(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 10 月 4 日(04.10.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/133275 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/057704

(22) 国際出願日: 2012 年 3 月 26 日(26.03.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2011-076715 2011 年 3 月 30 日(30.03.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): トヨタ自動車株式会社 **(TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA)** [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 Aichi (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 志佐 倫子 **(SHISA Noriko)** [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 赤田 倫治 **(AKADA Rinji)** [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１ 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 星田 尚司 **(HOSHIDA Hisashi)** [JP/JP]; 〒7558611 山口県宇部市常盤台２丁目１６－１ 国立大学法人山口大学工学部内 Yamaguchi (JP). 上村 毅 **(UEMURA Takeshi)** [JP/JP]; 〒2310815 神奈川県横浜市中区千鳥町８番 ＪＸ日鉱日石エネルギー株式会社内 Kanagawa (JP). 牟田口 梢栄 **(MUTAGUCHI Kozue)** [JP/JP]; 〒2310815 神奈川県横浜市中区千鳥町８番 ＪＸ日鉱日石エネルギー株式会社内 Kanagawa (JP). 徳弘 健郎 **(TOKUHIRO Kenro)** [JP/JP]; 〒4801192 愛知県長久手市横道４１番地の１ 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 片平 悟史 **(KATAHIRA Satoshi)** [JP/JP]; 〒4801192 愛知県長久手市横道４１番地の１ 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 **(HIRAKI Yusuke** et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕２丁目５番１号 愛宕グリーンヒルズＭＯＲＩタワー３２階 Tokyo (JP).

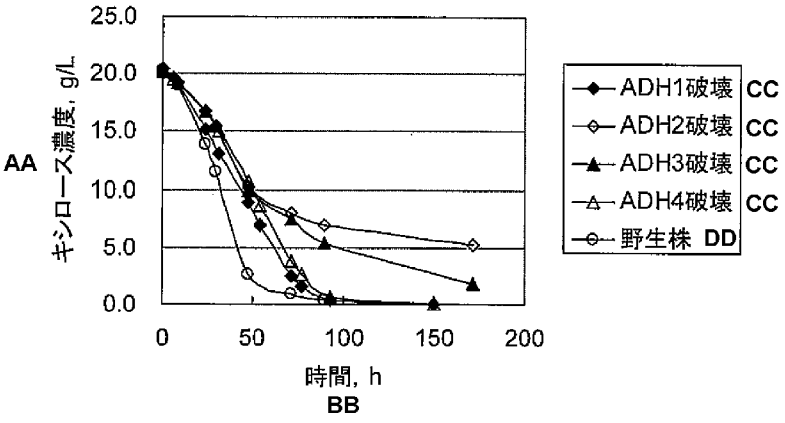
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,

[続葉有]

(54) **Title**: KLUYVEROMYCES YEAST MUTANT AND METHOD FOR PRODUCING ETHANOL USING SAME

(54) 発明の名称 : Kluyveromyces 属の変異体酵母及びこれを用いたエタノールの製造方法

[図1]



AA XYLOSE CONCENTRATION, g/L
BB TIME, h
CC KNOCKOUT
DD WILD STRAIN

(57) **Abstract**: The present invention modifies yeast belonging to the genus Kluyveromyces so as to enhance the ethanol yield from xylose. At least one gene in yeast belonging to the genus Kluyveromyces, selected from the group consisting of Kluyveromyces marxianus-derived ADH1 gene, a gene functionally equivalent to the ADH1 gene, a Kluyveromyces marxianus-derived ADH4 gene, and a gene functionally equivalent to the ADH4 gene, is attenuated.

(57) 要約: Kluyveromyces 属に属する酵母を、キシロースからのエタノール収率を向上するように改変する。 Kluyveromyces 属に属する酵母における、Kluyveromyces marxianus 由来 ADH1 遺伝子、当該 ADH1 遺伝子に機能的に等価な遺伝子、Kluyveromyces marxianus 由来 ADH4 遺伝子及び当該 ADH4 遺伝子に機能的に等価な遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１つの遺伝子を減弱化する。

WO 2012/133275 A1

SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

Kluyveromyces属の変異体酵母及びこれを用いたエタノールの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、Kluyveromyces属酵母を利用した変異体酵母及びこれを用いたエタノールの製造方法に関する。

背景技術

[0002] リグノセルロースを含むバイオマスは、エタノール等の有用なアルコールや有機酸の原料として有効に利用されている。リグノセルロースを含むバイオマスには、木質系バイオマス及び草本系バイオマスが含まれる。木質系バイオマスなどのリグノセルロースを含むバイオマスは、主としてセルロース、ヘミセルロース及びリグニンから構成されている。リグノセルロースを含むバイオマスからエタノール等液体燃料を製造するためには、セルロースやヘミセルロースを構成単糖にまで加水分解（糖化）し、発酵によって単糖をエタノールに変換する。セルロースはグルコースから構成され、ヘミセルロースは主としてアラビノースとキシロースから構成されている。したがって、リグノセルロースを含むバイオマスを利用してエタノールを製造する際には、グルコースのみではなくキシロースも発酵の基質として有効に利用されることが望ましい。

[0003] また、リグノセルロースを含むバイオマスからエタノールを製造する場合、上述した糖化反応と発酵反応とを同時に（各反応工程を区別することなく）行うことができれば製造コストの低減に繋がる。これを同時糖化発酵方法と称する。同時糖化発酵には、糖化酵素の反応温度領域（約40℃以上）で発酵が可能な耐熱性を有し、基質としてグルコースのみでなく５単糖のキシロースを利用できる微生物が必要となる。

[0004] 耐熱性を有する酵母としては、Kluyveromyces marxianus等のKluyveromyces属酵母が知られている。このKluyveromyces属酵母は、キシロースを利用し

てエタノール発酵を行うことができるが、その収率は不十分であった。例えば、非特許文献１及び２には、Saccharomyces cerevisiaeにおけるアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（複数のアイソマーを含む）について機能解析が報告されている。また、特許文献１には、キシロースをキシルロースに異性化する能力を付与された組換え酵母が開示されており、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を減少させることについても記載されている。しかしながら、これらの知見からは、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の欠損や破壊により、エタノール発酵能に対していかなる影響があるか判断することはできない。さらに、分類学的に異なる種であるKluyveromyces marxianus等のKluyveromyces属酵母におけるアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の機能を判断することはできない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表2005-514951号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：FEMS Yeast Research 2, (2002) p. 481-494

非特許文献2：FEMS Yeast Research 8, (2008) p. 967-978

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上述したように、Kluyveromyces属酵母は、キシロース資化性を有し、且つ耐熱性を有するため、上述した同時糖化発酵法等に有用な微生物として大きく期待されている。しかしながら、Kluyveromyces属酵母についてはキシロースからのエタノール収率が非常に悪く、またこれを改善する手段も知られていない。そこで、本発明は、このような実情に鑑み、キシロースからのエタノール収率を向上するように改変されたKluyveromyces属に属する変異体酵母、及び当該変異体酵母を用いたエタノールの製造方法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

[0008] 上述した目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、Kluyveromyces属酵母における複数のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のうち、特定の遺伝子を減弱化することで当該酵母におけるキシロースからのエタノール収率が大幅に向上することを見いだし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下を包含する。

[0009] （１）Kluyveromyces属に属する酵母における、Kluyveromyces marxianus由来ADH1遺伝子、当該ADH1遺伝子に機能的に等価な遺伝子、Kluyveromyces marxianus 由来ADH4遺伝子及び当該ADH4遺伝子に機能的に等価な遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１つの遺伝子を減弱化した変異体酵母。

[0010] （２）上記Kluyveromyces属に属する酵母は、Kluyveromyces marxianusであることを特徴とする（１）記載の変異体酵母。

[0011] （３）上記ADH1遺伝子に機能的に等価な遺伝子は、Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母に由来し、以下(a)～(c)いずれかのタンパク質をコードすることを特徴とする（１）記載の変異体酵母。

[0012] (a) 配列番号２のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号２のアミノ酸配列に対して90％以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

(c) 配列番号２のアミノ酸配列に対して１～複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入したアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

（４）上記ADH4遺伝子に機能的に等価な遺伝子は、Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母に由来し、以下(a)～(c)いずれかのタンパク質をコードすることを特徴とする（１）記載の変異体酵母。

[0013] (a) 配列番号４のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号４のアミノ酸配列に対して90％以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

(c) 配列番号４のアミノ酸配列に対して１～複数個のアミノ酸が欠失、置換

、付加又は挿入したアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

（５）（１）乃至（４）いずれか記載の変異体酵母をキシロース含有培地にて培養する工程と、その後、培地よりエタノールを回収する工程とを含む、エタノールの製造方法。

[0014] （６）上記培養する工程を、上記変異体酵母とリグノセルロースを含むバイオマスと糖化酵素とを含む反応系で実施されることを特徴とする（５）記載のエタノールの製造方法。

[0015] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-076715号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0016] 本発明に係る変異体酵母は、グルコースからのエタノール収率は殆ど変わらず、キシロースからのエタノール収率が大幅に向上している。したがって、本発明に係る変異体酵母は、例えば、木質系バイオマス等のリグノセルロースを含むバイオマスに由来するキシロースを含む培地において、高収率にエタノールを製造することができる。

[0017] 本発明に係るエタノールの製造方法は、キシロースからのエタノール収率が大幅に向上した変異体酵母を利用することで、エタノール製造効率を大幅に向上させることができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]キシロース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の培地中のキシロース濃度変化を示す特性図である。

[図2]キシロース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の培地中のエタノール濃度変化を示す特性図である。

[図3]キシロース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の菌体濃度変化を示す特性図である。

[図4]グルコース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の培地中のキシリトール濃度変化を示す特性図である。

[図5]グルコース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の培地中のエタノール濃度変化を示す特性図である。

[図6]グルコース含有培地にて４種類のADH破壊株を培養した際の菌体濃度変化を示す特性図である。

[図7]S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH1との間のアライメントを示す図である。

[図8]S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH2との間のアライメントを示す図である。

[図9]S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH3との間のアライメントを示す図である。

[図10]S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH4との間のアライメントを示す図である。

[図11]S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH1との間のアライメントを示す図である。

[図12]S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH2との間のアライメントを示す図である。

[図13]S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH3との間のアライメントを示す図である。

[図14]S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH4との間のアライメントを示す図である。

[図15]S. cerevisiae由来ADH1とS. cerevisiae由来ADH2との間のアライメントを示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明に係る変異体酵母は、Kluyveromyces属酵母における特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を減弱化したものであり、キシロースからのエタノール収率が向上した特徴を有している。

[0020] ここで、Kluyveromyces属酵母とは、K. aestuarii、K. africanus、K. bacillisporus、K. blattae、K. dobzhanskii、K. hubeiensis、K. lactis、K.

lodderae、K. marxianus、K. nonfermentans、K. piceae、K. sinensis、K. thermotolerans、K. waltii、K. wickerhamii及びK. yarrowii等の酵母を含む意味である。すなわち、本発明に係る変異体酵母は、これらの具体的なKluyveromyces属酵母及びその変異体に対して、特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を減弱化することで作製することができる。Kluyveromyces属酵母としては、特に、耐熱性酵母として知られているKluyveromyces marxianusを使用することが好ましい。Kluyveromyces marxianusとしては、特に限定されず、寄託機関に分譲可能に保存された公知の株を使用することができるし、また公知の株から派生した変異株を使用することもできる。Kluyveromyces marxianusの公知株としては、Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042株を挙げることができる。公知の株から派生した変異株とは、例えば、Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042株に対して栄養要求性を付与するためにura3遺伝子やleu2遺伝子を破壊した株を例示することができる。

[0021] 本発明に係る変異体酵母は、特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を減弱化したものである。ここで「遺伝子の減弱化」とは、当該遺伝子の発現量を低減すること、当該遺伝子がコードする酵素の活性を低減することの両者を含む意味である。例えば、特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊又は欠失させる方法、当該遺伝子の発現制御領域（プロモーター等）を破壊又は欠失させる方法、当該遺伝子に対するアンチセンスRNAを発現する方法等により、当該遺伝子の発現量を低減することができる。また、所謂、トランスポゾン法、トランスジーン法、転写後遺伝子サイレンシング法、RNAi法、ナンセンス仲介減衰（Nonsense mediated decay, NMD）法、リボザイム法、アンチセンス法、miRNA（micro-RNA）法、siRNA（small interfering RNA）法等を適用し、当該遺伝子の発現量を低減することができる。さらに、アルコールデヒドロゲナーゼの阻害剤を作用させる手法等により、当該遺伝子がコードする酵素の活性を低減することができる。なお、これらの方法を組み合わせて、特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を減弱化しても良い。

[0022] また、本発明に係る変異体酵母は、キシロースからのエタノール収率が向上した特徴を有している。言い換えると、本発明に係る変異体酵母は、キシロース代謝能が向上した特徴を有している。ここで、キシロース代謝能とは、培地に含まれるキシロースを代謝してアルコールとする発酵反応における効率を意味する。したがって、キシロース代謝能の向上とは、当該発酵反応における反応効率を向上させることと同義となる。酵母におけるキシロース代謝能は、キシロース含有培地にて培養し、産生されたアルコールを定量することによって評価できる。また、酵母におけるキシロース代謝能は、例えば、培地に含まれるキシロースの取り込み速度（消費速度）を指標にして評価することもできる。キシロースの取り込み速度は、培養開始時における既知濃度のキシロースの減少量を経時的に測定することで算出することができる。

[0023] 減弱化するアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、Kluyveromyces属酵母に存在する複数のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子のうち特定のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子である。具体的に、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、Kluyveromyces marxianusにおいて４種類（KmADH1～KmADH4）が知られている。Kluyveromyces marxianusにおいて減弱化するアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、これらのうちKmADH1遺伝子及び/又はKmADH4遺伝子である。Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母において減弱化するアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、KmADH1遺伝子に機能的に等価なADH遺伝子及び/又はKmADH4遺伝子に機能的に等価なADH遺伝子である。

[0024] Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母において、KmADH1遺伝子に機能的に等価なADH遺伝子及びKmADH4遺伝子に機能的に等価なADH遺伝子は、従来公知の方法により同定することができる。例えば、先ず、Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母において複数のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を特定する。そして、これら遺伝子がコードするアルコールデヒドロゲナーゼのなかから、KmADH1遺伝子がコードするアルコールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列に対して最も配列類似性が高いアミノ酸配列

を有するものを特定する。このように特定したアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、Kluyveromyces marxianusにおけるKmADH1遺伝子と機能的に等価な遺伝子であると特定できる。なお、KmADH4遺伝子と機能的に等価な遺伝子を特定する場合も同様である。ここで、配列類似性の値は、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）プログラムを実装したコンピュータを用いてデフォルトの設定で求められる値を意味する。

[0025] ここで、KmADH1遺伝子のコーディング領域の塩基配列及びKmADH1遺伝子がコードするアルコールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号１及び２に示す。また、KmADH4遺伝子のコーディング領域の塩基配列及びKmADH4遺伝子がコードするアルコールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号３及び４に示す。

[0026] なお、Kluyveromyces marxianusに存在する、これらKmADH1遺伝子及びKmADH4遺伝子は、以上の具体的な塩基配列及びアミノ酸配列に限定されるものではない。すなわち、KmADH1遺伝子及びKmADH4遺伝子は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、それぞれ配列番号２及び４に示すアミノ酸配列に対して８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、更に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の配列類似性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものも含まれる。ここで、配列類似性の値は、BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）プログラムを実装したコンピュータを用いてデフォルトの設定で求められる値を意味する。

[0027] また、KmADH1遺伝子及びKmADH4遺伝子は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする限り、それぞれ配列番号２及び４に示すアミノ酸配列に対して１又は複数個（例えば２～３５個、好ましくは２～３０個、より好ましくは２～２０個、更に好ましくは２～１０個）のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものも含まれる。

[0028] さらに、KmADH1遺伝子及びKmADH4遺伝子は、アルコールデヒドロゲナーゼ

活性を有するタンパク質をコードする限り、それぞれ配列番号１及び３に示す塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドの一部又は全部に対してストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドも含まれる。ここで、ストリンジェントな条件とは、９０％程度、好ましくは９５％、更に好ましくは９８％の同一性を有する一対のポリヌクレオチドが特異的なハイブリダイズを形成する条件（温度条件、塩濃度条件）を意味する。

[0029] ＜エタノール製造＞

以上で説明した変異体酵母を利用することで、キシロース等の糖を基質としたエタノール発酵を行うことができる。特に、上述した本発明に係る変異体酵母は、優れたキシロース代謝能、すなわちキシロースからのエタノール収率が優れているため、キシロース含有培地を利用したエタノール発酵に好適である。キシロース含有培地とは、Kluyveromyces属酵母が生育しうる培地であってエタノール合成の基質となる糖成分として少なくともキシロースを含有する培地を意味する。なお、キシロース含有培地は、キシロース以外の糖成分、例えばグルコースを含有していても良い。

[0030] キシロース含有培地は、特に限定されないが、SD培地、YPD培地、YPAD培地、YM培地及びYeast Nitrogen Baseを含む各種合成培地にキシロースを添加するか、これら公知の培地に含まれる糖成分をキシロースに代替することで調整することができる。

[0031] また、木質系バイオマスや草本系バイオマスといったリグノセルロースを含むバイオマスからキシロース含有培地を調整しても良い。すなわち、リグノセルロースを含むバイオマスに含まれるセルロースやヘミセルロースを糖化処理し、得られた処理物をキシロース含有培地として使用することもできる。糖化処理としては、特に限定されず従来公知の手法をなんら限定されることなく利用することができる。糖化方法としては、例えば、希硫酸又は濃硫酸を利用する硫酸法、セルラーゼやヘミセルラーゼを利用する酵素法等を挙げることができる。また、糖化処理に先立って、木質系バイオマスや草本

系バイオマスに対して従来公知の前処理を施しても良い。前処理としては、特に限定されないが、例えば、リグニンを微生物によって分解する処理や、木質系バイオマスや草本系バイオマスの粉砕処理、イオン液体やアルカリ溶液に浸漬して構造を緩和する処理、高温の水で蒸煮する水熱処理、アンモニアによる処理等を挙げることができる。

[0032] 特に、Kluyveromyces marxianusから作製した変異体酵母では、特に耐熱性に優れるため、例えば40℃以上、好ましくは35～48℃、より好ましくは40～42℃といった比較的に高温度でエタノール発酵を行うことができる。このような温度領域は、セルラーゼやヘミセルラーゼといった糖化酵素も活性を示す温度領域である。したがって、当該変異体酵母は、糖化酵素を利用した所謂、同時糖化発酵に好適である。ここで同時糖化発酵とは、糖化酵素による木質系バイオマスの糖化処理と、キシロースからのエタノール発酵処理とを同一反応系で実施する処理を意味する。より具体的には、木質系バイオマスと糖化酵素と変異体酵母とを含む溶液を例えば40℃といった温度条件にてインキュベートする。これにより、木質系バイオマスの糖化と、糖化によって得られたキシロースやグルコースからのエタノール発酵が進行し、エタノールを製造することができる。また、このとき溶液を攪拌しても良いし、振とうしてもよい。

[0033] また、培地に含まれるキシロース等の炭素源から発酵生産されたエタノールを回収する際には、特に限定されず、従来公知のいかなる方法も適用することができる。例えば、上述したエタノール発酵が終了した後、固液分離操作によってエタノールを含む液層と、変異体酵母や固形成分を含有する固層とを分離する。その後、液層に含まれるエタノールを蒸留法によって分離・精製することで、純度の高いエタノールを回収することができる。なお、エタノールの精製度は、エタノールの使用目的にあわせて適宜調整することができる。

実施例

[0034] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲

は以下の実施例に限定されるものではない。

[0035] 〔実施例１〕

本実施例では、Kluyveromyces属酵母としてKluyveromyces marxianusを使用し、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株を作製し、キシロースからのエタノール収率を比較検討した。

[0036] ＜株の作製＞

＜接合、胞子形成によるura3- leu2-変異株の作製＞

Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042株のura3-株であるRAK3605株(Nonklang, S. et al., Appl. Environ. Microbiol. 74, p. 7514-7521 (2008))を基準株として使用した。K. marxianus DMKU3-1042株由来の栄養要求性変異株は、低頻度で２倍体になることを明らかにしている。紫外線変異により、多重栄養要求性変異株を取得することは可能であるが、その結果、染色体ＤＮＡに変異が入る確率が上昇する。より安定な株を作製するために、接合と胞子形成により、２倍体から簡単に多重栄養要求性株を作製するために以下の株を作製した。

[0037] 先ず、RAK3605株に紫外線照射し、lys-株(RAK3896株:ura3- lys2-)、ade-株(RAK3919株:ura3- ade2-)及びleu-株(RAK3966株:ura3- leu2-)を取得した。これらの株にSaccharomyces cerevisiaeのURA3をランダムに染色体へ形質転換した株、RAK4088株 (ura3- leu2- ScURA3) 、RAK4152株(ura3- ade2- ScURA3)、RAK4153株(ura3- lys2- ScURA3)を作製した。RAK4152とRAK4153株をYPD培地(1% w/v Yeast extract, 2% w/v peptone, 2% glucose, 2% w/v agar)上で混ざるようにストリークし、MM培地 (0.17% w/v yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.5% w/v ammonium sulfate, 2% w/v glucose, 2% w/v agar) へレプリカした。MM培地で生えた株、RAK4154株(ura3-/ura3- ade2-/ADE2, lys2-/LYS2 ScURA3/ScURA3)をS. cerevisiaeで使用されるSPO培地(1% w/v potassium acetate, 0.1% w/v yeast extract, 0.05% w/v glucose)に植菌し、胞子形成させた。

[0038] 作製した胞子を分離し、ura- lys- ade-の3重栄養要求性株を取得するため

に、-A培地(MM+uracil, tryptophan, histidine HCl, methionine, leucine, lysine HCl), -K培地(MM+ uracil, tryptophan, histidine HCl, methionine, leucine, adenine hemisulfate), -U培地(MM+ tryptophan, histidine HCl, methionine, leucine, lysine HCl, adenine hemisulfate)へレプリカし、3つの培地で増殖できない株をRAK4154株の胞子から3株取得することに成功した。その株をRAK4155株(ura3- lys2- ade2-)と命名した。同様の方法でRAK4088株とRAK4155株を接合させ、RAK4156株(ura3-/ura3- lys2-/LYS2 ade2-/ADE2 leu2-/LEU2 ScURA3/ScURA3)を作製した。この株を胞子形成させ、RAK4174株(leu2- ura3-)株を作製した。

[0039] ＜Ku70破壊株の作製＞

K. marxianusは非相同末端結合修復が高頻度で起こることから、S. cerevisiaeのように相同組換え修復を利用して遺伝子破壊を容易に行うことができない(Nonklang, S. et al., Appl. Environ. Microbiol. 74, p. 7514-7521 (2008))。そこで、非相同末端結合修復に必須のKU70遺伝子を破壊することで相同組換えを高頻度に起こさせる株の作製を行った。RAK4174株からKU70を破壊したRAK4736株(leu2- ura3- Kmku70Δ::ScLEU2)を作製した(Abdel-Banat, B.M. et al., Yeast 27, 29-39(2010))。

[0040] ＜ADH1破壊株の作製＞

K. marxianus DMKU3-1042株のADH1遺伝子における推定open reading frameはGenetyx ver.10 (株式会社ゼネティクス)で予測した。K. marxianus DMKU3-1042株のADH1遺伝子は348アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。この塩基配列情報を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0041] KmADH1-167-ASC：5’-GGGGGCACTTCGAACGCTGAAGTATCTTCATCTGGAGTATACCTTTTTTTCGCCACTGGAggcgcgcccggg-3’ （配列番号５）

KmADH1+1070c-TDHu：5’-TACCATATCAAAAGGGTCCTTGCTTATTTGGAAGTGTCAACGACAATTCTACCAATGATTtggcagtattgataatgag-3’ （配列番号６）

なお、上記プライマーの塩基配列において大文字はADH1との相同領域を示す。このプライマーでpST106 vector (Ano, A. et al., Biosci. Biotechnol

. Biochem. 73, p. 633-640 (2009))からScURA3を合成し、RAK4736株へ形質転換した。その結果RAK6148株(ura3- leu2- ku70Δ::ScLEU2 adh1Δ::ScURA3)を作製した。

[0042] ＜ADH4破壊株の作製＞

K. marxianus DMKU3-1042株のADH4遺伝子における推定open reading frameはGenetyx ver.10 (株式会社ゼネティクス)で予測した。K. marxianus DMKU3-1042株のADH4遺伝子は379アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。この塩基配列情報を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0043] KmADH4-60-ASC：5’-CGTACACCCTCAAGCTCATCGCCCGTACACCCACATTATACTATTAATAAACCACAAACAggcgcgcccggg-3’ （配列番号７）

KmADH4+1206c：5’-GAAGGATCATCCAAATGAAAAGAAAGGGACGTTAAGTTAGCATAGCTTAGTTGGACTGAGtggcagtattgataatgag-3’ （配列番号８）

なお、上記プライマーの塩基配列において大文字はADH4との相同領域を示す。このプライマーでpST106 vectorからScURA3を合成し、RAK4736株へ形質転換した。その結果RAK6150株(ura3- leu2- ku70Δ::ScLEU2 adh4Δ::ScURA3)を作製した。

[0044] ＜ADH2破壊株の作製＞

K. marxianus DMKU3-1042株のADH2遺伝子における推定open reading frameはGenetyx ver.10 (株式会社ゼネティクス)で予測した。K. marxianus DMKU3-1042株のADH2遺伝子はADH1遺伝子と同じく348アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。この塩基配列を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0045] KmADH2-764：5’-CCCACCCACCCACTGCTACA-3’ （配列番号９）

KmADH2-1c：5’-catttctagttgttggttgttgttt-3’ （配列番号１０）

これら一対のプライマーでADH2 open reading frameの上流部分をK. marxianus DMKU3-1042ゲノムを鋳型として合成した。

[0046] また、ADH2遺伝子の塩基配列を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0047] KmADH2+1045：5’-GCGGACTAACTAGCCCATTAGT-3’ （配列番号１１）
KmADH2-2141c：5’-CCCCACGCACAACGTAAACCTT-3’ （配列番号１２）
これら一対のプライマーでADH2 open reading frameの下流部分をK. marxianus DMKU3-1042ゲノムを鋳型として合成した。

[0048] 一方、S. cerevisiae BY4704 (MATa ade2Δ::hisG his3Δ200 leu2Δ0 met15Δ0 trp1Δ63)から定法に従ってScURA3遺伝子を合成した。

[0049] 以上のようにして得られたScURA3遺伝子をADH2上流領域とADH2下流領域の間に位置するように融合させ、RAK3605株へ形質転換した。その結果RAK6396株(ura3- adh2Δ::ScURA3)を作製した。

[0050] ＜ADH3破壊株の作製＞
K. marxianus DMKU3-1042株のADH3遺伝子における推定open reading frameはGenetyx ver.10 (株式会社ゼネティクス)で予測した。K. marxianus DMKU3-1042株のADH3遺伝子は375アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。この塩基配列を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0051] KmADH3-842：5’-GGCCTGGGTTACCACTGGTCCCCTG-3’ （配列番号１３）
KmADH3-1c：5’-tgttgcgtgatattttctgtgcctg-3’ （配列番号１４）
これら一対のプライマーでADH3 open reading frameの上流部分をK. marxianus DMKU3-1042ゲノムを鋳型として合成した。

[0052] また、ADH3遺伝子の塩基配列を利用して以下の一対のプライマーを設計した。

[0053] KmADH3+1076：5’-TGGAACAAGGTAAGATCTTGGG-3’ （配列番号１５）
KmADH3+2069c：5’-TTGCAGGATCCAGAATGGGTCAGTG-3’ （配列番号１６）
これら一対のプライマーでADH3 open reading frameの下流部分をK. marxianus DMKU3-1042ゲノムを鋳型として合成した。

[0054] そして、上述したADH2破壊株の作製手順と同様に、ScURA3をADH3上流領域とADH3下流領域の間に位置するように融合させ、RAK3605株へ形質転換した。その結果RAK6398株(ura3- adh3Δ::ScURA3)を作製した。

[0055] ＜エタノール発酵試験＞

以上のように作製されたADH1破壊株、ADH2破壊株、ADH3破壊株及びADH4破壊株についてグルコースを利用したエタノール発酵試験、及びキシロースを利用したエタノール発酵試験を行った。

[0056] ＜前培養＞

YPX（キシロース20g/L）培地20mlを加えた50mlアシストチューブに上記破壊株を一白金耳植菌し、30℃、140rpmで6～8時間振とう培養した。次に、その菌液2.5%を、YPX培地（キシロース:20g/L）200mlが入った500ml三角フラスコで、30℃、140rpm、一晩振とう培養した。培養後の酵母を遠心回収、滅菌水で3回洗浄し、OD600=30の酵母懸濁液を調製した。

[0057] ＜本培養＞

表１に示す条件で培養し、糖の利用、菌体増殖およびエタノール生産を確認した。初発の糖濃度は、グルコース培養は50g/L、キシロース培養は20g/Lとした。

[表1]

表 1. 実験条件

液量	容器	初発 O.D.	温度	回転数
25ml	50ml アシストチューブ	1	30℃	140rpm

[0058] また、菌体増殖は、島津製作所社製の分光光度計UV-1800（λ=600）を用いて菌体濃度を測定することで評価した。また、培地中の糖やエタノール濃度は島津製作所社製のHPLC（検出器:RI）を用いて測定した。

[0059] ＜結果＞

糖成分としてキシロースを含有する培地にて上記破壊株を培養した際の「培地中のキシロース濃度変化」、「培地中のエタノール濃度変化」、「培地中のキシリトール濃度変化」及び「菌体濃度変化」を図１～３に示す。図１に示すように、いずれのADH破壊株でも野生株と比較して、キシロースの利用が遅れている。特にADH2破壊株及びADH3破壊株でキシロース利用の遅れが顕著であった。また、図２に示すように、ADH1破壊株及びADH4破壊株では、野生株と比較し、キシロースからのエタノール収率が大幅に向上していた。し

かし、ADH2破壊株及びADH3破壊株ではエタノール収率の向上は認められなかった。また、図３に示すように、ADH1破壊株及びADH4破壊株では、野生株と同等の菌体増殖能を有することが判った。一方、ADH2破壊株及びADH3破壊株は野生株と比較して、菌体増殖が悪いことが判った。

[0060] 一方、糖成分としてグルコースを含有する培地にて上記破壊株を培養した際の「培地中のグルコース濃度変化」、「培地中のエタノール濃度変化」、「培地中のグリセロール濃度変化」及び「菌体濃度変化」を図４～６に示す。図４～６に示すように、上記破壊株をグルコースで培養しても、野生型と同程度或いは下回るエタノール収率しか達成できなかった。すなわち、グルコースの取り込みやグルコースからのエタノール発酵に対して、いずれのADH遺伝子を破壊しても、グルコースを利用したエタノール発酵においてエタノール生産性等になんら影響がないことが明らかとなった。換言すれば、Kluyveromyces 属酵母においては、ADH1遺伝子及びADH4遺伝子を減弱化すると、キシロースからのエタノール収率が特異的に向上することが示された。

[0061] なお、参考のため、S. cerevisiae由来ADH1及びADH2と、K. marxianus由来ADH1～ADH4とのアミノ酸レベルでの相同性を検討した結果を図７～１４に示す。図７はS. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH1との間のアライメントである。図８はS. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH2との間のアライメントである。図９はS. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH3との間のアライメントである。図１０はS. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH4との間のアライメントである。図１１はS. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH1との間のアライメントである。図１２はS. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH2との間のアライメントである。図１３はS. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH3との間のアライメントである。図１４はS. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH4との間のアライメントである。

[0062] 図７に示すように、S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH1との間の同一性及び類似性はそれぞれ79%及び97%であった。図８に示すように、S

. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH2との間の同一性及び類似性はそれぞれ86%及び96%であった。図９に示すように、S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH3との間の同一性及び類似性はそれぞれ79%及び96%であった。図１０に示すように、S. cerevisiae由来ADH1とK. marxianus由来ADH4との間の同一性及び類似性はそれぞれ80%及び94%であった。図１１に示すように、S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH1との間の同一性及び類似性はそれぞれ79%及び97%であった。図１２に示すように、S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH2との間の同一性及び類似性はそれぞれ84%及び96%であった。図１３に示すように、S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH3との間の同一性及び類似性はそれぞれ78%及び96%であった。図１４に示すように、S. cerevisiae由来ADH2とK. marxianus由来ADH4との間の同一性及び類似性はそれぞれ80%及び95%であった。

[0063] なお、S. cerevisiae由来ADH1とS. cerevisiae由来ADH2との間のアライメントを図１５に示した。図１５に示すように、S. cerevisiae由来ADH1とS. cerevisiae由来ADH2との間の同一性及び類似性はそれぞれ93%及び99%であった。

[0064] 以上の図７～１４に示すように、K. marxianus由来ADH1～ADH4は、S. cerevisiae由来ADH1及びADH2と非常に高い同一性及び類似性を示しており、S. cerevisiae由来ADH1及びADH2との比較から機能を推定することは困難である。したがって、Kluyveromyces 属酵母のADH1遺伝子を減弱化する、又はADH4遺伝子を減弱化すると、キシロースからのエタノール収率が特異的に向上することは驚くべき結果と言える。

[0065] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] Kluyveromyces属に属する酵母における、Kluyveromyces marxianus 由来ADH1遺伝子、当該ADH1遺伝子に機能的に等価な遺伝子、Kluyveromyces marxianus 由来ADH4遺伝子及び当該ADH4遺伝子に機能的に等価な遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも１つの遺伝子を減弱化した変異体酵母。

[請求項2] 上記Kluyveromyces属に属する酵母は、Kluyveromyces marxianusであることを特徴とする請求項１記載の変異体酵母。

[請求項3] 上記ADH1遺伝子に機能的に等価な遺伝子は、Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母に由来し、以下(a)～(c)いずれかのタンパク質をコードすることを特徴とする請求項１記載の変異体酵母。

(a) 配列番号２のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号２のアミノ酸配列に対して90％以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

(c) 配列番号２のアミノ酸配列に対して１～複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入したアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

[請求項4] 上記ADH4遺伝子に機能的に等価な遺伝子は、Kluyveromyces marxianus以外のKluyveromyces属酵母に由来し、以下(a)～(c)いずれかのタンパク質をコードすることを特徴とする請求項１記載の変異体酵母。

(a) 配列番号４のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号４のアミノ酸配列に対して90％以上の配列類似性を有するアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

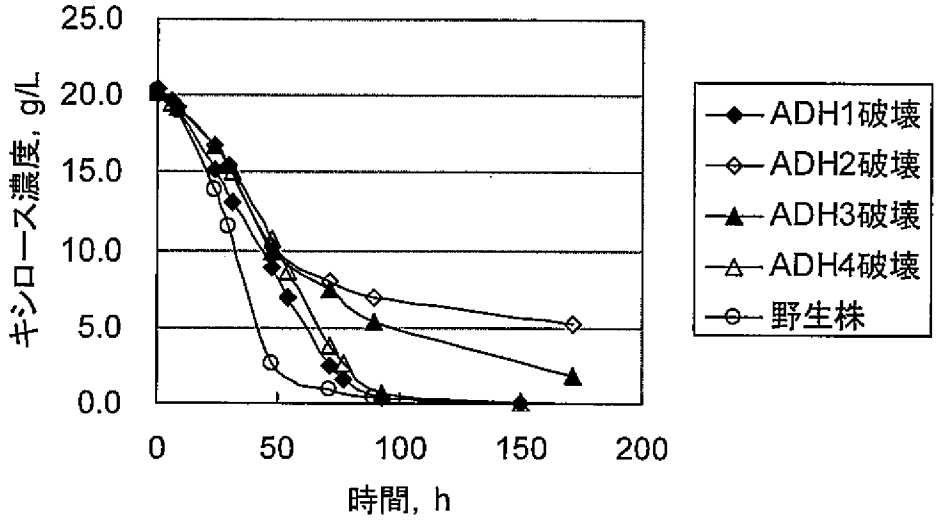
(c) 配列番号４のアミノ酸配列に対して１～複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入したアミノ酸配列を含み、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質

［請求項5］ 請求項１乃至４いずれか一項記載の変異体酵母をキシロース含有培地にて培養する工程と、

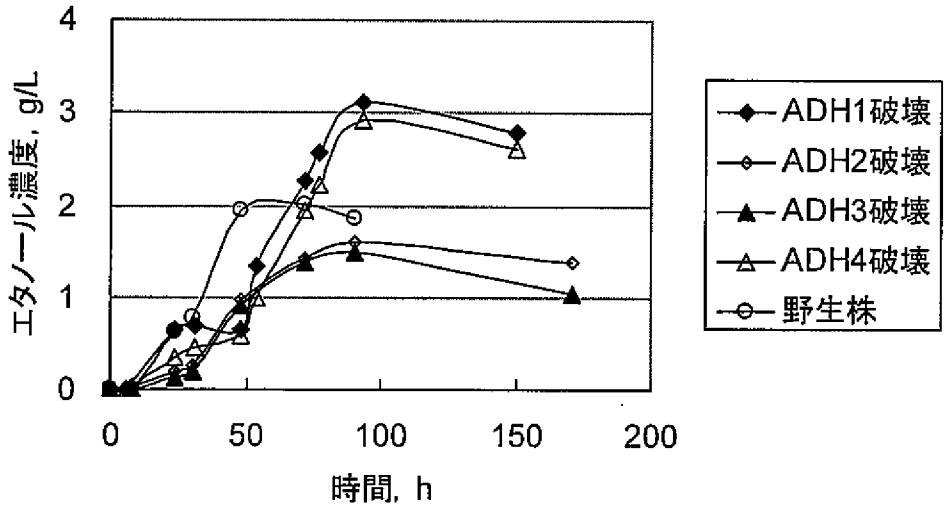
その後、培地よりエタノールを回収する工程とを含む、エタノールの製造方法。

［請求項6］ 上記培養する工程を、上記変異体酵母とリグノセルロースを含むバイオマスと糖化酵素とを含む反応系で実施することを特徴とする請求項５記載のエタノールの製造方法。

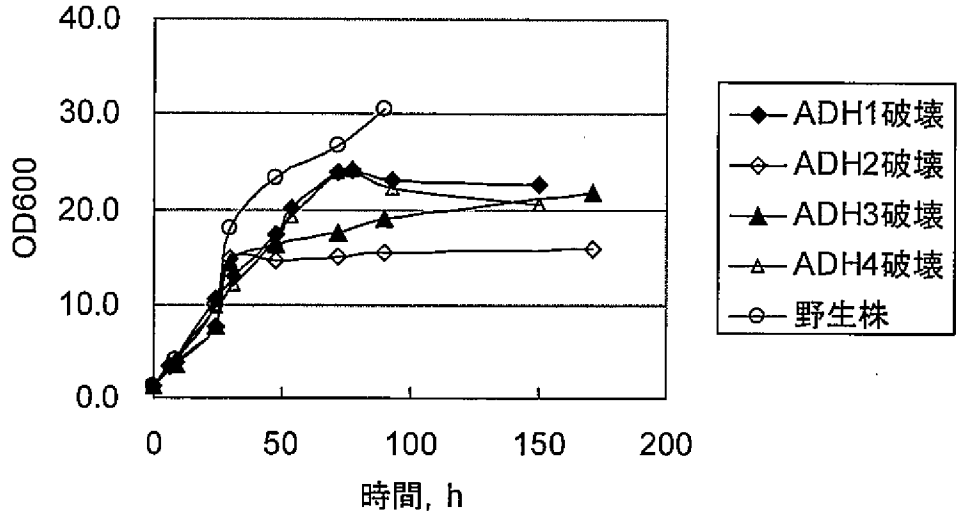
[図1]


25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
キシロース濃度, g/L
0
50
100
150
200
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

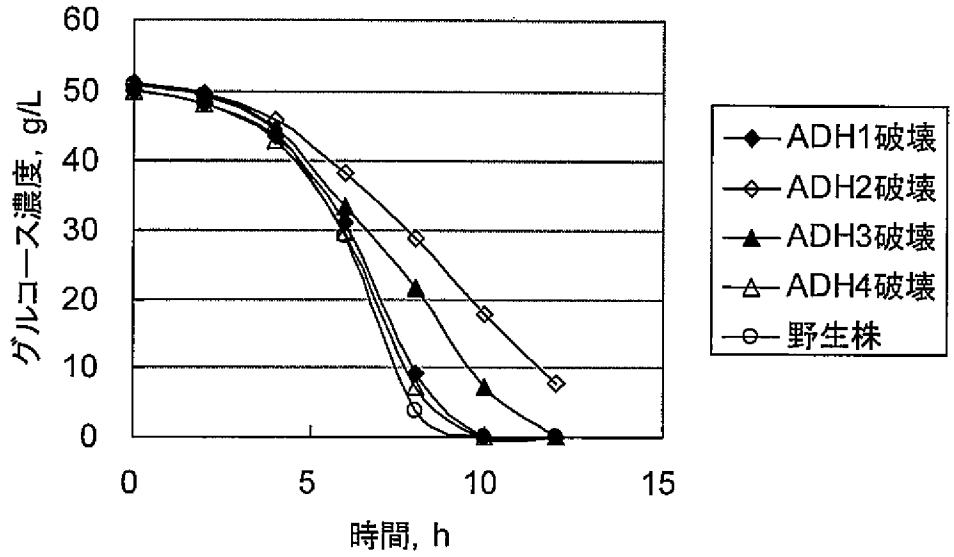
[図2]


4
3
2
1
0
エタノール濃度, g/L
0
50
100
150
200
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

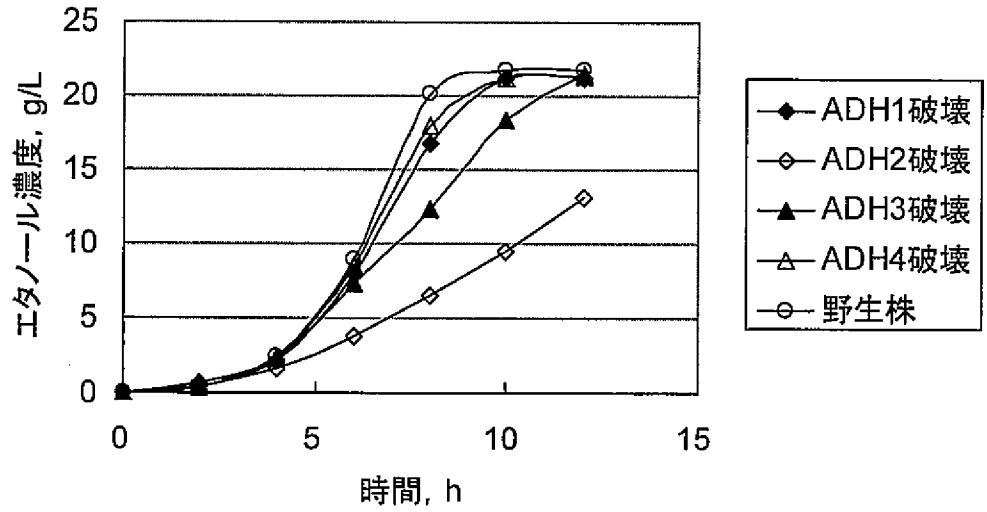
[図3]


40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
OD600
0
50
100
150
200
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

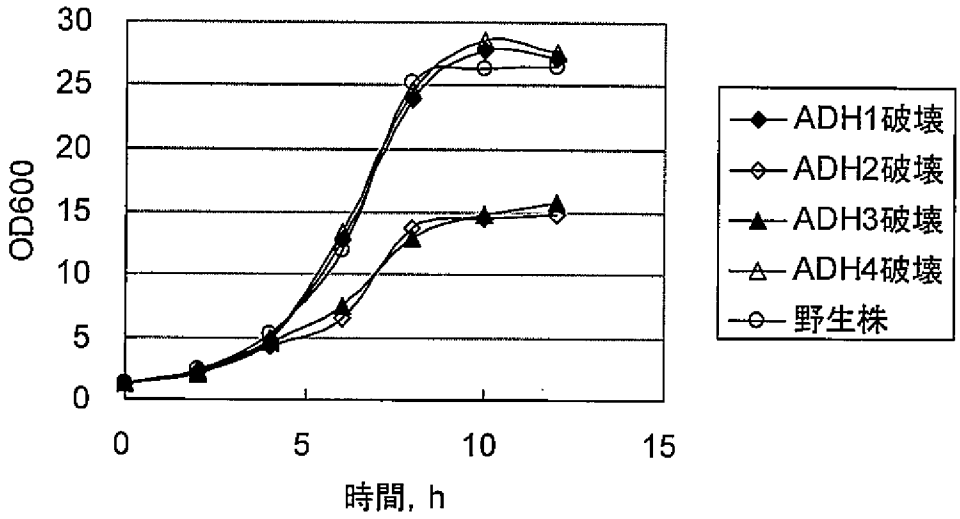
[図4]


60
50
40
30
20
10
0
グルコース濃度, g/L
0
5
10
15
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

[図5]


25
20
15
10
5
0
エタノール濃度, g/L
0
5
10
15
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

[図6]


30
25
20
15
10
5
0
OD600
0
5
10
15
時間, h
ADH1破壊
ADH2破壊
ADH3破壊
ADH4破壊
野生株

[図7]

```
ScADH1:KmADH1 (79/97---Identity/Similarity)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH1p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH1pMAIP1047.prj
  Sequence Name    : KmADH1pMAIP1047.prj
  Sequence Size    : 348

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 1 - 348
348 bp, INT.Score: 1445, OPT.Score: 1452
Identity: 277 / 348 (79%)
Similarity: 339 / 348 (97%)

Query  1    MSIPETQKGVIFYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK  60
            |.||||||||||||. |.|.|||||||||.|||||||||||||||||.|||||.|
Sbjct  1    MAIPETQKGVIFYENGGELQYKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWQGDWPLDTK  60

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            ||||||||||.||.|||||.||.|||||||||||||.|| |||.||.|||.||||||
Sbjct  61   LPLVGGHEGAGIVVAMGENVTGWEIGDYAGIKWLNGSCMSCEECELSNEPNCPKADLSGY  120

Query  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAA  180
            |||||||||||||||||.||...|||.|||||||.|||||||||...||.|||||||
Sbjct  121  THDGSFQQYATADAVQAARIPKNVDLAEVAPILCAGVTVYKALKSAHIKAGDWVAISGAC  180

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGA  240
            |||||||.|||||||||||||.|..|..||...||| ||||||.||.|..|..||.|||
Sbjct  181  GGLGSLAIQYAKAMGYRVLGIDAGDEKAKLFKELGGEYFIDFTKTKDMVAEVIEATNGGA  240

Query  241  HGVINVSVSEAAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300
            |.||||||||||..|. |.|.|||.||||.| .|.| |||||||||||||||||||||
Sbjct  241  HAVINVSVSEAAISTSVLYTRSNGTVVLVGLPRDAQCKSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK  348
            |||||||||.|||||.|||..|||.|...|.||.||||.|| ||||||
Sbjct  301  DTREALDFFSRGLVKAPIKILGLSELATVYDKMSKGQIIGRIVVDTSK  348
```

[図8]

```
ScADH1:KmADH2 (86/96)
[ GENETYX : Homology Data ]
Date : 2010.10.23
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH1p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH2pMSIP1047.prj
  Sequence Name    : KmADH2pMSIP1047.prj
  Sequence Size    : 348

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 1 - 348
348 bp, INT.Score: 1512, OPT.Score: 1512
Identity: 300 / 348 (86%)
Similarity: 336 / 348 (96%)

Query  1    MSIPETQKGVIFYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK  60
            ||||.|||||||||. |.| ||||||||||.|||||||||||||||||||.||||| .|
Sbjct  1    MSIPTTQKGVIFYENGGQLYYKDIPVPKPKSNELLINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLDTK  60

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            |||||||||||||.||.|||||||||| ||||||||||.|| |||.||||||.||||||
Sbjct  61   LPLVGGHEGAGVVVAMGDNVKGWKIGDLAGIKWLNGSCMNCEECELSNESNCPDADLSGY  120

Query  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAA  180
            ||||||||||||||||||||.|||||||||||||.|||||||.|...||.||||||||
Sbjct  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPAGTDLAQVAPILCAGVTVYKALKTAAMKAGDWVAISGAA  180

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGA  240
            ||||||||||||||.|||||||||||||||.|.|||||||||.|||||.|.|||.|||
Sbjct  181  GGLGSLAVQYAKAMGFRVLGIDGGEGKEELFKSLGGEVFIDFTKSKDIVGEVIKATNGGA  240

Query  241  HGVINVSVSEAAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300
            |||||||||| |||.|. | |.|||.||||.| .||| |||||||||| |||||||||
Sbjct  241  HGVINVSVSEKAIESSIEYCRSNGTVVLVGLPKDAKCKSDVFNQVVKSIHIVGSYVGNRA  300

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK  348
            ||||||||| ||||..||||||||||||||.|.|.|||||||||
Sbjct  301  DTREALDFFCRGLVHAPIKVVGLSTLPEIYEKMEQGKILGRYVVDTSK  348
```

[図9]

```
ScADH1:KmADH3 (79/96)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH1p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH3pMLRL1128.prj
  Sequence Name    : KmADH3MLRL1128+-_1
  Sequence Size    : 375

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 28 - 375
348 bp, INT.Score: 1427, OPT.Score: 1435
Identity: 275 / 348 (79%)
Similarity: 336 / 348 (96%)

Query  1    MSIPETQKGVIFYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK  60
            ..|||.||||||||. ||||||||||||||.||.||||||||||||||||.|||||..|
Sbjct  28   VAIPEKQKGVIFYENGGKLEYKDIPVPKPKPNEILINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLATK  87

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            ||||||||||||||.|||||||.|||||||||||||||.||.|||.||||||.||||||
Sbjct  88   LPLVGGHEGAGVVVAMGENVKGWEIGDYAGIKWLNGSCMSCEFCELSNESNCPDADLSGY  147

Query  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAA  180
            ||||||||||||||||||.||.|||||..|||||||.|||||||.|.|.|.||.||||||||
Sbjct  148  THDGSFQQYATADAVQAARIPKGTDLAEIAPILCAGVTVYKALKTAGLKAGDWVAISGAA  207

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGA  240
            ||||||||||||||||||.||||||.|..| . .|.|.|.||||.||..|.. . |.||.
Sbjct  208  GGLGSLAVQYAKAMGYRVVGIDGGEEKGKLAKQLGAEAFVDFTKTKDMIGEIQEITNGGP  267

Query  241  HGVINVSVSEAAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300
            ||||||||||||..|||.|||..||.||||.||||    |.||..|||||.| ||||||||
Sbjct  268  HGVINVSVSEAAMNASTQYVRPTGTVVLVGLPAGAVIKSEVFSHVVKSIAIKGSYVGNRA  327

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK  348
            |||||..||| | ||||||||||.||..|| ||.|.|.|.|||||||.|
Sbjct  328  DTREAIEFFAAGKVKSPIKVVGLSELPKVYELMEQGKILGRYVVDTEK  375
```

[図10]

```
ScADH1:KmADH4 (80/94)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH1p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH4pMFRL1140.prj
  Sequence Name    : KmADH4pMFRL1140.prj
  Sequence Size    : 379

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 2 - 348
Sbjct Range: 33 - 379
347 bp, INT.Score: 1414, OPT.Score: 1415
Identity: 278 / 347 (80%)
Similarity: 329 / 347 (94%)

Query  2    SIPETQKGVIFYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPVKL  61
            .|||.||||||||. |||||||.||||||.||.||||||||||||||||.|||||||||
Sbjct  33   AIPESQKGVIFYENGGKLEYKDLPVPKPKPNEILINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLPVKL  92

Query  62   PLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGYT  121
            ||||||||||||..||||....|||||||||||||||.|| || | |||| .|||||||
Sbjct  93   PLVGGHEGAGVVVAKGENVTNFEIGDYAGIKWLNGSCMSCELCEQGYESNCLQADLSGYT  152

Query  122  HDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAAG  181
            |||||||||||||||.||.||||..|||||||.|||||||.|.| .|.|.|||||||
Sbjct  153  HDGSFQQYATADAVQAAQIPKGTDLAEIAPILCAGVTVYKALKTADLQPGQWIAISGAAG  212

Query  182  GLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGAH  241
            |||||||||||||| |||||||| ||||||.|.||||||||||.||.|... .||.||.|
Sbjct  213  GLGSLAVQYAKAMGLRVLGIDGGPGKEELFKSLGGEVFIDFTKSKDMVADIQEATNGGPH  272

Query  242  GVINVSVSEAAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRAD  301
            ||||||||||||. || |||..|..||||.|| |   |.||..||||||| ||||||||
Sbjct  273  GVINVSVSEAAISMSTEYVRPTGVVVLVGLPAHAYVKSEVFSHVVKSISIKGSYVGNRAD  332

Query  302  TREALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK  348
            ||||.|||.|||||||||||||.||..|| || |.|.|||||||||
Sbjct  333  TREAIDFFTRGLVKSPIKVVGLSELPKVYELMEAGKILGRYVVDTSK  379
```

[図11]

```
ScADH2:KmADH1 (79/97)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH2p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH1pMAIP1047.prj
  Sequence Name    : KmADH1pMAIP1047.prj
  Sequence Size    : 348

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 1 - 348
348 bp, INT.Score: 1442, OPT.Score: 1449
Identity: 277 / 348 (79%)
Similarity: 338 / 348 (97%)

Query  1    MSIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTK  60
            |.||||||..||||..|.|..|||||||||||||||||||||||||||||.||||| ||
Sbjct  1    MAIPETQKGVIFYENGGELQYKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWQGDWPLDTK  60

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            ||||||||||.||.|||||.||.|||||||||||||.|| |||.||.|||.||||||
Sbjct  61   LPLVGGHEGAGIVVAMGENVTGWEIGDYAGIKWLNGSCMSCEECELSNEPNCPKADLSGY  120

Query  121  THDGSFQEYATADAVQAAHIPQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAA  180
            |||||||.||||||||||.||...||||||||||.|||||||||...||.|.|||||
Sbjct  121  THDGSFQQYATADAVQAARIPKNVDLAEVAPILCAGVTVYKALKSAHIKAGDWVAISGAC  180

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGPGKEELFTSLGGEVFIDFTKEKDIVSAVVKATNGGA  240
            |||||||.|||||||||||||.| .|..||..|||| ||||||.||.|..|..||||||
Sbjct  181  GGLGSLAIQYAKAMGYRVLGIDAGDEKAKLFKELGGEYFIDFTKTKDMVAEVIEATNGGA  240

Query  241  HGIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFNHVVKSISIVGSYVGNRA  300
            |..||||||||||..|.| | |.|||||||||| .|.|.|||||.|||||||||||||||
Sbjct  241  HAVINVSVSEAAISTSVLYTRSNGTVVLVGLPRDAQCKSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK  348
            |||||||||.|||||.|||..|||.|...|.||.|||| || ||||||
Sbjct  301  DTREALDFFSRGLVKAPIKILGLSELATVYDKMSKGQIIGRIVVDTSK  348
```

[図12]

```
ScADH2:KmADH2 (84/96)
[ GENETYX : Homology Data ]
Date : 2010.10.23
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH2p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH2pMSIP1047.prj
  Sequence Name    : KmADH2pMSIP1047.prj
  Sequence Size    : 348

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 1 - 348
348 bp, INT.Score: 1510, OPT.Score: 1510
Identity: 295 / 348 (84%)
Similarity: 337 / 348 (96%)

Query  1    MSIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTK  60
            ||||.|||..||||..|.| .|||||||||.|||||||||||||||||.|||||  ||
Sbjct  1    MSIPTTQKGVIFYENGGQLYYKDIPVPKPKSNELLINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLDTK  60

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            |||||||||||||.||.|||||||| ||||||||||.|| |||.||||||.||||||
Sbjct  61   LPLVGGHEGAGVVVAMGDNVKGWKIGDLAGIKWLNGSCMNCEECELSNESNCPDADLSGY  120

Query  121  THDGSFQEYATADAVQAAHIPQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAA  180
            |||||||.|||||||||||||.|||||.||||||||.|||||||.|...||.|.||||||
Sbjct  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPAGTDLAQVAPILCAGVTVYKALKTAAMKAGDWVAISGAA  180

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGPGKEELFTSLGGEVFIDFTKEKDIVSAVVKATNGGA  240
            ||||||||||||||.|||||||| ||||||.||||||||||||.||||..|.|||||||
Sbjct  181  GGLGSLAVQYAKAMGFRVLGIDGGEGKEELFKSLGGEVFIDFTKSKDIVGEVIKATNGGA  240

Query  241  HGIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFNHVVKSISIVGSYVGNRA  300
            ||.|||||| |||.|. |||.|||||||||| .|||.|||||.||||| ||||||||||
Sbjct  241  HGVINVSVSEKAIESSIEYCRSNGTVVLVGLPKDAKCKSDVFNQVVKSIHIVGSYVGNRA  300

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK  348
            |||||||| ||||..||||||||.|||||||||.|.| |||||||||
Sbjct  301  DTREALDFFCRGLVHAPIKVVGLSTLPEIYEKMEQGKILGRYVVDTSK  348
```

[図13]

```
ScADH2:KmADH3 (78/96)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH2p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH3pMLRL1128.prj
  Sequence Name    : KmADH3MLRL1128+-_1
  Sequence Size    : 375

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 28 - 375
348 bp, INT.Score: 1418, OPT.Score: 1426
Identity: 274 / 348 (78%)
Similarity: 335 / 348 (96%)

Query  1    MSIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTK  60
            ..|||.||..||||..||||.||||||||||||.||||||||||||||.|||||.||
Sbjct  28   VAIPEKQKGVIFYENGGKLEYKDIPVPKPKPNEILINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLATK  87

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            |||||||||||||.||||||||.||||||||||||||||.||.|||.||||||.||||||
Sbjct  88   LPLVGGHEGAGVVVAMGENVKGWEIGDYAGIKWLNGSCMSCEFCELSNESNCPDADLSGY  147

Query  121  THDGSFQEYATADAVQAAHIPQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAA  180
            |||||||.||||||||||.||.||||||.|||||||.|||||||.|.|.|.||.|.||||||
Sbjct  148  THDGSFQQYATADAVQAARIPKGTDLAEIAPILCAGVTVYKALKTAGLKAGDWVAISGAA  207

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGPGKEELFTSLGGEVFIDFTKEKDIVSAVVKATNGGA  240
            |||||||||||||||||.|||||.|..| .||.|.|.||||.||..... . ||||.
Sbjct  208  GGLGSLAVQYAKAMGYRVVGIDGGEEKGKLAKQLGAEAFVDFTKTKDMIGEIQEITNGGP  267

Query  241  HGIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFNHVVKSISIVGSYVGNRA  300
            ||.|||||||||..|||.| |..||||||||||||  .|.||.||||||.| ||||||||
Sbjct  268  HGVINVSVSEAAMNASTQYVRPTGTVVLVGLPAGAVIKSEVFSHVVKSIAIKGSYVGNRA  327

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK  348
            |||||..|||.| ||||||||||.||..|| ||.|.| |||||||.|
Sbjct  328  DTREAIEFFAAGKVKSPIKVVGLSELPKVYELMEQGKILGRYVVDTEK  375
```

[図14]

```
ScADH2:KmADH4 (80/95)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH2p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : KmADH4pMFRL1140.prj
  Sequence Name    : KmADH4pMFRL1140.prj
  Sequence Size    : 379

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 2 - 348
Sbjct Range: 33 - 379
347 bp, INT.Score: 1412, OPT.Score: 1413
Identity: 279 / 347 (80%)
Similarity: 330 / 347 (95%)

Query  2    SIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTKL  61
            .|||.||..||||..||||.||.|||||||||.|||||||||||||||||.||||||.||
Sbjct  33   AIPESQKGVIFYENGGKLEYKDLPVPKPKPNEILINVKYSGVCHTDLHAWKGDWPLPVKL  92

Query  62   PLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGYT  121
            ||||||||||||..||||....|||||||||||||.|| || | |||| .|||||||
Sbjct  93   PLVGGHEGAGVVVAKGENVTNFEIGDYAGIKWLNGSCMSCELCEQGYESNCLQADLSGYT  152

Query  122  HDGSFQEYATADAVQAAHIPQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAAG  181
            ||||||.||||||||||.||.||||||.|||||||.|||||||.|.|..|.| |||||||
Sbjct  153  HDGSFQQYATADAVQAAQIPKGTDLAEIAPILCAGVTVYKALKTADLQPGQWIAISGAAG  212

Query  182  GLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGPGKEELFTSLGGEVFIDFTKEKDIVSAVVKATNGGAH  241
            |||||||||||||| |||||||||||||||.||||||||||||.||.|... .|||||.|
Sbjct  213  GLGSLAVQYAKAMGLRVLGIDGGPGKEELFKSLGGEVFIDFTKSKDMVADIQEATNGGPH  272

Query  242  GIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFNHVVKSISIVGSYVGNRAD  301
            |.||||||||||. || | |..|.|||||||| ]  .|.||.|||||||| |||||||||
Sbjct  273  GVINVSVSEAAISMSTEYVRPTGVVVLVGLPAHAYVKSEVFSHVVKSISIKGSYVGNRAD  332

Query  302  TREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK  348
            ||||.|||.||||||||||||.||..|| || |.| |||||||||
Sbjct  333  TREAIDFFTRGLVKSPIKVVGLSELPKVYELMEAGKILGRYVVDTSK  379
```

[図15]

```
ScADH1:ScADH2 (93/99---Identity/Similarity)
Query Sequence
  File Name        :
  Sequence Name    : ScADH1p.prj
  Sequence Size    : 349

Target Sequence
  File Name        : ScADH2p.prj
  Sequence Name    : ScADH2p.prj
  Sequence Size    : 349

  Unit Size to Compare = 2
  Pick up Location No. = 1

Query Range: 1 - 348
Sbjct Range: 1 - 348
348 bp, INT.Score: 1618, OPT.Score: 1618
Identity: 324 / 348 (93%)
Similarity: 345 / 348 (99%)

Query  1    MSIPETQKGVIFYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK  60
            ||||||||..|||||.||||.|||||||||.|||||||||||||||||||||||||||.|
Sbjct  1    MSIPETQKAIIFYESNGKLEHKDIPVPKPKPNELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPLPTK  60

Query  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   LPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADLSGY  120

Query  121  THDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKALKSANLMAGHWVAISGAA  180
            |||||||.|||||||||||||||||.|||||||||||||||||||.||||.||||||
Sbjct  121  THDGSFQEYATADAVQAAHIPQGTDLAEVAPILCAGITVYKALKSANLRAGHWAAISGAA  180

Query  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGEGKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGA  240
            |||||||||||||||||||||| |||||| |.|||||||||||||.||.|||.|||
Sbjct  181  GGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGGPGKEELFTSLGGEVFIDFTKEKDIVSAVVKATNGGA  240

Query  241  HGVINVSVSEAAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSISIVGSYVGNRA  300
            ||.|||||||||||||| |||||.||||.||||||.|||||.||||||||||||||||
Sbjct  241  HGIINVSVSEAAIEASTRYCRANGTVVLVGLPAGAKCSSDVFNHVVKSISIVGSYVGNRA  300

Query  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK  348
            |||||||||||||||||||||||.||||||||||||.|||||||||
Sbjct  301  DTREALDFFARGLVKSPIKVVGLSSLPEIYEKMEKGQIAGRYVVDTSK  348
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/057704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/19(2006.01)i, *C12P7/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

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)
C12N1/19, C12P7/10, C12N15/09

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(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	HEIPIEPER H.J. et al., Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in adh multiple and null mutants of Kluyveromyces lactis. Research in Microbiology, 2000, Vol.151, pp. 777-784	1,2/3,4
Y	LERTWATTANASAKUL N. et al., Comparison of the Gene Expression Patterns of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus and Their Physiological Functions. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, Vol.71, No.5, pp.1170-1182	3,4

☒ 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	Date of mailing of the international search report
12 April, 2012 (12.04.12)	24 April, 2012 (24.04.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/057704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NONKLANG S. et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042. Applied and Environmental Microbiology, 2008, Vol.74, No.24, pp.7514-7521	1-6
A	CHO JY. et al., Pichia stipitis Genes for Alcohol Dehydrogenase with Fermentative and Respiratory Functions. Applied and Environmental Microbiology, 1998, Vol.64, No.4, pp.1350-1358	1-6
A	BERA A.K. et al., A genetic overhaul of Saccharomyces cerevisiae 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011 (Published online 17 August 2010), Vol.38, pp. 617-626	1-6
A	JP 2011-024500 A (Toyota Central Research and Development Laboratories, Inc.), 10 February 2011 (10.02.2011), (Family: none)	1-6
A	WO 2009/116286 A1 (Yamaguchi University), 24 September 2009 (24.09.2009), & EP 2256194 A1 & US 2011/0020937 A1	1-6
A	WO 2008/098227 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 14 August 2008 (14.08.2008), & US 2009/0081746 A1 & EP 2118266 A2 & JP 2011-510611 A	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/057704

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

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

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

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

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

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

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

Claim 1 describes an yeast mutant which belongs to the genus Kluyveromyces and in which either one of ADH1 gene and ADH4 gene both derived from Kluyveromyces marxianus is diminished. Therefore, it can be considered that claim 1 describes two types of yeast mutants. These yeast mutants belong to the genus Kluyveromyces and share a common technical feature "ADH gene is diminished". However, the matter does not make a contribution over the prior art in light of the contents disclosed in document 1 (Research in Microbiology, 2000, Vol.151, pp.777-784), and cannot be regarded as a special technical feature.

(continued to extra sheet)

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

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The inventions described in claims 2-6 refer to claim 1. Therefore, these claims include two inventions, as in the case of claim 1.
Consequently, claims 1-6 describe two inventions.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５７７０４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/19(2006.01)i, C12P7/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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.　C12N1/19, C12P7/10, C12N15/09

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

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/MEDLINE/WPIDS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(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	HEIPIEPER H.J. et al., Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in adh multiple and null mutants of Kluyveromyces lactis. Research in Microbiology, 2000, Vol.151, pp.777-784	1, 2/ 3, 4

☑　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
１２．０４．２０１２	２４．０４．２０１２

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　３９６０
伊達　利奈
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
Y	LERTWATTANASAKUL N. et al., Comparison of the Gene Expression Patterns of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus and Their Physiological Functions. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, Vol.71, No.5, pp.1170-1182	3, 4
A	NONKLANG S. et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042. Applied and Environmental Microbiology, 2008, Vol.74, No.24, pp.7514-7521	1-6
A	CHO JY. et al., Pichia stipitis Genes for Alcohol Dehydrogenase with Fermentative and Respiratory Functions. Applied and Environmental Microbiology, 1998, Vol.64, No.4, pp.1350-1358	1-6
A	BERA A.K. et al., A genetic overhaul of Saccharomyces cerevisiae 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011(Published online 17 August 2010), Vol.38, pp.617-626	1-6
A	JP 2011-024500 A (株式会社豊田中央研究所) 2011.02.10, (ファミリーなし)	1-6
A	WO 2009/116286 A1 (国立大学法人山口大学) 2009.09.24, & EP 2256194 A1 & US 2011/0020937 A1	1-6
A	WO 2008/098227 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2008.08.14, & US 2009/0081746 A1 & EP 2118266 A2 & JP 2011-510611 A	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５７７０４

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

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

請求項１には、Kluyveromyces属に属する酵母であって、Kluyveromyces marxianus 由来のＡＤＨ１遺伝子又はＡＤＨ４遺伝子のいずれかを減弱化した変異体酵母が記載されているため、２種類の変異体酵母が記載されているといえる。これら変異体酵母は「Kluyveromyces 属に属する酵母であって、ＡＤＨ遺伝子が減弱化されている」という共通の技術的特徴を有しているが、当該事項は、文献１（Research in Microbiology, 2000, Vol.151, pp.777-784）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

請求項２－６に係る発明は、請求項１を引用するものであるから、請求項１と同様に２つの発明を含むものであると認める。

したがって、請求項１－６には２つの発明が記載されている。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。