

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-533292  
(P2015-533292A)

(43) 公表日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 9/42</b> (2006.01)	C 12 N 9/42	Z N A 4 B 0 2 4
<b>C 13 K 1/02</b> (2006.01)	C 13 K 1/02	4 B 0 5 0
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 0 6 4
<b>C 12 P 19/14</b> (2006.01)	C 12 P 19/14	A 4 B 0 6 5
<b>C 12 N 1/15</b> (2006.01)	C 12 N 1/15	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-540738 (P2015-540738)	(71) 出願人	509240479 ダニスコ・ユース・インク
(86) (22) 出願日	平成25年10月30日 (2013.10.30)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94 304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ ード 925
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月30日 (2015.6.30)	(74) 代理人	100071010 弁理士 山崎 行造
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/067413	(74) 代理人	100118647 弁理士 赤松 利昭
(87) 國際公開番号	W02014/070837	(74) 代理人	100138438 弁理士 尾首 亘聰
(87) 國際公開日	平成26年5月8日 (2014.5.8)	(74) 代理人	100138519 弁理士 奥谷 雅子
(31) 優先権主張番号	61/720,697	(74) 代理人	100123892 弁理士 内藤 忠雄
(32) 優先日	平成24年10月31日 (2012.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) 由来のβ-グルコシダーゼ

## (57) 【要約】

本発明の組成物及び方法は、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) 由来の - グルコシダーゼ、 - グルコシダーゼをコードするポリヌクレオチド、並びにその製造及び使用方法に関する。 - グルコシダーゼを含有する製剤は、リゲノセルロース系バイオマス基質の加水分解への使用に適している。

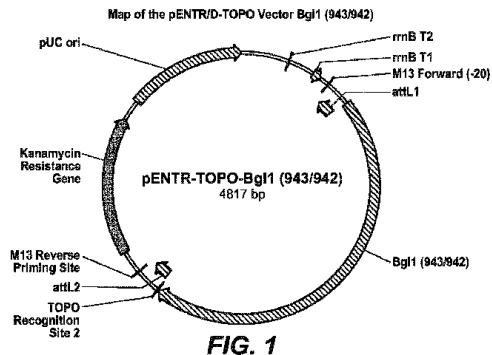


FIG. 1

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 75 % 同一であるアミノ酸配列を含み、 - グルコシダーゼ活性を有する組換えポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記組換えポリペプチド及びトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11 を使用してリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する場合に、前記トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11 と比較して前記ポリペプチドの - グルコシダーゼ活性が向上している、請求項 1 に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 3】**

前記 - グルコシダーゼ活性の向上が、セロビアーゼ活性の増大である、請求項 1 又は 2 に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 4】**

前記 - グルコシダーゼ活性の向上が、同じ糖化条件下でのリグノセルロース系バイオマスからのグルコース収率の増加である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 5】**

糖化の前に前記リグノセルロース系バイオマスに前処理を行う、請求項 4 に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 6】**

配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 7】**

配列番号 2 又は配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチド。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドを含み、1種又はそれ以上の別のセルラーゼを更に含む組成物。

**【請求項 9】**

前記 1種又はそれ以上の別のセルラーゼが、ゼロ又は 1種又はそれ以上の別の - グルコシダーゼ、1種又はそれ以上のセロビオヒドロラーゼ、及び 1種又はそれ以上のエンドグルカナーゼから選択される、請求項 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドを含み、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含む組成物。

**【請求項 11】**

1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含む、請求項 8 又は 9 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記 1種又はそれ以上のヘミセルラーゼが、1種又はそれ以上のキシラナーゼ、1種又はそれ以上の - キシロシダーゼ、及び 1種又はそれ以上の L - アラビノフラノシダーゼから選択される、請求項 10 又は 11 に記載の組成物。

**【請求項 13】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組換えポリペプチドをコードしている核酸。

**【請求項 14】**

前記ポリペプチドが、シグナルペプチド配列を更に含む、請求項 13 に記載の核酸。

**【請求項 15】**

前記シグナルペプチド配列が、配列番号 13 ~ 42 からなる群から選択される、請求項 14 に記載の核酸。

**【請求項 16】**

作動可能に調節配列と組み合わせて、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸を

10

20

30

40

50

含む発現ベクター。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 18】

細菌細胞又は真菌細胞である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 17 又は 18 に記載の宿主細胞及び培養培地を含む組成物。

【請求項 20】

- グルコシダーゼを生成する方法であって、- グルコシダーゼを産生するのに好適な条件下で、請求項 17 又は 18 に記載の宿主細胞を培養培地中で培養する工程を含む方法。

10

【請求項 21】

前記培養培地の上清中に、請求項 20 に記載の方法に従って生産させた - グルコシダーゼを含む組成物。

【請求項 22】

リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するための方法であって、前記リグノセルロース系バイオマス基質を、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドと、又は請求項 21 に記載の組成物と接触させて、グルコース又は他の糖を得る工程を含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(優先権)

本出願は、その全体が参考として本明細書に組み込まれる 2012 年 10 月 31 日に出願された米国仮出願シリアル番号第 61/720,697 号の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明の組成物及び方法は、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) から得ることができる - グルコシダーゼポリペプチド、- グルコシダーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにその製造及び使用方法に関する。 - グルコシダーゼポリペプチドを含む製剤及び組成物は、リグノセルロース系バイオマスを分解又は加水分解するために有用である。

30

【背景技術】

【0003】

セルロース及びヘミセルロースは、光合成によって生成される最も豊富な植物材料である。これらは、高分子基質を単糖に加水分解することができる細胞外酵素を生産する非常に多くの微生物（例えば、細菌、酵母及び真菌）により分解し、エネルギー源として使用することができる (Aro et al., (2001) J. Biol. Chem., 276: 24309 ~ 24314)。非再生可能資源の取り組みには限界があり、セルロースが主要な再生可能エネルギー資源となる可能性は非常に大きい (Krishna et al., (2001) Bioresource Tech., 77: 193 ~ 196)。生物学的プロセスによるセルロースの効率的な利用は、食糧、飼料、及び燃料の不足を解消する取り組みの一つである (Ohmiya et al., (1997) Biotechnol. Gen. Engineer. Rev., 14: 365 ~ 414)。

40

【0004】

セルラーゼは、セルロース (-1,4-グルカン又は D-グルコシド結合を含む) を加水分解し、グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖などを形成する酵素である。セルラーゼは、慣例的に以下の 3 つの主要なクラスに分類されている：エンドグルカナーゼ (EC 3.2.1.4) (「EG」)、エキソグルカナーゼ又はセロビオヒドロラーゼ (EC 3.2.1.91) (「CBH」) 及び - グルコシダーゼ ( [ ] - D - グ

50

ルコシドグルコヒドロラーゼ；EC 3.2.1.21) (「BG」) (Knowles et al., (1987) *TI BTECH* 5: 255~261; 及び Schulen, (1988) *Methods Enzymol.*, 160: 234~243)。エンドグルカナーゼはセルロース纖維の非結晶部分に主に作用するが、セロビオヒドロラーゼは結晶性セルロースも分解することができる (Nevalaainen and Penttila, (1995) *Mycota*, 303~319)。よって、結晶性セルロースを効率的に可溶化するためには、セルラーゼ系においてセロビオヒドロラーゼが存在することが必要である (Suurnakkiset al., (2000) *Cellulose*, 7: 189~209)。-グルコシダーゼは、セロビオース、セロオリゴ糖、及び他のグルコシドからD-グルコース単位を遊離させる働きをする (Freer, (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 9337~9342)。

## 【0005】

セルラーゼは、多くの細菌、酵母、及び真菌によって產生されることが知られている。ある種の真菌は、結晶形態のセルロースを分解することができる完全なセルラーゼ系を產生する。これらの真菌は、発酵して数種類のセルラーゼ又はセルラーゼ混合物を產生することができる。同じ真菌及び別の真菌を、ある特定のセルラーゼを產生又は過剰產生するように改変し、異なるタイプ又は比率のセルラーゼを含むセルラーゼ混合物を得ることもできる。真菌は、様々なセルラーゼを発酵によって大量に產生するように改変することもできる。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの多くの酵母は、天然の状態でセルロース加水分解能を有さないため、糸状菌は特別な役割を果たす (例えば、Wood et al., (1998) *Methods in Enzymology*, 160: 87~116を参照されたい)。

## 【0006】

CBH、EG及びBGの真菌セルラーゼ分類は、それぞれの分類が複数の成分を包含するよう更に拡大することができる。例えば、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) (ヒポクレア・ジェコリナ (*Hypocrea jecorina*) とも称される) を含む様々な分離源真菌から多数のCBH、EG及びBGが単離されており、これらには2つのCBH、すなわち、CBH I (「CBH1」) 及びCBH II (「CBH2」)、少なくとも8つのEG、すなわち、EG I、EG II、EG III、EG IV、EG V、EG VI、EG VII及びEG VIII、並びに少なくとも5つのBG、すなわち、BG 1、BG 2、BG 3、BG 4、BG 5及びBG 7の既知の遺伝子が含まれる (Foreman et al. (2003), *J. Biol. Chem.* 278 (34): 31988~31997)。EG IV、EG V及びEG VIIはまた、キシログルカナーゼ活性も有する。

## 【0007】

結晶セルロースを効率的にグルコースに変換するには、CBH、EG及びBG分類のそれぞれの成分を含む完全なセルラーゼ系が必要とされ、単離された成分による結晶セルロースの加水分解は効率が低い (Filho et al., (1996) *Can. J. Microbiol.*, 42: 1~5)。エンド-1,4--グルカナーゼ (EG) 及びエキソ-セロビオヒドロラーゼ (CBH) は、セロオリゴ糖 (主生成物はセロビオース) へのセルロースの加水分解を触媒する一方、-グルコシダーゼ (BGL) はオリゴ糖をグルコースへと変換する。異なる分類のセルラーゼ成分間で、相乗的な関係が観察されている。特に、EG型セルラーゼ及びCBH型セルラーゼは、相乗的に作用してセルロースを効率的に分解する。-グルコシダーゼは、糖をエタノールに発酵させるために使用される、例えば酵母などの微生物への毒性があり、またエンドグルカナーゼ及びセロビオヒドロラーゼの活性も阻害し、これらの酵素が結晶セルロースを更に加水分解できないようにするセロビオースなどのセロオリゴ糖から、グルコースを遊離させるのに重要な役割を果たす。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

## 【0008】

セルロース材料の分解又は変換において - グルコシダーゼが果たす重要な役割を考慮すると、セルロース供給原料を加水分解する効率又は能力の向上した - グルコシダーゼ相同体を発見、同定、調製、及び適用することが望ましく、有利である。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) から得ることができる - グルコシダーゼ及びその使用

セルロースの酵素的加水分解は依然として、セルロース糖及び / 又は下流生成物であり得る材料のリグノセルロース系バイオマス供給原料から生物生産する際の主な律速段階の 1 つである。 - グルコシダーゼは、そのプロセスの最後の工程を触媒し、阻害性のセロビオースからグルコースを遊離するという重要な役割を果たすため、その活性及び効率は、酵素によるリグノセルロース系バイオマス変換の全体の効率、結果的に酵素溶液の使用コストに直接寄与する。したがって、新規でより効率的な - グルコシダーゼを発見、製造及び使用することに大きな関心が寄せられている。

10

## 【0010】

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 又はヒポクレア・ジェコリナ (*Hyphomycetes jecorina*) 由来の - グルコシダーゼ B g 1 1、B g 1 3、B g 1 5、B g 1 7 など (Korotkova O. G. et al., (2009) *Biochemistry* 74: 569 ~ 577; Chauve, M. et al., (2010) *Biotechnol. Biofuels* 3: 3 - 3)、フミコラ・グリセア (*Humicola grisea*)

20

変異体サーモイデア (*thermoidea*) 由来 (Nascimento, C. V. et al., (2010) *J. Microbiol.* 48, 53 ~ 62)；スボロトリクム・ブルベルレンタム (*Sporotrichum pulverulentum*) 由来、Deshpande V. et al., (1988) *Methods Enzymol.*, 160: 415 ~ 424)；アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) の (Fukuda T. et al., (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 1027 ~ 1033、タラロミセス・サーモフィラス (*Talaromyces thermophilus*) CBS 236.58 由来 (Nakkharat P. et al., (2006) *J. Biotechnol.* 123: 304 ~ 313)、タラロミセス・エメリソニ (*Talaromyces emersonii*) 由来 (Murray P., et al., (2004) *Protein Expr. Purif.* 38: 248 ~ 257) の - グルコシダーゼを含む多数の - グルコシダーゼが知られているが、これまでのところトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) の - グルコシダーゼ B g 1 1 及びアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の

30

- グルコシダーゼ S P 1 8 8 が基準の - グルコシダーゼと考えられており、他の - グルコシダーゼの活性及び性能はこれらに対して評価されている。トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 は、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の - グルコシダーゼ S P 1 8 8 よりも高い特異的活性を有するが、前者は分泌が不十分である可能性があり、一方後者はグルコース阻害に対してより感受性であることが報告されている (Chauve, M. et al., (2010) *Biotechnol. Biofuels*, 3 (1): 3)。

40

## 【0011】

本発明の組成物及び方法の一態様は、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するため、真菌種マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) から単離された高活性の - グルコシダーゼの適用又は使用である。マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) といういネイもち病真菌のゲノムは、2005年に Dean et al. によって *Nature*, 434 (7036): 980 ~ 986 (2005) においてアノテーションされている。本明細書に記載の配列番号 2 の配列は、国立生物科学情報センター (National Center for Biotechnology Information)、米国国立医学図書館 (National Library of Medicine) (NCBI) によって X P \_ 0 0 3 7 0 9 9 0 7 のアクセスション番

50

号で公開され、 $\alpha$ -グルコシダーゼIと指定された。この酵素は以前に、組換え型で作製されたことがなく、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するために有用な酵素組成物中に含まれたこともない。この酵素又はそのような酵素を含む組成物は、リグノセルロース系バイオマス基質の好適な酵素的加水分解方法においてそのような基質に適用されたこともない。更に、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) の $\alpha$ -グルコシダーゼは、改变微生物によってこれまで発現されていない。1つ又はそれ以上のセルラーゼ遺伝子及び/又は1つ又はそれ以上のヘミセルラーゼ遺伝子との共発現もされていない。長年にわたる開発によって極めて有効になった好適な微生物における発現、並びに異種タンパク質及び酵素の効率的な生産菌により、遺伝子的手段の蓄積にも助けられて、これらの有用な $\alpha$ -グルコシダーゼを、遺伝子組み換えされていない微生物において内因的に発現させる場合よりも、又は植物において発現させる場合よりもかなり大量に発現させることが可能となった。 $\alpha$ -グルコシダーゼに分類される酵素は、その起源だけでなくリグノセルロース系基質に対するその活性も多様であるものの、全てとはいえないがほとんどの $\alpha$ -グルコシダーゼは、好適な条件下でセロビオース加水分解を触媒することができる。例えば、セロビオースだけでなくより長鎖のオリゴ糖に対しても活性をもつものもあり、一方、より限局的にセロビオースだけに活性をもつものもある。同様の基質選択性を有する $\alpha$ -グルコシダーゼであっても、触媒活性及び効率がより高く、したがって酵素が触媒する加水分解に長くても2~3日以上はかけることができない工業的用途においてより有用な、酵素反応速度プロファイルを有するものもある。更に、リグノセルロース系バイオマスの酵素的加水分解により得られるセルロース糖を変換することができる発酵微生物又はエタノール生成微生物で、本発明のMg3Aポリペプチドなどのマグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) 由来の $\alpha$ -グルコシダーゼを発現するように改变されたものはない。エタノール生成微生物における $\alpha$ -グルコシダーゼの発現は、酵素糖化では完全に変換されない残存セロビオースからD-グルコースを更に遊離させる重要な機会をもたらし、この場合、このように生成されたD-グルコースは、エタノール生成微生物が直ちに消費するか、時間内に発酵することができる。

## 【0012】

本発明の組成物及び方法の態様は、本明細書において「Mg3A」又は「Mg3Aポリペプチド」と称する、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) に由来するグリコシルヒドロラーゼファミリー3の $\alpha$ -グルコシダーゼポリペプチド、それをコードしている核酸、それを含む組成物、並びにリグノセルロース系バイオマスの可溶性発酵性糖への加水分解又は変換において $\alpha$ -グルコシダーゼポリペプチド及びそれを含む組成物を生成及び適用する方法に関連する。そのような発酵性糖は、その後、セルロースエタノール、燃料、並びに他のバイオケミカル及び有用な製品に変換することができる。ある特定の実施形態では、Mg3A $\alpha$ -グルコシダーゼポリペプチドは、既知の高正確性 $\alpha$ -グルコシダーゼである、基準となるトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11と比較して、より高い $\alpha$ -グルクロシダーゼ (glucosidase) 活性を有し、かつ/又は所与のリグノセルロース系バイオマス基質の加水分解力が増大している (Chauve, M. et al., (2010) Biotechnol. Biofuels, 3(1):3)。

## 【0013】

一部の実施形態では、Mg3Aポリペプチドを、酵素組成物において1種又はそれ以上の別のセルラーゼと一緒に、又はその存在下において適用して、好適なバイオマス基質を加水分解又は分解する。1種又はそれ以上の別のセルラーゼは、例えば、他の $\alpha$ -グルコシダーゼ、セロビオヒドロラーゼ、及び/又はエンドグルカナーゼであってよい。例えば、酵素組成物は、Mg3Aポリペプチド、セロビオヒドロラーゼ、及びエンドグルカナーゼを含んでいてよい。一部の実施形態では、Mg3Aポリペプチドは、酵素組成物において1種又はそれ以上のヘミセルラーゼと一緒に、又はその存在下において適用される。1種又はそれ以上のヘミセルラーゼは、例えば、キシラナーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、及び/又はL-アラビノフラノシダーゼであってよい。更なる実施形態では、Mg3Aポリペプチドは、酵素組成物において1種又はそれ以上のセルラーゼ及び1種又はそれ以上の

10

20

30

40

50

ヘミセルラーゼと一緒に、又はその存在下において適用される。例えば、酵素組成物は、Mg 3 A ポリペプチド、ゼロ又は1種又は2種の別の - グルコシダーゼ、1種又はそれ以上のセロビオヒドロラーゼ、1種又はそれ以上のエンドグルカナーゼ；任意にゼロ又は1種又はそれ以上のキシラナーゼ、ゼロ又は1種又はそれ以上の - キシロシダーゼ、及びゼロ又は1種又はそれ以上のL - アラビノフラノシダーゼを含む。

【0014】

ある特定の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチド、又はMg 3 A ポリペプチドを含む組成物を、リグノセルロース系バイオマス基質の酵素的加水分解により生成される可溶性発酵性糖を代謝し、そのような糖をエタノール、バイオケミカル又は他の有用な材料に変換することができるエタノール生成微生物の存在下において、リグノセルロース系バイオマス基質又は部分的に加水分解されたリグノセルロース系バイオマス基質に適用する。そのようなプロセスは、発酵工程の前に加水分解工程が起こる厳密な逐次プロセスであってよい。そのようなプロセスは、代替として、加水分解工程をまず開始するが、後から開始する発酵工程としばらくの間重複させるハイブリッドプロセスであってもよい。そのようなプロセスは、更に代替として、バイオマス基質の酵素的加水分解が起こると同時に、酵素的加水分解により生成した糖がエタノール生成源により発酵される、同時加水分解発酵プロセス (simultaneous hydrolysis and fermentation process) であってもよい。

【0015】

Mg 3 A ポリペプチドは、例えば、酵素的加水分解プロセス及びセロビオースなどのオリゴ糖からのD - グルコースの遊離に寄与する酵素組成物の一部であってもよい。ある特定の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチドを遺伝子改変して、エタノール生成微生物がそのような - グルコシダーゼ活性を発現及び/又は分泌するようにエタノール生成源において発現させてもよい。更に、Mg 3 A ポリペプチドは、加水分解酵素組成物の一部であると同時にまたエタノール生成源によって発現及び/又は分泌されてもよく、この場合、加水分解酵素組成物を使用したリグノセルロース系バイオマス基質の加水分解により生成した可溶性発酵性糖は、Mg 3 A ポリペプチドもまた発現及び/又は分泌するエタノール生成微生物によってエタノールに代謝及び/又は変換される。加水分解酵素組成物は、1種若しくはそれ以上の他のセルラーゼ及び/又は1種若しくはそれ以上のヘミセルラーゼに加えて、Mg 3 A ポリペプチドを含むことができる。エタノール生成源は、Mg 3 A ポリペプチド、1種又はそれ以上の別のセルラーゼ、1種又はそれ以上の別のヘミセルラーゼ、又はこれらの酵素の組合せを発現するように改変することができる。 - グルコシダーゼの1種又はそれ以上が、加水分解酵素組成物中に存在し、かつエタノール生成源によって発現及び/又は分泌されてもよい。例えば、リグノセルロース系バイオマス基質の加水分解は、Mg 3 A ポリペプチドを含む酵素組成物を使用して実現してもよく、その場合、加水分解により生成する糖を、Mg 3 A ポリペプチドを発現及び/又は分泌するように改変された微生物を用いて発酵することができる。あるいは、第1の - グルコシダーゼを含む組成物が加水分解工程に関与し、第1の - グルコシダーゼとは異なる第2の - グルコシダーゼが、エタノール生成源により発現及び/又は分泌される。例えば、リグノセルロース系バイオマス基質の加水分解は、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Bg 11 を含む加水分解酵素組成物を使用して実現してもよく、加水分解により生成する発酵性糖は、Mg 3 A ポリペプチドを発現及び/又は分泌するエタノール生成微生物により発酵され、又は逆もまた同様である。

【0016】

本明細書において示すように、Mg 3 A ポリペプチド及びMg 3 A ポリペプチドを含む組成物は、リグノセルロース系バイオマスの糖化及び分解が起こる条件において効率が向上している。Mg 3 A ポリペプチドを含む酵素組成物の効率の向上は、所与のバイオマス基質を加水分解するその性能を、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) のBg 11 を含む、他の点では同等の酵素組成物の性能と比較した場合に示される。

【0017】

ある特定の実施形態では、 - グルコシダーゼ活性の向上又は増大は、Mg 3 A ポリペ

10

20

30

40

50

チドのセロビアーゼ活性の向上又は増大に反映され、これは、セロビオースを基質として使用して、例えば、約30から約65の温度（例えば、約35から約60、約40から約55、約45から約55、約48から約52、約40、約45、約50、約55など）で測定される。一部の実施形態では、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1の活性と比較して向上したMg3Aポリペプチドの-グルコシダーゼ活性は、-グルコシダーゼポリペプチドを使用してリン酸膨潤セルロース（PASC）を、例えば、Walseth, TAPP 1971, 35:228及びWood, Biochem. J. 1971, 121:353~362の適合プロトコールを用いて前処理した前処理Avicelを加水分解する場合に観察される。一部の実施形態では、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1の活性と比較して向上したMg3Aポリペプチドの-グルコシダーゼ活性は、-グルコシダーゼポリペプチドを使用して、希アンモニア前処理されたトウモロコシ茎葉、例えば、国際特許出願公開：国際公開第WO2006110891、国際公開第WO2006110899、国際公開第WO2006110900、国際公開第WO2006110901、及び国際公開第WO2006110902；米国特許第7,998,713号、同第7,932,063号に記載のものを加水分解する場合に観察される。

10

20

30

40

50

## 【0018】

一部の実施形態では、-グルコシダーゼ活性の向上は、より高い温度で実施される糖化反応において、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1の力と比較して、Mg3Aポリペプチドがバイオマス基質の変換又は加水分解を触媒する力の強さが増大することに反映される。例えば、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1で観察されるものに対してMg3Aで観察される加水分解増大の差異又はレベルは、より低い温度よりもより高い温度で大きく、よって、本開示のMg3Aポリペプチドは、そのより高い熱安定性のために、より高い温度でのバイオマス加水分解に特に好適であることを示す。一部の実施形態では、約55の加水分解温度で、Mg3Aポリペプチドは、等量の別のセルラーゼ及びヘミセルラーゼ（hemicellase）の存在下において、同じレベルで添加されるトリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1と比較して、少なくとも2%、例えば、少なくとも5%、少なくとも7%、少なくとも10%、又は更には少なくとも15%高いレベルの同じ基質の加水分解を実現することができる。ある特定の実施形態では、Mg3Aの加水分解レベルとBgl1の加水分解レベルとの間のその差異は、50よりも55でより高い。高温でのポリペプチドのアンフォールディング又は分解を測定するために通常使用される融解温度（Tm）が、実際には、トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）Bgl1についてMg3Aよりもはるかに高いTm（例えば、約10高い）を示したため、Mg3Aのこの熱安定性又は高温での性能の向上はかなり予想外であることに留意されたい。理論に束縛されるものではないが、この驚くべき観察結果は、バイオマス基質の存在下では、Tmは熱安定性の良好な指標又は予測因子ではないことを示唆し得る。

## 【0019】

一部の態様では、Mg3Aポリペプチド及び/又はそれが酵素組成物において若しくはリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する方法において適用される場合は、（a）マグナポルテ・グリセア（*Magnaporthe grisea*）に由来する、それから得ることができる、又はそれにより産生される；（b）配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも75%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%）同一であるアミノ酸配列を含む組換えポリペプチドである；（c）配列番号2の触媒ドメイン、すなわちアミノ酸残基19~873と少なくとも75%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%）同一であるアミノ酸配列を含む組換えポリペプチドである；（d）配列番号3の成熟型アミノ酸配列、すなわち配列番号2のアミノ酸残基19~873と少なくとも75%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%）同一であるアミノ酸配列を含む組換えポリペプチドである；又は（e）-グルコシダーゼ活性を有する（a）、（b）、（c）又は（d）の断片である。ある特定の実施形態では、配列番号2の1つ又はそれ以上のアミノ酸残基に置換、欠失及び／又は挿入を含む、-グルコシダーゼ活性を有する変異体ポリペプチドが提供される。

#### 【0020】

一部の態様では、Mg3Aポリペプチド及び／又はそれが酵素組成物において又はリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する方法において適用される場合は、（a）配列番号1と少なくとも75%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）の配列同一性である核酸配列によってコードされているポリペプチド、又は（b）中程度ストリンジエンシー条件、高ストリンジエンシー条件又は極めて高いストリンジエンシー条件下で、配列番号1と又は少なくとも100個の連続するヌクレオチドである配列番号1の部分配列、又はその相補配列とハイブリダイズするものであり、このポリペプチドは-グルコシダーゼ活性を有する。一部の実施形態では、Mg3Aポリペプチド及び／又はそれが組成物において又はリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する方法において適用される場合、遺伝子コードの縮重のために、中程度ストリンジエンシー条件、高ストリンジエンシー条件又は極めて高いストリンジエンシー条件下で配列番号1と又は少なくとも100個の連続するヌクレオチドである配列番号1の部分配列とハイブリダイズしないにもかかわらず、-グルコシダーゼ活性を有し、配列番号2の配列と又は配列番号3の成熟-グルコシダーゼ配列と少なくとも75%（例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%）同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするものである。核酸配列は合成であってもよく、必ずしもマグナポルテ・グリセア（Magnaporthe grisea）に由来しないが、核酸配列は、-グルコシダーゼ活性を有し、配列番号2又は配列番号3と少なくとも（least）75%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

#### 【0021】

いくつかの好ましい実施形態では、Mg3Aポリペプチド又はMg3Aポリペプチドを含む組成物は、野生型トリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesei）Bgl1（配列番号4の）、又はトリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesei）Bgl1を含む酵素組成物と比較して、-グルコシダーゼ活性が向上している。ある特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法のMg3Aポリペプチドのセルラーゼ活性は、クロロ-ニトロ-フェニル-グルコシド（CNP G）加水分解アッセイを使用して測定したときに、トリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesei）Bgl1の活性より少なくとも約5%高い、又は約10%高い、又は約15%高い、又は約20%高い。CNP Gアッセイは、本明細書において実施例2Bに記載されている。一部の実施形態では、本発明の組成物及び方法のMg3Aポリペプチドのセルラーゼ活性は、CNP G加水分解アッセイを使用して測定したときに、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger）B-gluの活性より少なくとも約2倍高い、少なくとも約5倍高い、少なくとも約6倍高い、少なくとも約7倍高い、少なくとも約8倍高い、少なくとも約9倍高い、又は更には少なくとも約10倍高い。

#### 【0022】

例えば、本発明の組成物及び方法のMg3Aポリペプチドの-グルコシダーゼ活性は、セロビオース加水分解アッセイを使用して測定したときに、トリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesei）Bgl1の活性より少なくとも約20%高い（例えば、少なくとも約20%高い、少なくとも約30%高い、少なくとも約40%高い、少なくとも約50%高い、少なくとも約60%高い、少なくとも約70%高い、少なくとも約80%高い、少なくとも約85%高い、例えば、少なくとも約87%高いなど）。セロビオース加水分解アッセイは、本明細書において実施例2Cに記載されている。一部の実施形態では、本発明の組成物及び方法のMg3Aポリペプチドの-グルコシダーゼ活性は、セロビオース

10

20

30

40

50

加水分解アッセイを使用して測定したときに、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B - g 1 u の活性より約 2 % 低い、約 5 % 低い、約 7 % 低い、約 10 % 低い、例えば、約 13 % 低いなどである。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態では、本発明の組成物及び方法の Mg 3 A ポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 と比較して、セロビオース加水分解活性が実質的に増大している（例えば、少なくとも約 20 % 高い、少なくとも約 30 % 高い、少なくとも約 40 % 高い、少なくとも約 50 % 高い、少なくとも約 60 % 高い、少なくとも約 70 % 高い、少なくとも約 80 % 高い、少なくとも約 85 % 高い、例えば、少なくとも約 87 % 高いなど）が、クロロ - ニトロ - フェニル - グルコシド (C N P G) を加水分解する力は、それほど劇的でなく若干増大している（例えば、約 5 % 高い、又は約 10 % 高い、又は約 15 % 高い、又は約 20 % 高い）。例えば、本発明の組成物及び方法の Mg 3 A ポリペプチドは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B - g 1 u と比較して C N P G 加水分解活性が実質的に増大しているが、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B - g 1 u と比較した場合のセロビアーゼ活性又はセロビオース加水分解活性がある程度同様であるか又はわずかに低い。

10

【 0 0 2 4 】

一部の実施形態では、組換え Mg 3 A ポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 と比較して、C N P G / セロビオースに対する加水分解活性の比が約 10 % 低減している、約 20 % 低減している、約 30 % 低減している、又は更には約 40 % 低減している。一部の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチドは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B - g 1 u と比較して、約 2 倍、約 5 倍、約 7 倍、約 10 倍、約 15 倍、又は更には約 20 倍高い、C N P G / セロビオースに対する相対的加水分解活性比を有する。

20

【 0 0 2 5 】

ある特定の態様では、Mg 3 A ポリペプチド及び本発明の Mg 3 A ポリペプチドを含む組成物は、野生型トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 (配列番号 4 ) のものと比較して、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する性能が向上している。一部の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチド又は Mg 3 A ポリペプチドを含む組成物の加水分解性能の向上は、ある特定の方法で前処理された所与のリグノセルロース系バイオマス基質から、同じ糖化条件下で、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 又はトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 を含む同一の酵素組成物により同じように前処理された同じバイオマスから生成されるグルコースのレベルと比較して、より多量のグルコースが生成されることによって観察できる。例えば、Mg 3 A ポリペプチドによって又は Mg 3 A ポリペプチドを含む酵素組成物によって生成されるグルコースの量は、0 ~ 10 mg (例えば、約 1 mg、約 2 mg、約 3 mg、約 4 mg、約 5 mg、約 6 mg、約 7 mg、約 8 mg、約 9 mg、約 10 mg) の - グルコシダーゼ (Mg 3 A ポリペプチド又はトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 ) を使用してバイオマス基質中のグルカン 1 g を加水分解する場合に、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 又はトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 (Mg 3 A ポリペプチドではない) を含む、他の点では同一の酵素組成物によって生成されるグルコースの量よりも、少なくとも約 5 % (例えば、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %) 多い。

30

【 0 0 2 6 】

一部の態様では、Mg 3 A ポリペプチド又は Mg 3 A ポリペプチドを含む組成物の加水分解性能の向上は、ある特定の方法で前処理された所与のリグノセルロース系バイオマス基質から、同じ糖化条件下で、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 又はトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) B g 1 1 を含む、他の点では同一の酵素組成物による同じように前処理された同じバイオマスからのグルカン変換率 % のレベ

40

50

ルと比較して、グルカン変換率%が増加することによって観察できる。例えば、Mg3Aポリペプチドによる又はMg3Aポリペプチドを含む酵素組成物によるグルカン変換率%は、0~10mg(例えば、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg)の-グルコシダーゼ(Mg3Aポリペプチド又はトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1)を使用してバイオマス基質中のグルカン1gを加水分解する場合に、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1又はトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1(Mg3Aポリペプチドではない)を含む、他の点では同一の酵素組成物によるグルカン変換率%より少なくとも約5%(例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、又は少なくとも約15%)高い。

10

## 【0027】

更なる態様では、Mg3Aポリペプチド及びMg3Aポリペプチドを含む組成物の加水分解性能の向上は、ある特定の方法で前処理された所与のリグノセルロース系バイオマス基質の加水分解の結果、同じ糖化条件下で、同じバイオマス基質をトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1又はトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1を含む、他の点では同一の組成物によって加水分解する場合のセロビオース残存量と比較して、セロビアーゼ活性がより高く、かつ/又は生成物混合物中の残存セロビオースの量が低減していることによって観察できる。例えば、Mg3Aポリペプチド又はMg3Aポリペプチドを含む組成物によって、ある特定の方法で前処理された所与のバイオマス基質の加水分解により生成された生成物混合物中の残存セロビオースの量は、同じ糖化条件下で、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1によって又はトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1を含む他の点では同一の酵素組成物によって、同じ方法で前処理された同じバイオマス基質の加水分解により生成された生成物混合物中の生成された残存セロビオースの量より少なくとも約5%(例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、又は更には少なくとも約20%)少ない。これは、0~10mgの-グルコシダーゼ(例えば、約1mg、約2mg、約3mg、約4mg、約5mg、約6mg、約7mg、約8mg、約9mg、約10mg)の-グルコシダーゼ(例えば、Mg3Aポリペプチド又はトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1)を使用してバイオマス基質中のグルカン1gを加水分解する場合である。

20

## 【0028】

本発明の組成物及び方法の態様は、上記で詳述した組換えMg3Aポリペプチド及びリグノセルロース系バイオマスを含む組成物を含む。好適なリグノセルロース系バイオマスは、例えば、農作物、食品又は飼料製造の副生成物、リグノセルロース廃棄物、例えばイネ科草本の残渣を含む植物残渣、又は紙くず若しくは廃棄紙に由来してもよい。ある特定の実施形態では、キシラン、ヘミセルロース、セルロース及び/又はリグニン材料を酵素に利用し易い又は作用し易いものにし、よって酵素的加水分解をより行い易くするために、リグノセルロース系バイオマスには、1つ又はそれ以上の前処理工程を行っている。好適な前処理方法は、例えば、反応器中で、強酸及び金属塩の希釀溶液を含む触媒にバイオマス材料を接触させることであってよい。例えば、米国特許第6,660,506号、同第6,423,145号を参照されたい。あるいは、好適な前処理は、例えば、米国特許第5,536,325号に記載されている多段階プロセスであってよい。ある特定の実施形態では、バイオマス材料には、米国特許第6,409,841号の開示に従って、約0.4%から約2%の強酸を使用した1つ又はそれ以上の段階の希酸加水分解を行ってよい。前処理方法の更なる態様は、例えば、米国特許第5,705,369号; Gould, (1984) Biotech. & Bioengr., 26: 46~52; Teixeira et al., (1999) Appl. Biochem. & Biotech., 77~79: 19~34; 国際公開特許出願第WO2004/081185号; 又は米国特許公開第20070031918号、又は国際公開特許出願第WO06110901号に記載されているものを含み得る。

30

40

50

## 【0029】

本発明はまた、<sup>-</sup>グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている単離ポリヌクレオチドであって、以下から選択される単離ポリヌクレオチドにも関連する。

(1) 配列番号2又は配列番号3と少なくとも75% (例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%)の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド；

(2) 配列番号1と少なくとも75% (例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%)の同一性を有する、又は中程度ストリンジエンシー条件、高ストリンジエンシー条件、又は極めて高いストリンジエンシー条件下で配列番号1、又はその相補配列にハイブリダイズする、ポリヌクレオチド。

## 【0030】

本発明の組成物及び方法の態様は、配列番号2の配列又は成熟配列である配列番号3の配列と少なくとも75%同一 (例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%)であるアミノ酸配列を含む組換えポリペプチドをコードしている単離核酸配列を用いる、<sup>-</sup>グルコシダーゼ活性を有するMg3Aポリペプチドを製造又は生成する方法を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、産生されるMg3Aポリペプチドが宿主生物により分泌されるような天然又は非天然シグナルペプチドを更に含み、例えば、シグナルペプチドは、配列番号13 (トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11のシグナル配列) に少なくとも90%同一である配列を含む。ある特定の実施形態では、単離核酸は、配列番号1に少なくとも75% (例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%)同一である配列を含む。ある特定の実施形態では、単離核酸は、シグナルペプチド配列をコードしている核酸配列を更に含む。ある特定の実施形態では、シグナルペプチド配列は、配列番号13～42から選択される配列であってよい。ある特定の詳細な実施形態では、配列番号13のシグナルペプチド配列をコードしている核酸配列を使用して、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) においてMg3Aポリペプチドを発現させる。

## 【0031】

本発明の組成物及び方法の態様は、作動可能に調節配列と組み合わせて上記の単離核酸を含む発現ベクターを含む。

## 【0032】

本発明の組成物及び方法の態様は、発現ベクターを含む宿主細胞を含む。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、細菌細胞又は真菌細胞である。ある特定の実施形態では、発現ベクターを含む宿主細胞は、リグノセルロース系バイオマスの加水分解により生成する可溶性糖を代謝することができるエタノール生成微生物であり、加水分解は、化学的及び/又は酵素的プロセスの結果である。

## 【0033】

本発明の組成物及び方法の態様は、上記の宿主細胞及び培養培地を含む組成物を含む。本発明の組成物及び方法の態様は、<sup>-</sup>グルコシダーゼを產生するのに好適な条件下で、上記の宿主細胞を培養培地中で培養する工程を含む、Mg3Aポリペプチドを生成する方法を含む。

## 【0034】

本発明の組成物及び方法の態様は、上記の<sup>-</sup>グルコシダーゼを生成するための方法に従って生成した培養培地の上清中のMg3Aポリペプチドを含む組成物を含む。

## 【0035】

一部の態様では、本発明は、上記及び本明細書において記載の、<sup>-</sup>グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む、核酸構築物、組換え

10

20

30

40

50

発現ベクター、改変された宿主細胞に関する。更なる態様では、本発明は、核酸構築物、組換え発現ベクター、及び／又は改変された宿主細胞を使用して、本発明の - グルコシダーゼポリペプチド又はそのような - グルコシダーゼポリペプチドを含む組成物を調製又は生成する方法に連関する。特に、本発明は例えは、配列番号 2 又は配列番号 3 の成熟配列と少なくとも 75% 同一である、又は配列番号 1 と少なくとも 75% 同一であるポリヌクレオチドによってコードされている、 - グルコシダーゼの成熟配列に作動可能に連結した好適なシグナルペプチドを含む核酸構築物、そのような核酸構築物を含む単離ポリヌクレオチド、核酸構築物、組み換え発現ベクター、又は改変された宿主細胞に関する。一部の実施形態では、シグナルペプチド及び - グルコシダーゼ配列は異なる微生物に由来する。

10

## 【0036】

作動可能に調節配列と組み合わせて単離核酸を含む発現ベクターもまた提供される。加えて、発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。なお更なる態様では、宿主細胞及び培養培地を含む組成物が提供される。

## 【0037】

一部の実施形態では、宿主細胞は細菌細胞又は真菌細胞である。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、化学的加水分解又は酵素的加水分解又はこれらのプロセスの組合せによるものであってもよい、リグノセルロース系バイオマス基質の加水分解により生成される可溶性糖を代謝することができるが、異種の酵素を発現することもできるエタノール生成微生物である。一部の実施形態では、宿主細胞は、本発明の Mg 3 A ポリペプチドなどの異種ポリペプチドを発現することができるだけでなく、糖をエタノール及び／又は下流生成物に発酵することもできる、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 細胞である。ある特定の詳細な実施形態では、 - グルコシダーゼを発現するサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞又はザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 細胞は、1種又はそれ以上の - グルコシダーゼを含む酵素組成物によってリグノセルロース系バイオマスから生成される糖を発酵することができる。1種又はそれ以上の - グルコシダーゼを含む酵素組成物は、同じ - グルコシダーゼを含んでいてもよく、又は1種又はそれ以上の異なる - グルコシダーゼを含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、1種又はそれ以上の - グルコシダーゼを含む酵素組成物は、細菌又は真菌細胞であってもよい、改変された宿主細胞によって產生される酵素混合物であってもよい。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 細胞が本開示の Mg 3 A ポリペプチドを発現する場合、Mg 3 A ポリペプチドは、発現はされるが分泌されないことがある。したがって、 - グルコシダーゼ Mg 3 A ポリペプチドが D - グルコースの遊離を触媒するためには、そのような宿主細胞中にセロビオースが導入又は「輸送」されなければならない。したがってある特定の実施形態では、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 細胞は、Mg 3 A ポリペプチドをコードしている遺伝子に加えてセロビオーストランスポーター遺伝子により形質転換させる。セロビオーストランスポーター及び - グルコシダーゼは、例えは、Hart et al. (2011) PNAS, 108 (2) : 504 ~ 509 にあるように、得られる微生物がセロビオースを発酵することができるよう、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において発現されている。他のセロビオーストランスポーターは、例えは、公開されている米国特許出願番号第 20110262983 号にあるように、ピキア (*Pichia*) 酵母において発現されている。セロビオーストランスポーターは、例えは、Sekar et al. (2012) Applied Environmental Microbiology, 78 (5) : 1611 ~ 1614 にあるように、大腸菌 (*E. coli*) に導入されている。

20

## 【0038】

更なる実施形態では、Mg 3 A ポリペプチドは、宿主細胞に異種発現させる。例えは、Mg 3 A ポリペプチドは、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) ではない改変

30

40

40

50

微生物によって発現させる。一部の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチドを、1つ又はそれ以上の異なるセルラーゼ遺伝子と共に発現させる。一部の実施形態では、Mg 3 A ポリペプチドを、1つ又はそれ以上のヘミセルラーゼ遺伝子と共に発現させる。

#### 【0039】

一部の態様では、前述の段落の組換えMg 3 A ポリペプチドを含む組成物及びそのような組成物を調製する方法が提供される。一部の実施形態では、組成物は、1種又はそれ以上の別のセルラーゼを更に含み、この場合、1種又はそれ以上の別のセルラーゼは、宿主細胞によってMg 3 A ポリペプチドと共に発現させる。例えば、1種又はそれ以上の別のセルラーゼは、ゼロ又は1種又はそれ以上の別の - グルコシダーゼ、1種又はそれ以上のセロビオヒドロリーゼ (cellobiohydrolyase) 、及び / 又は1種又はそれ以上のエンドグルカナーゼから選択することができる。そのような他の - グルコシダーゼ、セロビオヒドロラーゼ及び / 又はエンドグルカナーゼが存在する場合、これを、単一の宿主細胞によってMg 3 A ポリペプチドと共に発現することができる。2種以上のセルラーゼのうちの少なくとも2種は、互いに異種であってもよく、又は異なる生物に由来してもよい。例えば、組成物は、2種の - グルコシダーゼを含んでいてもよく、第1の - グルコシダーゼはMg 3 A ポリペプチドであり、第2の - グルコシダーゼはマグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) 株に由来しない。例えば、組成物は、マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) に由来しない、少なくとも1種のセロビオヒドロラーゼ、1種のエンドグルカナーゼ、又は1種の - グルコシダーゼを含んでいてもよい。一部の実施形態では、セルラーゼのうちの1種又はそれ以上は宿主細胞の内因性のものであるが、改変されなければ宿主細胞において天然に存在していたであろうレベルとは異なるレベルで過剰発現又は発現される。例えば、セルラーゼのうちの1種又はそれ以上は、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 宿主細胞にもともと存在するトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) C B H 1 及び / 又は C B H 2 であってもよいが、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 宿主細胞においてMg 3 A ポリペプチドと共に発現するときに、C B H 1 及び C B H 2 のいずれか又は両方を過剰発現又は過少発現させる。

#### 【0040】

ある特定の実施形態では、組換えMg 3 A ポリペプチドを含む組成物は、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含んでもよく、この場合、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを、宿主細胞によってMg 3 A ポリペプチドと共に発現させる。例えば、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼは、1種又はそれ以上のキシラナーゼ、1種又はそれ以上の - キシロシダーゼ、及び / 又は1種又はそれ以上の L - アラビノフラノシダーゼから選択することができる。そのような他のキシラナーゼ、 - キシロシダーゼ及び L - アラビノフラノシダーゼが存在する場合、これを単一の宿主細胞によってMg 3 A ポリペプチドと共に発現することができる。一部の実施形態では、組成物は、マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) に由来しない少なくとも1種の - キシロシダーゼ、キシラナーゼ又はアラビノフラノシダーゼを含んでいてもよい。

#### 【0041】

更なる態様では、組換えMg 3 A ポリペプチドを含む組成物は、1種又はそれ以上の別のセルラーゼ及び1種又はそれ以上のヘミセルラーゼ (hemicellulase) を更に含んでもよく、この場合、1種又はそれ以上のセルラーゼ及び / 又は1種又はそれ以上のヘミセルラーゼは、宿主細胞によってMg 3 A ポリペプチドと共に発現させる。例えば、Mg 3 A ポリペプチドは、1種又はそれ以上の別の - グルコシダーゼ、1種又はそれ以上のセロビオヒドロラーゼ、1種又はそれ以上のエンドグルカナーゼ、1種又はそれ以上のエンドキシラナーゼ、1種又はそれ以上の - キシロシダーゼ、及び 1種又はそれ以上の L - アラビノフラノシダーゼと、他の非セルラーゼ非ヘミセルラーゼ酵素又はタンパク質に加えて、同じ宿主細胞において共発現せてもよい。本発明の組成物及び方法の態様はしたがって、Mg 3 A ポリペプチドに加えていくつかの酵素を共発現している上記の宿主細胞及び培養培地を含む組成物を含む。本発明の組成物及び方法の態様はしたがって、Mg 3 A 含有酵素組成物を生成する方法であって、上記のいくつかの酵素をMg 3 A ポリペプチドと共に発

10

20

30

40

50

現する宿主細胞を、培養培地中で、Mg 3 A 及び他の酵素を產生するために好適な条件下で培養する工程を含む、方法を含む。本発明の方法に従って生成されるMg 3 A ポリペプチド及び他の酵素を培養培地の上清中に含む組成物もまた提供される。そのような培養培地の上清は、細胞残屑を除去する濾過、殺菌手順、及び / 又は限外濾過又は中の酵素の含有率を高める若しくは濃縮する他の工程を典型的には含む、最低限の生成後の処理を行って又は行わずに、そのまま使用することができる。そのような上清は、本明細書において「全プロス」又は「全セルラーゼプロス」と呼ばれる。

#### 【0042】

更なる態様では、本発明は、セルロース材料を分解又は変換するため、及びセルロース材料から物質を生成するために好適な条件下で、上記の組成物を適用又は使用する方法に関連する。

10

#### 【0043】

更なる態様では、セルロース材料を発酵性糖に分解又は変換するための方法であって、好ましくはすでに 1 つ又はそれ以上の前処理工程を行っているセルロース材料を、Mg 3 A ポリペプチド又は前述の段落のうちの 1 つのそのようなポリペプチドを含む組成物と接触させて、発酵性糖を得る工程を含む、方法が提供される。

#### 【0044】

したがって、本明細書は、以下の特定の態様に関する。

第 1 の態様では、配列番号 2 と又は成熟配列である配列番号 3 と少なくとも 75 % 同一であるアミノ酸配列を含み、- グルコシダーゼ活性を有する組換えポリペプチド。

20

#### 【0045】

第 2 の態様では、組換えポリペプチド及びトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg 1 1 を使用してリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する場合に、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg 1 1 と比較して - グルコシダーゼ活性又はリグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する力が向上している、第 1 の態様の組換えポリペプチド。

#### 【0046】

第 3 の態様では、- グルコシダーゼ活性の向上が、セロビアーゼ活性の増大又はセロビオースを加水分解し、それにより D - グルコースを遊離させる力の向上である、上記の第 1 又は第 2 の態様の組換えポリペプチド。

30

#### 【0047】

第 4 の態様では、- グルコシダーゼ活性の向上が、所与の糖化条件下での所与のリグノセルロース系バイオマスからのグルコース収率の増加である、第 1 、第 2 、又は第 3 のいずれか一態様の組換えポリペプチド。

#### 【0048】

第 5 の態様では、リグノセルロース系バイオマスが、糖化の前に前処理を行ったものである、上記第 1 から第 4 の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチド。前処理は、好適には、リグノセルロース系バイオマス基質の酵素的利用及び加水分解を行い易くする、当技術分野において知られているものであってよく、例えば本明細書において記載されている前処理方法を含み得る。

40

#### 【0049】

第 6 の態様では、配列番号 2 と又は成熟配列である配列番号 3 と少なくとも 80 % 同一であるアミノ酸配列を含む、上記第 1 から第 5 の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチド。

#### 【0050】

第 7 の態様では、配列番号 2 と又は成熟配列である配列番号 3 と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、上記第 1 から第 6 の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチド。

#### 【0051】

第 8 の態様では、上記第 1 から第 7 の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチドを含

50

み、1種又はそれ以上の別のセルラーゼを更に含む組成物。

【0052】

第9の態様では、1種又はそれ以上の別のセルラーゼが、ゼロ又は1種又はそれ以上の別の-グルコシダーゼ、1種又はそれ以上のセロビオヒドロラーゼ及び1種又はそれ以上のエンドグルカナーゼから選択される、第8の態様の組成物。

【0053】

第10の態様では、上記第1から7の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチドを含み、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含む組成物。

【0054】

第11の態様では、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含む、上記の第8又は第9の態様の組成物。 10

【0055】

第12の態様では、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼが、1種又はそれ以上のキシラナーゼ、1種又はそれ以上の-キシロシダーゼ、及び1種又はそれ以上のL-アラビノフラノシダーゼから選択される、上記第10の又は第11の態様の組成物。

【0056】

第13の態様では、第1から第7の態様のいずれか一態様の組換えポリペプチドをコードしている核酸。

【0057】

第14の態様では、シグナル配列を更に含む、第13の態様の核酸。 20

【0058】

第15の態様では、シグナル配列が、配列番号13～42からなる群から選択される、第14の態様の核酸。

【0059】

第16の態様では、作動可能に調節配列と組み合わせて、第13から第15の態様のいずれか一態様の核酸を含む発現ベクター。

【0060】

第17の態様では、第16の態様の発現ベクターを含む宿主細胞。

【0061】

第18の態様では、細菌細胞又は真菌細胞である、第17の態様の宿主細胞。いくつかの細菌細胞は、本明細書に記載されている通り好適な宿主細胞であることが知られている。いくつかの真菌細胞もまた適している。一部の実施形態では、細菌又は真菌宿主細胞は、ある特定の単糖をエタノールに発酵又は代謝することができるエタノール生成源であってもよい。例えば、エタノール生成ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) が、本開示の-グルコシダーゼポリペプチドを発現する宿主細胞であってもよい。例えば、エタノール生成真菌サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 酵母もまた、本開示の-グルコシダーゼポリペプチドを生産する宿主細胞として機能する。 30

【0062】

第19の態様では、第16又は第17の態様の宿主細胞及び培養培地を含む組成物。

【0063】

第20の態様では、-グルコシダーゼを生成する方法であって、-グルコシダーゼを產生するのに好適な条件下で、第17又は第18の態様の宿主細胞を培養培地中で培養する工程を含む方法。 40

【0064】

第21の態様では、上記の第20の態様の方法に従って生成された-グルコシダーゼを、培養培地の上清中に含む組成物。

【0065】

第22の態様では、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するための方法であって、リグノセルロース系バイオマス基質を、第1から第7の態様のいずれか一態様のポリペプチドと又は第21の態様の組成物と接触させて、グルコース及び/又は他の糖を得

る工程を含む方法。

【0066】

Mg3A組成物及び方法のこれらの態様及び他の態様は、以下の説明より明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】pENTR/D-TOPO-Bg11(943/942)ベクターのマップを示す図。

【図2】pTrex3g 943/942構築物のマップを示す図。

【図3A】本明細書の実施例4-Aに記載の条件に従う、様々な - グルコシダーゼ添加量でのグルカン変換率%の測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei) Bg11に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBg11を、特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図3B】本明細書の実施例4-Aに記載の条件に従う、様々な - グルコシダーゼ添加量での全グルコース生成量の測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei) Bg11に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBg11を、特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図3C】本明細書の実施例4-Aに記載の条件に従って、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASCを加水分解することにより生成されたセロビオースの測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei) Bg11に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBg11を、特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図3D】本明細書の実施例4-Bに記載の条件に従う、様々な - グルコシダーゼ添加量でのグルカン変換率%の測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei) Bg11に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBg11を、特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図3E】本明細書の実施例4-Bに記載の条件に従う、様々な - グルコシダーゼ添加量での全グルコース生成量の測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei) Bg11に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBg11を、特許出願

10

20

30

40

50

公開第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図3F】本明細書の実施例4-Bに記載の条件に従って、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASCを加水分解することにより生成されたセロビオースの測定及び比較を示す図。50 及び1.5hで、リン酸膨潤セルラーゼ(PASC)を基質として使用して、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1に対するMg3Aの加水分解性能を比較するために若干異なるMg3A酵素調製物を使用した2組の実験を示す。Mg3A及びBgl1を、特許出願公開第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成されたバックグラウンド全セルラーゼに添加し、 - グルコシダーゼ + 全セルラーゼ混合物を、様々な - グルコシダーゼ添加量でPASC基質と混合した。

【図4A】セルロースに対する全タンパク質添加量を変化させた場合の、全グルカン変換の測定及び比較を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、50 にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1と比較して示す。国際公開公報第WO 2011/038019号における記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成したバックグラウンド全セルラーゼに、Mg3A及びBgl1を添加し、セルロースに対する全タンパク質添加量を様々な変化させて - グルコシダーゼ + セルラーゼ混合物をDACS基質と混合した。

【図4B】セルロースに対する全タンパク質添加量を変化させた場合の、全グルコース生成量の測定及び比較を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、50 にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1と比較して示す。国際公開公報第WO 2011/038019号における記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成したバックグラウンド全セルラーゼに、Mg3A及びBgl1を添加し、セルロースに対する全タンパク質添加量を様々な変化させて - グルコシダーゼ + セルラーゼ混合物をDACS基質と混合した。

【図5A】様々な - グルコシダーゼ投入量での(全セルラーゼバックグラウンドは13.4mgタンパク質/gセルロースで一定に保つ)全グルカン変換の測定及び比較を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、50 にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1と比較して示す。国際公開公報第WO 2011/038019号における記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成した全セルラーゼを13.4mgタンパク質/gセルロースの一定量で使用し、様々な添加量でMg3A及びBgl1を添加した。

【図5B】様々な - グルコシダーゼ投入量(全セルラーゼバックグラウンドは13.4mgタンパク質/gセルロースで一定に保つ)での全グルコース生成量の測定及び比較を示す。図5A～5Bは、希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、50 にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1と比較して示す。国際公開公報第WO 2011/038019号における記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成した全セルラーゼを13.4mgタンパク質/gセルロースの一定量で使用し、様々な添加量でMg3A及びBgl1を添加した。

【図6A】様々な - グルコース(beta-glucose)投入量(全セルラーゼバックグラウンドは10mgタンパク質/gセルロースで一定に保つ)での全グルカン変換の測定及び比較を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、55 にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1と比較して示す。特許出願公開第WO 2011/0

10

20

30

40

50

38019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された、10mgタンパク質/gセルロースを含有する全セルラーゼバックグラウンドに、様々な添加量でMg3A及びBg11を添加した。

【図6B】様々な-グルコシダーゼ投入量(全セルラーゼバックグラウンドは10mg/gタンパク質/gセルロースで一定に保つ)での全グルコース生成量の測定及び比較を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、55にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11と比較して示す。特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された、10mgタンパク質/gセルロースを含有する全セルラーゼバックグラウンドに、様々な添加量でMg3A及びBg11を添加した。

【図6C】様々な添加量でMg3A及びBg11を存在させて、55糖化反応を行った場合のセロビオース枯渇の、用量応答曲線(dose curve)を示す図。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用し、55にて2日間での、Mg3Aの加水分解性能を、基準となる改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11と比較して示す。特許出願公開第WO2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された、10mgタンパク質/gセルロースを含有する全セルラーゼバックグラウンドに、様々な添加量でMg3A及びBg11を添加した。

【図7】サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)エタノール生成源におけるMg3Aポリペプチドの発現のために最適化され合成されたMg3A遺伝子を含む酵母シャトルベクター-pSC11構築物を示す図。

【図8】ザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)エタノール生成源におけるMg3Aポリペプチドの発現のために最適化され合成されたMg3A遺伝子を含むザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)組込みベクター-pZC11を示す図。

【図9A】本開示の配列及び配列識別子。

【図9B】本開示の配列及び配列識別子。

【図9C】本開示の配列及び配列識別子。

【図9D】本開示の配列及び配列識別子。

【図9E】本開示の配列及び配列識別子。

【発明を実施するための形態】

【0068】

#### I. 概略

マグナポルテ・グリセア(*Magnaporthe grisea*)由来のグリコシリヒドロラーゼファミリー3に属する組換え-グルコシダーゼMg3Aに関する組成物及び方法が本明細書において記述されている。本発明の組成物及び方法は、この組成物を使用してリグノセルロース系バイオマス材料又は供給原料を加水分解する場合、組換えMg3Aポリペプチドが、例えば、既知の基準となる高正確性-グルコシダーゼトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)のBg11よりも、より高いセルラーゼ活性を有し、酵素組成物の成分としてより強力であるという観察結果に一部基づく。Mg3Aポリペプチドのこうした特徴のため、これら又はその変異体は、例えば、リグノセルロース系バイオマス供給原料の変換又は加水分解を含む、非常に多くのプロセスに使用するのに好適である。

【0069】

本発明の組成物及び方法をより詳細に記述する前に、本発明の組成物及び方法は、記載されている特定の実施態様に限定されず、したがって当然ながら、多様であり得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される専門用語は、具体的な実施形態を記載するという目的でのみ使用されるものであり、制限を意図するものではなく、したがって、本発明の組成物及び方法の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることも理解されるであろう。

【0070】

10

20

30

40

50

値の範囲が示される場合、間にある各値、文脈により別途明確に規定されない限り下限の単位の10分の1まで、その範囲の上限と下限の間及びその記載されている範囲内の任意の別の記載されている値又は間にある値が、本発明の組成物及び方法の範囲内に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立に、そのより小さい範囲に含まれてもよく、記載されている範囲内の任意の明確に除外されている限界に従って、やはり本発明の組成物及び方法の範囲内に包含される。規定の範囲が上限又は下限のいずれか又は両方を含む場合、これらの含まれる上限又は下限のいずれか又は両方を除外する範囲もまた本発明の組成物及び方法に含まれる。

#### 【0071】

ある特定の範囲は、その前に「約」という用語を伴う数値を用いて本明細書において提示される。「約」という用語は、本明細書において、その後に続く正確な数、並びにその用語の後に続く数に近い又は近似の数を文字で支持するために使用される。ある数が具体的に列挙されている数に近い又は近似の数であるかどうかを決定するとき、その近い又は近似する列挙されていない数は、それが提示されている文脈において、具体的に列挙されている数の実質的な同値を示す数であり得る。例えば、ある数値に関して、「約」という用語は、その用語が文脈において別途明確に定義されていない限り、その数値の-10%から+10%の範囲を指す。別の例では、「約6のpH値」という語句は、そのpH値が別途明確に定義されていない限り、5.4から6.6までのpH値を指す。

10

#### 【0072】

本明細書において記載されている見出しが、全体として本明細書に参照により用いられる本発明の組成物及び方法の様々な態様又は実施形態を制限するものではない。したがって、以降で定義される用語は、総じて本明細書を参照することによってより詳しく定義される。

20

#### 【0073】

本文書は読み易くするためにいくつかの節に構成されているが、読者は、1つの節においてなされた記述が他の節にも適用され得ることを理解するであろう。このように、本開示の異なる節に使用される見出しが、限定であると解釈されるべきではない。

#### 【0074】

本明細書において別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明の組成物及び方法の属する当業者により一般に理解される意味と同じ意味を持つ。本明細書に記載されているものと類似又は同等の任意の方法及び材料もまた、本発明の組成物及び方法の実施又は試験において使用することができるが、代表的な例示的方法及び材料を、以下に記述する。

30

#### 【0075】

本明細書において引用されているすべての出版物及び特許は、それぞれの個々の出版物又は特許が参照として援用されると具体的かつ個々に示された場合と同様に、本明細書に参照として援用され、関連の出版物が引用された方法及び/又は材料を開示及び記述するために、参照として本明細書に援用される。任意の出版物の引用は、出願日の前のその開示に関するものであり、本発明の組成物及び方法が先行発明のためにそのような出版物に先行する権利を有さないことを承認するものと解釈されるべきではない。更に、示されている出版日は、それぞれ別個に確認する必要があるであろう実際の出版日とは異なる場合がある。

40

#### 【0076】

この発明を実施するための形態に従い、以下の略記及び定義を適用する。単数形「a」「a n」及び「t h e」は、内容が明らかに他の事を指し示していない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば「酵素」という場合には、複数のこうした酵素が含まれ、「投与量(dosage)」という場合には、当業者には周知の1つ又はそれ以上の投与量及びその等価物などが含まれる。

#### 【0077】

特許請求の範囲は、任意の要素を除外するように作成され得ることに更に留意されたい

50

。したがって、この記述は、請求項の構成要素の列挙、又は「消極的」限定の使用に関連して、「だけ」、「のみ」などのような排他的な用語を使用するための先行する根拠として役立つことを意図する。

#### 【0078】

「組換え」という用語は、ある対象の細胞、核酸、ポリペプチド／酵素又はベクターに関する使用される場合、その対象が天然の状態から改変されていることを示す。よって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内では見られない遺伝子を発現し、又は自然界で見られるものと異なるレベル、又は異なる条件下で天然の遺伝子を発現する。組換え核酸は、天然配列とは1つ又はそれ以上のヌクレオチドが異なっていてもよく、かつ／又は発現ベクターにおいて、異種配列、例えば、異種プロモーター、分泌を可能にするシグナル配列などに作動可能に連結されている。組換えポリペプチド／酵素は、天然配列とは1つ又はそれ以上のアミノ酸が異なっていてもよく、かつ／又は異種配列と融合されている。- グルコシダーゼをコードしている核酸を含むベクターは、例えば、組み換えベクターである。

10

#### 【0079】

本明細書において使用される「本質的に～からなる（consisting essentially of）」という用語は、その用語の後の成分が、前記成分の作用又は活性に寄与又は干渉しない、全組成物の30重量%未満の全量の他の既知の成分の存在下にある、組成物を指すことに更に留意されたい。

20

#### 【0080】

「含む（comprising）」という用語は、本明細書において使用される場合、「含む（comprising）」という用語の後の成分を含むがこれらに限定されないことを意味することに更に留意されたい。「含む（comprising）」という用語の後の成分は、必要又は必須であるが、この成分を含む組成物は、他の必須でない又は任意の成分を更に含んでもよい。

30

#### 【0081】

「～からなる（consisting of）」という用語は、本明細書において使用される場合、「～からなる（consisting of）」という用語の後の成分を含みこれらに限定されることを意味することにもまた留意されたい。「～からなる（consisting of）」という用語の後の成分はしたがって、必要又は必須であり、他の成分は組成物中に存在しない。

30

#### 【0082】

本開示を読めば当業者には明らかとなるように、本明細書において記述及び例示されている個々の態様のそれぞれは、本明細書において記載されている本発明の組成物及び方法の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他の一部の態様のいずれかの特徴と容易に分離し、又はそれと組み合わせができる別個の成分及び特徴を有する。任意の列挙されている方法は、列挙されている事象の順序で又は論理的に可能な任意の他の順序で行うことができる。

#### 【0083】

##### I I . 用語の定義

「- グルコシダーゼ」は、E . C . 3 . 2 . 1 . 2 1 の - D - グルコシドグルコヒドロラーゼを指す。「- グルコシダーゼ活性」という用語はしたがって、- D - グルコース又はセロビオースの加水分解を触媒してD - グルコースを放出する力を指す。- グルコシダーゼ活性は、例えば、本開示の実施例2Cに記載しているように、酵素がセロビオース基質の加水分解を触媒してD - グルコースを生じる力を測定する、セロビアーゼアッセイを使用して決定してもよい。

40

#### 【0084】

本明細書において使用される場合、「Mg3A」又は「Mg3Aポリペプチド」は、基準となる - グルコシダーゼである、配列番号4のアミノ酸配列を有する野生型トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Bg11ポリペプチドと比較した場合に、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解する性能が向上している、マグナポルテ・グリセア (Magnaporthe grisea) (及びその変異体) に由来するグリコシリヒドロラーゼファミ

50

リー 3 に属する - グルコシダーゼ ( 例えは、組換え - グルコシダーゼ ) を指す。本発明の組成物及び方法の態様によれば、M g 3 A ポリペプチドは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有し、並びに配列番号 2 のアミノ酸配列と、又は配列番号 2 の成熟配列と、又は配列番号 2 の長さが少なくとも 1 0 0 残基の断片と、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する誘導体又は変異体ポリペプチドを含み、M g 3 A ポリペプチドは、 - グルコシダーゼ活性を有し、セロビオースから D - グルコースへの変換を触媒することができるだけでなく、トリコデルマ・リーゼイ ( *Trichoderma reesei* ) B g 1 1 と比べてより高い - グルコシダーゼ活性を有し、及びセロビオースから D - グルコースへと変換するより高い触媒活性を有する。

10

## 【 0 0 8 5 】

本開示の組成物及び方法において使用される M g 3 A ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列のポリペプチド、又は配列番号 2 の残基 1 9 ~ 8 7 3 からなるポリペプチド、あるいは成熟配列である配列番号 3 の、少なくとも 1 0 %、好ましくは少なくとも 2 0 %、より好ましくは少なくとも 3 0 %、及び更により好ましくは少なくとも 4 0 %、より好ましくは少なくとも 5 0 %、更により好ましくは少なくとも 6 0 %、及び好ましくは少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 9 0 %、更により好ましくは少なくとも 1 0 0 % 又はそれ以上の - グルコシダーゼ活性を有するであろう。

20

## 【 0 0 8 6 】

「ファミリー 3 グリコシルヒドロラーゼ」又は「G H 3」は、Henrissat, Biochem. J. 280: 309 ~ 316 ( 1991 ) による、及び Henrissat & Cairolach, Biochem. J., 316: 695 ~ 696 ( 1996 ) による分類に従って、グリコシルヒドロラーゼファミリー 3 の定義に入るポリペプチドを指す。

20

## 【 0 0 8 7 】

本明細書に記載の本発明の組成物及び方法による M g 3 A ポリペプチドは、単離又は精製することができる。精製又は単離は、M g 3 A ポリペプチドが、それが自然界において関連している天然に存在する成分の一部又はすべてから M g 3 A を分離することによって、その天然の状態から変化していることを意味する。そのような単離又は精製は、最終組成物において望ましくない細胞全体、細胞残屑、夾雑物、外来タンパク質、又は酵素を除去するための、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性分離、透析、プロテアーゼ処理、硫酸沈殿又は他のタンパク質塩析、遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィー、濾過、精密濾過、ゲル電気泳動又は勾配分離などの当技術分野において承認されている分離技術によって行うことができる。その後、例えは、活性化剤、抗阻害剤、望ましいイオン、p H を調節する化合物又は他の酵素若しくは化学物質など、追加の利益をもたらす構成要素を M g 3 A 含有組成物に加えることが更に可能である。

30

## 【 0 0 8 8 】

本明細書において使用される場合、「微生物」は、細菌、真菌、ウイルス、原虫、及び他の微生物又は微小な生物を指す。

40

## 【 0 0 8 9 】

本明細書において使用される場合、ポリペプチドの「誘導体」又は「変異体」という用語は、N - 末端及び C - 末端のいずれか又は両方に 1 つ又はそれ以上のアミノ酸を付加することにより、アミノ酸配列中の 1 つ又は多数の異なる部位で 1 つ又はそれ以上のアミノ酸を置換することにより、ポリペプチドのいずれか若しくは両方の末端で又はアミノ酸配列の 1 つ又はそれ以上の部位で 1 つ又はそれ以上のアミノ酸を欠失させることにより、あるいは、アミノ酸配列中の 1 つ又はそれ以上の部位で 1 つ又はそれ以上のアミノ酸を挿入することにより、前駆体ポリペプチド ( 例えは、天然ポリペプチド ) から誘導されるポリペプチドを指す。M g 3 A 誘導体又は変異体の調製は、任意の好都合な方法で、例えは、天然ポリペプチドをコードしている D N A 配列を変更し、その D N A 配列により好適な宿

50

主を形質転換し、変更したDNA配列を発現させて、誘導体／変異体Mg3Aを形成することによって、実現することができる。誘導体又は変異体は、化学的に修飾されたMg3Aポリペプチド、例えば、グリコシル化又は別 の方法でMg3Aポリペプチドの特性を変えることを更に含む。Mg3Aの誘導体及び変異体が本発明の組成物及び方法に包含されるが、そのような誘導体及び変異体は、同じリグノセルロース系バイオマス基質加水分解条件下で、配列番号4の野生型トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1のものと比較した場合に向上した-グルコシダーゼ活性を示すだろう。

## 【0090】

ある特定の態様では、本発明の組成物及び方法のAte3Cポリペプチドはまた、親ポリペプチドに由来し、配列番号2を含む又はそれからなる完全長ポリペプチド、又は配列番号3を含む又はそれからなる(consisting)成熟配列であってもよい、-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチド又はポリペプチド断片の機能的断片を包含してもよい。機能的ポリペプチドは、N末端領域若しくはC末端領域のいずれかにおいて、又は両領域において切断されて、親ポリペプチドの断片を生じててもよい。本開示の目的のために、機能的断片は、親ポリペプチドの活性の少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、40%、50%、又は好ましくは、少なくとも60%、70%、80%、又は更により好ましくは少なくとも90%の-グルコシダーゼ活性を有さなければならない。

## 【0091】

ある特定の態様では、Mg3A誘導体／変異体は、配列番号2のアミノ酸配列と、又は成熟配列である配列番号3と75%から99%（又はそれ以上）までの間のいずれかのアミノ酸配列同一性、例えば、配列番号2のアミノ酸配列と又は成熟配列である配列番号3と75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸配列同一性を有する。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、1個のアミノ酸を、他の生物学的に類似したアミノ酸で置き換える、L-アミノ酸を使用した「保存的アミノ酸置換」である。保存的アミノ酸置換は、置換されるアミノ酸の全体の電荷、疎水性／親水性及び／又は立体的な大きさを維持するものである。保存的置換の例は、以下の群間の置換である：Gly / Ala、Val / Ile / Leu、Lys / Arg、Asn / Gln、Glu / Asp、Ser / Cys / Thr、及びPhe / Trp / Tyr。誘導体は、例えば、わずか1から10アミノ酸残基、例えば、6～10、わずか5、わずか4、3、2、又は更には1アミノ酸残基が異なっていてもよい。一部の実施形態では、Mg3A誘導体は、N末端及び／又はC末端欠失を有してもよく、欠失した末端部分を除いたMg3A誘導体は、配列番号2又は配列番号3中の連続的な小領域と同一である。

## 【0092】

本明細書において使用される場合、本明細書において同定されているアミノ酸又はヌクレオチド配列に関する「配列同一性パーセント(%)」は、保存的置換は配列同一性の一部とみなさずに、最大の配列同一性パーセントを実現するために、配列をアラインメントし、必要であればギャップを挿入した後に、Mg3A配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一である、候補配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドのパーセントと定義される。

## 【0093】

「相同体」は、対象アミノ酸配列及び対象ヌクレオチド配列と一定の同一性を有するものを意味する。相同配列は、通常の配列アラインメントツール（例えば、Clustal、BLASTなど）を用い、対象配列と少なくとも75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は更には99%同一であるアミノ酸配列を含むとみなされる。通常、相同体は、特に指示がない限り、対象アミノ酸配列と同じ活性部位残基を含む。

## 【0094】

配列アラインメントを実施し、配列同一性を決定するための方法は当業者に公知であり

10

20

30

40

50

、過度の実験を行わずとも実施することができ、同一性の値の計算は明確に得ることができる。例えば、Ausubel et al. , eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York) ; 及びthe ALIGN program (Dayhoff (1978) in Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.) を参照されたい。多数のアルゴリズムが、配列をアラインメントし、配列同一性を決定するために利用可能であり、例えば、Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48 : 443 の相同性アラインメントアルゴリズム ; Smith et al. (1981) Adv. Appl. Math. 2 : 482 の局所的相同性アルゴリズム ; Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85 : 2444 の類似性検索方法 ; Smith-Watermanアルゴリズム (Meth. Mol. Biol. 70 : 173 ~ 187 (1997) ; 及びBLASTP、BLASTN、及びBLASTXアルゴリズム (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403 ~ 410 を参照されたい) が挙げられる。

10

## 【0095】

これらのアルゴリズムを使用したコンピュータ制御プログラムもまた利用可能であり、ALIGN又はMegalign (DNASTAR) ソフトウェア、又はWU-BLAST-2 (Altschul et al. , (1996) Meth. Enzym. , 266 : 460 ~ 480) ; 又はGenetics Computing Group (GCG) パッケージ、Version 8, Madison, Wisconsin, USAで利用可能なGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、及びTFASTA ; 並びにIntelliGenetics, Mountain View, CaliforniaによるPC/GeneプログラムのCLUSTALが挙げられるがこれらに限定されない。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを得るために必要とされるアルゴリズムを含め、アラインメントを評価するための適切なパラメータを決定することができる。好ましくは、配列同一性は、プログラムにより決定されるデフォルトパラメータを使用して決定する。詳細には、配列同一性は、以下のデフォルトパラメータを用いてCLUSTAL W (Thompson J. D. et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22 : 4673 ~ 4680) を使用して決定する。

20

30

## 【0096】

## 【表1】

ギャップ開始ペナルティ:	10.0	
ギャップ伸張ペナルティ:	0.05	
タンパク質重み行列:	BLOSUM行列	
DNA重み行列:	IUB	
異なる配列を遅延(Delay divergent sequences) %:	40	
ギャップ間距離:	8	40
DNAトランジションの重み:	0.50	
親水性残基リスト:	GPSNDQEKR	
負値行列の使用:	オフ	
残基特異的ペナルティの切り替え:	オン	
親水性ペナルティの切り替え:	オン	
末端ギャップ間ペナルティの切り替え	オフ	

## 【0097】

本明細書において使用される場合、「発現ベクター」は、好適な宿主においてDNAの

50

発現に作用することができる、好適な調節配列に作動可能に連結されているDNA配列を含むDNA構築物を意味する。このような調節配列として、転写に作用するプロモーター、転写を調節するための任意のオペレーター配列、mRNA上の適切なリボソーム結合部位をコードしている配列、並びに転写及び翻訳の終結を調節する配列を挙げができる。異なる細胞タイプを、異なる発現ベクターとともに使用してもよい。バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)において使用されるベクター用の例示的なプロモーターはA p r E プロモーターであり、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)において使用される例示的なプロモーターはA 4 プロモーター（アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来）であり、大腸菌 (*E. coli*)において使用される例示的なプロモーターはL a c プロモーターであり、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)において使用される例示的なプロモーターはP G K 1 であり、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)において使用される例示的なプロモーターはg l a A であり、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)用の例示的なプロモーターはc b h I である。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、又は単純に潜在的なゲノムインサートであってよい。ベクターは、好適な宿主に形質転換すると、宿主ゲノムとは独立して複製及び機能できるようになり、あるいは好適な条件下においてゲノム自体に組み込まれ得る。本明細書において、プラスミド及びベクターは、互換的に使用されることがある。しかしながら、本発明の組成物及び方法は、同等の機能を果たし、当技術分野において公知である、又は公知となる他の形態の発現ベクターを含むことを意図する。よって、広範な種類の宿主 / 発現ベクターの組合せを、本明細書に記載のDNA配列を発現させるのに用いることができる。有用な発現ベクターは、例えば、染色体、非染色体及び合成DNAの配列断片からなってもよく、例えば、S V 4 0 の様々な既知の誘導体及び既知の細菌プラスミド、例えば、c o l E 1、P C R 1、p B R 3 2 2、p M b 9、p U C 1 9 及びそれらの誘導体を含む大腸菌 (*E. coli*) 由来プラスミド、より広い宿主域のプラスミド、例えば、R P 4、ファージDNA、例えば、ファージ の非常に多くの誘導体、例えば、N M 9 8 9、及び他のDNAファージ、例えば、M 1 3 及び纖維状一本鎖DNAファージ、酵母プラスミド、例えば、2  $\mu$  プラスミド又はその誘導体、真核生物細胞において有用なベクター、例えば、動物細胞において有用なベクター及びプラスミドとファージDNAの組合せにより得られるベクター、例えば、ファージDNA又は他の発現調節配列を用いるように変更されているプラスミドなどである。本発明の組成物及び方法の発現ベクターを使用した発現技術は当技術分野において知られており、概して、例えば、S a m b r o o k et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press (1989) に記載されている。しばしば、本明細書中に記載のDNA配列を含むそのような発現ベクターは、組込みイベントによって特定の種のゲノム中に直接挿入することによって単細胞宿主に形質転換する（例えば、B e n n e t t & L a s u r e, More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, San Diego, pp. 70 ~ 76 (1991) 及び真菌宿主における位置選択的ゲノム挿入 (targeted genomic insertion) を記述しているその引用論文）を参照されたい。

#### 【0098】

本明細書において使用される場合、「宿主株」又は「宿主細胞」は、本発明の組成物及び方法によるDNAを含む発現ベクターに好適な宿主を意味する。本発明の組成物及び方法において有用な宿主細胞は、一般に、発現を実現することができる任意の形質転換可能な微生物を含む原核生物又は真核生物宿主である。詳細には、宿主株は、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) であってよい。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、エタノール生成微生物であってもよく、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccha*

10

20

30

40

50

romyces cerevisiae) などの酵母又はザイモモナス・モビリス (Zymomonas mobilis) などのエタノール生成細菌であってよい。サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 又はザイモモナス・モビリス (Zymomonas mobilis) が宿主細胞として使用される場合、 - グルコシダーゼ遺伝子が宿主細胞から分泌されるのではなく細胞内で発現されるものであれば、細胞内で発現される - グルコシダーゼがセロビオース基質に作用し、グルコースを遊離させ、次いでこれを微生物がその後又は直ちに代謝し、エタノール変換することができるよう、セロビオーストランスポーター遺伝子を宿主細胞中に導入することができる。

## 【0099】

宿主細胞は、組み換えDNA技術を使用して構築されたベクターを用いて形質転換又はトランスフェクトさせる。そのような形質転換宿主細胞は、Mg3A (及びその誘導体又は変異体 (突然変異体)) をコードするベクター、及び所望のペプチド生成物を発現するベクターの一方又は両方を複製することができる場合がある。本発明の組成物及び方法のある特定の実施形態では、「宿主細胞」は、トリコデルマ (trichoderma) 属種の細胞から作出される細胞及びプロトプラストの両方を意味する。

10

## 【0100】

細胞に関して使用される「形質転換された」、「安定に形質転換された」及び「トランジジェニック」という用語は、その細胞が、ゲノムに組み込まれた又は複数世代を通して維持されるエピソームとして保有される非天然 (例えば、異種) の核酸配列を含有することを意味する。

20

## 【0101】

細胞へ核酸配列を挿入するという文脈における「導入された」という用語は、当技術分野において公知の「遺伝子導入」、「形質転換」、又は「形質導入」を意味する。

## 【0102】

「宿主株」又は「宿主細胞」は、目的のポリペプチド (例えば、 - グルコシダーゼ) をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、ファージ、ウイルス又はDNA構築物が導入された生物である。例示的な宿主株は、目的のポリペプチドを発現することができる微生物細胞 (例えば、細菌、糸状菌、及び酵母) である。「宿主細胞」という用語は、細胞から生成されるプロトプラストを含む。

30

## 【0103】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドに関する「異種の」という用語は、宿主細胞において天然に存在しないポリヌクレオチド又はポリペプチドを指す。

## 【0104】

ポリヌクレオチド又はポリペプチドに関する用語「内因性」は、宿主細胞中に天然に存在するポリヌクレオチド又はポリペプチドのことをいう。

## 【0105】

「発現」という用語は、核酸配列に基づいてポリペプチドが産生される過程を指す。このプロセスは、転写と翻訳の両方を含む。

## 【0106】

したがってリグノセルロース系バイオマス基質をエタノールに変換するプロセスは、一部の実施形態では、2つの - グルコシダーゼ活性を含むことができる。例えば、第1の - グルコシダーゼ活性は、糖化又は加水分解工程中にリグノセルロース系バイオマス基質に適用されてもよく、第2の - グルコシダーゼ活性は、糖化又は加水分解工程から得られた単量体糖又は発酵性糖が代謝される発酵工程においてエタノール生成微生物の一部として適用されてもよい。第1及び第2の - グルコシダーゼ活性は、一部の実施形態では、同じ - グルコシダーゼポリペプチドの存在により得られるものであってもよい。例えば、糖化における第1の - グルコシダーゼ活性は、本発明のMg3Aポリペプチドの存在により得られるものであってもよく、一方、発酵段階における第2の - グルコシダーゼ活性は、エタノール生成微生物が異なる - グルコシダーゼを発現することにより得られるものであってもよい。別の例では、第1及び第2の - グルコシダーゼ活性は、糖

40

50

化又は加水分解工程及び発酵工程において同じポリペプチドが存在することにより得られるものであってもよい。例えば、本発明の同じMg3Aポリペプチドは、一部の実施形態では、加水分解又は糖化工程と発酵工程の両方のために、-グルコシダーゼ活性を提供し得る。

【0107】

ある特定の別の実施形態では、リグノセルロース系バイオマス基質をエタノールに変換するプロセスは、2種類の-グルコシダーゼ活性を含むことができるが、糖化又は加水分解工程と発酵工程は、例えば同じタンク内で、同時に起こる。2種以上の-グルコシダーゼポリペプチドが-グルコシダーゼ活性に寄与し得、そのうちの1種は本発明のMg3Aポリペプチドであり得る。

10

【0108】

更にある特定の態様では、リグノセルロース系バイオマスをエタノールに変換するプロセスは、1種の-グルコシダーゼ活性を含むことができるものの、糖化又は加水分解工程と発酵工程の両工程ではなくいずれか一方が、-グルコシダーゼの関与を伴う。例えば、本発明のMg3Aポリペプチド又はMg3Aポリペプチドを含む組成物を、糖化工程において使用してもよい。別の例では、リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するために使用される酵素組成物は-グルコシダーゼ活性を含まないものの、エタノール生成微生物が-グルコシダーゼポリペプチド、例えば、本発明のMg3Aポリペプチドを発現する。

20

【0109】

本明細書において使用される場合、「シグナル配列」は、ポリペプチドのN末端部分に結合したアミノ酸の配列を意味し、細胞外のポリペプチドの成熟型の分泌を促進する。シグナル配列のこの定義は、機能的定義である。細胞外ポリペプチドの成熟型は、分泌プロセスの間に切断されるシグナル配列を有していない。Mg3Aの天然シグナル配列を本発明の組成物及び方法の態様において用いてもよいが、他の非天然シグナル配列（例えば、配列番号13）を用いてもよい。「成熟」という用語は、本明細書においてポリペプチドに関する場合、翻訳及び任意の翻訳後修飾後のその最終形態のポリペプチドを意味する。例えば、本発明のMg3Aポリペプチドは、1つ又はそれ以上の成熟型を有し、そのうちの少なくとも1つは配列番号3のアミノ酸配列を有する。

30

【0110】

本発明の-グルコシダーゼポリペプチドは、シグナル配列を含む場合は「プレカーサー」、「未成熟」又は「完全長」と称され、又はシグナル配列を欠く場合は「成熟」と称され得る。ポリペプチドの成熟型は、一般に最も有用である。別途記載のない限り、本明細書において使用されるアミノ酸残基番号付けは、それぞれのアミラーゼポリペプチドの成熟型を参照する。本発明の-グルコシダーゼポリペプチドはまた、得られるポリペプチドが-グルコシダーゼ活性を保持する限り、切断されてN又はC末端が除去されてもよい。

【0111】

本発明の-グルコシダーゼポリペプチドはまた、第1の-グルコシダーゼポリペプチドの少なくとも一部分、及び第2の-グルコシダーゼポリペプチドの好きなくとも一部分を含むという点で「キメラ」又は「ハイブリッド」ポリペプチドであってもよい（そのようなキメラ-グルコシダーゼポリペプチドは、例えば、それぞれの-グルコシダーゼのドメインスワッピングを含む公知の技術を使用して、第1及び第2の-グルコシダーゼから得ることができる）。本発明の-グルコシダーゼポリペプチドは更に、異種シグナル配列、追跡又は精製を可能にするエピトープなどを含んでもよい。「異種」という用語が、目的のポリペプチドを発現させるために使用されるシグナル配列を指すために使用される場合、この用語は、シグナル配列が、例えば、目的のポリペプチドとは異なる微生物に由来することを意味する。本発明のMg3Aポリペプチドを発現させるために好適な異種シグナル配列の例は、例えば、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 由来のものであってよい。

40

50

## 【0112】

本明細書において使用される場合、「機能的に結合された」又は「作動可能に連結された」は、既知の又は所望の活性を有する制御領域又は機能的ドメイン、例えば、プロモーター、ターミネーター、シグナル配列又はエンハンサー領域などが、制御領域又は機能的ドメインがその既知の又は所望の活性に応じてその標的の発現、分泌又は機能を調節することができるように、標的（例えば、遺伝子又はポリペプチド）に結合している又は連結されていることを意味する。

## 【0113】

本明細書において使用される場合、「ポリペプチド」及び「酵素」という用語は互換的に使用されて、ペプチド結合により連結されたアミノ酸残基を含む任意の長さのポリマーを指す。アミノ酸残基については従来の一文字又は三文字コードが本明細書でも使用される。ポリマーは直鎖又は分枝鎖であってよく、修飾されたアミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されてもよい。この用語は、自然に又は介入によって、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は任意の他の操作若しくは修飾、例えば、標識成分とのコンジュゲーションによって修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸の1つ又はそれ以上の類似体（例えば、非天然アミノ酸などを含む）を含有するポリペプチド、並びに当技術分野において公知の他の修飾物も定義に含まれる。

10

## 【0114】

本明細書において使用される場合、「野生型」及び「天然」遺伝子、酵素又は菌株は、天然に見出されるものである。

20

## 【0115】

ポリペプチドに関する「野生型」、「親」、又は「参照」という用語は、1つ又はそれ以上のアミノ酸位置において人工的な置換、挿入、又は欠失を含まない、天然に存在するポリペプチドを指す。同様に、ポリヌクレオチドに関する「野生型」、「親」、又は「参照」という用語は、人工的なヌクレオシドの変化を含まない、天然に存在するポリヌクレオチドを指す。しかしながら、野生型、親、又は参照ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するポリヌクレオチドに限定されるのではなく、野生型、親、又は参照ポリペプチドをコードするいかなるポリヌクレオチドも包含する。

30

## 【0116】

本明細書において使用される場合、「変異型ポリペプチド」は、典型的には組換えDNA技術によって、1つ又はそれ以上のアミノ酸の置換、付加、又は欠失により親（又は参照）ポリペプチドから誘導されるポリペプチドを指す。変異体ポリペプチドは、少数のアミノ酸残基が親ポリペプチドとは異なっていてもよい。変異体ポリペプチドは、それらの親ポリペプチドとの一次アミノ酸配列相同性／同一性のレベルによって定義することができる。好適には、変異体ポリペプチドは、親ポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する。

40

## 【0117】

本明細書において使用される場合、「変異体ポリヌクレオチド」は、変異体ポリペプチドをコードするか、親ポリヌクレオチドと特定の程度の相同性／同一性を有するか、又は親ポリヌクレオチド又はその相補鎖とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする。好適には、変異体ポリヌクレオチドは、親ポリヌクレオチドと又は親ポリヌクレオチドの相補鎖と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%のヌクレオチド配列同一性を有する。同一性パーセント（%）を決定するための方法は当技術分野において公知であり、上記で述べている。

50

## 【0118】

「～に由来する」という用語は、「～を起源とする」、「～から得られる」、「～から得ることができる」、「～から単離される」、及び「～から作出される」という用語を包含し、ある特定の材料が、別の特定の材料を起源とするか、又は別の特定の材料に関連して述べられ得る特徴を有することを一般に示す。

## 【0119】

本明細書において使用される場合、「ハイブリダイゼーション条件」という用語は、ハイブリダイゼーション反応が行われる条件を指す。これらの条件は、ハイブリダイゼーションが測定される条件の「ストリンジエンシー」の程度によって一般に分類される。ストリンジエンシーの程度は、例えば、核酸結合複合体又はプローブの融解温度( $T_m$ )に基づいたものであり得る。例えば、通常、「最大のストリンジエンシー」は約 $T_m - 5$  (プローブの $T_m$ よりも5低い温度)で、「高ストリンジエンシー」は $T_m$ よりも約5~10低い温度で、「中程度ストリンジエンシー」はプローブの $T_m$ よりも約10~20低い温度で、「低ストリンジエンシー」は $T_m$ よりも約20~25低い温度で起こる。あるいは、又は更に、ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション及び/又は1回若しくはそれ以上のストリンジエンシー洗浄の塩又はイオン強度条件に基づいたもの、例えば、 $6 \times SSC =$ 極めて低いストリンジエンシー、 $3 \times SSC =$ 低~中程度のストリンジエンシー、 $1 \times SSC =$ 中程度のストリンジエンシー、及び $0.5 \times SSC =$ 高ストリンジエンシーなどであってもよい。機能的には、ハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性又はほぼ厳密な同一性を有する核酸配列を特定するためには最大のストリンジエンシー条件を用いることが可能であり、一方、プローブと約80%以上の配列同一性を有する核酸配列を特定するためには高ストリンジエンシー条件が用いられる。高い選択性が求められる用途では、比較的ストリンジエントな条件を用いてハイブリッドを形成させることが一般に望ましい(例えば、比較的低い塩濃度及び/又は高い温度条件が用いられる)。

## 【0120】

本明細書において使用される場合、「ハイブリダイゼーション」という用語は、当技術分野において公知のように、核酸の鎖が塩基対形成によって相補鎖と結合するプロセスを指す。より詳細には、「ハイブリダイゼーション」は、プロットハイブリダイゼーション法及びPCR法の最中に起こるような、核酸の1つの鎖が相補鎖と二本鎖、すなわち塩基対を形成するプロセスを指す。中程度~高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件下で2つの配列が互いに特異的にハイブリダイゼーションする場合、核酸配列は参照核酸配列に対し「選択的にハイブリダイゼーション可能」であるものとみなされる。ハイブリダイゼーション条件は、核酸結合複合体又はプローブの融解温度( $T_m$ )に基づく。例えば、通常、「最大のストリンジエンシー」は約 $T_m - 5$  (プローブの $T_m$ よりも5低い温度)で、「高ストリンジエンシー」は $T_m$ よりも約5~10低い温度で、「中程度ストリンジエンシー」はプローブの $T_m$ よりも約10~20低い温度で、「低ストリンジエンシー」は $T_m$ よりも約20~25低い温度で起こる。機能上は、最大のストリンジエンシー条件を使用して、ハイブリダイゼーションプローブと厳密な同一性又はほぼ厳密な同一性を有する配列を同定することができ、一方、中程度又は低ストリンジエンシーハイブリダイゼーションを使用して、ポリヌクレオチド配列相同物を同定又は検出することができる。

## 【0121】

中程度及び高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、当技術分野において周知である。例えば、中程度ストリンジエンシーハイブリダイゼーションは、20%ホルムアミド、 $5 \times SSC$  ( $150 \text{ mM NaCl}$ 、 $15 \text{ mM}$ クエン酸三ナトリウム)、 $50 \text{ mM}$ リン酸ナトリウム( $\text{pH } 7.6$ )、 $5 \times$ デンハルト溶液、10%デキストラント硫酸及び $20 \text{ mg / ml}$ の変性され剪断されたサケ精子DNAを含む溶液中で、37で一晩インキュベーションし、続いてフィルターを $1 \times SSC$ 中、約37~50で洗浄することにより行うことができる。高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、65

10

20

30

40

50

でのハイブリダイゼーション及び $0.1 \times SSC$ （ここで、 $1 \times SSC = 0.15 M NaCl$ 、 $0.015 M$ クエン酸 $Na_3$ 、pH 7.0である）であってよい。あるいは、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、 $5 \times SSC$ 、 $5 \times$ デンハルト溶液、0.5% SDS及び $100 \mu g / ml$ の変性キャリアDNA中、約42で行い、続いて $2 \times SSC$ 及び0.5% SDS中、室温で2回、 $0.1 \times SSC$ 及び0.5% SDS中、42で更に2回洗浄することにより行うことができる。さらに、極めて高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、68及び $0.1 \times SSC$ でのハイブリダイゼーションであってよい。当業者であれば、プローブ長などの因子に適応させる必要に応じて、温度、イオン強度などを調整する方法をご存知であろう。

10

## 【0122】

変異体 - グルコシダーゼをコードする核酸は、配列番号1のヌクレオチドとその同一な相補鎖との間で形成される二本鎖と比較して、1 ~ 3 以上低減された $T_m$ を有し得る。

## 【0123】

少なくとも2個の核酸又はポリペプチドとの関連における「実質的に同様」又は「実質的に同一」という語句は、ポリヌクレオチド又はポリペプチドが、親配列又は参照配列と少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は更には少なくとも約99%の同一性を有する配列を含むことを意味し、あるいは機能性を付与することなく本発明の記載を回避するためだけに行われるアミノ酸の置換、挿入、欠失、又は修飾を含まないことを意味する。

20

## 【0124】

本明細書において使用される場合、「発現ベクター」とは、特定のポリペプチドをコードしており、好適な宿主においてそのポリペプチドを発現させることができる好適な調節配列に作動可能に連結されたDNA配列を含む、DNA構築物を指す。そのような調節配列は、転写を行うプロモーター、こうした転写を調節する任意のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに/又は転写及び翻訳の終結を調節する配列を含み得る。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、又は潜在的なゲノムインサートであってよい。ベクターは、好適な宿主に形質転換すると、宿主ゲノムとは独立して複製及び機能できるようになり、あるいはいくつかの例では宿主ゲノムに組み込まれ得る。

30

## 【0125】

「組換え」という用語は、例えば、コード配列を変異させて変化したポリペプチドを生成すること、コード配列を別の遺伝子のコード配列と融合させること、遺伝子を異なるプロモーターの制御下に置くこと、遺伝子を異種生物において発現させること、遺伝子の発現レベルを低下又は上昇させること、遺伝子をその天然の発現プロファイルとは異なる発現プロファイルで条件的又は構成的に発現させることなどにより、その配列又は発現特性を変化させるように改変された遺伝物質（すなわち、核酸、核酸がコードするポリペプチド、並びにこうしたポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞）を指す。一般に組換え核酸、ポリペプチド、及びこれらに基づく細胞は、関連する核酸、ポリペプチド、及び天然に見られる細胞と同一ではなくなるよう人為的に操作されている。

40

## 【0126】

「シグナル配列」は、ポリペプチドのN末端部分に結合したアミノ酸の配列を指し、細胞からの成熟型のポリペプチドの分泌を促進する。細胞外ポリペプチドの成熟型は、分泌プロセスの間に切断されるシグナル配列を有していない。

## 【0127】

「選択マーカー」又は「選択可能マーカー」という用語は、導入された核酸又はベクターを含有する宿主の選択を容易にする、宿主細胞において発現させることができる遺伝子を指す。選択可能なマーカーの例としては、これらに限定されるものではないが、抗菌物

50

質（例えば、ヒグロマイシン、ブレオマイシン、又はクロラムフェニコール）及び／又は、宿主細胞に栄養的優位性のような代謝的優位性を与える遺伝子が挙げられる。

【0128】

「調節エレメント」という用語は、核酸配列の発現の何らかの態様を調節する遺伝要素を指す。例えばプロモーターは、作動可能に連結されたコード領域の転写の開始を促進する調節エレメントである。更なる調節エレメントとしては、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、及び終結シグナルが挙げられる。

【0129】

本明細書において使用される場合、「宿主細胞」は一般に、当技術分野において知られている組換えDNA技術を使用して構築されたベクターを形質転換又は遺伝子導入した原核生物又は真核生物の宿主細胞である。形質転換された宿主細胞は、ポリペプチド変異体をコードするベクターを複製すること、又は所望のポリペプチド変異体を発現することが可能である。ポリペプチド変異体のプレ型又はプロ型をコードするベクターの場合、一般にこうした変異体は、発現されると宿主細胞から宿主細胞培地中に分泌される。

10

【0130】

細胞への核酸配列の挿入に関連する「導入された」という用語は、形質転換、形質導入、又は遺伝子導入を意味する。形質転換の手段として、当技術分野において公知の通り、プロトプラスト形質転換、塩化カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、ネイキッドDNAなどが挙げられる。（Chang and Cohen Mol. Gen. Genet. 168: 111～115, 1979; Smith et al., (1986) Appl. Env. Microbiol. 51: 634; 及び Ferrari et al.による概説、Harwood, *Bacillus*, Plenum Publishing Corporation, pp. 57～72, 1989を参照されたい）。

20

【0131】

「融合した」ポリペプチド配列は、2つの対象ポリペプチド配列間のペプチド結合を介して、接続（即ち、作動可能に連結）されている。

【0132】

「糸状菌」という用語は、真菌亜門（Eumycotina）、特にチャワンタケ亜門（Pezizomycotina）の種のすべての糸状菌型を指す。

30

【0133】

「エタノール生産微生物」とは、糖又はオリゴ糖をエタノールに変換する能力を有する微生物を指す。

【0134】

他の技術用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する（例えば、Singleton及びSainsbury、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2d Ed., John Wiley and Sons, NY 1994；並びにHale及びMarham、The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991)を参照されたい）。

40

【0135】

III. - グルコシダーゼポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

A. Mg3Aポリペプチド

一態様では、本発明の組成物及び方法は、 - グルコシダーゼ活性を有する組換えMg3A - グルコシダーゼポリペプチド、その断片、又はその変異体を提供する。組換え - グルコシダーゼポリペプチドの例は、マグナポルテ・グリセア（Magnaporthe grisea）から単離された。成熟Mg3Aポリペプチドは、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する。同様の、実質的に同様のMg3Aポリペプチドは、例えばマグナポルテ・グリセア（Magnaporthe grisea）の他の株又は単離物などにおいて、天然に存在し得る。これらの及

50

び他の組換えMg3Aポリペプチドが、本発明の組成物及び方法に包含される。

【0136】

一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、例示されたMg3Aポリペプチドに対して規定の程度のアミノ酸配列同一性、例えば、配列番号2のアミノ酸配列と又は成熟配列である配列番号3と、少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は更には少なくとも99%の配列同一性を有する変異体Mg3Aポリペプチドである。配列同一性は、例えば本明細書において述べるように、BLAST、ALIGN、又はCLUSTALなどのプログラムを使用して、アミノ酸配列アラインメントにより決定することができる。

【0137】

ある特定の実施形態では、微生物において、例えば、細菌又は真菌宿主生物において組換えMg3Aポリペプチドは組換えにより生成され、一方、他の生物においては、Mg3Aポリペプチドは合成的に生成され、又は天然源（例えば、マグナポルテ・グリセア（Mgnaporthe grisea））から精製される。

【0138】

ある特定の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、ポリペプチドの構造及び/又は機能に実質的に影響しない置換を含む。こうした置換の例は、表Iにまとめた保存的突然変異である。

【0139】

【表2】

表I. アミノ酸置換

元の残基	コード	許容される置換
アラニン	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
アスパラギン	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
アスパラギン酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
グルタミン	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, beta-Ala, Acp
イソロイシン	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
リジン	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
メチオニン	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, トランス-3, 4、又は5-フェニルプロリン、シス-3, 4又は5-フェニルプロリン
プロリン	P	D-Pro, L-I-チオアゾリジン-4-カルボン酸、D-又はL-1-オキサゾリジン-4-カルボン酸
セリン	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
スレオニン	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
チロシン	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
バリン	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

【0140】

天然に存在するアミノ酸が関与する置換は、組換えMg3Aをコードする核酸に突然変異を導入し、次いでこの変異体ポリヌクレオチドを生物で発現させることにより一般に行

10

20

30

40

50

われる。天然に存在しないアミノ酸が関与する置換、又はアミノ酸に対する化学修飾は、Mg3Aポリペプチドが生物によって合成された後にMg3Aポリペプチドを化学的に修飾することによって一般に行われる。

#### 【0141】

一部の実施形態では、変異体組換えMg3Aポリペプチドは、配列番号2又は配列番号3と実質的に同一であり、これは、ポリペプチドの構造、機能又は発現に大きく影響しないアミノ酸の置換、挿入、又は欠失を含まないことを意味する。このような変異体組換えMg3Aポリペプチドには、本発明の記載を回避するために設計されたものが含まれる。一部の実施形態では、変異体組換えMg3Aポリペプチド、これらの変異体を含む組成物及び方法は、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドの特性と比較して、例えば、リグノセルロース基質を加水分解する特異的活性の向上、望ましい宿主生物における発現の向上、熱安定性、pH安定性の向上などを含む特性の向上が実現できるように、配列番号2又は配列番号3と実質的に同一ではなく、ある特定の環境で本発明のポリペプチドの構造、機能、又は発現に実質的に影響を及ぼすアミノ酸置換、挿入、又は欠失を含む。

10

#### 【0142】

一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチド（その変異体を含む）は、-グルコシダーゼ活性を有する。-グルコシダーゼ活性は、本明細書中に記載のアッセイ、例えば、実施例2に記載されているものを使用して、又は当技術分野において公知の他のアッセイによって、決定及び測定することができる。

20

#### 【0143】

組換えMg3Aポリペプチドには、-グルコシダーゼ活性を保持する「完全長」Mg3Aポリペプチドの断片が含まれる。好ましくはそれらの機能的断片（すなわち、-グルコシダーゼ活性を保持する断片）は、少なくとも100アミノ酸残基長（例えば、少なくとも100アミノ酸残基長、少なくとも120アミノ酸残基長、少なくとも140アミノ酸残基長、少なくとも160アミノ酸残基長、少なくとも180アミノ酸残基長、少なくとも200アミノ酸残基長、少なくとも220アミノ酸残基長、少なくとも240アミノ酸残基長、少なくとも260アミノ酸残基長、少なくとも280アミノ酸残基長、少なくとも300アミノ酸残基長、少なくとも320アミノ酸残基長、又は少なくとも350アミノ酸残基長又はそれ以上）である。そのような断片は、好適には、完全長プレカーサーポリペプチド又は完全長成熟ポリペプチドの活性部位を保持するが、必須でないアミノ酸残基の欠失を有してもよい。断片の活性は、本明細書中に記載のアッセイ、例えば実施例2に記載されているものを使用して、又は当技術分野において公知の他のアッセイによって、容易に決定することができる。

30

#### 【0144】

一部の実施形態では、Mg3Aアミノ酸配列及び誘導体は、例えば、抽出、検出及び/又は精製を補助するため及び/又は機能性をMg3Aポリペプチドに付加するために、N及び/又はC末端融合タンパク質として產生される。融合タンパク質パートナーの例として、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6×His、GAL4(DNA結合及び/又は転写活性化ドメイン)、FLAG-、MYC-タグ又は当業者に公知の他のタグが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、タンパク質分解による切断部位を、融合タンパク質パートナーと目的のポリペプチド配列との間に設けて、融合配列を除去できるようにする。好適には、融合タンパク質は、組換えMg3Aポリペプチドの活性を妨げない。一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、リーダーペプチド、プロペプチド、結合ドメイン及び/又は触媒ドメインを含む機能的ドメインと融合させる。融合タンパク質は、いずれの成分の性質にも顕著な影響を及ぼすことなく、Mg3Aポリペプチドと融合ドメインをつなぐリンカー配列を介して組換えMg3Aポリペプチドに任意に連結されている。リンカーは場合により、意図される用途に機能的に寄与する。

40

#### 【0145】

本開示は、本開示の1つ又はそれ以上のMg3Aポリペプチドを発現するよう改変され

50

ている宿主細胞を提供する。好適な宿主細胞としては、任意の微生物の細胞（例えば、細菌、原生生物、藻類、真菌（例えば、酵母又は糸状菌）、又は他の微生物の細胞）が挙げられ、細菌、酵母、又は糸状菌の細胞が好ましい。

【0146】

好適な細菌属の宿主細胞としては、エシェリキア（*Escherichia*）、バチルス（*Bacillus*）、ラクトバチルス（*Lactobacillus*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、及びストレプトミセス（*Streptomyces*）の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。好適な細菌種の細胞としては、エシェリキア・コライ（*Escherichia coli*）、バチルス・スブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）、ラクトバチルス・ブレビス（*Lactobacillus brevis*）、シュードモナス・アエルギノサ（*Pseudomonas aeruginosa*）及びストレプトミセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0147】

好適な酵母属の宿主細胞としては、サッカロミセス（*Saccharomyces*）、シゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）、カンジダ（*Candida*）、ハンゼヌラ（*Hansenula*）、ピキア（*Pichia*）、クリベロマイセス（*Kluyveromyces*）、及びファフィア（*Phaffia*）の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。好適な酵母種の細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、P. カナデンシス（*P. canadensis*）、クリベロマイセス・マルキシアヌス（*Kluyveromyces marxianus*）及びファフィア・ロドザイマ（*Phaffia rhodozyma*）の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0148】

好適な糸状菌の宿主細胞としては、真菌亜門（*Eumycotina*）の全ての糸状菌が挙げられる。好適な糸状菌属の細胞としては、アクレモニウム（*Acremonium*）、アスペルギルス（*Aspergillus*）、アウレオバシジウム（*Aureobasidium*）、ビルカンデラ（*Bjerkandera*）、セリポリオプシス（*Ceriporiopsis*）、クリソポリウム（*Chrysopodium*）、コプリナス（*Coprinus*）、コリオラス（*Coriolus*）、コリナスクス（*Corynascus*）、ケトミウム（*Chaeotomium*）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）、フィロバシディウム（*Filobasidium*）、フザリウム（*Fusarium*）、ジベレラ（*Gibberella*）、ヒュミコラ（*Humicola*）、マグナポルテ（*Magnaporthe*）、ムコール（*Mucor*）、マイセリオフソラ（*Myceliophthora*）、ムコール（*Mucor*）、ネオカリマスティクス（*Neocallimastix*）、ニューロスpora（*Neurospora*）、ペシロマイセス（*Paecilomyces*）、ペニシリウム（*Penicillium*）、ファネロカエテ（*Phanerochaete*）、フレビア（*Phlebia*）、ピロミセス（*Piromyces*）、ヒラタケ（*Pleurotus*）、シタリジウム（*Scytaldium*）、シゾフィラム（*Schizophyllum*）、スプロトリクム（*Sporotrichum*）、タラロミセス（*Talaromyces*）、サーモアスカス（*Thermoascus*）、チエラビア（*Thielavia*）、トリポクラディウム（*Tolypocladium*）、ホウロクタケ（*Trametes*）、及びトリコデルマ（*Trichoderma*）の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0149】

好適な糸状菌種の細胞として、アスペルギルス・アワモリ（*Aspergillus awamori*）、アスペルギルス・フミガツス（*Aspergillus fumigatus*）、アスペルギルス・フォエティダス（*Aspergillus foetidus*）、アスペルギルス・ジャポニクス（*Aspergillus japonicus*）、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）、アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）、クリソスポリウム・ラクノウェンス（*Chrysosporium lucknowense*）、フザリウム・バクトリディオイデス（*Fusarium bactridioides*）、フザリウム・セレアリス（*Fusarium cerealis*）、フザリウム・クローケウェレンス（*Fusarium crookwellense*）、フザリウム・クルモルム（*Fusarium culmorum*）、フザリウム・グラミネアルム（*Fusarium graminearum*）、フ

40

50

ザリウム・グラミヌム (*Fusarium graminum*)、ザリウム・ヘテロスポラム (*Fusarium heterosporum*)、ザリウム・ネグンディ (*Fusarium negundi*)、ザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*)、ザリウム・レティキュラツム (*Fusarium reticulatum*)、ザリウム・ロゼウム (*Fusarium roseum*)、ザリウム・サムブキヌム (*Fusarium sambucinum*)、ザリウム・サルコクロウム (*Fusarium sarcochroum*)、ザリウム・スボロトリキオイデス (*Fusarium sporotrichioides*)、ザリウム・スルフレウム (*Fusarium sulphureum*)、ザリウム・トルロスマ (*Fusarium torulosum*)、ザリウム・トリコテキオイデス (*Fusarium trichothecioides*)、ザリウム・ベネナツム (*Fusarium venenatum*)、ビルカンデラ・アズスタ (*Bjerkandera adusta*)、セリポリオプシス・アネイリナ (*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオプシス・アネイリナ (*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオプシス・カレギエア (*Ceriporiopsis caregiae*)、セリポリオプシス・ギルベスケンス (*Ceriporiopsis gilvescens*)、セリポリオプシス・パンノキンタ (*Ceriporiopsis pannocinta*)、セリポリオプシス・リブロサ (*Ceriporiopsis rivulosa*)、セリポリオプシス・スブルファ (*Ceriporiopsis subrufa*)、セリポリオプシス・スベルミスボラ (*Ceriporiopsis subvermispora*)、コプリヌス・シネレウス (*Coprinus cinereus*)、コリオルス・ヒルスツス (*Coriolus hirsutus*)、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、フミコラ・ラヌギノサ (*Humicola lanuginosa*)、ムコール・ミエイ (*Mucor miehei*)、マイセリオフソラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、ニューロスボラ・インターメディア (*Neurospora intermedia*)、ペニシリウム・プルプロゲヌム (*Penicillium purpurogenum*)、ペニシリウム・カネッセンス (*Penicillium canescens*)、ペニシリウム・ソリツム (*Penicillium solitum*)、ペニシリウム・フニクロスム (*Penicillium funiculosum*) ファネロカエテ・クリソスボリウム (*Phanerochaete chrysosporium*)、フレビア・ラディアテ (*Phlebia radiata*)、プレウロツス・エリンギイ (*Pleurotus eryngii*)、タラロマイセス・フラブス (*Talaromyces flavus*)、チエラビア・テレストリス (*Thielavia terrestris*)、トラメテス・ビルロサ (*Trametes villosa*)、トラメテス・ベルシコロル (*Trametes versicolor*)、トリコデルマ・ハルジアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニンギ (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアタム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、及びトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) の細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0150】

これらの生物中に核酸を形質転換するための方法は当技術分野において公知である。例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 宿主細胞を形質転換させるために好適な手順は、欧州特許第 238 023 号に記載されている。

#### 【0151】

一部の実施形態では、組換え Mg 3 A ポリペプチドは、例えば、組換え Mg 3 A ポリペプチドの細胞外分泌を容易にするために、シグナルペプチドと融合させる。例えば、ある特定の実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 13 ~ 42 から選択される配列によってコードされている。特定の態様では、組換え Mg 3 A ポリペプチドは、異種生物において分泌型ポリペプチドとして発現される。したがって、本発明の組成物及び方法は、異種生物において Mg 3 A ポリペプチドを分泌型ポリペプチドとして発現するための方法を包含する。一部の実施形態では、例えば、異種生物がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又はザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) などのエタノール生成微生物である場合、組換え Mg 3 A ポリペプチドは、異種生物において細胞内で発現される。こうした場合、Mg 3 A ポリペプチドが生物内部でセロビオース基質に作用して、セロビオースを、その後その生物がエタノールに代謝又は変換する D - グルコースに変換するために、遺伝子工学手段を使用してセロビオース (*cellulose*) トランスポーター遺伝子をその生物に導入することができる。

#### 【0152】

10

20

30

40

50

本開示は、上記の核酸を含む、発現カセット及び／又はベクターも提供する。好適には、本開示のMg 3 Aポリペプチドをコードしている核酸は、プロモーターに作動可能に連結されている。プロモーターは当技術分野において周知である。-グルコシダーゼ及び／又は本開示のその他の核酸のいずれかを発現させるために、宿主細胞において機能する任意のプロモーターを使用することができる。様々な宿主細胞において-グルコシダーゼ核酸及び／又は本開示のその他の核酸のいずれかの発現を駆動するのに有用な開始調節領域又はプロモーターは多数あり、当業者には周知である（例えば、国際公開第WO 2004/033646号及び当該特許に引用されている参照文献を参照されたい）。これらの核酸を駆動することのできる、事実上全てのプロモーターを使用することができる。

## 【0153】

特に、糸状菌宿主において組換え体を発現させることが望ましい場合、プロモーターは糸状菌のプロモーターであってよい。例えば、核酸は、異種プロモーターの調節下にあってもよい。核酸は、構成的又は誘導性プロモーターの調節下で発現させることもできる。使用することができるプロモーターの例としては、セルラーゼのプロモーター、キシラナーゼのプロモーター、1818プロモーター（ESTマッピングしたTrichodermaにより高発現されるタンパク質として以前同定されている）が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、プロモーターは、好適にはセロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、又は-グルコシダーゼのプロモーターであってよい。特に好適なプロモーターは、例えばT.リーゼイ（T. reesei）のセロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、又は-グルコシダーゼのプロモーターであってよい。例えば、プロモーターは、セロビオヒドロラーゼI（cbh1）プロモーターである。プロモーターの非限定例としては、cbh1、cbh2、egl11、egl12、egl13、egl14、egl15、pk11、gpd1、xyn1、又はxyn2プロモーターが挙げられる。プロモーターの更なる非限定例としては、T.リーゼイ（T. reesei）のcbh1、cbh2、egl11、egl12、egl13、egl14、egl15、pk11、gpd1、xyn1、又はxyn2プロモーターが挙げられる。

10

20

30

40

## 【0154】

本発明中のMg 3 Aポリペプチドをコードしている核酸配列は、ベクター中に含まれてもよい。一部の態様では、ベクターは、発現調節配列に調節されるMg 3 Aポリペプチドをコードしている核酸配列を含有する。一部の態様では、発現調節配列は天然の発現調節配列である。一部の態様では、発現調節配列は非天然の発現調節配列である。一部の態様では、ベクターは選択マーカー又は選択可能マーカーを含有する。一部の態様では、Mg 3 Aポリペプチドをコードしている核酸配列は、選択可能マーカーなしで宿主細胞の染色体中に組み込まれる。

## 【0155】

好適なベクターは、選択された宿主細胞と適合性があるものである。好適なベクターは、例えば、細菌、ウイルス（バクテリオファージT7又はM-13由来ファージなど）、コスミド、酵母又は植物から得ることができる。好適なベクターは、宿主細胞中で、低コピー数、中コピー数、又は高コピー数で維持することができる。このようなベクターを取得及び使用するためのプロトコールは、当業者に公知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989を参照されたい）。

40

## 【0156】

一部の態様では、発現ベクターは終結配列も含む。終結調節領域もまた、宿主細胞に元々存在する様々な遺伝子から得ることができる。一部の態様では、終結配列及びプロモーター配列は同じ供給源から得られる。

## 【0157】

Mg 3 Aポリペプチドをコードする核酸配列は、標準的な技術を使用して、発現ベクターなどのベクター中に組み込むことができる（Sambrook et al., Mol

50

ecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982).

【0158】

一部の態様では、Mg 3 A ポリペプチド及び／又は本開示に記載の1つ又はそれ以上の任意の他の核酸を、天然に存在する細胞において現在観察されるよりもはるかに高いレベルで過剰発現させることが望ましい場合がある。一部の実施形態では、内因性 - グルコシダーゼ及び／又は本開示に記載の1つ又はそれ以上の任意の他の核酸を、天然に存在する細胞において現在観察されるよりもはるかに低いレベルで過少発現させる（例えば、変異させる、不活性化する、又は欠失させる）ことが望ましい場合もある。

【0159】

B. Mg 3 A ポリヌクレオチド

本明細書に記載の組成物及び方法の別の態様は、 - グルコシダーゼ活性を有する組換えMg 3 A ポリペプチド（変異体及びその断片を含む）をコードしているポリヌクレオチド又は核酸配列である。一部の実施形態では、本明細書において特定されているものなどの、異種生物におけるMg 3 A ポリペプチドの発現を指示するための発現ベクターと関連して、ポリヌクレオチドが提供される。組換えMg 3 A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、コードされたポリペプチドの発現を助けるための調節エレメント（例えば、プロモーター、ターミネーター、エンハンサーなど）と作動可能に連結させることができる。

【0160】

組換えMg 3 A ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の例は、配列番号1のヌクレオチド配列を有する。組換えMg 3 A ポリペプチド及び変異体をコードしている、実質的に同一のものを含めた同様のポリヌクレオチドは、例えば、マグナポルテ・グリセア（Magnaporthe grisea）、又はマグナポルテ（Magnaporthe）属種の他の株又は単離物において、天然に存在し得る。遺伝子コードの縮重を考慮して、異なるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、同じMg 3 A ポリペプチド、変異体、又は断片をコードし得ることが理解されるであろう。

【0161】

一部の実施形態では、組換えMg 3 A ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、例示されるMg 3 A ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに対して規定の程度のアミノ酸配列同一性、例えば、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%の配列同一性を有する。相同性は、例えば本明細書に記載のB L A S T、A L I G N、又はC L U S T A Lなどのプログラムを使用して、アミノ酸配列アラインメントにより決定することができる。

【0162】

一部の実施形態では、組換えMg 3 A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、組換えMg 3 A ポリペプチドの細胞外分泌を指示するためのシグナルペプチドのコード配列の後ろ（すなわちその下流）にインフレームで融合される。本明細書において記載されているように、目的のポリペプチドを発現させるために使用されるシグナル配列を指すために使用される場合、「異種」という用語は、シグナル配列及び目的のポリペプチドが、異なる生物由来であることを意味する。異種シグナル配列として、例えば、他の真菌セルラーゼ遺伝子由来のもの、例えば、配列番号13のトリコデルマ・リーゼイ（Trichodema reesei）B g 1 1のシグナル配列などが挙げられる。発現ベクターは、組換えMg 3 A ポリペプチドを発現させるのに好適な、又は好適な宿主細胞中に発現ベクターを導入する前に発現ベクターを増殖させるのに好適な異種宿主細胞において提供されてもよい。

【0163】

一部の実施形態では、組換えMg 3 A ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、

10

20

30

40

50

特定のハイブリダイゼーション条件下で配列番号1のポリヌクレオチド(又はその相補鎖)とハイブリダイズする。条件の例は、本明細書に記載されている中程度ストリンジエンシー、高ストリンジエンシー及び極めて高いストリンジエンシー条件である。

【0164】

Mg3Aポリヌクレオチドは天然に存在するものであっても、又は合成(すなわち人工)のものであってもよく、異なる宿主内での発現のためにコドン最適化させてもよく、突然変異させてクローニング部位を導入してもよく、又は別 の方法で変更して機能を付加してもよい。

【0165】

C. Mg3Aベクター及び宿主細胞

開示されている組換えMg3Aポリペプチドを生成するために、ポリペプチドをコードしているDNAを、公開されている配列から化学合成することができ、又はその遺伝子を有する宿主細胞から直接(例えば、cDNAライブラリースクリーニング又はPCR増幅によって)得ることができる。一部の実施形態では、Mg3Aポリヌクレオチドは、発現カセット中に含まれ、かつ/又は標準的な分子クローニング技術によって好適な発現ベクター中にクローニングされる。そのような発現カセット又はベクターは、転写の開始及び終結を助ける配列(例えば、プロモーター及びターミネーター)を含有し、また通常は、1つ又はそれ以上の選択可能マーカーも含有することができる。

【0166】

発現カセット又はベクターを好適な発現宿主細胞中に導入し、次いで、対応するMg3Aポリヌクレオチドを発現させる。適な発現宿主は、細菌又は真菌微生物であってよい。細菌発現宿主は、例えば、エシェリキア(Escherichia)(例えば、エシェリキア・コライ(Escherichia coli))、シュードモナス(Pseudomonas)(例えば、P.フルオレッセンス(P. fluorescens)又はP.ストゥツェライ(P. stutzerei))、プロテウス(Proteus)(例えば、プロテウス・ミラビリス(Proteus mirabilis))、ラルストニア(Ralstonia)(例えば、ラルストニア・ユートロファ(Ralstonia eutropha))、ストレプトミセス(Streptomyces)、スタフィロコッカス(Staphylococcus)(例えば、S.カルノサス(S. carnosus))、ラクトコッカス(例えば、L.ラクチス(L. lactis))、又はバチルス(Bacillus)(例えば、バチルス・スブチリス(Bacillus subtilis)、バチルス・メガテリウム(Bacillus megaterium)、バチルス・リケニフォルミス(Bacillus licheniformis)など)であってよい。真菌発現宿主は、例えば、エタノール生成源としても機能することができる酵母であってよい。酵母発現宿主は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、ヤロワイア・リポリチカ(Yarrowia lipolytica)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)、クリベロマイセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)又はピキア・パストリス(Pichia pastoris)であってよい。真菌発現宿主はまた、例えば、アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)、クリソスピリウム・ラクノウェンス(Chrysosporium lucknowense)、マイセリオフソラ・サーモフィラ(Mycelio phthora thermopila)、アスペルギルス属(Aspergillus)(例えば、A.オリゼ(A.oryzae)、A.ニガー(A.niger)、A.ニデュランス(A.nidulans)など)、又はトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)を含む糸状菌宿主であってよい。哺乳動物発現宿主、例えば、マウス(例えば、NS0)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)又はベビーハムスター腎臓(BHK)細胞系などもまた適している。他の真核生物宿主、例えば、昆虫細胞又はウイルス発現系(例えば、M13、T7ファージ又はなどのバクテリオファージ、又はバキュロウイルスなどのウイルス)などもまた、Mg3Aポリペプチドを產生させるために適している。

【0167】

目的の特定の宿主における分泌型タンパク質と関連したプロモーター及び/又はシグナル配列は、その宿主又は他の宿主におけるMg3Aポリペプチドの異種產生及び分泌において使用するための候補である。例として、糸状菌系では、セロビオヒドロラーゼI(c

10

20

30

40

50

b h 1 ) 、グルコアミラーゼ A ( g l a A ) 、 T A K A - アミラーゼ ( a m y A ) 、キシラナーゼ ( e x 1 A ) 、 g p d - プロモーター c b h 1 、 c b h 1 1 、エンドグルカナーゼ遺伝子 e g 1 ~ e g 5 、 C e l 6 1 B 、 C e l 7 4 A 、 g p d プロモーター、 P g k 1 、 p k i 1 、 E F - 1 、 t e f 1 、 c D N A 1 及び h e x 1 の遺伝子を駆動するプロモーターが適しており、多くの異なる生物 ( 例えは、 A . ニガ ( A . niger ) 、 T . リーゼイ ( T . reesei ) 、 A . オリゼ ( A . oryzae ) 、 A . アワモリ ( A . awamori ) 、 A . ニデュランス ( A . nidulans ) ) から得ることができる。

#### 【 0 1 6 8 】

一部の実施形態では、 M g 3 A ポリヌクレオチドは、組換え M g 3 A ポリペプチドを細胞外 ( 又はペリプラズム ) 空間へ分泌させ、それにより細胞上清 ( 又はペリプラズム空間又は溶解物 ) 中で酵素活性を直接検出することを可能にする、好適な相同又は異種シグナル配列をコードしているポリヌクレオチドと、組換えにより関連させる。エシェリキア・コライ ( Escherichia coli ) 、他のグラム陰性細菌及び当技術分野において公知の他の生物に好適なシグナル配列として、 H 1 y A 、 D s b A 、 P b p 、 P h o A 、 P e l B 、 O m p A 、 O m p T 又は M 1 3 ファージ G i l 1 遺伝子の発現を駆動するものが挙げられる。バチルス・スブチリス ( Bacillus subtilis ) 、グラム陽性生物及び当技術分野において公知の他の生物では、好適なシグナル配列として更に、 A p r E 、 N p r B 、 M p r 、 A m y A 、 A m y E 、 B l a c 、 S a c B の発現を駆動するものが挙げられ、 S . セレビシエ ( S . cerevisiae ) 又は他の酵母では、キラートキシン、 B a r 1 、 S u c 2 、接合因子 、 I n u 1 A 又は G g p 1 p シグナル配列が挙げられる。シグナル配列は、多くのシグナルペプチダーゼにより切断して、発現されたタンパク質の残部から除去することができる。真菌発現のシグナル配列は、例えは、本明細書中の配列番号 1 3 ~ 3 7 から選択されるものであってよい。酵母発現のシグナル配列は、例えは、配列番号 3 8 ~ 4 0 から選択されるものであってよい。ザイモモナス・モビリス ( Zymomonas mobilis ) において本発明の M g 3 A ポリペプチドを発現させるために使用するのに好適である可能性があるシグナル配列は、例えは、配列番号 4 1 ~ 4 2 から選択されるものを含み得る。 ( L i n g e r J . G . e t a l . , ( 2 0 1 0 ) A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 7 6 ( 1 9 ) : 6 3 6 0 ~ 6 3 6 9 ) 。

#### 【 0 1 6 9 】

一部の実施形態では、組換え M g 3 A ポリペプチドは、単独で又は N 末端若しくは C 末端に位置する他のペプチド、タグ若しくはタンパク質 ( 例えは、 6 × H i s 、 H A 又は F L A G タグ ) との融合体として発現させる。好適な融合体として、アフィニティ精製又は検出を容易にするタグ、ペプチド又はタンパク質 ( 例えは、 6 × H i s 、 H A 、キチン結合タンパク質、チオレドキシン又は F L A G タグ ) 、並びに標的 - グルコシダーゼの発現、分泌又はプロセシングを容易にするものが挙げられる。好適なプロセシング部位として、エンテロキナーゼ、 S T E 1 3 、 K e x 2 又はインビボ若しくはインビトロでの切断のための他のプロテアーゼ切断部位が挙げられる。

#### 【 0 1 7 0 】

M g 3 A ポリヌクレオチドは、エレクトロポレーション、脂質を用いた形質転換又は遺伝子導入 ( 「リポフェクション」 ) 、化学的に媒介される遺伝子導入 ( 例えは、 C a C 1 及び / 又は C a P ) 、酢酸リチウムに媒介される形質転換 ( 例えは、宿主細胞プロトプラストの形質転換 ) 、バイオリストイック「遺伝子銃」形質転換、 P E G に媒介される形質転換 ( 例えは、宿主細胞プロトプラストの形質転換 ) 、プロトプラスト融合 ( 例えは、細菌又は真核生物のプロトプラストを使用した融合 ) 、リポソームに媒介される形質転換、アグロバクテリウム・ツメファシエンス ( Agrobacterium tumefaciens ) 、アデノウイルス又は他のウイルス又はファージによる形質転換又は形質導入が挙げられるがこれらに限定されない、多くの形質転換方法によって、発現宿主細胞中に導入される。

#### 【 0 1 7 1 】

##### D . 細胞培養培地

概して、微生物は、本明細書に記載の M g 3 A ポリペプチドを產生させるのに好適な細

10

20

30

40

50

胞培養培地で培養する。培養は、当技術分野において既知の手順及び変法を用いて、炭素源及び窒素源並びに無機塩類を含む好適な栄養培地中で行われる。増殖及びセルラーゼ生成に好適な培地、温度範囲及び他の条件は当技術分野において公知である。非限定的な例として、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) にセルラーゼを生産させるための典型的な温度範囲は、24から37、例えば、25から30の間である。

#### 【0172】

##### 1. 細胞培養条件

真菌培地の維持及び増殖に好適な材料及び方法は、当技術分野において周知である。一部の態様では、細胞は、宿主細胞中に挿入された核酸によってコードされている1つ又はそれ以上の-D-グルコシダーゼポリペプチドを発現させることのできる条件下で、培養培地中で培養される。細胞を培養する際には、標準的な細胞培養条件を使用することができる。一部の態様では、適切な温度、気体混合物、及びpHで細胞を増殖させ、維持する。一部の態様では、適切な細胞培地中で細胞を増殖させる。

10

#### 【0173】

##### I V . M g 3 A の活性

本明細書において開示されている組換えMg3Aポリペプチドは、-D-グルコシダーゼ活性又はセロビオースを加水分解し、そこからD-グルコースを遊離させる力を有する。本発明のMg3Aポリペプチドは、同じの糖化条件下で、基準となる高正確性-D-グルコシダーゼトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) のBg11よりも、-D-グルコシダーゼ活性がより高く、D-グルコースを遊離させる能力が向上又は増大している。一部の実施形態では、本発明のMg3Aポリペプチドは、別の基準となるアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) の-D-グルコシダーゼBg1uよりも、高い-D-グルコシダーゼ活性を有し得るものであり、かつ/又はセロビオースからD-グルコースを遊離させる力が向上又は増大し得るものである。

20

#### 【0174】

実施例3に示すように、組換えMg3Aポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11と比較して、クロロ-ニトロ-フェニル-グルコシド (CNP G) 基質を加水分解する活性が少なくとも約5%、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約15%、より好ましくは少なくとも約20%高い。一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B-g1uと比較して、CNP G基質を加水分解する活性が少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7倍、好ましくは少なくとも約9倍、より好ましくは少なくとも約10倍高い。

30

#### 【0175】

組換えMg3Aポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11と比較して、酵素がセロビオースの加水分解を触媒し、D-グルコースを遊離させる能力の程度を示すセロビアーゼ活性が劇的に向上又は増大しており、例えば、少なくとも約30%高い、より好ましくは少なくとも約40%高い、好ましくは少なくとも約50%高い、より好ましくは少なくとも55%高い、好ましくは少なくとも60%、更により好ましくは少なくとも約65%高い、好ましくは少なくとも約70%高い、より好ましくは少なくとも約75%高い、最も好ましくは少なくとも約80%高い。一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B-g1uと比較して、セロビオースの加水分解を触媒し、D-グルコースを遊離させる能力が約1/2、約1/3、約1/4、約1/5、又は更には約1/6である。

40

#### 【0176】

一部の実施形態では、組換えMg3Aポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) Bg11と比較して、CNP G/セロビオースに対する加水分解活性の比が約10%低減している、約20%低減している、約30%低減している、又は更には約40%低減している。一部の実施形態では、Mg3Aポリペプチドは、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) B-g1uと比較して、約2倍、約5倍、約7倍、約1

50

0倍、約15倍、又は更には約20倍高い、CNP G / セロビオースに対する相対的加水分解活性比を有する。

【0177】

実施例4に示すように、組換えMg3Aポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11と比較して、リン酸膨潤セルロース基質からより多くのグルコースを生成したが、全糖量は同等又はそれ以下であった。

【0178】

実施例5に示すように、組換えMg3Aポリペプチドは、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11と比較して、希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉基質からやはりより多くのグルコースを生成したが、全糖量は同等又はそれ以下であった。

10

【0179】

実施例6に示すように、組換えMg3Aポリペプチドは、より高い加水分解反応温度である55度、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11と比較して、グルカン変換においてより効率的であり、希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉基質からより多くのグルコースを生成する。50より高い温度で、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11は低い - グルコシダーゼ性能を有することが観察されており、これは、熱安定性が低いこと起因する酵素活性の低下によるものであると考えられた。対照的に、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bg11について測定された融解温度(Tm)はMg3Aの融解温度より約10度高いにもかかわらず、驚くべきことに、Mg3Aの活性及び性能は55度という高い糖化温度で完全なままであることが観察された。この熱安定性及び高温での性能という利点により、Mg3Aは、バイオマスの変換に特に好適な - グルコシダーゼである。

20

【0180】

V. 組換え - グルコシダーゼMg3Aポリペプチドを含む組成物

本開示は、改変された酵素組成物(例えば、セルラーゼ組成物)又は組換えMg3Aポリペプチド高含有発酵プロスを提供する。一部の態様では、組成物はセルラーゼ組成物である。セルラーゼ組成物は、例えば、トリコデルマ(*Trichoderma*)セルラーゼ組成物などの、糸状菌セルラーゼ組成物であってよい。一部の態様では、組成物は、1つ又はそれ以上のセルラーゼポリペプチドをコードしている1つ又はそれ以上の核酸を含む細胞である。一部の態様では、組成物は、セルラーゼ活性を有する発酵プロスであり、このプロスは、バイオマス試料中に存在するセルロースの約50重量%超を糖に変換することができる。「発酵プロス」及び「全プロス」という用語は、本明細書で使用される場合、発酵後に最低限の回収及び/又は精製しかしていない、又は全くしていない、改変された微生物の発酵により生成された酵素調製物を指す。発酵プロスは糸状菌の発酵プロスであってよく、例えば、トリコデルマ(*Trichoderma*)、ヒュミコラ(*Humicola*)、フザリウム(*Fusarium*)、アスペルギルス(*Aspergillus*)、ニューロスボラ(*Neurospora*)、ペニシリウム(*Penicillium*)、セファロスボリウム(*Cephalosporium*)、アクリヤ(*Achlya*)、ボドスボラ(*Podospora*)、エンドチア(*Endothia*)、ムコール(*Mucor*)、コクリオプロス(*Cochliobolus*)、ピリクラリア(*Pyricularia*)、マイセリオフソラ(*Myceliophthora*)又はクリソスボリウム(*Chrysosporium*)の発酵プロスであってよい。特に、発酵プロスは、例えば、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)などのトリコデルマ属種(*Trichoderma* spp.)、又はペニシリウム・フニクロサム(*Penicillium funiculosum*)などのペニシリウム属種(*Penicillium* spp.)のものであってよい。発酵プロスは、好適には無細胞発酵プロスであってよい。一部の態様では、本発明のセルラーゼ、細胞、又は発酵プロス組成物のいずれかは、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを更に含んでもよい。

30

【0181】

一部の態様では、全プロス組成物は、T.リーゼイ(*T. reesei*)又はその改変株において発現させる。一部の態様では、全プロスは、Mg3Aポリペプチドを含む多数のセルラーゼがT.リーゼイ(*T. reesei*)宿主細胞のゲノム中に組み込まれている、組み込まれたT.リーゼイ(*T. reesei*)株において発現させる。一部の態様では、組み込まれた

40

50

T. リーゼイ (T. reesei) 株において発現されたポリペプチドの 1 つ又はそれ以上の成分は欠失している。

【 0 1 8 2 】

一部の態様では、全プロス組成物は、A. ニガー (A. niger) 又はその改変株において発現させる。

【 0 1 8 3 】

あるいは、組換え M g 3 A ポリペプチドは細胞内で発現させることができる。任意に、酵素変異体の細胞内発現、又は上記で述べたものなどのシグナル配列を使用したペリプラズム空間への分泌の後に、透過化又は溶解工程を使用して、組換え M g 3 A ポリペプチドを上清中に放出することができる。膜バリアの破壊は、超音波、加圧処理 (フレンチプレス)、キャビテーションなどの機械的手段を使用して、又はリゾチームなどの膜消化酵素又は酵素混合物を使用して行うことができる。この実施形態の変形例として、エタノール生成微生物における細胞内での組換え M g 3 A ポリペプチドの発現が挙げられる。例えば、リグノセルロース系バイオマスの加水分解により得られるセロビオースをエタノール生成生物中に輸送することができるよう、並びにエタノール生成生物中で加水分解して、次にエタノール生成生物により代謝できる D - グルコースに変換することができるよう、遺伝子工学によりセロビオーストランスポーターと同じエタノール生成微生物中に導入することができる。

10

【 0 1 8 4 】

一部の態様では、組換え M g 3 A ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、好適な無細胞発現系を使用して発現させる。無細胞系では、目的のポリヌクレオチドは通常、プロモーターの補助により転写させるが、ライゲーションして環状発現ベクターを形成させるかは任意である。一部の実施形態では、RNA を外因的に加えるか、又は無細胞系において転写及び翻訳を伴わずに生成する。

20

【 0 1 8 5 】

V I . リグノセルロース系バイオマス基質を加水分解するための M g 3 A ポリペプチドの使用

一部の態様では、リグノセルロース系バイオマスを糖に変換するための方法であって、バイオマス基質を、バイオマス基質を発酵性糖に変換するのに有効な量の M g 3 A ポリペプチドを含む本明細書に開示されている組成物と接触させる工程を含む方法が本発明において提供される。一部の態様では、方法は、バイオマスを酸及び / 若しくは塩基並びに / 又は機械的な若しくは他の物理的な手段で前処理する工程を更に含む。一部の態様では、酸はリン酸を含む。一部の態様では、塩基は水酸化ナトリウム又はアンモニアを含む。一部の態様では、機械的手段は、例えば、引っ張り、加圧、圧碎、摩碎、及びリグノセルロース系バイオマスをより小さい物理的形態へ物理的に分解する他の手段を含んでもよい。他の物理的手段はまた、酵素がセルロース及びヘミセルロースをより利用し易くなるように、例えば、リグノセルロース系バイオマスを「ほぐす」ための水蒸気又は他の加圧蒸気又は蒸気の使用を含んでもよい。ある特定の実施形態では、前処理の方法にはまた、バイオマス加水分解酵素組成物の酵素がバイオマスのセルロース及びヘミセルロースを利用し易くなるように、リグノセルロース系バイオマス基質のリグニンを分解することができる酵素を包含させることもできる。

30

【 0 1 8 6 】

バイオマス：本開示は、M g 3 A ポリペプチドを含む本開示の酵素組成物を使用する、バイオマス糖化のための方法及びプロセスを提供する。本明細書において使用される場合、「バイオマス」という用語は、セルロース及び / 又はヘミセルロースを含む（場合により、リグノセルロース系バイオマス材料中のリグニンも含む）任意の組成物を指す。本明細書において使用される場合、バイオマスとしては、種子、穀物、塊茎、植物性廃棄物（例えば、ヤシの木の空果房又はヤシの実の纖維の廃棄物など）又は食品加工若しくは工業加工の副産物（例えば、茎）、トウモロコシ（例えば、穂軸、及び茎葉など）、イネ科草本（例えば、ソルガストラム・ヌタンス (Sorghastrum nutans) などのインディアン・グ

40

50

ラス；又はスイッチグラス、例えば、パニクム・ウィルガツム (*Panicum virgatum*) などの (*Panicum*) 属種)、イネ科の多年草 (perennial cane) (例えば、暖竹 (giant reed))、木材 (例えば、木片、加工廃棄物)、紙、パルプ、及び再生紙 (例えば、新聞紙及びプリンター用紙など) が挙げられるがこれらに限定されない。他のバイオマス材料としては、ジャガイモ、マメ科植物 (例えば、菜種)、大麦、ライ麦、オーツ麦、小麦、ビート、及びサトウキビバガスが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0187】

したがって、本開示は、バイオマス材料、例えば、キシラン、ヘミセルロース、セルロース、及び／又は発酵性糖を含む材料を含む組成物を、本開示の Mg 3 A ポリペプチド、又は本開示の核酸若しくはポリヌクレオチドによりコードされる Mg 3 A ポリペプチド、又は Mg 3 A ポリペプチドを含むセルラーゼ若しくは天然に存在しないヘミセルラーゼ組成物のいずれか 1 つ、又は本開示の製造品と接触させる工程を含む、糖化方法を提供する。

10

#### 【0188】

糖化させたバイオマス (例えば、本開示の酵素により加工したリグノセルロース材料) に、例えば、微生物発酵及び／又は化学合成などの加工を行うことで、数多くのバイオ系製品を製造することができる。本明細書において使用される場合、「微生物発酵」は、好適な条件下で発酵微生物を増殖させ回収するプロセスを指す。発酵微生物は、バイオ系製品を生産するための所望の発酵プロセスにおいて使用するのに好適な任意の微生物であり得る。好適な発酵微生物としては、糸状菌、酵母、及び細菌が挙げられるがこれらに限定されない。糖化されたバイオマスは、例えば、発酵及び／又は化学合成によって燃料 (例えばバイオエタノール、バイオブタノール、バイオメタノール、バイオプロパンノール、バイオディーゼル、ジェット燃料などのバイオ燃料) にことができる。糖化させたバイオマスを、例えば、発酵及び／又は化学合成によって、汎用化学物質 (例えば、アスコルビン酸、イソブレン、1, 3 - プロパンジオール)、脂質、アミノ酸、ポリペプチド及び酵素にことができる。

20

#### 【0189】

前処理：キシラン、ヘミセルロース、セルロース及び／又はリグニン材料を酵素組成物 (例えば、Mg 3 A ポリペプチドを含む本発明の酵素組成物) 中の酵素により利用し易い又は作用し易いものにし、よって酵素及び／又は酵素組成物により加水分解させ易くするために、糖化又は酵素的加水分解及び／又は糖化により得られる発酵性糖の発酵の前に、バイオマス (例えば、リグノセルロース材料) に、好ましくは、1 つ又はそれ以上の前処理工程を行う。

30

#### 【0190】

一部の態様では、好適な前処理方法には、反応器中で、バイオマス材料を強酸及び金属塩の希釈溶液を含む触媒に接触させることを包含させてもよい。バイオマス材料は、例えば、未加工の材料又は乾燥させた材料であってよい。この前処理により、セルロースの加水分解の活性化工エネルギー、又は温度を低くすることができ、最終的には発酵性糖の収率を高くすることができる。例えば、米国特許第 6,660,506 号、同第 6,423,145 号を参照されたい。

40

#### 【0191】

一部の態様では、好適な前処理方法には、大部分のセルロースをグルコースへと解重合させずに、ヘミセルロースの一次解重合を実施するために選択される温度及び圧力で、バイオマス材料に対し、水性培地中の第 1 の加水分解工程を行う工程を包含させてもよい。この工程により得られるスラリーでは、ヘミセルロースの解重合から得られた单糖が溶解している液体水性相と、セルロース及びリグニンを含有する固体相が生じる。次に、セルロースの大部分を解重合させ、溶解した／可溶性のセルロース解重合産物を含有している液体水性相を生成することができる条件下で、スラリーに第 2 の加水分解工程を行う。例えば、米国特許第 5,536,325 号を参照されたい。

#### 【0192】

50

更なる態様では、好適な前処理方法には、約0.4%～約2%の強酸を使用する1段階又はそれ以上の希酸加水分解によりバイオマス材料を加工する工程、続いて酸加水分解させた材料のうち、未反応の固体リグノセルロース成分をアルカリにより脱リグニン処理する工程を包含させてもよい。例えば、米国特許第6,409,841号を参照されたい。

【0193】

更に別の態様では、好適な前処理の方法には、予備加水分解反応器中でバイオマス（例えばリグノセルロース材料）を予備加水分解する工程と、固体リグノセルロース材料に酸性の液体を加えて混合物とする工程と、その混合物を反応温度まで加熱する工程と、リグノセルロース材料が、少なくとも約20%のリグノセルロース材料由来のリグニンを含む可溶化部分と、セルロースを含む固体画分とに分画されるのに十分な時間にわたって反応温度を維持する工程と、可溶化部分を固体画分から分離し、可溶化部分が反応温度又はそれに近い温度にある間に可溶化部分を除去する工程と、可溶化部分を回収する工程とを包含させてもよい。固体画分中のセルロースは、酵素による消化を受けやすくなる。例えば、米国特許第5,705,369号を参照されたい。この態様の変形例では、前加水分解には、代替として又は更に、例えば、リグノセルロース系バイオマス材料のリグニンを分解することができる酵素を使用した前加水分解を包含させることもできる。

10

【0194】

更に他の態様では、好適な前処理には、過酸化水素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の使用を包含させてもよい。Gould, 1984, Biotech, and Bioengr. 26: 46～52を参照されたい。

20

【0195】

別の態様では、前処理は、バイオマス材料を、非常に低濃度の化学量論量の水酸化ナトリウム及び水酸化アンモニウムと接触させる工程も含むことができる。Teixeira et al., (1999)、Appl. Biochem. and Biotech. 77～79: 19～34を参照されたい。

【0196】

一部の実施形態では、前処理は、リグノセルロースを、温和な温度、圧力及びpHで、例えばpH約9～約14の化学物質（例えば、炭酸ナトリウム又は水酸化カリウムなどの塩基）と接触させる工程を含むことができる。国際出願公開第WO2004/081185号を参照されたい。例えば、好ましい前処理方法ではアンモニアを使用する。このような前処理方法は、高固形分条件下で、バイオマス材料を低濃度アンモニアに接触させる工程を含む。

30

【0197】

例えば、米国特許出願公開第20070031918号及び国際出願公開第WO06110901号を参照されたい。

【0198】

A. 糖化プロセス

一部の態様では、本明細書では、ポリペプチドを含む酵素組成物でバイオマスを処理する工程を含む糖化プロセスであって、ポリペプチドが-グルコシダーゼ活性を有し、プロセスにより、少なくとも約50重量%（例えば、少なくとも約55重量%、60重量%、65重量%、70重量%、75重量%、又は80重量%）のバイオマスが発酵性糖に変換される、糖化プロセスが提供される。一部の態様では、バイオマスはリグニンを含む。一部の態様では、バイオマスはセルロースを含む。一部の態様では、バイオマスはヘミセルロースを含む。一部の態様では、セルロースを含むバイオマスは、更に1種又はそれ以上のキシラン、ガラクタン、又はアラビナンを含む。一部の態様において、バイオマスは、種子、穀類、塊茎、植物性廃棄物（例えば、ヤシの木の空果房、又はヤシの実の纖維の廃棄物）又は食品加工若しくは工業加工に関係する副産物（例えば、茎）、トウモロコシ（例えば、穂軸、及び茎葉など）、イネ科草本（例えば、ソルガストラム・ヌタンス（Sorghastrum nutans）などのインディアン・グラス；又はスイッチグラス、例えば、パニクム・ウィルガツム（Panicum virgatum）などのパニクム（Panicum）属種など）、イネ科

40

50

の多年草 (perennial cane) (例えば、暖竹 (giant reed))、木材 (例えば、木片、加工廃棄物)、紙、パルプ、及び再生紙 (例えば、新聞紙、及びプリンター用紙など)、ジャガイモ、大豆 (例えば、菜種)、大麦、ライ麦、オーツ麦、小麦、ビート、及びサトウキビバガスであってもよいがこれらに限定されない。一部の態様では、バイオマスを含む材料に、ポリペプチドによる処理の前に、1つ又はそれ以上の前処理方法 / 工程を行う。一部の態様では、糖化又は酵素的加水分解は、本発明の Mg 3 A ポリペプチドを含む酵素組成物でバイオマスを処理することを更に含む。酵素組成物は、例えば、Mg 3 A ポリペプチドに加えて、1種又はそれ以上の別のセルラーゼを含んでもよい。あるいは、酵素組成物は、1種又はそれ以上の別のヘミセルラーゼを含んでもよい。ある特定の実施形態では、酵素組成物は、本発明の Mg 3 A ポリペプチド、1種又はそれ以上の別のセルラーゼ、1種又はそれ以上のヘミセルラーゼを含む。一部の実施形態では、酵素組成物は全プロセス組成物である。

10

## 【0199】

一部の態様では、リグノセルロース系バイオマス材料を、ポリペプチドを含む組成物で処理する工程を含む糖化プロセスであって、ポリペプチドが配列番号 2 と少なくとも約 75 % (例えば、少なくとも約 75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %) の配列同一性を有し、プロセスにより、少なくとも約 50 % (例えば、少なくとも約 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、又は 90 %) の重量のバイオマスが発酵性糖に変換される、糖化プロセスが提供される。一部の態様では、リグノセルロース系バイオマス材料は、本明細書に記載の1つ又はそれ以上の前処理方法 / 工程を行ったものである。

20

## 【0200】

本発明の組成物及び方法の他の態様及び実施形態は、上記の説明及び以下の実施例より明らかとなるであろう。

## 【実施例】

## 【0201】

以下の実施例は、本開示の特定の好ましい実施形態及び態様を実証及び例示する目的で示されるものであって、限定と解釈されるべきものではない。

30

## 【0202】

## (実施例 1)

1 - A . Mg 3 A 及び基準となる T . リーゼイ (T. reesei) B g 1 1 の遺伝子発現のクローニング及び発現。

## 1 - A - a . T . リーゼイ (T. reesei) B g 1 1 発現ベクターの構築

天然の T . リーゼイ (T. reesei) の - グルコシダーゼ遺伝子 b g 1 1 の N 末端部分をコドン最適化させた (DNA 2 . 0 , Menlo Park , CA)。この合成部分は、この酵素のコード領域の最初の 447 塩基を含んでいた。次いで、プライマー SK 9 4 3 及び SK 9 4 1 (下記) を使用して、この断片を PCR により増幅した。天然 b g 1 1 遺伝子の残りの領域は、T . リーゼイ (T. reesei) R L - P 3 7 株 (Sheir - Neiss, et al. (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 46 ~ 53) から抽出したゲノム DNA 試料から、プライマー SK 9 4 0 及び SK 9 4 2 (下記) を使用して PCR 増幅した。プライマー SK 9 4 3 及び SK 9 4 2 を使用して、b g 1 1 遺伝子のこれらの 2 つの PCR 産物を、融合 PCR 反応で融合させた。

40

フォワードプライマー SK 9 4 3 : (5' - C A C C A T G A G A T A T A G A A C A G C T G C C G C T - 3') (配列番号 5)

リバースプライマー SK 9 4 1 : (5' - C G A C C G C C C T G C G G A G T C T T G C C C A G T G G T C C C G C A C A G - 3') (配列番号 6)

フォワードプライマー (SK 9 4 0) : (5' - C T G T C G C G G G A C C A C T G G G C A A G A C T C C G C A G G G C G G T C G - 3') (配列番号 7)

50

リバースプライマー (SK 9 4 2) : (5' - C C T A C G C T A C C G A C A G A G

T G - 3' ) (配列番号 8 )

【 0 2 0 3 】

得られた融合 P C R 断片を G a t e w a y (登録商標) E n t r y ベクター-p E N T R (商標) / D - T O P O (登録商標) (図 1 )にクローニングし、 E . c o l i O n e S h o t (登録商標) T O P 1 0 ケミカルコンピテント細胞 ( I n v i t r o g e n )に形質転換することにより、中間体ベクター-p E N T R - T O P O - B g 1 1 ( 9 4 3 / 9 4 2 ) (図 1 )を得た。挿入した D N A のヌクレオチド配列を確認した。正しい b g 1 1 配列を有する p E N T R - 9 4 3 / 9 4 2 ベクターを、 L R クロナーゼ (登録商標) 反応により、 p T r e x 3 g で組み換えた ( I n v i t r o g e n )によるプロトコール概要を参照されたい)。この L R クロナーゼ反応混合物を E . c o l i O n e S h o t (登録商標) T O P 1 0 ケミカルコンピテント細胞 ( I n v i t r o g e n )に形質転換することにより、発現ベクターである p T r e x 3 g 9 4 3 / 9 4 2 (図 2 )を得た。ベクターには、形質転換した T . リーゼイ ( T . r e e s e i )の選択可能マークーとして、アセトアミダーゼをコードしているアスペルギルス・ニデュランス ( A s p e r g i l l u s n i d u l a n s )の a m d S 遺伝子も含有させた。プライマー-S K 7 4 5 及び S K 7 7 1 (下記)により発現カセットを P C R 増幅させて、形質転換用の産物を作製した。

フォワードプライマー-S K 7 7 1 : ( 5 ' - G T C T A G A C T G G A A A C G C A A C - 3 ' ) (配列番号 9 )

リバースプライマー-S K 7 4 5 : ( 5 ' - G A G T T G T G A A G T C G G T A A T C C - 3 ' ) (配列番号 1 0 )

【 0 2 0 4 】

1 - A - b . m g 3 a 発現ベクターの構築

- グルコシダーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームを、マグナポルテ・グリセア ( M a g n a p o r t h e g r i s e a ) から抽出したゲノム D N A を鋳型として使用した P C R によって増幅した。オープンリーディングフレームは、天然シグナル配列とともに増幅した。 D N A E n g i n e T e t r a d 2 P e l t i e r T h e r m a l C y c l e r ( B i o - R a d L a b o r a t o r i e s ) を P C R サーマルサイクラーとして使用した。使用した D N A ポリメラーゼは、 P f u U l t r a I I F u s i o n H S D N A ポリメラーゼ ( S t r a t a g e n e ) 又は同様の性質のブルーフリーディング D N A ポリメラーゼであった。オープンリーディングフレームを増幅する際に使用したプライマーは次の通りである。

M g 3 A - F : 5 ' - C A C C A T G C G T T T C T C C G G G A T C G T - 3 ' (配列番号 1 1 )

M g 3 A - R : 5 ' - T C A G T T C A G G T C A G C A C T C A G A T G G A G C - 3 ' (配列番号 1 2 )

【 0 2 0 5 】

M g 3 A - F フォワードプライマーには、4つの追加のヌクレオチド ( 配列 - C A C C ) を 5 ' 末端に含めて、 p E N T R / D - T O P O 中への定方向クローニングを容易にした。オープンリーディングフレームの P C R 産物を、 Q i a q u i c k P C R P u r i f i c a t i o n K i t ( Q i a g e n , V a l e n c i a , C A ) を用いて精製した。精製した P C R 産物を、 p E N T R / D - T O P O ベクター ( I n v i t r o g e n ) 中にクローニングし、 T O P 1 0 ケミカルコンピテント E . c o l i 細胞 ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) を形質転換させ、 5 0 p p m のカナマイシンを含む L A プレートにプレーティングした。 Q I A s p i n プラスミド調製キット ( Q i a g e n ) を用いて、 E . c o l i 形質転換体からプラスミド D N A を得た。

【 0 2 0 6 】

M 1 3 フォワード及びリバースプライマーを用いて、 p E N T R / D - T O P O ベクターに挿入された D N A の配列データを得た。製造業者の使用説明書に従って L R クロナーゼ反応混合物 ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) を使用して、オープンリーディングフレームの正しい D N A 配列を有する p E N T R / D - T O P O ベクターを

10

20

30

40

50

、pTre3gMデスティネーションベクター(図2)と再結合した。

【0207】

続いて、LRクロナーゼの反応産物により、TOP10ケミカルコンピメントE.coli細胞を形質転換し、次いで、これを50ppmカルベニシリンを含有するLA上にブレーティングした。得られたpExpreesion構築物は、Mg3Aオーブンリーディングフレーム及びアスペルギルス・ツビゲンシス(*Aspergillus tubingensis*)アセトアミダーゼ選択マーカー(amdS)を含有するpTre3gMであった。pExpreision構築物のDNAは、Qiaagenミニプレップキットを使用して単離し、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)の形質転換に使用した。

【0208】

pExpreisionプラスミド又は発現カセットのPCR産物のいずれかで、T.リーゼイ(*T. reesei*)六重欠失(six-fold-delete)株(例えば、国際特許出願公開公報第WO2010/141779号中の記載を参照されたい)を、下記に記述するように若干の修正をしたPEGに媒介されるプロトプラスト法を使用して形質転換させた。プロトプラスト調製では、20g/Lのグルコース、15g/LのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 4.5)、5g/Lの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.6g/LのMgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O、0.6g/LのCaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O、1mLの1000×T.リーゼイ(*T. reesei*)微量元素溶液(5g/LのFeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O、1.4g/LのZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O、1.6g/LのMnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O、3.7g/LのCoCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>Oを含有していた)を含有するトリコデルマ(*Trichoderma*)最小培地MM中、24で16~24時間、150rpmで振とうしながら胞子を増殖させた。出芽した胞子を遠心分離により回収し、50mg/mLのGluconex G200(Novozymes AG)溶液で処理して、真菌細胞壁を溶解させた。Penttilaes et al.(1987)、Gene 61155~164に記載の方法に従って、更にプロトプラスト調製を行った。形質転換混合物(総量200μL中に約1μgのDNA及び1~5×10<sup>7</sup>プロトプラストを含有)を、各々25%PEG溶液2mLで処理し、2倍量の1.2Mソルビトール/10mMトリス(pH 7.5)、10mMのCaCl<sub>2</sub>で希釈し、5mMウリジン及び20mMアセトアミドを含有する3%の選択的上層アガロースMMと混合した。得られた混合物を、ウリジン及びアセトアミドを含有する2%選択的アガロースプレート上に注いだ。プレートを28で更に7~10日間インキュベートした後、単一の形質転換体をウリジン及びアセトアミドを含有する新しいMMプレート上にピックアップした。独立したクローン由来の胞子を使用して振とうフラスコ中の発酵培地に接種した。

【0209】

250mLのThomson Ultra Yield Flask(Thomson Instrument Co, Oceanside, CA)内で、グルコース/ソホロース及び2g/Lのウリジンを含有する36mLの合成培地、例えばGlycine Minimal培地(6.0g/Lのグリシン; 4.7g/Lの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5.0g/LのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.0g/LのMgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 33.0g/LのPIPPS; pH 5.5)などに、滅菌後に炭素源として約2%のグルコース/ソホロース混合物、10mL/Lの100g/L CaCl<sub>2</sub>、2.5mL/LのT.リーゼイ(*T. reesei*)微量元素(400×): 175g/Lの無水クエン酸; 200g/LのFeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 16g/LのZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 3.2g/LのCuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 1.4g/LのMnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 0.8g/LのH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>を添加したもの)を発酵培地とした。

【0210】

1-A-c. 酵母シャトルベクターpSC11の構築

酵母シャトルベクターは、図7のベクターマップに従って構築することができる。このベクターを使用して、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)において細胞内でMg3Aポリペプチドを発現させることができる。セロビオーストランスポーターは、例えば、Hae et al., (2011), PNAS, 108(2): 504

10

20

30

40

50

～509により記述されているものなどの公知の方法を使用して、同じシャトルベクターで又は別々のベクターで、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中に導入することができる。

#### 【0211】

発現カセットの形質転換は、酵母EZ-Transformationキットを使用して実施することができる。形質転換体は、20g/Lセロビオースを含有するYSC培地を使用して選択することができる。酵母への発現カセットの導入が成功したことは、特異的プライマーを用いたコロニーPCRによって確認することができる。

#### 【0212】

酵母株は、公知の方法及びプロトコールに従って培養することができる。例えば、酵母株は、20g/Lグルコースを添加したYP培地(10g/Lの酵母エキス、20g/LのBactoペプトン)中、30℃で培養することができる。アミノ酸栄養要求性マークを使用して形質転換体を選択するために、6.7g/Lの酵母ニトロゲンベース、更に20g/Lのグルコース、20g/Lの寒天、並びにヌクレオチド及びアミノ酸を添加するためのCSM-Leu-Trp-Uraを含有する酵母合成完全(YSC)培地を使用してもよい。

#### 【0213】

1-A-d. ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 組込みベクター-pZC11の構築。

ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 組込みベクター-pZC11は、図8のベクターマップに従って構築することができる。このベクターを使用して、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) において細胞内でMg3Aポリペプチドを発現することができる。セロビオーストランスポーターは、例えば、Sekar et al. (2012) Applied Environmental Microbiology, 78(5):1611～1614により記述されているものなどの、それらのトランスポーターを細菌細胞中に導入する公知の方法を使用して、同じ組込みベクターで又は別々のベクターで、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 中に導入することができる。

#### 【0214】

組込みベクター並びにセロビオーストランスポーター遺伝子の導入が成功したことは、様々な既知の手法を使用して、例えば、この目的のために特異的に設計された確認用プライマーを使用したPCRによって、確認することができる。

#### 【0215】

ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 株は、例えば、米国特許第7,741,119号に記述されているものなどの公知の方法に従って、培養及び発酵することができる。

#### 【0216】

1-B-T.リーゼイ (*T. reesei*) Bg11及びMg3Aの精製  
T.リーゼイ (*T. reesei*) Bg11を、六重欠失トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 宿主株(例えば、公開されている国際特許出願公開第WO2010/141779号における記載を参照されたい)の発酵プロセスにおいて過剰発現させ、そこから精製した。濃縮されたプロセスを、G25 SECカラム (GE Healthcare Biophysics Sciences) に負荷し、50mM酢酸ナトリウム (pH 5.0) に緩衝液交換した。次いで、緩衝液交換したBg11を、アミノベンジル-S-グルコピラノシリセファロースアフィニティマトリックスを充填した25mLカラムに負荷した。50mM酢酸ナトリウム (pH 5.0) 中の250mM塩化ナトリウムで十分に洗浄した後、結合画分を、50mM酢酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウム (pH 5.0) 中の100mMグルコースで溶出させた。クロロ-ニトロ-フェニルグルコシド (CNPG) 活性について陽性を示した溶出画分をプールし、濃縮した。SDS-PAGEによるT.リーゼイ (*T. reesei*) Bg11のMWに対応する単一バンドを質量分析により確認し、

10

20

30

40

50

溶出された *B. gl 1* の純度を検証した。280 nm での吸光度により測定した所、最終的なストック濃度は 2.2 mg / mL であった。

#### 【0217】

上記の *Trichoderma reesei* により発現された Mg 3 A は、濃縮された発酵プロセスから精製することができる。精製の際には、まず、100 mg を 50 mM の MES 緩衝液 (pH 6.0) に希釈する。樹脂 1 mL 当たり 2 mg のタンパク質を、pH 6 に荷電した SP Sepharose イオン交換樹脂 (GE Healthcare) に負荷することによって、Mg 3 A の含有率を富化することができる。次いで、Mg 3 A を、フロースルー中に溶出させることができる。次いで、含有率を高めた Mg 3 A を、10,000 MW カットオフ膜 (Vivaspin, GE Healthcare) を使用して元の体積の 5 分の 1 の体積まで濃縮することができる。他のバックグラウンド成分は、40% 硫酸アンモニウム (w/v) をバッヂ方式で添加することによって、Mg 3 A から除去することができる。次いで純粋な Mg 3 A を、遠心分離後の上清において回収する。次いで、10,000 MW カットオフ膜 (Vivaspin, GE Healthcare) を使用して、Mg 3 A を 50 mM の MES 緩衝液 (pH 6.0) 中で同時に透析及び濃縮する。Mg 3 A の活性及び純度は、それぞれクロロ - ニトロ - フェニルグルコシドアッセイ及び SDS - PAGE によって評価することができる。次いで 7,000 MW カットオフ膜透析カセット (PIERCE) を使用して、50 mM の MES、100 mM の NaCl 緩衝液 (pH 6.0) に対して上清を十分に透析する。最終的な Mg 3 A バッヂの活性は、クロロ - ニトロ - フェニルグルコシドアッセイによって決定することができる。濃度は、ビシンコニン酸アッセイ (Pierce) によって及び GPM AW v 7.0 により計算したモル吸光係数を使用した 280 nm の波長での吸光度アッセイによって、決定することができる。

10  
20  
30

#### 【0218】

##### 実施例 2：様々なアッセイ

###### 2 - A. UPLC によるタンパク質濃度測定

タンパク質定量には、Agilent HPLC 1290 Infinity システムを、Waters ACQUITY UPLC BEH C4 Column (1.7  $\mu$ m、1 × 50 mm) とともに使用した。0.5 分で 5% ~ 33% アセトニトリル (Sigma - Aldrich) の初期勾配、続いて 4.5 分で 33% ~ 48% の勾配、その後 90% アセトニトリルまでの段階勾配を用いる 6 分間のプログラムを使用した。精製したトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) *B. gl 1* に基づくタンパク質検量線を使用して、Mg 3 A ポリペプチドを定量した。

30  
40

#### 【0219】

2 - B. クロロ - ニトロ - フェニル - グルコシド (CNP G) 加水分解アッセイ  
マイクロタイタープレートの各ウェルに、50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 200  $\mu$ L を加えた。個々のウェルに、50 mM の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) で希釈した 5  $\mu$ L の酵素も加えた。プレートを覆い、エッペンドルフ・サーモミキサーにおいて 37 度 15 分平衡化させた。ミリポア水を用い、2 mM の 2 - クロロ - 4 - ニトロフェニル - - D - グルコピラノシド (CNP G, Rose Scientific Ltd., Edmonton, CA) 20  $\mu$ L を調製し、各ウェルに加え、プレートを早く分光光度計 (SpectraMax 250, Molecular Devices) に移した。OD 405 nm で 15 分間、カイネティック測定を行い、データを  $V_{max}$  として記録した。CNP の吸光係数を使用して、 $V_{max}$  の単位を OD/sec から  $\mu$ M CNP/sec へと変換した。 $\mu$ M CNP/sec を、アッセイで使用した酵素量 (mg) で除算し、比活性 ( $\mu$ M CNP/sec / タンパク質 mg) を決定した。CNP G アッセイの標準誤差を 3% と決定した。

#### 【0220】

###### 2 - C. セロビオース加水分解アッセイ

Ghose, T. K. Pure & Applied Chemistry, 1987

50

, 59(2), 257~268の方法を使用して、50でセロビアーゼ活性を決定した。セロビオース単位(Ghoseに記載の通りに導いた)は、アッセイ条件下でグルコース0.1mgを生成させるのに必要な酵素量により除算し、0.0926と定義した。セロビアーゼアッセイの標準誤差は、10%と決定した。

## 【0221】

## 2-D. リン酸膨潤セルロース(PASC)の調製

リン酸膨潤セルロース(PASC)は、Walseth, TAPP 1971, 35:228及びWood, Biochem. J. 1971, 121:353~362の適合プロトコールを用いてAvicelから調製した。簡潔に述べると、Avicel PH-101を濃リン酸で可溶化させ、次いで冷脱イオン水により沈殿させた。セルロースを回収し、更に水で洗浄して、pHを中和した。これを、50mM酢酸ナトリウム(pH5)中に希釈して固形分1%とした。

## 【0222】

実施例3. CNPG及びセロビアーゼアッセイにおいて見られる、基準となるトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1に対する、又は基準となるアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)B-gluに対する、Mg3Aの加水分解性能の向上。

3-A. 振とうフラスコにおいて生成される - グルコシダーゼのCNPG及びセロビアーゼ活性

未精製の振とうフラスコプロス中のMg3Aの濃度を、UPLC(本明細書において記載されている)によって測定したところ、0.041g/Lであった。2種のセロビオヒドロラーゼを、発現株バックグラウンドにおける - グルコシダーゼ活性の対照として以下の実験に含めた。これらはアッセイの検出限界未満であった。2.2mg/mL(A280測定)のストックから、精製トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1を使用した。Megazyme International(Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland, Lot No. 031809)から、BSAを不含有の精製A.ニガー(A. niger) - グルコシダーゼBgluを得た。

## 【0223】

モデル基質であるクロロ-ニトロ-フェニル-グルコシド(CNPG)及びセロビオースに対する各酵素の活性を測定した。アッセイは標準的なプロトコールにある温度で、すなわちCNPGは37で及びセロビオースは50で、それぞれ行った。

## 【0224】

## 【表3】

表3~1

		T.リーゼイ(T. reesei) Bgl1に対する比	
酵素	精製	CNPG	セロビオース
T.リーゼイ(T. reesei) Bglu	Y	1	1
A.ニガー(A. niger) B-glu	Y	0.13	12
Mg3A	N	1.19	1.87

## 【0225】

Mg3Aは、CNPG活性がトリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)Bgl1の活性より20%高く、セロビオース加水分解活性(又はセロビアーゼ活性)が80%超高かった。Mg3Aは、CNPGに対する活性がアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)B-gluの活性の約9倍高かったが、セロビオースに対する活性はアスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)B-gluの活性の約6分の1であった。セロビオヒドロラーゼは、セロビオースに対して活性がなかった(いずれのウェルに関してもグル

10

20

30

40

50

コースは観察されなかった)。

【0226】

【表4】

表3～2

酵素	精製	C N P G / セロビオース
T. リーゼイ (T. reesei) B g 1 u 1	Y	62
A. ニガー (A. n i g e r) B - g 1 u	Y	1.6
Mg 3 A	N	39

10

【0227】

タンパク質定量とは独立して各分子の活性を比較するために、C N P G 対セロビアーゼ活性の比を計算した。Mg 3 A の C N P G / セロビオースに対する加水分解活性の比は、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) B g 1 1 の C N P G / セロビオースに対する加水分解活性の比の半分より若干低い。Mg 3 A の C N P G / セロビオースに対する加水分解活性の比は、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) B - g 1 u の C N P G / セロビオースに対する加水分解活性の比より 20 倍超高い。

【0228】

実施例 4 : P A S C 基質に対する Mg 3 A ポリペプチドの向上した加水分解性能。

4 - A. 国際公開特許出願第 W O 2 0 1 1 / 0 3 8 0 1 9 号に記載の菌株により生成されたバックグラウンド全セルラーゼ組成物において、Mg 3 A 及び基準となるトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) B g 1 1 による P A S C の加水分解を測定及び比較した用量応答曲線。

全タンパク質濃度 88.8 g / L で、F v 4 3 D、F v 3 A、F v 5 1 A、A f u X y n 2、及び E G 4などを発現する、国際特許出願公開第 W O 2 0 1 1 / 0 3 8 0 1 9 号に記載の菌株によって生成された、10 mg タンパク質 / g グルカンの一定の投入量の全セルラーゼバックグラウンドに対して、0 ~ 10 mg タンパク質 / g セルロースまでの - グルコシダーゼを添加した。混合物を使用して、リン酸膨潤セルロース (P A S C) を加水分解した。各試料添加量は 4 連でアッセイした。

【0229】

酵素希釈液はすべて、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) とした。150  $\mu$  L の冷 0.6% P A S C を、マイクロタイタープレート (N U N C 平底 P S、カタログ番号 2 6 9 7 8 7) 中の 30  $\mu$  L の酵素溶液に添加した。したがって酵素混合物は、10 mg タンパク質 / g グルカンの全セルラーゼに加えて、0 ~ 10 mg の Mg 3 A 又は B g 1 1 / g グルカンを含有していた。プレートをアルミニウムプレートシールで覆い、50 度 1.5 時間、I n n o v a インキュベーター / シェーカーにおいて 200 r p m でインキュベートした。100  $\mu$  L の 100 mM グリシン (pH 10) で反応を停止させ、濾過し (M i l l i p o r e 真空フィルターブレートカタログ番号 M A H V N 4 5)、A m i n e x H P X - 8 7 P カラムを用いて A g i l e n t 5 0 4 2 - 1 3 8 5 H P L C において可溶性糖を測定した。

【0230】

グルカン変換率 (%) は、反応中の (mg グルコース + mg セロビオース + mg セロトロース) / mg セルロースとして決定した。

【0231】

結果を図 3 A ~ 3 C に示す。約 4.6% 及び 6.2.5% の変換率での横線は、10 mg / g 及び 20 mg / g の投入量の全セルラーゼのみのバックグラウンド活性を表す。

【0232】

Mg 3 A は、同じ添加量の T. リーゼイ (T. reesei) B g 1 1 より多くのグルコースを生成した。このことは、Mg 3 A が T. リーゼイ (T. reesei) B g 1 1 よりも高いセロビアーゼ活性を有することと一致する。全グルカン変換率 % を測定するために全糖、す

20

30

40

50

なわちグルコース、セロビオース及びセロトリオース濃度を合計した場合、Mg3AはT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1より性能が優れていた。

【0233】

4-B.4-Aのような様々な条件下で、国際公開特許出願第WO2011/038019号に記載の菌株により生成されたバックグラウンド全セルラーゼ組成物において、Mg3A及び基準となるトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1によるPASCの加水分解を測定及び比較した2つめの用量応答曲線。

振とうフラスコで生成したMg3A培養プロスを、10,000分子量カットオフPE-Sスピンコンセントレーターを使用して20倍超濃縮した。タンパク質濃度はUPLCによって決定し、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1標準曲線と比較した。上記の4-Aより高いタンパク質投入量で、PASC加水分解実験を繰り返した。濃縮した試料のセロビアーゼ比活性は、元の振とうフラスコ上清と同等であった。PASCアッセイを、上述した通り実施した(50で1.5時間)。次いで、pH 10の100mMグリシン緩衝液100μLで反応を停止させた。各添加量は4連でアッセイした。

【0234】

Mg3Aの濃度は、UPLCを使用して測定して1.55g/Lであった。基準となるトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1の濃度は2.2mg/Lであった。

【0235】

結果を図3D～3Fに示す。

【0236】

結果により、Mg3Aが、同じPASCの加水分解から、同じ添加量のトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1が生成するより多くのグルコースを生成することが裏付けられた。Mg3Aは、同じ加水分解条件下で同じPASC基質から得られるセロビアーゼ活性がBgl1より高く、セロビオース濃度がより低い。全グルカン変換率%を測定するために全糖を測定した場合、すなわちグルコース及びセロビオースの全濃度を合計した場合、Mg3AはT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1より実質的に性能が優れていた。

【0237】

実施例5：希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉基質に対する、Mg3Aポリペプチドの加水分解性能の向上

5-A.国際公開特許出願第WO2011/038019号に記載の菌株により生成されたバックグラウンド全セルラーゼ組成物における、Mg3A及び基準となるトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1によるDACSの加水分解の測定及び比較を示す添加量曲線。

振とうフラスコで生成したMg3A培養プロスを、10,000分子量カットオフPE-Sスピンコンセントレーターを使用して20倍超濃縮した。タンパク質濃度はUPLCによって決定し、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1標準曲線と比較した。希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)を基質として使用する糖化アッセイにおいて、濃縮した振とうフラスコ上清を使用した。各酵素混合物試料を、10%のMg3A又はBgl1と、国際公開特許出願第WO2011/038019号に記載の改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株により生成された全セルラーゼと混合した。3～53mg全タンパク質/gグルカン酵素混合物を基質に添加することにより、DACS基質の加水分解に関する添加量応答曲線を作成した。

【0238】

トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1を、2.2g/Lの全タンパク質の精製したストックから加水分解アッセイに添加した。1.55mg/mLの濃縮した試料からMg3Aを添加した。

【0239】

10

20

30

40

50

希アンモニア前処理されたトウモロコシ茎葉 (DACS) を、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5) においてスラリー化し、最終的に 7% グルカン (21.5% 固体) 含量とした。必要であれば、スラリーを pH 5 に調整し、スラリーを 96 ウエルマイクロタイプレートに移した。

## 【0240】

基質中の mg タンパク質 / g グルカンに基づいて、すべての酵素を負荷した。酵素希釈液はすべて、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) とした。96 ウエルマイクロタイプレートの 1 ウエル当たり 30 μL の酵素溶液及び 45 μg の DACS 基質を添加した。各試料添加量は 4 連で試験した。プレートをアルミニウムシールで覆い、50 で 2 日間、Innova インキュベーター / シェーカーにおいて 200 rpm でインキュベートした。100 μL の 100 mM グリシン (pH 10) で反応を停止させ、濾過し、HPLC により可溶性糖を測定した。

10

## 【0241】

グルカン変換率 (%) は、DACS 基質中の (mg グルコース + mg セロビオース + mg セロトリオース) / mg セルロースと定義する。

## 【0242】

添加量応答曲線を図 4A ~ 4B に示す。

## 【0243】

Mg 3A 及び全セルラーゼバックグラウンド組成物を混合することにより、基準となるトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Bg 11 を同じ全セルラーゼバックグラウンド組成物と混合する場合よりも、又はグルカン変換がセルラーゼバックグラウンド組成物を単独で用いて測定されるレベルである場合よりも、より高いレベルのグルカン変換がもたらされた。 - グルコシダーゼを 13 mg / g 未満で添加した場合、向上が特に顕著であった。

20

## 【0244】

5-B : 國際公開特許出願第 WO 2011 / 038019 号に記載の菌株により生成された 13.4 mg / g の全セルラーゼ組成物に対して、添加量を漸増させて Mg 3A 及び Bg 11 を添加した、Mg 3A 及び基準となるトリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Bg 11 による DACS の加水分解の測定及び比較を示す用量応答曲線。

30

この実験では、國際公開特許出願第 WO 2011 / 038019 号に従って、改変トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) 株により生成された、13.4 mg タンパク質 / g グルカンの一定の投入量の全セルラーゼに対して、添加量を漸増させて - グルコシダーゼを添加した。混合物を使用して、50 で 2 日間、DACS (4% グルカン) を加水分解した。混合物を調製するために、トリコデルマ・リーゼイ (Trichoderma reesei) Bg 11 を 2.2 g / L 全タンパク質の精製したストックから混合物に添加し、全セルラーゼを、88.8 g / L 全タンパク質ストックから混合物に添加した。Mg 3A を、1.55 mg / mL の濃縮物から添加した。

## 【0245】

マイクロタイプレートに入れた、希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉は、上述した通り調製した。基質中の mg タンパク質 / g グルカンに基づいて、すべての酵素を負荷した。酵素希釈液はすべて、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) とした。30 μL の酵素溶液を、マイクロタイプレートの 1 ウエル当たり 45 μg の基質に添加した。プレートをホイルシールで覆い、50 で 2 日間、Innova インキュベーター / シェーカーにおいて 200 rpm でインキュベートした。100 μL の 100 mM グリシン (pH 10) で反応を停止させ、濾過し、HPLC (脱灰カラム (BioRad 125-0118) 及び炭水化物カラム (Aminex HPX-87P) を取り付けた Agilent 100 シリーズにより可溶性糖を測定した。移動相は水、流速 0.6 mL / min、20 分のランタイムとした。グルコース標準曲線を作成し、定量に使用した。

40

## 【0246】

50

グルカン変換率(%)は、基質中の(mgグルコース+mgセロビオース+mgセロトリオース)/mgセルロースと定義する。

【0247】

結果を図5A～5Bに示す。

【0248】

Mg3Aは、すべての添加量でトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1より性能が優れていた。

【0249】

実施例6：Mg3Aポリペプチドの熱安定性及び希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉基質に対する高温加水分解性能の向上。

この実験では、国際公開特許出願第WO2011/038019号に従って、改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株により生成された、10mgタンパク質/gグルカンの一定の投入量の全セルラーゼに対して、添加量を漸増させて-グルコシダーゼを添加した。混合物を使用して、55で2日間、DACS(4%グルカン)を加水分解した。混合物を調製するために、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1を2.2g/L全タンパク質の精製したストックから混合物に添加し、全セルラーゼを、88.8g/L全タンパク質ストックから混合物に添加した。上記の説明に従って調製された1.55mg/mL濃縮物からMg3Aを添加した。

【0250】

マイクロタイタープレート中の希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉は、上述した通り調製した。基質中のmgタンパク質/gグルカンに基づいて、すべての酵素を負荷した。酵素希釈液はすべて、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)とした。30μLの酵素溶液を、マイクロタイタープレートの1ウェル当たり75μgの基質に添加した。プレートをホイルシールで覆い、55で2日間、Innovaインキュベーター/シェーカーにおいて200rpmでインキュベートした。100μLの100mMグリシン(pH10)で反応を停止させ、濾過し、HPLC(脱灰カラム(BioRad 125-0118)及び炭水化物カラム(Aminex HPX-87P)を取り付けたAgilent 100シリーズにより可溶性糖を測定した。移動相は水、流速0.6mL/min、20分のランタイムとした。グルコース検量線を作成し、定量に使用した。

【0251】

グルカン変換率(%)は、基質中の(mgグルコース+mgセロビオース+mgセロトリオース)/mgセルロースと定義する。

【0252】

結果を図6A～6Cに示す。

【0253】

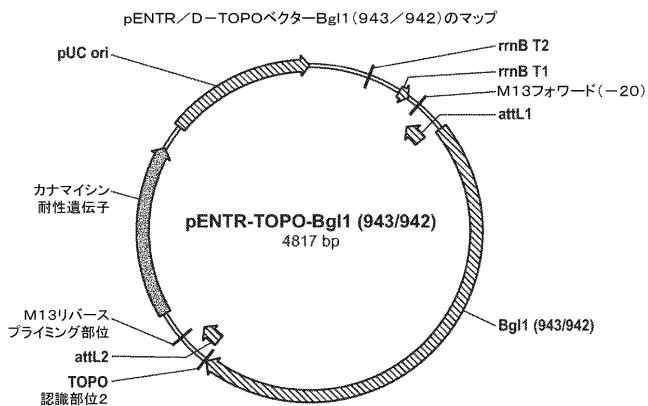
グルカン変換率、グルコース生成量について、Mg3Aはすべての添加量でトリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)Bgl1より性能が優れていた。Mg3A及びBgl1はともに、糖化混合物中のセロビオースを効率的に枯渇させる。

10

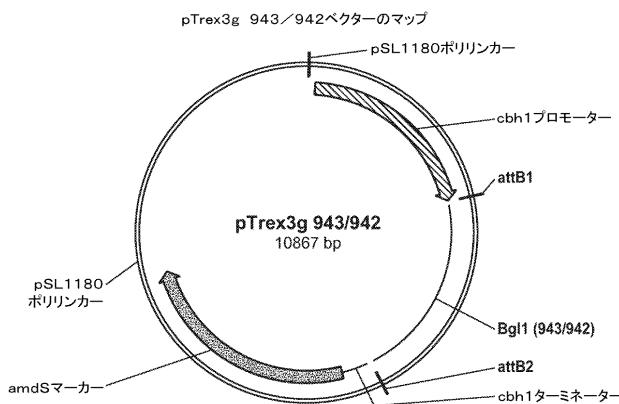
20

30

【図1】



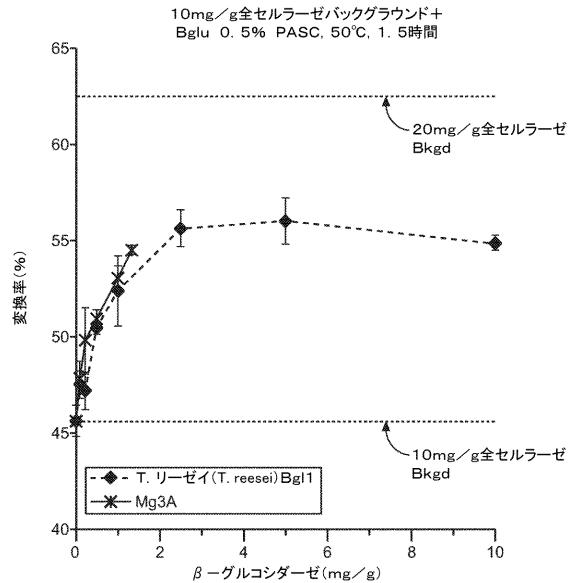
【図2】



【図3A】

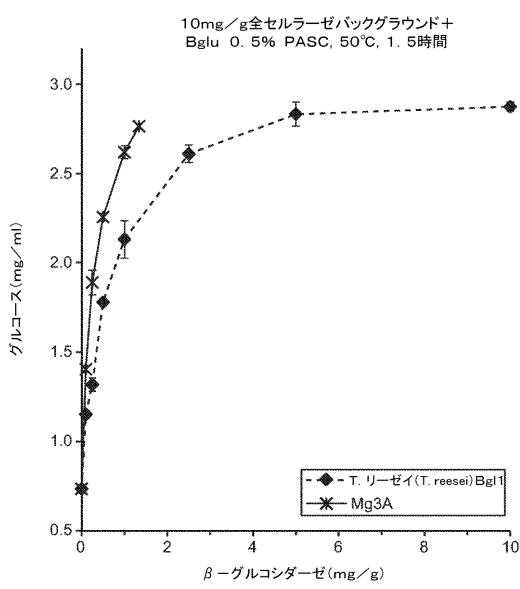
図3:PASC(リン酸膨潤セルロース)の加水分解を測定及び比較する用量応答曲線

3A:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質からの全グルカン変換率%の測定及び比較を示す用量応答曲線。測定は実施例4-Aの条件に従って行った。



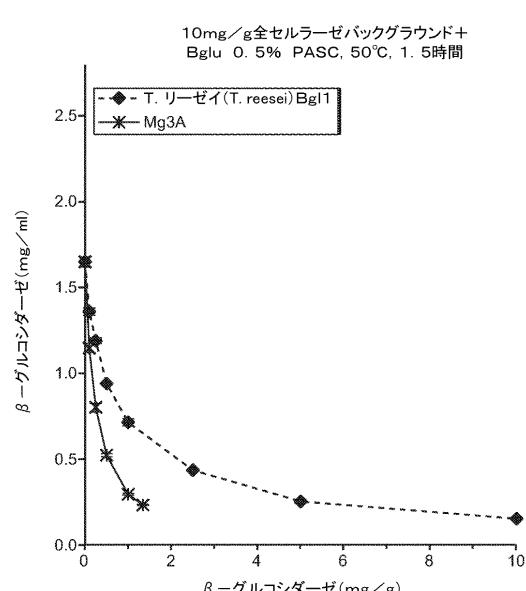
【図3B】

3B:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号における記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質の加水分解からのグルコース収率の測定及び比較を示す用量応答曲線。測定は実施例4-Aの条件に従って行った。



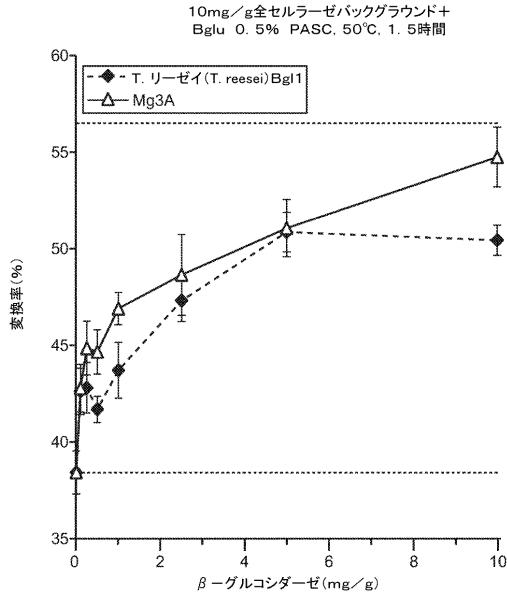
【図3C】

3C:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質の加水分解からのセロビオース収率の測定及び比較を示す用量応答曲線。測定は実施例4-Aの条件に従って行った。



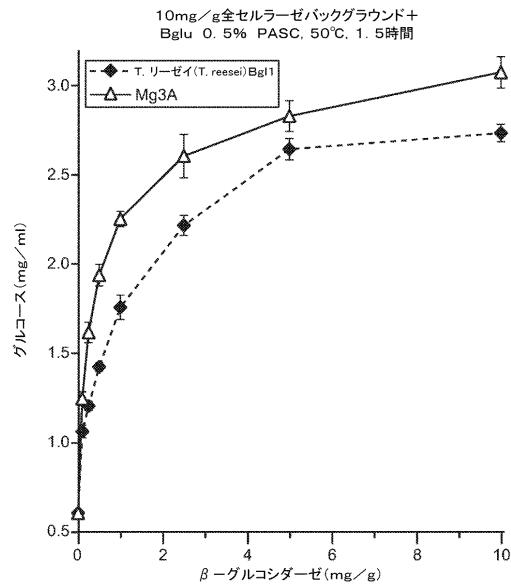
## 【図3D】

3D:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質からの全グルカン変換率%の測定及び比較を示す用量応答曲線。測定は実施例4-Bの条件に従って行った。



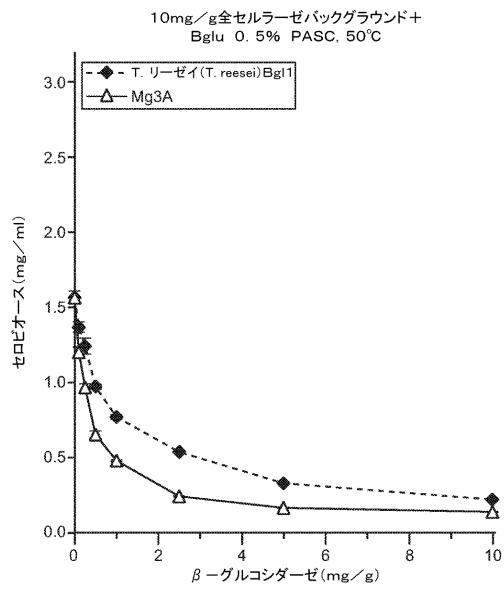
## 【図3E】

3E:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質からの全グルカン変換率%の測定及び比較を示す用量応答曲線。測定は実施例4-Bの条件に従って行った。



## 【図3F】

3F:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のPASC基質の加水分解からのセロビオース収率の測定及び比較を示す用量応答曲線。

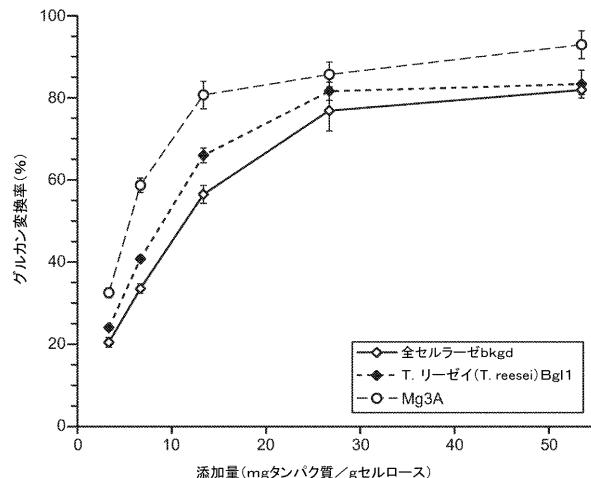


## 【図4A】

図4:希アンモニアで前処理したトウモロコシ茎葉(DACS)の加水分解を測定及び比較する用量応答曲線

4A:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のDACS基質からの全グルカン変換の測定及び比較を示す用量応答曲線。

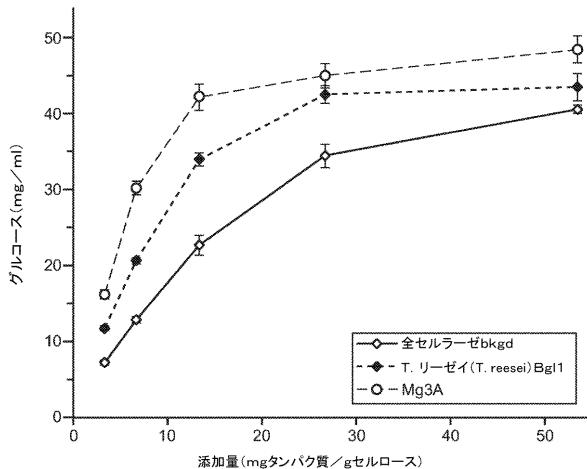
添加量応答:全セルラーゼバックグラウンド+/-10%  
Bglu DACS, 4%セルロース, MTP, 50°C, 2日間



【図4B】

4B:同じ濃度のT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1及びMg3Aを含む全セルラーゼ組成物(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)による、所与のDACS基質の加水分解からのグルコース収率の測定及び比較を示す用量応答曲線。

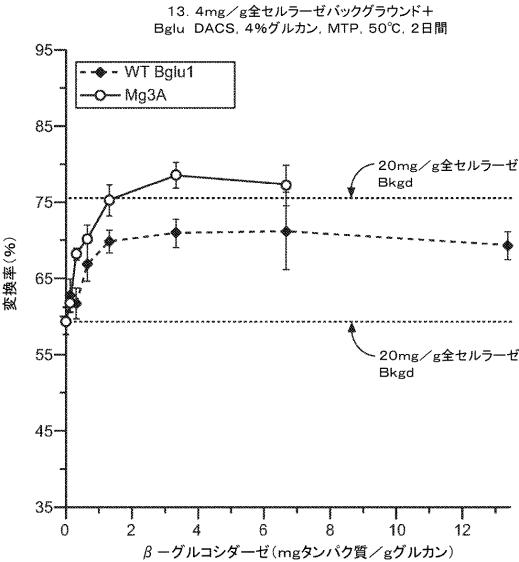
添加量応答:全セルラーゼバックグラウンド+/-10%  
Bglu DACS, 4%セルロース, MTP, 50°C, 2日間



【図5A】

図5:異なる添加量のMg3A及びT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1を、13.4mg/g全タンパク質の全セルラーゼに添加した、DACS基質に対する加水分解性能の測定及び比較を示す用量応答曲線。

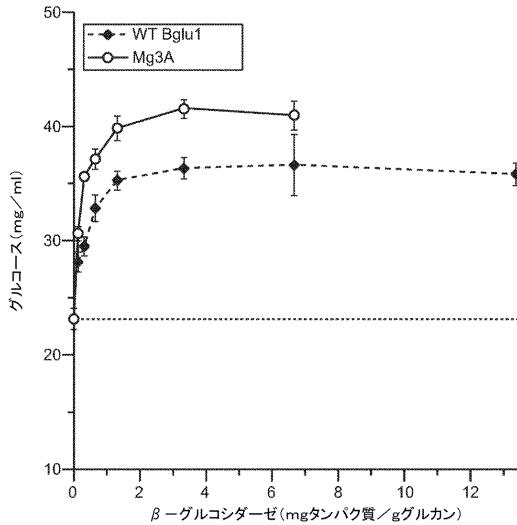
5A:13.4mg/g全セルラーゼ(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)に添加量を漸増させて添加した、Mg3Aの混合物及びT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1の混合物による、所与のDACS基質からの全グルカン変換の測定及び比較を示す用量応答曲線。



【図5B】

5B:13.4mg/g全セルラーゼ(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)に添加量を漸増させて添加した、Mg3Aの混合物及びT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1の混合物による、所与のDACS基質からのグルコース収率の測定、及び比較を示す用量応答曲線。

13.4mg/g全セルラーゼバックグラウンド+Bglu DACS, 4%グルカン, MTP, 50°C, 2日間

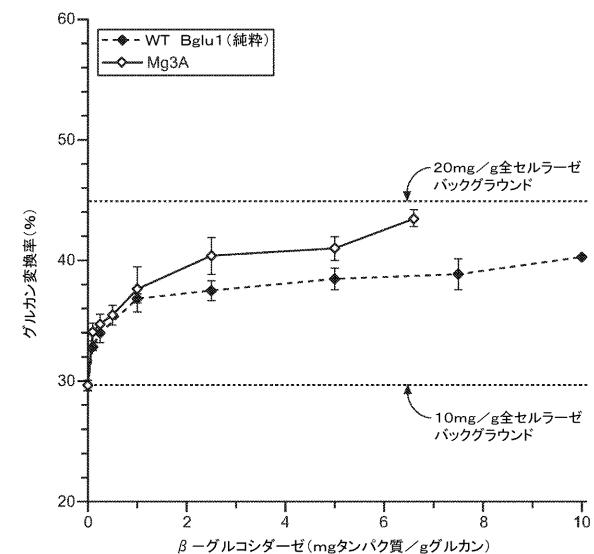


【図6A】

図6:異なる添加量のMg3A及びT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1を、10.0mg/g全タンパク質の全セルラーゼに添加した、55°CでのDACS基質に対する加水分解性能の測定及び比較を示す用量応答曲線。

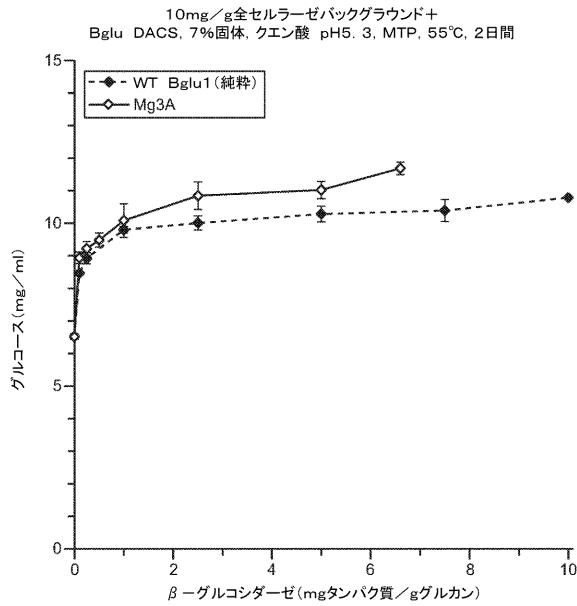
6A:10mg/g全セルラーゼ(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)株から生成された)に添加量を漸増させて添加した、Mg3Aの混合物及びT.リーゼイ(*T. reesei*)Bgl1の混合物による、所与のDACS基質からの全グルカン変換の測定及び比較を示す用量応答曲線。

10mg/g全セルラーゼバックグラウンド+Bglu DACS, 7%固体、クエン酸pH 5.3, MTP, 55°C, 2日間



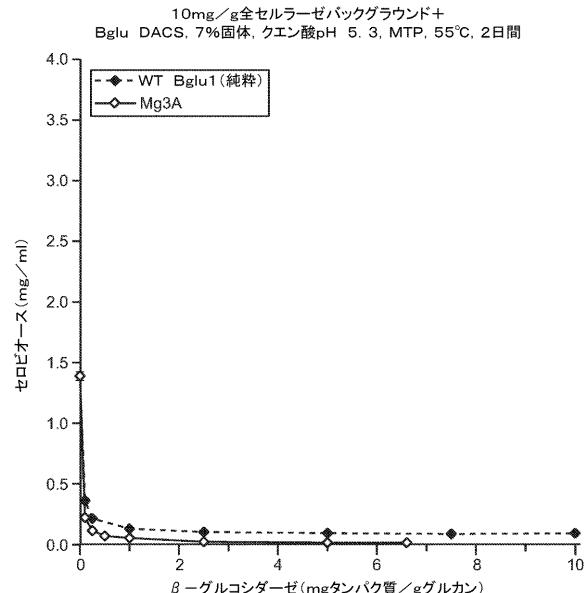
( 义 6 B )

6B: 10mg/g全セルラーゼ(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)株から生成された)に添加量を漸増させて添加した、Mg3Aの混合物及びT. reesei(Bgl I)の混合物による、所与のDACS基質からのグルコース収率の測定及び比較を示す用量応答曲線。



【 6 C 】

6C: 10mg/g全セルラーゼ(国際公開特許出願第WO 2011/038019号中の記載に従って改変トリコデルマ・リーゼイ(Trichodema reesei)株から生成された)に添加量を漸増させて添加した、Mg3Aの混合物及び、リーゼイ(T. reesei)Bg1の混合物による、DACS基質に対する所与の糖化反応によるセロビオース枯渇の測定及び比較を示す用量答辯曲線。



【 四 7 】

( 8 )

【 図 9 A 】

## 【図9B】

cgaggaggatccctgcccccaaggcgctcgatggctcgccccagccctgcccccgccgtcgccaaaga  
actcgcccccggcaaccggcaactcgccagctgtacggacaccctgtacaccgtcagggcaaccatcaccacacc  
ggcaagctctgtggcgaaagggtggccagttgtacgtgtccacggccggccggagggacccgcccc  
cgtcctgcgcggcttcgagccatccgtctcgaccccgccagagccgccccacttcaaggctcgactga  
ccaggaggaaactcgcaactggacgtcaaggactcgactgtcatctgagcccccagaag  
gtttgtcgaaagcagcagcagcaggaaactcgactgtacactga

配列番号2:Mg3Aのポリペプチド配列(下線付きの残基は予測されるシグナル配列である)

mrfsgivatlvagqvsahpgdysklerravatsephypqpwmpndadgwqeyavkakdfvsgmtt  
kvnlitggwqasdlcvngvavprlrlsrlclqdsgptvrfadwsvfpagittgtatfdkglyrrq  
amgqeakdkgivnllgpvagggrvaaagrawesfgadpvltygymietikqiqdgtviatakhfign  
egehfrgveergrgvniseslsnniddktmhelylwpfadavragvgsvmsctyvngnsgcngskl  
lqllkdelgfqgfvmsdwqahgtaaasaagldmsmpgdtetfntglswganltlavvngtvaewri  
ddmamrimaaffkvngtldqpeinfsswtkdtfghlsssgnriqqinqhvdvrrdhgnlirevaakg  
tvllkntnnalplnkpkflavigddagsnprgncpdrqcllgtgmawgsgtadfpvliptdaalq  
aqaiedgtryesilsnyataqtgalvsqtyataivfvaassgegyidfdgnkgdrnnitlwqgdslv  
knvssvcnntivhstgptiletdwvnpnvtiawgvgpgesgraitygvrnpagrsptfwkg  
tresytdtmykpnpgneapqdytegyifdyrhfdqgkdepvyeqfghlsyttfeysnirvdakpas  
eykpttgqtipapvfganvsksdlsqytfpsdefphiyliyplntssgeesardpkyygtaeeflp  
pkaldgspqplrasgknsqgnrqlqydtlytvtatitngklvgeevpqlivysshggpedppvvlrg  
erirldpgqssatfkvdtrrdvsnwdvkvqdwvisehpkvfvgsrssrkhlsadln

配列番号3:成熟Mg3Aポリペプチド配列

hpgdysklerravatsephypqpwmpdadgwqeyavkakdfvsgmttakdfvsgmttakdfvsgmtt  
vgavprlrlsrlclqdsgptvrfadwsvfpagittgtatfdkglyrrqamgqeakdkgivnllgpv  
agglgrvaagrawesfgadpvltygymietikqiqdgtviatakhfignqehfrgveergrgvni  
seslssniddktmhelylwpfadavragvgsvmsctyvngnsgcngsklqllkdelgfqgfvmsd  
wqaqhtaaasaagldmsmpgdtetfntglswganltlavvngtvaewriidmamrimaaffkvngt  
dqpeinfsswtkdtfghlsssgnriqqinqhvdvrrdhgnlirevaakgtvllkntnnalplnkpkf  
laviqddagsnprgncpdrqcllgtgmawgsgtadfpvliptdaalqqaiedgtryesilsny  
taqtgalvsqtyataivfvaassgegyidfdgnkgdrnnitlwqgdslvknvssvcnntivhstg  
ptiletdwvnpnvtiawgvgpgesgraitygvrnpagrsptfwkgktryesgtdvmykpnpgne  
apqdytegyifdyrhfdqgkdepvyeqfghlsyttfeysnirvdakpas eykpttgqtipapvfgan  
vsksdlsqytfpsdefphiyliyplntssgeesardpkyygtaeeflpkaldgspqplrasgkns  
spqgnrqlqydtlytvtatitngklvgeevpqlivysshggpedppvvlrgferirldpgqssatfkvdlt  
rrdvsnwvdvkvqdwvisehpkvfvgsrssrkhlsadln

## 【図9C】

配列番号4:T.リーゼイ(T.reesei)Bgl1ポリペプチド配列(下線付きは予測されるシグナル配列である)  
mryrtaaalatqpfaradshstsgasaeavppagtptwqyaytdakakalnlldkvgqivsgvgwngpcvg  
ntspaskisysplclqdqplgvrystgtstafptgvqaaestwdvnlirergfifgeevkasisghilgvapglk  
tpqgrnrwefgfvdpyltqiangtqingiqsbyvgvqatakhylneqelretissnpddrtlhehlytwpfadavq  
anavsvmcsvnkvnttwedqyt1qtvldqkldq1qfpgyvmtwdnqahqttvqnsansgldmsmpgtdfngnnrlwgp  
altnavnsngvptsvdmdvtrilaawyltqddqayqpsfnisrnvgvgnhktvnrairdgivllkndanilplk  
kpasivvgssaa1gnharnspscndkgcddgalmgwygsgavvypyfwapydaintrassqgtqvtlsmtndts  
sgasargkdvaiffitdsgegyitvegnaqdrnnldpwhngnalgvavagansnvivvhsvalq  
pgkvavwagslpsqesqna1vdwlwgvdvpsqsklvtiakspndyntrvsrgsdssfseglidykhfddanitp  
ryefgyglsytkfnyrsrlstakspatgavvpgqpsdlfqnvatvtdiansggvtaevqlyitypssap  
rppkqlrgfaklnltpqgssatfnirrlsldyswtdasqkvvvpsgsfjisvqassrdirltstlsva

## 【図9D】

配列番号13~39:シグナルペプチド配列

配列番号13: mryrtaaalatqpfara

配列番号14: mvsftslalaapsprscrpaaevsvevake

配列番号15: mkanvilcllaplava

配列番号16: mivgilttlatlatlaas

配列番号17: myrklavisaflatara

配列番号18: mllnqvaasalsisllgglaea

配列番号19: mklnwvaalsisigaqtds

配列番号20: masirsvlvsqllagyna

配列番号21: mwltspillfastllgtgvala

配列番号22: mrfswllcpplamgsa

配列番号23: mrlsfpshllvaflltikeass

配列番号24: mqlkfllssalllsltgncaa

配列番号25: mkywlvawatsltpala

配列番号26: mvrfssilaaaacfavaves

配列番号27: mihlkpalaallalstqcv

配列番号28: malqffffilaamlna

配列番号29: mklnkpfliaylafnlaea

配列番号30: maplsiralsllaltgaaaa

配列番号31: mVRPTILLTSLLLAPFAAA

配列番号32: mmhmslvaalaagtlpllassa

配列番号33: mvhlsllaaalaalpivyg

配列番号34: mrfslaattllaglata

配列番号35: mvvlkslvssilfaslvs

配列番号36: mvqikaaalamlfashvls

配列番号37: mKASSVLLGLAPLAIA

配列番号38: MRFPSIFTAVLFAASSALA

配列番号39:

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYLDLEGDFDVAVLPPSNSTNNGLFINTTIAA

KEEGVSLDKR

## 【図9E】

配列番号40~42:シグナルペプチド配列

配列番号40: MLLQAFLFLLAGFAAKISAR

配列番号41:

ATGATAAAAGTCCCGCGGTTCTCTGTATGATCGCGCTTACATCCAGCGTTCTGGCAAGCGGGCTTCTCAAAG  
GTTTCAGCTCAT

配列番号42:

ATGAAAAGAAAGCTTGGCTGCCAGTTATTAACGGCTTGTGCCCTGGCGGTATGGGATTACAGCTGGT

AAGGCCAGGCTCT

【配列表】

2015533292000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2013/067413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12N9/42  
ADD.

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)  
C12N

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)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE UniProt [Online] 15 March 2005 (2005-03-15), "SubName: Full=Beta-glucosidase-like protein; ", XP002718760, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q5EMW3 Database accession no. Q5EMW3 sequence ----- -/-</p>	1-22

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

16 January 2014

28/01/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Griesinger, Irina

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2013/067413

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>14 December 2011 (2011-12-14),    "SubName: Full=Beta-glucosidase 1;",    XP002718761,    retrieved from EBI accession no.    UNIPROT:G4MQA2    Database accession no. G4MQA2    sequence</p> <p>-----</p>	1-22
X	<p>WO 2007/071818 A1 (ROAL OY [FI];    VEHMAANPERAE JARI [FI]; ALAPURANEN MARIKA    [FI]; PURANEN) 28 June 2007 (2007-06-28)    claims 1,10, 18, 26; example 20; table 24;    sequences 23,24</p> <p>-----</p>	1-22
A	<p>OHMIYA KUNIO ET AL: "Structure of    cellulases and their applications",    BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING    REVIEWS, INTERCEPT LTD., ANDOVER, GB,    vol. 14, 1 April 1997 (1997-04-01), pages    365-414, XP008093172,    ISSN: 0264-8725    the whole document</p> <p>-----</p>	1-22
1		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/067413

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007071818 A1	28-06-2007	AR 058721 A1	20-02-2008
		AU 2006326963 A1	28-06-2007
		BR P10620287 A2	08-11-2011
		CA 2632502 A1	28-06-2007
		CA 2833029 A1	28-06-2007
		CN 101384713 A	11-03-2009
		CN 102174492 A	07-09-2011
		EP 1963498 A1	03-09-2008
		EP 2319920 A1	11-05-2011
		EP 2453013 A1	16-05-2012
		EP 2453014 A1	16-05-2012
		FI 20051318 A	28-12-2006
		TW 200801195 A	01-01-2008
		US 2009042266 A1	12-02-2009
		US 2011045544 A1	24-02-2011
		US 2013224801 A1	29-08-2013
		WO 2007071818 A1	28-06-2007

## 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 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24	
C 0 7 K 14/37 (2006.01)	C 0 7 K 14/37	

(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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,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,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100169993

弁理士 今井 千裕

(74)代理人 100131082

弁理士 小原 正信

(74)代理人 100185535

弁理士 逢坂 敦

(72)発明者 バウアー、ベンジャミン・エス

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
、ダニスコ・ユース・インク

(72)発明者 フーダラ、メレディス・ケー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925  
、ダニスコ・ユース・インク

F ターム(参考) 4B024 AA05 AA10 AA17 BA11 BA12 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20  
DA05 DA11 DA12 EA04 GA11 HA01 HA08  
4B050 CC03 DD02 DD03 DD04 LL02 LL05  
4B064 AF01 AF02 AF03 AF04 AF11 CA02 CA05 CA06 CA19 CB01  
CB07 DA10 DA16  
4B065 AA01X AA01Y AA26X AA58X AA58Y AB01 AC14 BA01 BA03 CA20  
CA21 CA22 CA31 CA41 CA43 CA54  
4H045 AA30 BA10 CA10 CA11 CA15 DA89 EA01 EA02 EA07 FA74