖化反応する際に生じるグルコースやキシロオリゴ糖が菌体により消費されるのを防ぐためである。菌体の除去方法としては、遠心分離、膜分離などが例として挙げられる。菌体が生育しないようにする処理方法としては、熱処理、薬剤処理、酸・アルカリ処理、UV処理などが挙げられる。
- [0034] 次に本発明における加水分解反応について説明する。加水分解反応に使用するバイオマスはセルロースおよびキシランを含むバイオマスであれば特に限定はされず、種子植物、シダ植物、コケ植物、藻類、水草などの植物の他、パルプ、廃建材なども用いることができる。種子植物は、裸子植物と被子植物に分類されるが、どちらも好ましく用いることができる。裸子植物の具体例としては、ソテツ、イチョウ、マツ、モミ、トウヒ、スギなどが挙げられる。被子植物はさらに単子葉植物と双子葉植物に分類されるが、単子葉植物の具体例としては、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、コーンコブ、稻わら、麦わらなどが挙げられ、双子葉植物の具体例としては、ビートパルプ、ユーカリ、ナラ、シラカバなどが好ましく用いられる。
- [0035] これらのセルロースおよびキシランを含むバイオマスは、加水分解反応が進みやすいように前処理されていてもよい。前処理方法としては、特に限定されないが、具体的には、酸処理、硫酸処理、希硫酸処理、アルカリ処理、水熱処理、亜臨界処理、微粉碎処理、蒸煮処理など公知の手法を用いることができる。また、反応pHについても特に限定はされないが、pHが3から7付近が好ましく、より好ましくは4から6であり、より好ましくは5付近である。反応温度についても特に限定はされないが、40°Cから70°Cが好ましい。また、反応に使用するセルラーゼ組成物の量についても特に限定は

されない。また、反応時間についても特に限定はされない。

[0036] 本発明の糖化反応から製造される反応後液には、キシロオリゴ糖とグルコースのほかに、セルラーゼ組成物に含まれる加水分解酵素によって生じたマンノース、アラビノース、ガラクトースなどの单糖や、セロビオース、セロテトラオース、マンノビオース、ガラクトビオースなどのオリゴ糖などが含まれていてもよい。

[0037] 本発明の糖化反応から製造される反応後液には、不純物として、無機塩、アミノ酸、タンパク質、リグニンなども含まれていてもよく、またこれらの不純物を除去するために、精製操作を行ってもよい。精製操作としては、イオン交換、膜分離、晶析、脱塩など公知の手法が適用できる。

[0038] 本発明により製造された单糖画分（グルコース、キシロース等）とキシロオリゴ糖等画分は後工程により分離されることが好ましい。グルコースは発酵原料として化学品の製造に好ましく使用され、キシロオリゴ糖は飼料や食品、化粧品用途に好ましく使用される。化学品の具体例としては、エタノール、1, 3-プロパンジオール、1, 4-ブタンジオール、グリセロールなどのアルコール、酢酸、乳酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、イタコン酸、クエン酸などの有機酸、イノシン、グアノシンなどのヌクレオシド、イノシン酸、グアニル酸などのヌクレオチド、カダベリンなどのアミン化合物を挙げることができる。

実施例

[0039] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0040] 参考例 1 タンパク質濃度測定方法

市販のタンパク質濃度測定試薬（Quick Start Bradford プロテインアッセイ、Bio-Rad 製）を使用した。室温に戻したタンパク質濃度測定試薬 250 μL に希釈した糸状菌由来セルラーゼ溶液を 5 μL 添加し、室温で 5 分間静置後の 595 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。標準品として BSA を使用し、検量線に照らし

合わせてタンパク質濃度を算出した。

[0041] 参考例2 β -キシロシダーゼ活性測定方法

β -キシロシダーゼ活性測定方法は具体的には1 mM p-ニトロフェニル- β -キシロピラノシド（シグマアルドリッヂャパン社製）を含有する50 mM酢酸バッファー90 μ L中で酵素希釈液10 μ Lを用いて30°Cで反応を行い、30分後に2 M炭酸ナトリウム10 μ Lを加えてよく混合して反応を停止し、405 nmの吸光度の増加を測定した。1分間あたり1 μ moIのp-ニトロフェノールを遊離する活性を1 Uと定義した。ブランクは1 mM p-ニトロフェニル- β -キシロピラノシドを含有する50 mM酢酸バッファー90 μ Lに2 M炭酸ナトリウム10 μ Lを加えてよく混合し、その後酵素希釈液10 μ Lを添加し30°Cで30分間反応させた。その後、405 nmの吸光度の増加を測定した。

[0042] 参考例2 β -グルコシダーゼ活性測定方法

β -グルコシダーゼ活性測定方法は具体的には1 mM p-ニトロフェニル- β -グルコピラノシド（シグマアルドリッヂャパン社製）を含有する50 mM酢酸バッファー90 μ L中で酵素希釈液10 μ Lを用いて30°Cで反応を行い、10分後に2 M炭酸ナトリウム10 μ Lを加えてよく混合して反応を停止し、405 nmの吸光度の増加を測定した。1分間あたり1 μ moIのp-ニトロフェノールを遊離する活性を1 Uと定義した。ブランクは1 mM p-ニトロフェニル- β -グルコピラノシドを含有する50 mM酢酸バッファー90 μ Lに2 M炭酸ナトリウム10 μ Lを加えてよく混合し、その後酵素希釈液10 μ Lを添加し30°Cで30分間反応させた。その後、405 nmの吸光度の増加を測定した。

[0043] 参考例3 セロビオハイドロラーゼ活性測定方法

セロビオハイドロラーゼ活性測定方法は具体的には1 mM p-ニトロフェニル- β -ラクトピラノシド（シグマアルドリッヂャパン社製）を含有する50 mM酢酸バッファー90 μ L中で酵素希釈液10 μ Lを用いて30°Cで反応を行い、60分後に2 M炭酸ナトリウム10 μ Lを加えてよく混合し

て反応を停止し、405 nmの吸光度の増加を測定した。1分間あたり1 μmolのp-ニトロフェノールを遊離する活性を1Uと定義した。ブランクは 1 mM p-ニトロフェニル-β-ラクトピラノシドを含有する50 mM酢酸バッファー 90 μLに2 M炭酸ナトリウム 10 μLを加えてよく混合し、その後酵素希釈液 10 μLを添加し30°Cで30分間反応させた。その後、405 nmの吸光度の増加を測定した。

[0044] 参考例4 糖濃度の測定

キシロオリゴ糖、グルコース、キシロースは、日立高速液体クロマトグラフ La Chrom Elite (HITACHI) を用いて、以下の条件で定量分析した。キシロオリゴ糖であるキシロビオース、キシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペントオース、キシロヘキサオース、およびグルコース、キシロースの標準品で作製した検量線をもとに、定量分析した。なお、本実施例で記すキシロオリゴ糖とは、キシロース単位がβグリコシド結合により2～6個結合したキシロオリゴ糖を指す。

カラム：KS802、KS803 (Shodex)

移動相：水

検出方法：RI

流速：0.5 mL/min

温度：75°C

[0045] 比較例1 トリコデルマ・リーセイ PC-3-7株のBXL1遺伝子破壊組み換え株の作製

相同組み換えで目的遺伝子を破壊する方法としては、マーカー遺伝子を含むDNAの上流及び下流に、導入目的箇所に相同的な部分を附加するようデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR断片を糸状菌に形質転換する方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。

[0046] 形質転換は、標準的な方法（プロトプラスト-PAGE法）を行った。宿主はPC-3-7株を使用し、マーカーはアセトアミドダーゼ (Amidase) 遺伝子を使用した。

[0047] 得られた形質転換体へ A m d S 遺伝子導入の確認は、 P D A 培地で培養した形質転換株から、 ゲノム D N A を抽出し、 これを鑄型として P C R により行った。 P D A 培地の組成は D i f c o ポテトデキストロースブロース (B D 社) 24 g / L である。その結果、 形質転換体において、 B X L 1 遺伝子と A m d S 遺伝子カセットが置換されていることが確認された。前記工程で得られた、 B X L 1 座に A m d S 遺伝子カセットが導入された P C - 3 - 7 株を、 以下、 P C - 3 - 7 / △ B X L 1 株と称す。この株は B X L 1 遺伝子の O R F の 3 つのドメインを全て失った株である。

[0048] 実施例 1 変異 B X L 1 をコードする遺伝子を有するトリコデルマ・リーセイ P C - 3 - 7 株の作製

変異 B X L 1 遺伝子として配列番号 3 の塩基配列を使用した。この変異 B X L 1 遺伝子はトリコデルマ・リーセイの B X L 1 遺伝子（配列番号 1）の 1940 番目と 1941 番目の塩基配列が欠失し、 その後のアミノ酸配列がフレームシフトしている塩基配列である。この変異 B X L 1 遺伝子がコードするアミノ酸配列と配列番号 2 の F n 3 - l i k e ドメインのアミノ酸配列との相同性は 0 % であった。この変異 B X L 1 遺伝子は、 人工合成により作成した。

[0049] 変異 B X L 1 遺伝子を含む D N A を染色体中の B X L 1 遺伝子のプロモーターの下流に相同組み換えで挿入する方法としては、 変異 B X L 1 遺伝子を含む D N A の上流及び下流に、 導入目的箇所に相同意的な部分を付加するようデザインしたプライマーを用いて P C R を行い、 得られた P C R 断片を糸状菌に形質転換する方法が挙げられるが、 これに限定されるものではない。

[0050] 形質転換は、 標準的な方法（プロトプラスト - P E G 法）で行った。宿主は P C - 3 - 7 株を使用し、 マーカーはアセトアミドダーゼ（A m d S）遺伝子を使用した。図 1 に分子生物学的操作により作製した変異 B X L 1 遺伝子挿入のためのプラスミドを示す。このプラスミドは変異 B X L 1 遺伝子（配列番号 3）を含み、 その後に B X L 1 遺伝子の終始コドンの下流 500 b p を含んでいる。さらに、 アセトアミダーゼ遺伝子カセットと、 B X L 1 遺伝

子の下流 501 bp から約 2.5 kb に相同的な遺伝子配列も含まれている。このプラスミドから変異 BXL1 遺伝子挿入カセットを PCR で増幅し、組換えに使用した。より具体的には、形質転換方法は Gene, 61, 165–176 (1987) に記載されたようにして行った。また、変異 BXL1 遺伝子挿入カセットの PCR による増幅はデザインしたプライマー（配列番号 5 号、配列番号 6）を使用して行った。

[0051] 得られた形質転換体への目的遺伝子導入の確認は、PDA 培地で培養した形質転換株から、ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として PCR により行った。具体的には、デザインしたプライマー（配列番号 7、配列番号 8）を使用して確認した。その結果、形質転換体において、変異 BXL1 遺伝子カセットが BXL1 遺伝子の開始コドンから導入されていることが確認された。得られた PC-3-7 株を、以下、PC-3-7 / 変異 BXL1 株と称す。

[0052] 比較例 2 トリコデルマ・リーセイ PC-3-7 株由来セルラーゼ組成物の作製
前培養

トリコデルマ・リーセイ PC-3-7 株の胞子を $1.0 \times 10^7 / mL$ になるように生理食塩水で希釈し、その希釈胞子溶液 $2.5 mL$ を $1 L$ バッフル付フラスコに入れた表 1 に記した組成で構成される前培養液 $250 mL$ へ接種させた。接種させた前培養液を $28^\circ C$ 、 $160 rpm$ の培養条件にて 3 日間培養を行った。

[0053] [表1]

成分	1 L 当たり
D-グルコース	20 g
5 × マンデルス **	200 mL
10 × 酒石酸アンモニウム	100 mL
コーンスティープリカーナ	15 g
微量元素*	1 mL
Tween 80	0.5 mL
消泡剤 (PE-M)	1 mL

*微量元素溶液は、0.3 g/L H₃BO₃、1.3 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、5 g/L FeCl₃·6H₂O、2 g/L CuSO₄·5H₂O、0.4 g/L MnCl₂·4H₂O、10 g/L ZnCl₂を含む。

**マンデルスは、7 g/L (NH₄)₂SO₄、10 g/L KH₂PO₄、3 g/L CaCl₂、3 g/L MgSO₄·7H₂Oを含む。

[0054] 本培養

トリコデルマ・リーセイ PC-3-7 株の前培養液 250 mL をそれぞれ 5 L 容ミニジャーに入れた表 2 に示した本培養液 2.5 L (バイオマス 250 g をさらに含む) へ接種させ、28°C、700 rpm、1vvm、pH 5 の培養条件にて 5 日間培養を行った。中和は 10% アンモニアと 1 N 硫酸を使用した。バイオマスは、Arboce I (登録商標) (J. Retttenmaier & Sohne) を使用した。

[0055] [表2]

成分	1 L 当たり
Arboce I (登録商標) *** (J. Retttenmaier & Sohne)	100 g
5 × マンデルス **	200 mL
コーンスティープリカーチ	25 g
微量元素*	1 mL
Tween 80	0.5 mL
消泡剤 (PE-M)	1 mL

*微量元素溶液は、0.3 g/L H₃BO₃、1.3 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、5 g/L FeCl₃·6H₂O、2 g/L CuSO₄·5H₂O、0.4 g/L MnCl₂·4H₂O、10 g/L ZnCl₂を含む。

**マンデルスは、7 g/L (NH₄)₂SO₄、10 g/L KH₂PO₄、3 g/L CaCl₂、3 g/L MgSO₄·7H₂Oを含む。

*** Arboce I は他成分を混合し、メスアップした後に添加する。

[0056] 培養液の採取

培養開始より2日おきに500μLずつ培養液を採取した。そして、15,000×g、4℃の条件下で10分間遠心分離を行い、上清を得た。その上清を0.22μmのフィルターでろ過し、そのろ液を培養上清液とした。酵素活性測定、糖化反応には培養5日目の培養上清液を使用した（表3）。

[0057] [表3]

	比較例2	比較例3	実施例2
使用株	PC-3-7	PC-3-7／△BXL1	PC-3-7／変異BXL1
β-キシロシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.400	0.002	0.002
β-グルコシダーゼ活性 (U/mg protein)	0.420	0.520	0.530
セロビオヒドロラーゼ活性 (U/mg protein)	0.158	0.159	0.159

[0058] 比較例3 トリコデルマ・リーセイPC-3-7／△BXL1株由来セルラーゼ組成物の作製

トリコデルマ・リーセイPC-3-7／△BXL1株を使用すること以外は比較例2と同様に行い、培養5日目の培養上清液を酵素活性測定、糖化反応に使用した（表3）。その結果、β-キシロシダーゼ活性が親株のPC-3-7株よりも顕著に減少していた。

[0059] 実施例2 トリコデルマ・リーセイPC-3-7／変異BXL1株由来セルラーゼ組成物の作製

トリコデルマ・リーセイPC-3-7／変異BXL1株を使用すること以外は比較例2と同様に行い、培養5日目の培養上清液を酵素活性測定、糖化反応に使用した（表3）。その結果、β-キシロシダーゼ活性がトリコデルマ・リーセイPC-3-7／△BXL1株と同等にまで減少していることが判明した。さらにトリコデルマ・リーセイPC-3-7／△BXL1株よりもβ-グルコシダーゼ活性が増加していることが判明した。

[0060] 比較例4 トリコデルマ・リーセイPC-3-7株由来セルラーゼ組成物を使用した糖化反応によるキシロオリゴ糖とグルコースの製造

比較例2で得られたろ液を使用して糖化反応を行った。糖化反応に使用し

たバガスはアルカリ処理（前処理）を行ったバガスを使用した。糖化反応は以下のようにして行った。2 mLチューブの中にアルカリ処理をしたバガスを乾燥重量50 mg分入れ、バガスの固体分濃度が反応開始時に5重量%となるように純水を加えつつ、希塩酸を用いてpH 5.0に調整した。pHを調製した前処理物に8 mg/g一バイオマスになるようにセルラーゼ組成物を添加して、ヒートブロックローターを用いてpH 5.0、50°Cの反応条件で反応を開始した。反応中は適宜pH 5.0になるように調整を行った。8時間後に99度の湯浴に5分間浸けて反応を停止した。反応液は8,000×gの条件下で5分間遠心分離を行い、上清を得た。その上清を0.22 μmのフィルターでろ過し、そのろ液を参考例5に従いキシロオリゴ糖とグルコースの分析に供した（表4）。

[0061] [表4]

	比較例4	比較例5	実施例3
使用株	PC-3-7	PC-3-7/ △BXL1	PC-3-7/ 変異BXL1
キシロオリゴ糖合計 (g/L)	0.8	6.9	6.9
グルコース (g/L)	9.2	10.3	11.0

[0062] 比較例5 トリコデルマ・リーセイPC-3-7/△BXL1株由来セルラーゼ組成物を使用した糖化反応によるキシロオリゴ糖とグルコースの製造
比較例3で得られたろ液を使用して糖化反応を行った。糖化反応は比較例4と同様に行った（表4）。その結果、親株のPC-3-7株よりもキシロオリゴ糖の収量が顕著に増加していた。

[0063] 実施例3 トリコデルマ・リーセイPC-3-7/変異BXL1由来セルラーゼ組成物を使用した糖化反応によるキシロオリゴ糖とグルコースの製造
実施例2で得られたろ液を使用し、比較例4と同様に糖化反応を行った（表4）。その結果、トリコデルマ・リーセイPC-3-7/△BXL1株のろ過液と同等のキシロオリゴ糖収量を得ることが判明し、さらにグルコースの収量が増加していることが判明した。

産業上の利用可能性

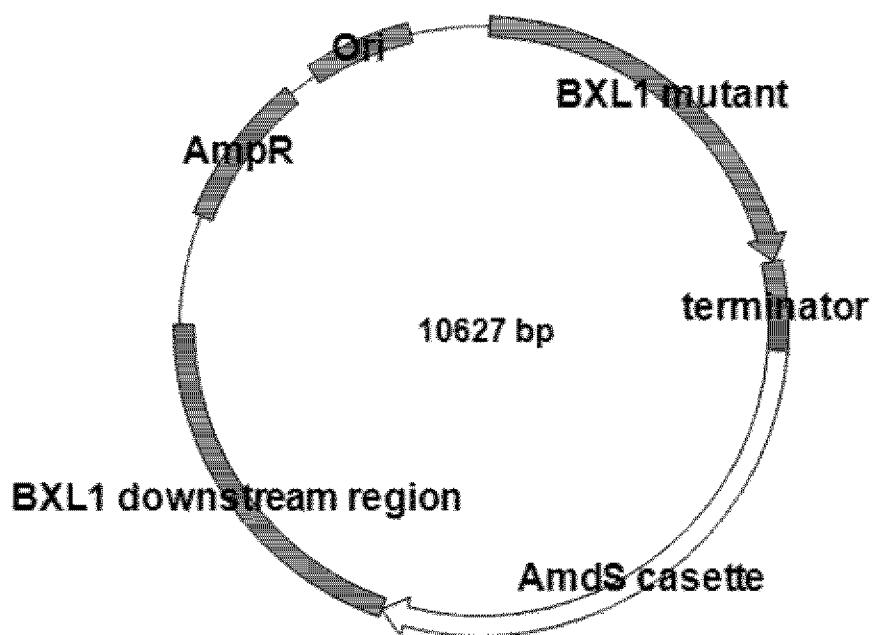
[0064] BXL 1 遺伝子の *Fnl3-1ike* ドメインを欠失することで β -キシロシダーゼ活性を欠失することができる。さらに BXL 1 遺伝子の 3 つのドメインを全て破壊した株と比較して β -グルコシダーゼ活性が増加し、キシロオリゴ糖とグルコースを効率良く製造することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 配列番号2に記載のアミノ酸配列から成る β -キシロシダーゼ1又は配列番号2に記載のアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列から成るポリペプチドであって β -キシロシダーゼ活性を持つポリペプチドにおける糖質加水分解酵素ファミリー3(GH3)のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、Fn3-likedomainを欠失し、かつ β -キシロシダーゼ活性が欠失した変異型 β -キシロシダーゼ1をコードする変異型BXL1遺伝子を有するトリコデルマ属真菌。
- [請求項2] 前記配列同一性が95%以上である請求項1記載のトリコデルマ属真菌。
- [請求項3] 前記変異型BXL1遺伝子は、配列番号2に記載のアミノ酸配列から成る β -キシロシダーゼ1におけるGH3のN末端ドメインとC末端ドメインを有し、Fn3-likedomainを欠失した変異型ポリペプチドをコードするものである請求項1又は2記載のトリコデルマ属真菌。
- [請求項4] 前記Fn3-likedomainの欠失が、前記C末端ドメインよりも下流で前記Fn3-likedomainよりも上流の領域をコードする遺伝子領域内の塩基の欠失若しくは挿入によるフレームシフト、又は塩基の置換によるストップコドン変異によるものである、請求項1～3のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌。
- [請求項5] 前記トリコデルマ属真菌が非組換え体である、請求項1～4のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌。
- [請求項6] 前記トリコデルマ属真菌がトリコデルマ・リーセイである、請求項1～5のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌。
- [請求項7] 前記トリコデルマ属真菌が、カーボン・カタボライト・リプレッショング解除されている株である、請求項5に記載のトリコデルマ属真菌。

- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項に記載のトリコデルマ属真菌を培養する工程を含む、セルラーゼ組成物の製造方法。
- [請求項9] 請求項8記載の方法により製造されたセルラーゼ組成物を回収する工程と、得られたセルラーゼ組成物でキシランとセルロースを含むバイオマスを加水分解する工程を含む、グルコースとキシロオリゴ糖の製造方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013379

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/14(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N15/01 (2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i, C13K1/02(2006.01)i, C13K13/00(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, C12N1/14, C12N1/15, C12N15/01, C12P19/14, C13K1/02, C13K13/00

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (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.
A	MARGOLLES-CLARK E et al., Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from <i>Trichoderma reesei</i> by expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Appl. Environ. Microbiol., 1996, Vol.62, No.10, pp. 3840-3846, Abstract	1-9
A	JP 2013-515482 A (Danisco US Inc.), 09 May 2013 (09.05.2013), examples 4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2 examples 4, 5	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	"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 26 May 2017 (26.05.17)	Date of mailing of the international search report 06 June 2017 (06.06.17)
---	---

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/JP2017/013379

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-507837 A (Danisco Ingredients A/S (Danisco A/S)), 13 July 1999 (13.07.1999), claims & US 6177261 B1 & EP 833922 A1 & WO 1997/000962 A1 claims	1-9
A	HERRMANN MC et al., The β -d-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional β -d-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal, 1997, Vol.321, No.2, pp.375-381, Abstract	1-9
A	RASMUSSEN LE et al., Mode of action and properties of the beta-xylosidases from Talaromyces emersonii and Trichoderma reesei, Biotechnol. Bioeng., 2006, Vol.94, No.5, pp. 869-876, Abstract	1-9
A	MAO LS et al., Study on production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by selectively purified endo- β -xylanase, Linchan Huaxue Yu Gongye, 2006, Vol.26, No.1, pp.124-126, Abstract	1-9
A	WO 2014/208493 A1 (Toray Industries, Inc.), 31 December 2014 (31.12.2014), paragraphs [0025], [0026] (Family: none)	1-9
A	WO 2015/099109 A1 (Toray Industries, Inc.), 02 July 2015 (02.07.2015), paragraph [0015] & US 2016/0326559 A1 & EP 3088530 A1 paragraph [0016]	1-9
A	JP 2009-171885 A (Nippon Paper Industries Co., Ltd.), 06 August 2009 (06.08.2009), paragraph [0025] (Family: none)	1-9
A	JP 4675139 B2 (Suntory Holdings Ltd.), 20 April 2011 (20.04.2011), claims & WO 2006/112380 A1 & US 2009/0062232 A1 claims	1-9
P,A	WO 2016/068223 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 May 2016 (06.05.2016), examples (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/013379

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 2016/100825 A1 (Danisco US Inc.), 23 June 2016 (23.06.2016), examples (Family: none)	1-9

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, C12N1/14(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N15/01(2006.01)i,
C12P19/14(2006.01)i, C13K1/02(2006.01)i, C13K13/00(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, C12N1/14, C12N1/15, C12N15/01, C12P19/14, C13K1/02, C13K13/00

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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/JST7580 (JDreamIII), CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (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 カテゴリーエ	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	MARGOLLES-CLARK E et al., Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from <i>Trichoderma reesei</i> by expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Appl. Environ. Microbiol., 1996, Vol. 62, No. 10, pp. 3840-3846, Abstract	1-9
A	JP 2013-515482 A (ダニスコ・ユース・インク) 2013.05.09, 実施例4, 5 & US 2013/0143277 A1 & EP 2516663 A1 & WO 2011/079048 A2, EXAMPLE4, EXAMPLE5	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

26. 05. 2017

国際調査報告の発送日

06. 06. 2017

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）

西村 亜希子

4N

3435

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	JP 11-507837 A (ダニスコ・イングレディエンツ・アー／エス (ダニスコ・アー／エス)) 1999.07.13, 特許請求の範囲 & US 6177261 B1 & EP 833922 A1 & WO 1997/000962 A1, Claims	1-9
A	HERRMANN MC et al., The β -d-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional β -d-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal, 1997, Vol. 321, No. 2, pp. 375-381, Abstract	1-9
A	RASMUSSEN LE et al., Mode of action and properties of the beta-xylosidases from Talaromyces emersonii and Trichoderma reesei, Biotechnol. Bioeng., 2006, Vol. 94, No. 5, pp. 869-876, Abstract	1-9
A	MAO LS et al., Study on production of xylo-oligosaccharides from xylan hydrolyzed by selectively purified endo-b-xylanase, Linchan Huaxue Yu Gongye, 2006, Vol. 26, No. 1, pp. 124-126, Abstract	1-9
A	WO 2014/208493 A1 (東レ株式会社) 2014.12.31, [0025], [0026] (ファミリーなし)	1-9
A	WO 2015/099109 A1 (東レ株式会社) 2015.07.02, [0015] & US 2016/0326559 A1 & EP 3088530 A1, [0016]	1-9
A	JP 2009-171885 A (日本製紙株式会社) 2009.08.06, [0025] (ファミリーなし)	1-9
A	JP 4675139 B2 (サントリーホールディングス株式会社) 2011.04.20, 特許請求の範囲 & WO 2006/112380 A1 & US 2009/0062232 A1, Claims	1-9
P, A	WO 2016/068223 A1 (東レ株式会社) 2016.05.06, 実施例 (ファミリーなし)	1-9
P, A	WO 2016/100825 A1 (DANISCO US INC) 2016.06.23, 実施例 (ファミリーなし)	1-9