

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5193997号

(P5193997)

(45) 発行日 平成25年5月8日(2013.5.8)

(24) 登録日 平成25年2月8日(2013.2.8)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/42 (2006.01)

C 1 2 N 9/42

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 7/08 (2006.01)

C 1 2 P 7/08

C 1 1 D 3/386 (2006.01)

C 1 1 D 3/386

請求項の数 24 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-504069 (P2009-504069)

(86) (22) 出願日 平成20年3月12日(2008.3.12)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2008/054511

(87) 国際公開番号 W02008/111613

(87) 国際公開日 平成20年9月18日(2008.9.18)

審査請求日 平成23年2月18日(2011.2.18)

(31) 優先権主張番号 特願2007-61266 (P2007-61266)

(32) 優先日 平成19年3月12日(2007.3.12)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10780

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-10781

微生物の受託番号 IPOD FERM BP-6047

(73) 特許権者 000006091

Me i j i S e i k aファルマ株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(74) 代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(72) 発明者 守屋 達樹

神奈川県小田原市相山788番地 明治製

菓株式会社内

(72) 発明者 中根 公隆

東京都中央区京橋二丁目4番16号 明治

製菓株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドグルカナーゼP P C E およびそれを含んでなるセルラーゼ調製物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の (a) ~ (e) から選択される、タンパク質。

(a) 配列番号4で表わされる16位~236位のアミノ酸配列を含む、タンパク質。

(b) 配列番号4で表わされる1位~236位のアミノ酸配列を含む、タンパク質。

(c) 配列番号30で表されるアミノ酸配列を含む、タンパク質。

(d) 配列番号4で表される16位~236位又は1位~236位のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加、及び/又は修飾されたアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質。

(e) 配列番号4で表される16位~236位若しくは1位~236位のアミノ酸配列、又は配列番号30で表されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項3】

以下の (f) 、 (g) から選択される、ポリヌクレオチド。

(f) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列、又は配列番号3又は28で表される46位~834位の塩基配列を含むポリヌクレオチド。

(g) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列又は配列番号3又は28で表される46位~834位の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、及び/又は付

10

20

加された塩基配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 又は 3 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。

【請求項 6】

宿主が酵母又は糸状菌である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 7】

糸状菌が、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、フミコーラ (*Humicola*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属又はペニシリウム (*Penicillium*) 属に属する微生物である、請求項 6 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 8】

糸状菌が、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属に属する微生物である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

糸状菌が、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 5～9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程、及び前記培養によって得られる宿主細胞又はその培養物から請求項 1 に記載のタンパク質を採取する工程を含む、タンパク質の製造方法。

20

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法で生産されたタンパク質。

【請求項 12】

請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質を含む、セルラーゼ調製物。

【請求項 13】

請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、又は請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物を含む、洗剤組成物。

【請求項 14】

30

セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

【請求項 15】

セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的として減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

【請求項 16】

着色されたセルロース含有繊維の色を局所的に変化させる方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

40

【請求項 17】

着色されたセルロース含有繊維の色を澄清化する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

【請求項 18】

セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を遅延させる方法、又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減させる方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

50

【請求項 19】

セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物、又は請求項 13 に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

【請求項 20】

洗剤組成物と接触させる工程が、その繊維の浸漬、洗濯、又はすすぎを通じて行われる、請求項 14 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、又は請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする、古紙の脱インキ方法。

10

【請求項 22】

紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、又は請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

【請求項 23】

動物飼料の消化能を改善する方法であって、動物飼料を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、又は請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

【請求項 24】

セルロース系の物質を分解・糖化し、バイオマスエタノールを製造する方法であって、セルロース系物質を、請求項 1 又は 11 に記載のタンパク質、又は請求項 12 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エンドグルカナーゼ P P C E (Endoglucanase PPCE) 及びそれを含んでなるセルラーゼ調製物、並びにそれらを利用したセルロース含有繊維の処理方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来から、セルロース含有繊維を、その繊維に所望の特性を与えるためにセルラーゼで処理することが行われている。例えば、繊維業界においては、セルロース含有繊維の肌触り及び外観を改善するために、又は着色されたセルロース含有繊維にその色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」の外観を与えるために、セルラーゼによる処理が行われてきた〔特許文献 1〕。

30

【0003】

この様な用途に用いられるセルラーゼとして、ファミリー 45 に属するエンドグルカナーゼや、ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼ、ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼが挙げられる。当該分野において、これらのエンドグルカナーゼは、その特徴（例えば、至適 pH、至適温度、繊維に対する風合い改善効果、繊維強度に対する影響など）に合わせて、区別して使い分けられることが一般的である。ファミリー 45 に属するエンドグルカナーゼは主に中性領域で、ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼは酸性～中性領域で、ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼは酸性領域で使用される例が多い。ファミリー 45 に属するエンドグルカナーゼの一例として、フミコーラ (Humicola) 属由来の精製された 43 k D エンドグルカナーゼ成分〔特許文献 2〕や、フミコーラ属由来のエンドグルカナーゼ N C E 5〔特許文献 3〕、リゾプス (Rhizopus) 属由来のエンドグルカナーゼ R C E I〔特許文献 4〕などが挙げられる。

40

【0004】

また、ファミリー 5 に属するエンドグルカナーゼの一例として、トリコデルマ (Trichoderma) 属由来の S C E 3〔特許文献 5〕などが挙げられる。ファミリー 12 に属するエンドグルカナーゼの一例として、トリコデルマ (Trichoderma) 属由来の E G III〔非特許

50

文献1]や、アスペルギルス (Aspergillus) 属由来のFI-CMCase [非特許文献2] が挙げられる。また、ペニシリウム (Penicillium) 属菌も分子量 25 kD のエンドグルカナーゼを生産することが知られている [非特許文献3]。

【0005】

これらの酵素を使用して繊維加工を行う場合、それぞれの至適条件下で反応を行うのが一般的である。これら現在までに報告されている酵素の至適温度は中温域（例えば、40℃～60℃）であり、至適 pH は、酸性から中性（例えば、pH 4.0～8.0）付近である。当該分野において、低温（例えば 40℃未満）や強酸性（例えば、pH 4.0未満）に至適を有する酵素が工業化され、恒常的に使用されている例はない。一方、工業的なセルロース含有繊維の処理においては、多くの場合、セルラーゼ調製物は、多量の高活性エンドグルカナーゼを含む調製物として提供されている。その製造方法としては、遺伝子組換えの技術を用いて、目的の高活性エンドグルカナーゼ成分を宿主細胞において大量に発現させる方法が知られている [特許文献6、特許文献7]。

【0006】

そして、これらの方法において好ましい宿主細胞としては、不完全菌類に属する糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、フミコーラ (Humicola) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属の糸状菌等が挙げられている。更に、酸性または強酸性領域での繊維加工に用いるセルラーゼを生産させる場合、宿主由来のセルラーゼとの相乗作用が期待できることから、中性セルラーゼを生産するアスペルギルス (Aspergillus) 属やフミコーラ (Humicola) 属の糸状菌よりも、酸性セルラーゼを生産するトリコデルマ (Trichoderma) 属を宿主とする方が適している。特に、工業レベルでの酵素の生産を考慮した場合、生産性の高いトリコデルマ (Trichoderma) 属の菌は極めて優良な宿主となる [特許文献8]。しかしながら、異種由来の遺伝子を、トリコデルマ (Trichoderma) 属の糸状菌において発現させる際、その塩基配列上の特性が異なる（遺伝子のコドン使用頻度が違う）等の理由で、発現が妨げられる場合が多い。そのため、異種由来の遺伝子に対して改変操作を行うことが必要となる。例えば、接合菌類に属するリゾプス属由来のエンドグルカナーゼ RCEI をフミコーラ・インソレンスにおいて大量発現させるためには、RCEI をコードする遺伝子を宿主細胞のコドン使用頻度に合わせて最適化しなければならない [特許文献4]。しかし、このように最適化されたとしても、通常、同種遺伝子の発現量と同程度の発現量を得ることは難しいことが予想されている。また、実際に異種由来遺伝子が発現し、宿主により生産された目的の酵素が、培養中に培養液中のプロテアーゼなどによる分解を受け、分解物もしくは部分分解物として得られてくる場合も予想される。

【0007】

【特許文献1】欧州特許第307,564号

【特許文献2】国際公開第98/03640号

【特許文献3】国際公開第01/090375号

【特許文献4】国際公開第00/24879号

【特許文献5】国際公開第98/54332号

【特許文献6】国際公開第91/17243号

【特許文献7】国際公開第98/03667号

【特許文献8】国際公開第05/054475号

【非特許文献1】Okada, H. et.al., "Appl. Environ. Microbiol." 64, 1998年, p.555-563

【非特許文献2】Ooi, T. et.al., "Nucleic Acids Research" 18, 1990年, p.5884

【非特許文献3】K. Mahalingeshwara et.al., "Carbohydrate Research" 190, 1989年, p.279-297

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これまでに、繊維加工用途に使用するために、フミコーラ (Humicola) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、ムコール (Mucor) 属、ファイコマイセ

ス (Phycomyces) 属、スタフィロトリカム (Staphylotrichum) 属などの様々な糸状菌からセルラーゼが単離され、それらセルラーゼをコードする遺伝子が単離されている。特にセルラーゼファミリー 5、ファミリー 12、ファミリー 45 に属する糸状菌由来の酵素群は繊維加工処理において優れた効果を示すことから、当該分野において広く使用されている。しかしながら、これら一連の酵素群は、至適温度が中温、至適 pH が酸性から中性の酵素であり、低温酵素や強酸性酵素ではない。当該分野では、繊維に対して高活性であり、至適温度が低温である酵素や、至適 pH が強酸性である酵素が強く求められている。更に、このような特殊なプロファイルを有する酵素が実用化されるためには、優良な宿主であるトリコデルマ属などの糸状菌において遺伝子の大量発現を成し遂げ、安価で高活性なセルラーゼ調製物を提供する必要がある。このようなセルラーゼ調製物が実用化されれば、その産業的価値は計り知れないが、未だそのようなセルラーゼ調製物は実用化されておらず、また遺伝子組換えに関する製造法の報告もない。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、今般、ペニシリウム・ピノフィラム (Penicillium pinophilum) P F 1 3 6 5 株 (F E R M B P - 1 0 7 8 0 株) から、新規なエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質及びその遺伝子を見出した。本発明は、エンドグルカナーゼ P P C E (Endo glucanase

PPCE) 及びそれを含むセルラーゼ調製物、並びにそれらを利用したセルロース含有繊維の処理方法を提供するものである。本発明者は、ペニシリウム・ピノフィラム (Penicillium

20

pinophilum) P F 1 3 6 5 株 (F E R M B P - 1 0 7 8 0 株) から単離された新規なエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質が極めて高いセルロース含有繊維の外観改善効果及び、着色されたセルロース含有繊維の「ストーンウォッシュ」の外観付与効果を有することを見出した。特にエンドグルカナーゼ P P C E (以下「P P C E」と略記することもある) は、代表的な繊維加工用セルラーゼとして主に酸性条件下で広く使用されているエンドグルカナーゼ S C E 3 [特許文献 5] や E G I I I [非特許文献 1] に比べ、顕著に高い繊維処理効果を有していた。更に、そのエンドグルカナーゼ P P C E は、その至適 pH、至適温度が従来より知られている繊維加工用セルラーゼと比較して顕著に低く、pH 3、30℃付近であるという驚くべき知見を得た。またこれは、繊維加工用としての使用例はないが、ペニシリウム・ピノフィラム I M I 8 7 1 6 0 i i 株由来であるエンドグルカナーゼ I の至適温度 (50~55℃)、至適 pH (4.0~5.0) [非特許文献 3] と比較しても顕著に低いものであった。

30

【0010】

更に本発明者らは、ペニシリウム・ピノフィラム P F 1 3 6 5 株 (F E R M B P - 1 0 7 8 0 株) 由来エンドグルカナーゼ P P C E をコードする遺伝子を単離し、セルラーゼ c b h I 遺伝子の制御配列 [国際公開第 98/11239 号] を利用して、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride) において、工業化可能な程度に P P C E を高生産することに成功した。従って、本発明は、ペニシリウム・ピノフィラム (Penicillium pinophilum) P F 1 3 6 5 株 (F E R M B P - 1 0 7 8 0 株) 由来のエンドグルカナーゼ活性を有する新規なタンパク質及びその遺伝子、並びに前記タンパク質を含有し、良好な特性を有するセルラーゼ調製物を提供するものである。また、本発明は、前記タンパク質をコードする遺伝子によって形質転換された宿主細胞、及び前記宿主細胞を培養して目的タンパク質を採取する方法を提供するものである。更に、本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物によりセルロース含有繊維を処理する方法を提供するものである。

40

【0011】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 以下の (a)、(b)、及び (c) の特性を有するタンパク質。

(a) ペニシリウム・ピノフィラム (Penicillium pinophilum) 由来であり、

50

- (b) エンドグルカナーゼ活性を有し、
- (c) N末端のアミノ酸配列が、(1) 配列番号2で表わされる配列、または、(2) 配列番号2で表される配列において、1個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加した配列である。
- (2) 以下の(d)の特性を有する(1)に記載のタンパク質。
- (d) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により測定した平均分子量が25 kD～27 kDのタンパク質。
- (3) 以下の(e)～(i)から選択される、タンパク質。
- (e) 配列番号4で表わされる16位～236位のアミノ酸配列を含む、タンパク質。
- (f) 配列番号4で表わされる1位～236位のアミノ酸配列を含む、タンパク質。 10
- (g) 配列番号30で表されるアミノ酸配列を含む、タンパク質。
- (h) 配列番号4で表される16位～236位又は1位～236位のアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加、及び／又は修飾されたアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有する改変タンパク質。
- (i) 配列番号4で表される16位～236位若しくは1位～236位のアミノ酸配列、又は配列番号30で表されるアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質。
- (4) (1)～(3)のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (5) 以下の(j)、(k)から選択される、ポリヌクレオチド。 20
- (j) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列、又は配列番号3又は28で表される46位～834位の塩基配列を含むポリヌクレオチド。
- (k) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列又は配列番号3又は28で表される46位～834位の塩基配列において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された塩基配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (6) (4)又は(5)に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- (7) (6)に記載の発現ベクターにより形質転換された、宿主細胞。
- (8) 宿主が酵母又は糸状菌である、(7)に記載の宿主細胞。
- (9) 糸状菌が、トリコデルマ(Trichoderma)属、フミコーラ(Humicola)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、アクレモニウム(Acremonium)属又はペニシリウム(Penicillium)属に属する微生物である、(8)に記載の宿主細胞。 30
- (10) 糸状菌が、トリコデルマ(Trichoderma)属に属する微生物である、(9)に記載の宿主細胞。
- (11) 糸状菌が、トリコデルマ・ビリデ(Trichoderma viride)である、(10)に記載の宿主細胞。
- (12) (7)～(11)のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程、及び前記培養によって得られる宿主細胞又はその培養物から(1)～(3)のいずれか一項に記載のタンパク質を採取する工程を含む、タンパク質の製造方法。
- (13) (12)に記載の方法で生産されたタンパク質。 40
- (14) (1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質を含む、セルラーゼ調製物。
- (15) (1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、又は(14)に記載のセルラーゼ調製物を含む、洗剤組成物。
- (16) セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれかの一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。
- (17) セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的として減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触さ 50

せる工程を含む、方法。

(18) 着色されたセルロース含有繊維の色を局所的に変化させる方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

(19) 着色されたセルロース含有繊維の色を澄明化する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

(20) セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を遅延させる方法、又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減させる方法であって、セルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

(21) セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減させるか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、(14)に記載のセルラーゼ調製物、又は(15)に記載の洗剤組成物と接触させる工程を含む、方法。

(22) 洗剤組成物と接触させる工程が、その繊維の浸漬、洗濯、又はすすぎを通じて行われる(16)～(21)のいずれか一項に記載の方法。

(23) 古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、又は(14)に記載のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする、古紙の脱インキ方法。

(24) 紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、又は(14)に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

(25) 動物飼料の消化能を改善する方法であって、動物飼料を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、又は(14)に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

(26) セルロース系の物質を分解・糖化し、バイオマスエタノールを製造する方法であって、セルロース系物質を、(1)～(3)及び(13)のいずれか一項に記載のタンパク質、又は(14)に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む、方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明のタンパク質、エンドグルカナーゼPPCEは、セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善、色の局所的変化、色の澄明化、毛羽立ちの低減、ごわつきの低減等を目的とした繊維加工、並びに洗剤用途に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質

本明細書において「エンドグルカナーゼ」とは、エンドグルカナーゼ活性を有する酵素、すなわちエンド-1, 4-β-グルカナーゼ(EC 3. 2. 1. 4)を意味し、前記酵素は、β-1, 4-グルカンのβ-1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解する。

【0014】

また、本明細書の「エンドグルカナーゼ活性」とは、CMCアーゼ活性を意味する。更に、「CMCアーゼ活性」とは、カルボキシメチルセルロース(CMC、東京化成工業株式会社製)を加水分解する活性を意味し、被験タンパク質とCMC溶液を一定時間インキュベーションした後に遊離してくる還元糖量を測定して、1分間に1 μmolのグルコース相当の還元糖を生成する酵素量を1単位と定義する。

【0015】

エンドグルカナーゼ活性は、例えば、次のような手順により測定することができる。ま

10

20

30

40

50

ず、被験タンパク質を含む溶液0.5 mLを、2%のCMCを溶解させた50 mmol/L酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0) 0.5 mLに添加し、50℃で30分間インキュベーションする。次いで、得られる反応液の生成還元糖濃度を、3,5-ジニトロサリチル酸法(DNS法)で定量する。すなわち、反応30分後の反応液1.0 mL中にDNS試薬3.0 mLを添加し、沸騰水浴中で5分間インキュベーションした後、蒸留水8.0 mLで希釈し、540 nmの吸光度を測定する。段階的に希釈したグルコース溶液を用いて検量線を作成し、酵素反応液中の生成還元糖量をグルコース換算で決定する。1分間に1 μmolのグルコース相当の還元糖を生成する酵素量を1単位として活性を算出する。

【0016】

なお、DNS試薬は文献(例えば、「生物化学実験法1-還元糖の定量法」、p. 19~20、福井作蔵著、学会出版センター)の記載に従って調製することができるが、例えば、次のような手順で調製することができる。まず、4.5%水酸化ナトリウム水溶液300 mLに、1% 3,5-ジニトロサリチル酸溶液880 mL、及びロッセル塩255 gを添加する(溶液A)。別に、1.0%水酸化ナトリウム水溶液22 mLに結晶フェノール10 gを加え、更に水を加えて溶解して100 mLとする(溶液B)。溶液B 69 mLに炭酸水素ナトリウム6.9 gを加えて溶解させ、溶液Aを注いでロッセル塩が十分に溶解するまで攪拌混合し、2日間放置した後には濾過する。

【0017】

本発明によるタンパク質は、糸状菌類、具体的には、ペニシリウム(Penicillium)属に属する微生物、好ましくは、ペニシリウム・ピノフィラム(Penicillium pinophilum)、より好ましくはペニシリウム・ピノフィラム(Penicillium pinophilum) PF1365株(FERM BP-10780株)から取得することができる。また、これらはその変異株であってもよい。更に、本発明によるタンパク質は、典型的には、そのN末端のアミノ酸配列が配列番号2で表わされる配列を有する。N末端のアミノ酸配列は、例えば後述の実施例2で示した方法により決定することができる。本発明によれば、ペニシリウム・ピノフィラム(Penicillium pinophilum)由来の、下記の特性を有するタンパク質が提供される：

(A) エンドグルカナーゼ活性を有し、

(B) N末端のアミノ酸配列が、(1) 配列番号2で表わされる配列、または、(2) 配列番号2で表される配列において、1個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加した配列を有し、

(C) SDS-PAGEにより測定した平均分子量が25 kD~27 kDである。ここで、SDS-PAGEによる平均分子量は、実施例1に示した方法によって決定することができる。また、ペニシリウム・ピノフィラム由来の本発明によるタンパク質は、典型的には、配列番号4で表わされる16位~236位のアミノ酸配列からなり、そのN末端グルタミン(Gln)残基がピログルタミン酸残基(pyroGlu)に修飾されている(すなわち、配列番号30で表されるアミノ酸配列からなる)。

【0018】

本発明の別の態様では、配列番号4で表わされるアミノ酸配列(又はその部分配列)を含むタンパク質、並びにその改変タンパク質又はその相同タンパク質が提供される。「配列番号4で表わされるアミノ酸配列又はその部分配列を含むタンパク質」には、例えば、配列番号4で表わされる16位~236位のアミノ酸配列を有する成熟タンパク質；1位~236位のアミノ酸配列を含むシグナルペプチド(1位~15位)が付加されたアミノ酸配列を有する前駆体タンパク質；配列番号4で表される16位~236位のアミノ酸配列を有する成熟タンパク質のN末端及び/又はC末端に、適当な配列が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質；並びに配列番号4で表される16位~236位のアミノ酸配列を有する成熟タンパク質のN末端及び/又はC末端のアミノ酸が修飾されたタンパク質が含まれる。本発明における「アミノ酸配列の付加」には、配列番号4で表される16位~236位のアミノ酸配列を有する成熟タンパク質のN末端に配列番号4で表される1位

～15位のシグナルペプチドの一部または全部のアミノ酸が付加されることを含む。また、本発明における「アミノ酸配列の修飾」には、配列番号4で表される16位～236位のアミノ酸配列を有する成熟タンパク質のN末端が宿主由来の酵素により、修飾されることを含む。本修飾には、該成熟タンパク質のN末端グルタミン（Gln）残基がピログルタミン酸残基（pyroGlu）に修飾されることを含む。

【0019】

シグナルペプチドは、例えば、配列番号4で表される1位～15位のアミノ酸配列、即ち配列番号3で表わされる塩基配列において、1～3位のATGで始まり、43～45位で終了するヌクレオチド配列からコードされる15アミノ酸残基からなるアミノ酸配列である。本発明における「改変タンパク質」とは、配列番号4で表わされるアミノ酸配列（又はその部分配列）において、1個又は複数個（好ましくは、1又は数個）のアミノ酸が欠失、置換、付加、及び／又は修飾されたアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質である。

10

【0020】

ここで、「欠失、置換、又は付加」などの改変に係るアミノ酸の数は、1個又は複数個（好ましくは、1又は数個）、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個である。更に、改変タンパク質には、配列番号4で表わされるアミノ酸配列において、1個又は複数個のアミノ酸残基が、保存的置換されたアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質を包含する。

【0021】

ここで、「保存的置換」とは、タンパク質の活性を実質的に改変しないように1個又は複数個のアミノ酸残基を、別の化学的に類似したアミノ酸で置き換えることを意味する。例えば、ある疎水性残基を別の疎水性残基によって置換する場合、ある極性残基を同じ電荷を有する別の極性残基によって置換する場合などが挙げられる。このような保存的置換を行うことができる機能的に類似のアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において公知である。具体的には、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。

20

30

【0022】

また、負電荷（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。本発明のタンパク質は、例えば実施例1に記載のように微生物から単離、精製することにより得ることができる。また、後述のように遺伝子組換え技術により本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主において発現させ、生産されたタンパク質を単離、精製することによっても得ることができる。

【0023】

本発明の相同タンパク質としては、配列番号4で表される16位～236位若しくは1位～236位のアミノ酸配列、又は配列番号30で表されるアミノ酸配列と90%以上（好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有する相同タンパク質を挙げることができる。本明細書において「相同性」とは、市販の遺伝子情報処理ソフトウェアGENETYX（ゼネティックス社製）により、ホモロジーサーチ機能のデフォルト条件にて算出した相同性を意味する。

40

デフォルト条件：

Unit Size to Compare = 2

Pick up Location = 1

【0024】

エンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

本発明によれば、配列番号4で表わされるアミノ酸配列又はその部分配列を含むタンパ

50

ク質、または、改変タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、よって、本発明のタンパク質をコードする種々の塩基配列を選択することができる。なお、本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれ、DNAが好ましい。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドは、典型的には、下記からなる群より選択されるものである：

(a) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列（又はその部分配列）を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号3又は28で表わされる塩基配列（又はその部分配列）において、1個又は複数個の塩基が欠失、置換、及び／又は付加された塩基配列を含み、かつエンドグルカナーゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

配列番号3で表される塩基配列又はその部分配列を含むポリヌクレオチドには、例えば配列番号3で表される1位～834位の塩基酸配列を有するポリヌクレオチド、または46位～834位の塩基酸配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

【0026】

本発明によるポリヌクレオチドは、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。本発明によるポリヌクレオチドの典型的な取得方法としては、ペニシリウム・ピノフィラムのゲノムDNAを鋳型にして、PCR反応により取得することができる。また、遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、ゲノムDNAライブラリーを作製し、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法などが挙げられる。本発明による、エンドグルカナーゼPPCEのアミノ酸配列をコードする、典型的塩基配列は、配列番号3で表わされる塩基配列を有するものである。配列番号3で表わされる塩基配列は、1～3位のATGで始まり、832～834位のTAGで終了するオープンリーディングフレームと411～469位、691～754位の2ヶ所のイントロンを含有する。また、46～48のヌクレオチド配列は、221アミノ酸残基からなるエンドグルカナーゼPPCEの成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

【0027】

発現ベクター及び形質転換された微生物

本発明においては、配列番号4で表わされるアミノ酸配列又はその部分配列を含むタンパク質、または、その改変タンパク質をコードするポリヌクレオチド（以下「本発明によるポリヌクレオチド」という）を、宿主微生物内で複製可能で、かつ、その塩基配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含む発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるポリヌクレオチドの他に、その発現を制御する塩基配列等を含んでいるのが望ましい。発現を制御する塩基配列としては、プロモーター、ターミネーター及びシグナルペプチドをコードする塩基配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御する塩基配列として得ることができる。

【0028】

また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するもので

あれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導される塩基配列より得ることができる。

【0029】

更に、本発明による発現ベクターは、これを宿主微生物に導入して形質転換体を選択するため、遺伝子マーカーを含んでいても良い。本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

【0030】

これら遺伝子マーカーは、発現ベクターと別のベクターに組み込み、形質転換時に混合して同時に導入する (co-transformともいう) こともできる。更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、及び、それらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その宿主細胞又は培養物から前記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。

【0031】

また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。また、本発明における新規タンパク質の好適な製造方法として、不完全菌類に属する糸状菌における発現方法が提供される。本発明における好適な宿主糸状菌として、トリコデルマ (Trichoderma) 属、フミコーラ (Humicola) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、又はペニシリウム (Penicillium) 属に属するものが挙げられるが、より好ましくは、トリコデルマ (Trichoderma) 属フミコーラ (Humicola) 属が挙げられる。より具体的には、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride)、トリコデルマ・リーセイ (Trichoderma reesei)、トリコデルマ・ロンジブラシアトゥム (Trichoderma longibrachiatum)、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens)、フミコーラ・サーモイデア (Humicola thermoidea)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、アスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae)、アクレモニウム・セルロリディカス (Acremonium cellulolyticus) 又はペニシリウム・ピノフィラム (Penicillium pinophilum) が挙げられるが、更により好ましくは、トリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride)、又はフミコーラ・インソレンス (Humicola insolens) が挙げられる。

【0032】

セルラーゼの用途／セルラーゼ調製物

本発明は、本発明のタンパク質 (例えば、配列番号4で表わされるアミノ酸配列又はその部分配列を含むタンパク質、又はその改変タンパク質、あるいは、本発明の宿主細胞を培養することにより得られるタンパク質) を含むセルラーゼ調製物にも関する。

【0033】

一般に、セルラーゼ調製物とは、セルラーゼ酵素の他に、例えば、賦形剤 (例えば、乳糖、塩化ナトリウム、ソルビトール等)、防腐剤、及び／又は、非イオン系界面活性剤等を含むことができる。また、セルラーゼ調製物の形態は、固形状であっても液体状であってもよく、具体的には、粉剤、粒剤、顆粒剤、非粉塵化顆粒、又は液体製剤が挙げられる。本発明のセルラーゼ調製物には、本発明のタンパク質に加えて、他のセルラーゼ酵素、例えば、セロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシダーゼ、及び／又は本発明のエンドグルカナーゼ以外のエンドグルカナーゼを含めてもよい。セルラーゼ調製物の1種である非粉塵化顆粒 (好ましくは、飛散性のない顆粒状) は、通常の乾式造粒法を用いて製造す

ることが可能である。すなわち、粉末状態の本発明のタンパク質を、無機塩（例えば、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム）、鉱物（例えば、ベントナイト、モンモリナイト）、及び有機物（例えば、澱粉又は粒状セルロース等）等から選ばれる１種又は複数種に混合した後、非イオン界面活性剤の１種又は複数種の粉末、あるいは微細に懸濁された懸濁液を加え、充分に混合又は混練する。状況に応じ、固形物を結着させる合成高分子（例えば、ポリエチレングリコール等）又は天然高分子（例えば、スターチ等）を適宜添加し、更に混練した後、ディスクベレッターなどの押し出し成形造粒を行い、成形物をマルメライザーにより球状に成形後、乾燥させることで非粉塵化顆粒を製造することが可能である。非イオン界面活性剤の１種又は複数の添加量は特に限定されないが、本発明のセルラーゼ調製物の全体に対して、好ましくは０．１～５０重量％、より好ましくは０．１～３０重量％、更に好ましくは１～１０重量％とする。また、顆粒表面をポリマー等でコーティングすることにより、酸素透過や水分透過をコントロールすることも可能である。一方、セルラーゼ調製物の１種である液状製剤（好ましくは、安定化された液体状）は、本発明のタンパク質を含む溶液に、エンドグルカナーゼの安定化剤（例えば、合成高分子、天然高分子等）を配合し、必要に応じて無機塩類及び／又は合成防腐剤を添加して調製することが可能である。

10

【００３４】

このとき、非イオン界面活性剤の１種又は複数種を配合することも可能である。非イオン界面活性剤の１種又は複数種の添加量は特に限定されないが、本発明のセルラーゼ調製物の全体に対して、好ましくは０．１～５０重量％、より好ましくは０．１～３０重量％、更に好ましくは１～１０重量％とする。更に、本発明は、本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物を含む洗剤組成物を提供する。本発明の洗剤組成物は、界面活性剤（アニオン性、ノニオン性、カチオン性、両性又は双性イオン性あるいはそれらの混合物であり得る）をも含有し得る。また、本発明の洗剤組成物は、当分野で既知の他の洗剤成分、例えば、ビルダー、漂白剤、漂白活性剤、腐食防止剤、金属イオン封鎖剤、汚れ解離ポリマー、香料、他の酵素（例えばプロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼなど）、酵素安定剤、製剤化補助剤、蛍光増白剤、及び／又は発泡促進剤等をも含有し得る。代表的なアニオン性界面活性剤は、直鎖状アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）、アルキル硫酸塩（AS）、アルファーオレフィンスルホン酸塩（AOS）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩（AES）、 α -スルホ脂肪酸エステル塩（ α -SFM_e）、及び天然脂肪酸のアルカリ金属塩等がある。ノニオン性界面活性剤の例としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（AE）、アルキルポリエチレングリコールエーテル、ノニルフェノールポリエチレングリコールエーテル、脂肪酸メチルエステルエトキシレート、スクロース、及びグルコースの脂肪酸エステル、並びにアルキルグルコシド、ポリエトキシ化アルキルグルコシドのエステル等がある。

20

30

【００３５】

本発明のセルロース含有繊維の処理方法は、本発明のタンパク質、本発明のセルラーゼ調製物、又は本発明の洗剤組成物を、セルロース含有繊維と接触させることにより行う。本発明の繊維処理方法により改善されうる、セルロース含有繊維の性質としては、以下のものが含まれる。

40

（１）減量による繊維の肌触り及び外観の改善

（２）着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化の付与、すなわち、着色セルロース含有繊維、代表的にはジーンズへのストーンウォッシュ様の外観及び風合いの付与

（３）着色セルロース含有繊維の色の澄明化

（４）柔軟化（ごわつき始める速度の低減、ごわつきの低減）

（５）毛羽の除去（毛羽立ち始める速度の低減、毛羽立ちの低減）

【００３６】

本発明の繊維処理方法は、具体的には、繊維が浸漬されているか又は浸漬されうる水に、本発明のタンパク質、本発明のセルラーゼ調製物、又は本発明の洗剤組成物を添加することにより行うことができ、例えば、繊維の浸漬工程、洗濯工程、又はすすぎ工程で行う

50

ことができる。接触温度、又は本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、若しくは洗剤組成物の添加量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えば、セルロース含有繊維の肌触り及び外観の改善を目的とした減量加工の場合、 $10\sim60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.1\sim50\text{mg/L}$ のタンパク質濃度の本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、又は洗剤組成物を使用することが好ましい。更に、着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供するために用いる場合、 $20\sim60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.1\sim100\text{mg/L}$ のタンパク質濃度の本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、又は洗剤組成物を使用することが好ましい。また、着色されたセルロース含有繊維の色を澄清化することを目的とした場合、 $10\sim60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01\sim20\text{mg/L}$ のタンパク質濃度の本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、又は洗剤組成物を使用することが好ましい。また、セルロース含有繊維がごわつき始める速度を低減するか又はセルロース含有繊維のごわつきを低減させる場合、 $10\sim60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01\sim20\text{mg/L}$ のタンパク質濃度の本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、又は洗剤組成物を使用することが好ましい。また、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するか又はセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する場合、 $10\sim60^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、 $0.01\sim20\text{mg/L}$ のタンパク質濃度の本発明のタンパク質、セルラーゼ調製物、又は洗剤組成物を使用することが好ましい。

10

【0037】

更に、本発明は、古紙を脱インキ薬品により処理して脱インキを行う工程において、本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物を用いることを特徴とする古紙の脱インキ方法に関する。本発明のタンパク質又はセルラーゼ調製物は、古紙に作用させると脱インキの効率を向上させるため、古紙から再生紙を製造する過程において有用である。上記脱インキ方法によれば、残インキ繊維が大幅に減少するため、古紙の白色度を向上させることができる。上記脱インキ薬品は、一般に古紙の脱インキに用いられる薬品であればよく、特に限定されないが、例えば、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム等のアルカリ、珪酸ソーダ、過酸化水素、燐酸塩、アニオン系の界面活性剤、ノニオン系の界面活性剤、又はオレイン酸等の補集材などが挙げられ、助剤として、pH安定剤、キレート剤、又は分散剤等が挙げられる。上記脱インキ方法を適用し得る古紙は、一般に古紙と呼ばれるものであればよく、特に限定されないが、例えば、機械パルプ及び化学パルプを配合した新聞古紙、雑誌古紙、下級～中級印刷古紙、化学パルプよりなる上質古紙、これらの塗工紙等の印刷古紙が挙げられる。更に、一般に古紙と呼ばれるもの以外であっても、インクの付着している紙であれば、上記脱インキ方法を適用することができる。

20

30

【0038】

更に、本発明は、紙パルプのろ水性の改善方法に関し、前記方法は、紙パルプを、本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む。前記方法によれば、紙パルプのろ水性が、強度の著しい低下を伴うことなく、有意に改善されるものと考えられる。前記方法を適用し得るパルプは特に限定されないが、例えば、古紙パルプ、再循環板紙パルプ、クラフトパルプ、亜硫酸パルプ、加工熱処理その他の高収率パルプ等が挙げられる。

【0039】

40

更に、本発明は、動物飼料の消化能を改善する方法に関し、動物飼料を、本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物で処理する工程を含む。前記方法によれば、動物飼料中のグルカンが適度に低分子化されるため、動物飼料の消化能を改善することができる。更に、本発明によるタンパク質を動物飼料中で用いることにより、飼料中のグルカンの消化能を改善することができる。従って、本発明によれば、動物飼料の消化能を改善する方法であって、本発明のタンパク質又はセルラーゼ調製物で動物飼料を処理する工程を含む方法が提供される。

【0040】

更に、本発明はバイオマスエタノールの製造方法に関し、セルロース系の物質（セルロース繊維を含む）を本発明のタンパク質又は本発明のセルラーゼ調製物で処理する工程を

50

含む。前記方法によれば、本発明によるタンパク質をセルロース系の物質に作用させ、これを分解・糖化し、グルコースを製造することができる。得られたグルコースは他の微生物（例えば酵母など）を用いた発酵技術によりバイオマスエタノールに変換することが可能である。

【0041】

微生物の寄託

本発明によるエンドグルカナーゼPPCEの由来であるペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株は、2007年（平成19年）2月7日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に国際寄託され、国際受託番号はFERM BP-10780である。

10

【0042】

プラスミドPCR2.1-TOPOにPPCE遺伝子を挿入したプラスミドp28FUL18で形質転換された本発明の大腸菌（*Escherichia coli*）JM109/p28FUL18株は、2007年（平成19年）2月7日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に国際寄託され、国際受託番号は、FERM BP-10781である。本発明の発現ベクターの宿主となりうるトリコデルマ・ビリデ（*Trichoderma viride*）MC300-1株は、1996年（平成8年）9月9日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（あて名：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に国内寄託（原寄託）されたものであり、1997年（平成9年）8月11日から国際寄託に移管されている。国際受託番号（国際受託番号に続く
[
]内は国内受託番号）は、FERM BP-6047 [FERM P-15842]である。

20

【実施例】

【0043】

以下、実施例をもって本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0044】

《実施例1：ペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株からの着色綿毛羽除去活性を有する成分の単離精製》

30

ペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株を、TS培地（2.0%可溶性でんぷん、1.0%グルコース、0.5%ポリペプトン、0.6%小麦胚芽、0.3%酵母エキス、0.2%大豆粕、0.2%炭酸カルシウム、pH7.0）中、25℃で振とう培養した。24時間培養の後、（N）培地（5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.03%硫酸マグネシウム、pH6.8）に植菌し、更に25℃5日間培養した。菌体を除去した培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。この粗精製セルラーゼ調製液を最終濃度1.2mol/Lの硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した後、1.2mol/L硫酸アンモニウムを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH5）で平衡化させたHiTrapTM Phenyl HPカラム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）にアプライし、50mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液（pH5）中、硫酸アンモニウム濃度が1.2mol/L、0.96mol/L、0.72mol/L、0.48mol/L、0.24mol/L、0mol/Lのステップワイズ溶離法により溶出して、分画した。このうち硫酸アンモニウム濃度が0.24mol/Lのときに溶出した画分に着色綿布に対する毛羽除去活性が認められた。着色綿布に対する毛羽除去活性は、以下のように行った。予め染色された青色綿ニットの生地を大型ワッシャー中で毛羽立たせた。その後、この毛羽立たせた青色綿ニット生地を下記の条件で毛羽除去処理を行い、処理後の布の毛羽の取れ具合を目視にて判定し、毛羽除去活性の有無を調べた。

40

50

【0045】

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12（大栄科学精器製作所社製）

温度：40℃

時間：120分

反応 pH：pH2（5mmol/Lクエン酸緩衝液）

処理液には、分画液とともにステンレスビーズを適量加えた。

【0046】

次に、硫酸アンモニウム 0.24mol/L 溶出画分を PD-10 脱塩カラム（GEヘルスケバイオサイエンス社製）を用い、添付のマニュアルの条件に従って脱塩した後、50mmol/L 酢酸緩衝液（pH4.0）となるよう調整し、50mmol/L 酢酸緩衝液（pH4.0）で平衡化させた Resource Mono S カラム（GEヘルスケバイオサイエンス社製）にアプライした。そして、50mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.0）から 50mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）中 1mol/L 塩化ナトリウムに対して、NaCl 0.1mol ずつのステップワイズ溶離法で溶出し、分画した。その結果、カラムに吸着せず通過した画分に着色綿布に対する毛羽除去活性が認められた。更に、通過画分を、50mmol/L 酢酸緩衝液（pH4.0）で平衡化させた Resource Mono Q カラム（GEヘルスケバイオサイエンス社製）にアプライした。そして、50mmol/L 酢酸緩衝液（pH4.0）から 50mmol/L 酢酸緩衝液（pH5.0）中 1mol/L 塩化ナトリウムに対して、NaCl 0.1mol ずつのステップワイズ溶離法で溶出し、分画した。その結果、カラムに吸着せず通過した画分に着色綿布に対する毛羽除去活性が認められた。得られた通過画分を 10K カット限外濾過膜（ミリポア社製）にて濃縮し、PPCE 画分とした。PPCE 画は CMC アーゼ活性を有していた。次に、粗精製セルラーゼ調製液及び各カラム精製工程における活性画分の SDS-PAGE を実施した。SDS-PAGE は、セイフティーセルミニ STC-808 電気泳動槽（テフコ社製）及びプリキャストミニゲル 12%-SDS-PAGE mini、1.0mm ゲル厚（テフコ社製）を使用し、泳動方法は製品取扱い説明書に従った。分子量マーカーは LMW Calibration For SDS Electrophoresis（GEヘルスケバイオサイエンス社製）を使用した。泳動後、クマシーブリリアントブルー R250（ナカライテスク社製）で染色し、脱色した。その結果、平均分子量（MW）約 26kD のタンパク質が精製に伴い、濃縮されていることが明らかとなった。特に、粗精製セルラーゼ調製液と PPCE 画分を比較すると、約 26kD のタンパク質比率は著しく増加していた。以上のことから、着色綿毛羽除去活性を有する成分は、平均分子量（MW）約 26kD のタンパク質であると推定し、以降の実験を行った。

【0047】

《実施例 2：ペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365 株由来 PPCE の N 末端アミノ酸配列の同定》

実施例 1 において得られた PPCE 画分を SDS-PAGE に供した後、マルチフォー II（GEヘルスケバイオサイエンス社製）を用いて PVDF 膜（ミリポア社製）へ電氣的にブロットした。これをブリリアントブルー G（東京化成工業社製）で染色した後、脱色した。この膜から分子量約 26kD のタンパク質（PPCE）がブロットされた部分を切り出し、プロテインシークエンサー Model 492（アプライドバイオシステムズ社製）に供し、N 末端アミノ酸配列の解析を試みたがエドマン分解によるシグナルは得られなかった。よって N 末端アミノ酸が修飾保護されていることが判明した。

【0048】

そこで、先の切り出したメンブレンを 0.5% ポリビニルピロリドン-40（シグマ社製）/100mmol/L 酢酸溶液に 37℃、30 分間浸漬し、膜上のタンパク質未結合部分をブロックした後、Pfu ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ（Pyroglutamate Aminopeptidase）（タカラバイオ社製）で 50℃、5 時間処理することにより修飾 N 末端残基を除去し、再度シークエンシングを行った。得られた配列は以下の通りであった（Xaa は不明アミノ酸残基を示す）。

シーケンス結果：Gln-Ser-Leu-Xaa-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Tyr-Thr-Ser（12残基）（配列番号1）

【0049】

保護されたN末端アミノ酸をPfuピログルタミン酸アミノペプチダーゼで脱保護したところ、シグナルが得られたことから、PPCEのN末端アミノ酸は、ピログルタミン酸（pyroGlu）であると考えられる。また、本プロテインシーケンサーでは、システイン（Cys）のシグナルは得られないことから、Xaaはシステインであると推定できる。よってPPCEのN末端アミノ酸配列は以下の配列と考えられる。

10

PPCEのN末端アミノ酸配列：Gln-Gln-Ser-Leu-Cys-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Tyr-Thr-Ser（13残基；但し、N末端グルタミンはピログルタミン酸に修飾されている）（配列番号2）

【0050】

このN末端アミノ酸配列を用いて相同性検索（GENETYX；ゼネティックス社製）を行ったところ、ペニシリウム・ベルクロッサム（*Penicillium verruculosum*）由来のエンドグルカナーゼIII〔ロシア公開第2238974号〕のアミノ酸配列と相同性を有していた。よってPPCEはファミリー12に属するエンドグルカナーゼであることが示唆された。

【0051】

20

《実施例3：エンドグルカナーゼPPCE遺伝子のPCR増幅》

PPCEのN末端アミノ酸配列が、ファミリー12に属するペニシリウム・ベルクロッサム由来のエンドグルカナーゼIIIと相同性を有していたことから、ロシア公開第2238974号に記載のEGIIIの塩基配列に基づき、PCRによるペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株由来エンドグルカナーゼPPCE遺伝子の増幅を試みた。

【0052】

（1）ペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株由来のクロモソームDNAの単離

ペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株をTS培地で28℃、24時間培養し、遠心分離によって菌体を回収した。得られた菌体よりISOP LANT（ニッポンジーン社製）を用いてクロモソームDNAの抽出を行った。条件はキットに添付のマニュアルに記載の条件に従った。

30

【0053】

（2）PCRによるペニシリウム・ピノフィラム（*Penicillium pinophilum*）PF1365株由来ファミリー12エンドグルカナーゼ遺伝子断片の増幅

ペニシリウム・ベルクロッサム（*Penicillium verruculosum*）由来のエンドグルカナーゼIIIのN末端、C末端のアミノ酸配列に対応するDNA配列に基づき、以下の配列の合成プライマーを作製した。

40

MSW-N：CAACAGAGTCTATGCGCTCAATACTCGAGCTACACCAGT（配列番号5）

MSW-C：CTAATTGACAGCTGCAGACCAA（配列番号6）

【0054】

上記のプライマー（MSW-N、MSW-C）を用い、実施例3（1）で取得したクロモソームDNAを鋳型にし、LA PCRTM Kit Ver2.1（タカラバイオ社製）によりPCR反応を行った。条件は、94℃1分の後、（94℃、30秒間）・（60℃、30秒間）・（72℃、1分間）の反応を20サイクル行い、最後に72℃10分間処理し、反応を終了した。得られた反応液はアガロースゲル電気泳動に供した。その結果、約0.8kbpの遺伝子断片の増幅が認められたため、クローン化して塩基配列の決定を行うこととした。アガロースゲル電気泳動で分離した約0.8kbpの遺伝子断片

50

を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System（プロメガ社製）を用いて、DNAの精製を行った。条件についてはキットに添付の条件に従った。得られた約0.8 kbpの精製DNAをTOPO TA Cloning Kit（インビトロジェン社製）を用い、TOPOベクター（PCR2.1-TOPO）にクローン化した。得られたプラスミドを定法により増幅・抽出し、DNA配列の決定を行った。プラスミドの抽出はQIAfilter Plasmid Kit（キアゲン社製）を用い、条件についてはキットに添付の条件に従った。また、DNA塩基配列の決定は、dRhodamine Terminator Kit（アプライドバイオシステムズ社製）およびプライマーとしてM13ユニバーサルプライマーまたは下記の配列を有するRevプライマーを用いて反応を行った。

10

Rev : CAGGAAACAGCTATGAC （配列番号7）

【0055】

条件についてはキットに添付の条件に従った。得られた反応液をキットに添付のマニュアルに記載の条件に従って精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて解析を行った。その結果、PCRによって増幅された遺伝子断片は、ペニシリウム・ベルクロッサム（Penicillium verruculosum）由来のエンドグルカナーゼIIIと相同性を示す遺伝子であることが明らかとなった。

【0056】

20

《実施例4：ゲノムウォーキングによるペニシリウム・ピノフィラム（Penicillium pinophilum）PF1365株由来ファミリー12エンドグルカナーゼ遺伝子断片の取得》

ゲノムウォーカーキット（ベクトン・デッキンソン社製）を用い、PCRにより増幅されたペニシリウム・ピノフィラムPF1365株由来ファミリー12エンドグルカナーゼ遺伝子断片の上・下流域の増幅を試みた。条件についてはキットに添付の条件に従った。ペニシリウム・ピノフィラム（Penicillium pinophilum）PF1365株より抽出したクロモソームDNAを制限酵素PvuII、StuIを用いて完全分解し、分解したクロモソームDNAとキットに添付のアダプターを連結し、ライブラリーを作製した。また、実施例3で得られた配列をもとに、次に、下記の配列を有する合成プライマーを作製し、PCR反応に用いた。

30

24-GSP-R1 : CGCCAGAGCTGGAAATGGAGTTGACATAAG（配列番号8）

24-GSP-R2 : GTGCACTGGGAGCCAGAGCCACTGCTCTCA（配列番号9）

24-GSP-F1 : TTTCGTATGATCTCTTCACGGCAGCGGATA（配列番号10）

24-GSP-F2 : ATCAACCATGTTACCTACAGTGGTGACTAT（配列番号11）

【0057】

PvuIIまたはStuIライブラリーを鋳型にし、プライマーとして24-GSP-R1またはF1と、キットに添付のAP-1を用い、ExTaq Premix（タカラバイオ社製）を用いてPCR反応を行った。条件は、94℃2分の後、94℃2秒・72℃3分の反応を7サイクル行い、94℃2秒・67℃3分の反応を32サイクル行い、最後に67℃4分処理し、反応を終了した。1回目のPCR反応液を脱イオン水で希釈したものを鋳型として、2回目のPCR反応を行った。プライマーとして24-GSP-R2またはF2と、キットに添付のAP-2を用い、ExTaq Premix（タカラバイオ社製）を用いてPCR反応を行った。条件は、94℃2分の後、94℃2秒・72℃3分の反応を5サイクル行い、94℃2秒・67℃3分の反応を20サイクル行い、最後に67℃4分処理し、反応を終了した。得られた反応液はアガロースゲル電気泳動に供した。結果、PvuIIライブラリーを鋳型にし、24-GSP-R1とAP-1で1回目のPCR反応を、24-GSP-R2とAP-2で2回目のPCR反応を実施したサンプルにおいて、約2Kbpの遺伝子断片の増幅が認められた。また、StuIライブラリーを鋳型にし、24-GSP-F1とAP-1で1回目のPCR反応を、24-GSP-F2とAP-

40

50

2で2回目のPCR反応を実施したサンプルにおいても、約2Kbpの遺伝子断片の増幅が認められた。次に、これらの約2Kbpの遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT（キアゲン社製）を用いて、DNAの精製を行った。条件についてはキットに添付の条件に従った。得られたそれぞれ約2Kbpの精製DNAをTOPO PCR CLONING KIT（インビトロジェン社製）を用い、TOPOベクター（PCR2.1-TOPO）にクローン化した。

【0058】

得られたプラスミドを定法により増幅・精製し、DNA配列の決定を行った。プラスミドの抽出はQIAPREP MINIPREP KIT（キアゲン社製）を用い、条件についてはキットに添付の条件に従った。また、DNA塩基配列の決定は、dRhodamine Terminator Kit（アプライドバイオシステムズ社製）およびプライマーとしてM13ユニバーサルプライマーまたはRevプライマーを用いて反応を行った。条件についてはキットに添付の条件に従った。得られた反応液をキットに添付のマニュアルに記載の条件に従って精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析を行った。

【0059】

その結果、PvuIIライブラリー由来の約2KbpのPCR産物は、実施例3（2）で得られた遺伝子の上流域を、StuIライブラリー由来の約2KbpのPCR産物は、実施例3（2）で得られた遺伝子の下流域を、それぞれ含んでいた。よって、これらのPCR産物の塩基配列を連結することにより、ペニシリウム・ピノフィラム（Penicillium pinophilum）PF1365株由来のPPCE遺伝子の全長が明らかとなった。得られたPPCE遺伝子の塩基配列（配列番号3）は、ペニシリウム・ベルクロッサム（Penicillium verruculosum）由来のエンドグルカナーゼIII遺伝子の翻訳領域と相同な領域を含んでいた。そしてその遺伝子の相同性を、市販の遺伝子情報処理ソフトウェアGENETYX（ゼネティックス社製）を用いて算出したところ、82%であった。更にDNA断片の配列より推定されるアミノ酸配列（配列番号4）をもとに、GENETYX（ゼネティックス社製）を用いて相同性を算出したところ、ペニシリウム・ベルクロッサム（Penicillium verruculosum）由来のエンドグルカナーゼIIIと86%の相同性であった。また、DNA断片の配列より推定されるアミノ酸配列（配列番号4）をもとに、公知のデータベース（NCBI）でblastp検索を行ったところ、アスペルギルス・アキュレータス（Aspergillus aculeatus）由来のFI-CMCaseと72%、トリコデルマ・リーセイ（Trichoderma reesei）由来のEGIIIと53%の相同性を有していた。これらは全てファミリー12に属するエンドグルカナーゼであることから、得られたDNA断片はペニシリウム・ピノフィラムPF1365株由来由来のファミリー12エンドグルカナーゼ遺伝子の翻訳領域及びその上・下流を含む遺伝子断片であるものと考えられた。

【0060】

《実施例5：PPCE遺伝子のトリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）での発現》

（1）PPCE発現用遺伝子断片の取得

PPCE遺伝子は、開始コドンの上流の配列にStuI、終止コドンの下流にPstIを予め含む形で以下のような変異導入用プライマーを設計し、PCR法にて増幅した。

32228-NSTU：CCAGGCCTGCGCATCATGAAGCTAACTTTTCTCCTG（配列番号12）

32228-CPST：CCCTGCAGCTAATTGACAGAAGCAGACC（配列番号13）

【0061】

PCRの反応は、実施例3（1）で取得したペニシリウム・ピノフィラム（Penicillium pinophilum）PF1365株のクロモソームDNAを鋳型に、32228-NSTUと32228-CPSTの合成DNAをプライマーにして、ExTaqPremix（タカラバイオ社製）を用いて実施した。条件は、94℃2分の後、94℃1分・50℃2分・

72℃1.5分の反応を25サイクル行い、最後に72℃3分処理し、反応を終了した。アガロースゲル電気泳動により反応後のサンプルを分離し、約800bpの遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT（キアゲン社製）を用いて、DNAの精製を行った。条件についてはキットに添付の条件に従った。得られた精製DNAをTOPO PCR CLONING KIT（インビトロジェン社製）を用い、TOPOベクター（PCR2.1-TOPO）にクローン化した。得られたプラスミドをp28FULL18とした。プラスミドp28FULL18を定法により増幅・精製し、上述の方法に従い、DNA配列を解析した。その結果、プラスミドp28FULL18は開始コドンの上流の配列にStuI、終止コドンの下流にPstIを有するPPCE遺伝子を含むことを確認できた。プラスミドp28FULL18に含まれるPPCE遺伝子の塩基配列が実施例4で決定したPPCE翻訳領域の配列と一致したことから、本遺伝子断片を以降の発現検討に用いた。

10

【0062】

（2）PPCE発現プラスミドの構築

プラスミドp28FULL18を制限酵素StuIおよびPstIで切断し、アガロースゲル電気泳動により反応後のサンプルを分離し、約800bpの遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT（キアゲン社製）を用いて、DNAの精製を行った。次に、プラスミドpCBI-M2〔国際公開第2005/056787号の実施例B1〕を制限酵素StuIおよびPstIで切断し、アガロースゲル電気泳動により反応後のサンプルを分離し、約5.6kbpの遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT（キアゲン社製）を用いて、DNAの精製を行った。これに先に得られた約800bpの遺伝子断片をTaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 1（タカラバイオ社製）を用いて連結し、プラスミドpPPCE-F2を作製した。

20

【0063】

（3）プラスミドpPPCE-F2によるトリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）の形質転換体の作製

実施例5（2）で得られたプラスミドpPPCE-F2によるトリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）の形質転換は、国際公開第2005/056787号に記載の方法に従い、実施した。即ち、ウラシル生合成遺伝子（pyr4）欠損株であるトリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）strain2株を宿主とし、選択マーカーとしてニューロスボラ・クラッサ（Neurospora crassa）のpyr4遺伝子を用いたコートランスフォーメーション（co-transformation）法により形質転換を実施した。まず、国際公開第2005/056787号に記載の方法に従い、トリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）strain2のプロトプラストを調製し、得られたプロトプラスト懸濁液100μLと7μgのプラスミドpPPCE-F2及び3μgのプラスミドpPYR4（ニューロスボラ・クラッサ（Neurospora crassa）由来のpyr4遺伝子をLITMUS28にサブクローンしたプラスミド）を混合した。混合液を氷冷下で5分間静置し、400μLのPEG溶液（60%ポリエチレングリコール4000、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸緩衝液、pH7.5）を加え、更に氷冷下で20分間静置した。以上の処理をしたプロトプラスト懸濁液をSUTC緩衝液（0.5mol/Lシュークロース、10mmol/L塩化カルシウム、10mmol/Lトリス塩酸緩衝液、pH7.5）で洗浄した後、0.5mol/Lシュークロースを含む最少培地に軟寒天とともに重層し、28℃で5日間培養した。培養後、生育したコロニーを再度、最少培地に移植し、ここで生育したコロニーを形質転換体とした。

30

40

【0064】

（4）プラスミドpPPCE-F2によるトリコデルマ・ビリデ（Trichoderma viride）形質転換体の培養

50

実施例 5 (3) で得られた形質転換体 50 株を P S W 培地 (1. 0 % グルコース、4. 0 % ラクトース、2. 0 % 大豆粕、1. 0 % 小麦胚芽、0. 2 % リン酸二水素カリウム、0. 2 % 硫酸アンモニウム、0. 2 % リン酸アンモニウム、0. 2 % 炭酸カルシウム) に植菌し、28℃にて5日間培養した。培養後、遠心分離により菌体を除去し、得られた培養上清を粗酵素液とした。粗酵素液を S D S - P A G E に供したところ、形質転換体において特異的に約 26 k D のタンパク質が発現していた。特に発現量の多かった 322 F - 205 株の培養上清を用いて、以降の洗浄試験を実施した。

【0065】

《実施例 6：P P C E 遺伝子発現株の毛羽除去活性評価》

(1) 発現タンパク質濃度の測定

P P C E 遺伝子発現株の毛羽除去活性を評価するため、対照としてトリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 由来の E G I I I [非特許文献 1] 及び、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) 由来のエンドグルカナーゼ S C E 3 [特許文献 5] 及びアスペルギルス・アキュレータス (*Aspergillus aculeatus*) 由来の F I - C M C a s e [非特許文献 2] の遺伝子を実施例 5 に従い、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) において発現させ、同様に培養上清を調製した。得られた培養上清及び P P C E 遺伝子発現株の培養上清を実施例 1 の方法に従い、12%ゲルを用いて S D S - P A G E に供した。泳動後、S Y P R O Ruby protein gel stain (インビトロジェン社製) で染色、水洗し、モレキュラーイメジャー F X (バイオラッドラボラトリーズ社製) 及び Q u a n t i t y O n e (バイオ・ラッドラボラトリーズ社製) を用いてバンド解析を行い、全タンパク質に占める発現タンパク質比率を測定した。次に培養上清中の全タンパク質濃度をプロテインアッセイキット (バイオラッドラボラトリーズ社製) により、ウシγグロブリンをスタンダードとして定量した。得られた全タンパク質濃度と発現タンパク質比率を乗じることにより、発現タンパク質濃度を求めた。

【0066】

【表 1】

トリコデルマ組換え体における発現タンパク質量

活性本体	全タンパク質濃度	発現比率	発現タンパク質濃度
P P C E (本発明)	13.2 μ g/mL	6.1%	0.81 μ g/mL
E G I I I	11.8 μ g/mL	18.1%	2.1 μ g/mL
S C E 3	14.7 μ g/mL	17.9%	2.6 μ g/mL
F I - C M C a s e	13.3 μ g/mL	9.8%	1.3 μ g/mL

【0067】

(2) 着色綿毛羽除去活性の測定

P P C E 遺伝子発現株及び実施例 6 (1) で得られた対照株の培養上清を用いて、毛羽除去活性を測定した。まず、予め染色された茶色綿ニットの生地を大型ワッシャー中で毛羽立たせた。その後、この毛羽立たせた茶色綿ニット生地を下記の条件で毛羽除去処理を行い、処理後の布の毛羽の取れ具合を目視にて判定し、毛羽除去活性を調べた。

【0068】

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L - 12 (大栄科学精器製作所社製)

温度：40℃

時間：60分

反応液：5mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4) 40mL

処理液には、培養上清とともにステンレスビーズを適量加えた。

【0069】

表 2 に形成された毛羽が目視評価でほぼ 50 % 除去されるのに要する培養上清液量を示した。また、実施例 6 (1) で求めた発現タンパク質濃度から、この時使用した発現タンパク質量も算出した。結果、PPCE が最も少量のタンパク質で毛羽を除去できることが明らかとなった。

【0070】

【表 2】

PPCE 発現株の毛羽除去活性

活性本体	毛羽が 50 % 除去される 培養上清液量	毛羽が 50 % 除去される 発現タンパク質量
PPCE (本発明)	100 μ L	0.081 μ g
EGIII	140 μ L	0.29 μ g
SCE3	150 μ L	0.39 μ g
FI-CMC a s e	200 μ L	0.26 μ g

10

【0071】

《実施例 7：PPCE の毛羽除去活性による温度、pH プロファイル》

(1) PPCE の毛羽除去活性による温度プロファイル

20

実施例 6 で用いた PPCE と EGIII 発現株の培養上清を使用して温度プロファイルを以下の洗浄条件にて調べた。洗浄後、目視により毛羽の除去度を評価し、毛羽が目視評価でほぼ 50 % 除去されるのに要する培養上清液量を算出した。この液量より、各サンプル中で最も毛羽を除去した温度を 100 % として相対活性を求めた。表 3 に示す通り、PPCE の至適温度は 30 $^{\circ}$ C、EGIII の至適温度は 40 $^{\circ}$ C であった。

【0072】

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12 (大栄科学精器製作所社製)

温度：20 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C

時間：60 分

反応液：5 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4) 40 mL

30

処理液には、培養上清とともにステンレスビーズを適当量加えた。

【0073】

【表 3】

PPCE 発現株の温度プロファイル

反応温度	PPCE (本発明)	EGIII
	相対活性 (%)	相対活性 (%)
20 $^{\circ}$ C	80	75
30 $^{\circ}$ C	100	85
40 $^{\circ}$ C	95	100
50 $^{\circ}$ C	80	80
60 $^{\circ}$ C	40	50

40

【0074】

(2) PPCE の毛羽除去活性による pH プロファイル

実施例 6 で用いた PPCE と EGIII 発現株の培養上清を使用して pH プロファイルを以下の洗浄条件にて調べた。洗浄後、目視により毛羽の除去度を評価し、毛羽が目視評価

50

では、50%除去されるのに要する培養上清液量を算出した。この液量より、各サンプル中で最も毛羽を除去したpHを100%として相対活性を求めた。表4に示す通り、PPCEの至適はpHは3、EGIIIの至適pHは4であった。

【0075】

試験機械：洗濯堅牢度試験機L-12（大栄科学精器製作所社製）

温度：40℃

時間：60分

反応液：5mmol/Lクエン酸または酢酸緩衝液（pH2～6） 40mL

処理液には、培養上清とともにステンレスビーズを適当量加えた。

【0076】

10

【表4】

PPCE発現株のpHプロファイル

緩衝液、pH	PPCE	EGIII
	洗浄活性 (%)	洗浄活性 (%)
クエン酸、pH2	85	25
クエン酸、pH3	100	45
クエン酸、pH4	90	100
酢酸、pH4	90	90
酢酸、pH5	30	55
酢酸、pH6	10以下	10

20

【0077】

《実施例8：コドン最適化PPCE遺伝子のトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) での発現》

（1）コドン最適化PPCE遺伝子の取得

トリコデルマ属において使用頻度の高いコドンのみで構成するPPCE遺伝子をPCR反応により合成した。

30

【0078】

a) PCEM1-2断片の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

PCEM-1：

CCAGGCCTGCGCATCATGAAGCTGACCTTCCTGCTGAACCTGGCCGTCGCCGCCAGCGCCCAGCAGAGCCTGTGCAGCCAGTACAGCAGCTACAC（配列番号14）

PCEM-2：

TGGCTGCCGCTGCCGCTGCTCTCGCCCCACAGGTTGTTGTTGACGCTGTACTGGCCGCTGGTGTAGCTGCTGTACTGGCT（配列番号15）

40

【0079】

鋳型非存在下で上記のプライマー（PCEM-1、PCEM-2）を20pmol使用し、PrimeStar MAX DNA POLYMERASE（タカラ社製）を用いてPCR反応を行った。条件は、98℃10秒・55℃5秒・72℃30秒の反応を30サイクル行った。反応液はQIAQUICK PCR PURIFICATION KIT（キアゲン社製）を用いてDNAの精製を行い50μLのTEバッファーに溶出した。条件についてはキットに添付の条件に従った。得られた約150bpのDNA断片をPCEM1-2とした。

【0080】

50

b) P C E M 3 - 4 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

P C E M - 3 :

AGCAGCGGCAGCGGCAGCCAGTGCACCTACGTCAACAGCATCAGCAGCAGCGGCGTCAGCTGGAGCACCACCTGGAAGT
(配列番号 1 6)

P C E M - 4 :

TTGGTCAGGCCGCTCAGCTGGCTGTTGGCGTAGCTCTTGACGCTGGTGCTGCCGCCGCTCCAGTTCCAGGTGGTGCTCCA
(配列番号 1 7)

10

鋳型非存在下で上記のプライマー (P C E M - 3、P C E M - 4) を 2 0 p m o l 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、P C R 反応、断片の精製を行った。得られた約 1 4 0 b p の D N A 断片を P C E M 3 - 4 とした。

【0 0 8 1】

c) P C E M 5 - 6 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

P C E M - 5 :

CAGCTGAGCGGCCTGACCAAGAAGCTGGTCAGCAACCTGCAGAGCATCCCCACCAGCGTCCAGTGGAGCTACAGCAACAC
(配列番号 1 8)

20

P C E M - 6 :

GTGACGTGGTTGATGTGCGCGGCGGTGAACAGGTCGTAGCTGACGTCGGCGACGATGTTGGTGTTGCTGTAGCTCCACTG
(配列番号 1 9)

鋳型非存在下で上記のプライマー (P C E M - 5、P C E M - 6) を 2 0 p m o l 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、P C R 反応、断片の精製を行った。得られた約 1 4 0 b p の D N A 断片を P C E M 5 - 6 とした。

【0 0 8 2】

d) P C E M 7 - 8 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

30

P C E M - 7 :

GCCGACATCAACCACGTCACCTACAGCGGCGACTACGAGCTGATGATCTGGTAAATATGCCCCGTCGTATTTCAAGTAT
(配列番号 2 0)

P C E M - 8 :

CAGGGGCTGGGCGCCGCGTACTTGCCAGCCTGATATCTTGATTAGCGGGAGATGTCTCATACTTGAAATACGACGGGG
(配列番号 2 1)

鋳型非存在下で上記のプライマー (P C E M - 7、P C E M - 8) を 2 0 p m o l 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、P C R 反応、断片の精製を行った。得られた約 1 4 0 b p の D N A 断片を P C E M 7 - 8 とした。

40

【0 0 8 3】

e) P C E M 9 - 1 0 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

P C E M - 9 :

ACGGCGGCGCCCAGCCCCTGGGCAGCCAGATCGGCACCGCCAACGTCGGCGGCGCCACCTGGCAGCTGTGGTACGGCGTC
(配列番号 2 2)

P C E M - 1 0 :

GCCGTTCCAGCTGGTGGTCTGGCTGCTGGCGACGAAGCTGTAGGTCTTCTGGCTGCCGTTGACGCCGTACCACAGCTGCC

50

(配列番号 2 3)

鋳型非存在下で上記のプライマー (PCEM-9、PCEM-10) を 20 pmol 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行った。得られた約 140 bp の DNA 断片を PCEM9-10 とした。

【0084】

f) PCEM11-12 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

PCEM-11:

AGACCACCAGCTGGAACGGCGACATCCTGCAGTTCTTCAAGTACCTGCAGAGCAACCAGGGCTTCCCCGCCAGCAGCCAG
(配列番号 2 4)

PCEM-12:

ATCATGTCAGATACAAGGAGTCTATAGGAACAGAAAGGGTCATGGCTTACCGATCAGGTACTGGCTGCTGGCGGGGAAGC
(配列番号 2 5)

鋳型非存在下で上記のプライマー (PCEM-11、PCEM-12) を 20 pmol 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行った。得られた約 140 bp の DNA 断片を PCEM11-12 とした。

【0085】

g) PCEM13-14 断片の作製

まず、以下の配列を有する 2 本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

PCEM-13:

CTCCTTGTATCTGACATGATTGCTTCGGTATCAGACCTGCAGTTCCGGCACCGAGCCCTTACCGGCAGCCAGACCACCT
(配列番号 2 6)

PCEM-14: CCCTCGAGCTAGTTGACGCTGGCGCTCCAGTGGTTGACGGTCAGGGTGGTCTGGCTGCCGGT (配列番号 2 7)

鋳型非存在下で上記のプライマー (PCEM-13、PCEM-14) を 20 pmol 使用し、実施例 8 (1) a) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行った。得られた約 120 bp の DNA 断片を PCEM13-14 とした。

【0086】

h) PCEM1-4 断片の作製

実施例 8 (1) a) で得られた PCEM1-2 及び実施例 8 (1) b) で得られた PCEM3-4 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-1、PCEM-4) を 20 pmol 使用し、PrimeStar MAX DNA POLYMERASE (タカラ社製) を用いて 2 回目の PCR 反応を行った。条件は、98℃10 秒・55℃5 秒・72℃30 秒の反応を 30 サイクル行った。反応液は QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT (キアゲン社製) を用いて DNA の精製を行い 50 µL の TE バッファーに溶出した。得られた約 270 bp の DNA 断片を PCEM1-4 とした。

【0087】

i) PCEM5-8 断片の作製

実施例 8 (1) c) で得られた PCEM5-6 及び実施例 8 (1) d) で得られた PCEM7-8 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-5、PCEM-8) を 20 pmol 使用し、2 回目の反応を行った。上記の実施例 8 (1) h) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行い、得られた約 260 bp の DNA 断片を PCEM5-8 とした。

【0088】

j) PCEM9-12 断片の作製

10

20

30

40

50

実施例 8 (1) e) で得られた PCEM9-10 及び実施例 8 (1) f) で得られた PCEM11-12 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-9、PCEM-12) を 20 pmol 使用し、2 回目の反応を行った。上記の実施例 8 (1) h) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行い、得られた約 260 bp の DNA 断片を PCEM9-12 とした。

【0089】

k) PCEM1-8 断片の作製

実施例 8 (1) h) で得られた PCEM1-4 及び実施例 8 (1) i) で得られた PCEM5-8 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-1、PCEM-8) を 20 pmol 使用し、PrimeStar MAX DNA POLYMERASE (タカラ社製) を用いて 3 回目の PCR 反応を行った。条件は、98℃10 秒・55℃5 秒・72℃30 秒の反応を 30 サイクル行った。反応液は QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT (キアゲン社製) を用いて DNA の精製を行い 50 µL の TE バッファーに溶出した。得られた約 510 bp の DNA 断片を PCEM1-8 とした。

【0090】

l) PCEM9-14 断片の作製

実施例 8 (1) j) で得られた PCEM9-12 及び実施例 8 (1) g) で得られた PCEM13-14 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-9、PCEM-14) を 20 pmol 使用し、3 回目の反応を行った。上記の実施例 8 (1) k) の方法に従い、PCR 反応、断片の精製を行い、得られた約 360 bp の DNA 断片を PCEM9-14 とした。

【0091】

m) プラスミド pCR-PCEm の作製

実施例 8 (1) k) で得られた PCEM1-8 及び実施例 8 (1) l) で得られた PCEM9-14 各 1 µL を鋳型とし、上記のプライマー (PCEM-1、PCEM-14) を 20 pmol 使用し、4 回目の PCR 反応を行った。条件は、98℃10 秒・55℃5 秒・72℃30 秒の反応を 30 サイクル行った。アガロースゲル電気泳動により反応後のサンプルを分離し、約 800 bp の遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (キアゲン社製) を用いて DNA の精製を行い 50 µL の TE バッファーに溶出した。得られた精製 DNA に dNTP、バッファー及び EXTa q (タカラ社製) を加え、72℃で 10 分インキュベートし A 塩基を付加した後に、TOPO PCR CLONING KIT (インビトロジェン社製) を用い、TOPO ベクター (PCR2.1-TOPO) にクローン化した。得られたプラスミドを pCR-PCEm とした。プラスミド pCR-PCEm を定法により増幅・精製し、上述の方法に従い DNA 配列を解析した。その結果、プラスミド pCR-PCEm は、コドン最適化 P P C E 遺伝子の翻訳領域 (配列番号 28) に加え、開始コドンの上流に制限酵素 S t u I の認識配列、終止コドンの下流に X h o I の認識配列を有することが確認できた。

【0092】

(2) コドン最適化 P P C E 発現プラスミドの構築

プラスミド pCR-PCEm を制限酵素 S t u I および X h o I で切断し、アガロースゲル電気泳動により反応後のサンプルを分離し、約 800 bp の遺伝子断片を切り出し、QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (キアゲン社製) を用いて、DNA の精製を行った。

次に、実施例 5 (2) と同様に、プラスミド pCB1-M2 を制限酵素 S t u I および X h o I で切断し、約 5.6 kb の遺伝子断片を回収、精製した。これに先に得られた約 800 bp の遺伝子断片を L i g a t i o n H i g h (東洋紡社製) を用いて連結し、プラスミド p P P C E -M を作製した。

【0093】

(3) プラスミド p P P C E -M によるトリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride) の形質転換体の作製

10

20

30

40

50

実施例 8 (2) で得られたプラスミド p P P C E - M により、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) を形質転換した。形質転換の方法は、実施例 5 (3) の方法に従い、ウラシル生合成遺伝子 (p y r 4) 欠損株であるトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) s t r a i n 2 株を宿主とし、選択マーカーとしてニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) の p y r 4 遺伝子を用いたコートランスフォーメーション (co-transformation) 法により形質転換を実施した。7 μ g のプラスミド p P P C E - M 及び 3 μ g のプラスミド p P Y R 4 を使用してトリコデルマ・ビリデ s t r a i n 2 を形質転換し、40 株の形質転換体を得た。

【0094】

(4) プラスミド p P P C E - M によるトリコデルマ・ビリデ形質転換体の培養

10

実施例 8 (3) で得られた形質転換体 40 株を実施例 5 (4) 記載の P S W 培地に植菌し、28℃にて5日間培養した。培養後、遠心分離により菌体を除去し、得られた培養上清を粗酵素液とした。粗酵素液を S D S - P A G E に供したところ、形質転換体において特異的に約 26 k D のタンパク質が発現していた。また、これらの粗酵素液の毛羽除去活性を実施例 7 に従い測定したところ (測定条件・・・温度; 30℃、時間; 60分、反応液; 5 mm o l / L クエン酸緩衝液 p H 3. 0)、非形質転換の宿主と比較して、形質転換体において特異的に活性が向上していた。

【産業上の利用可能性】

【0095】

本発明は、セルロースの各種処理、例えば、セルロース含有繊維の処理、古紙の脱インキ処理、紙パルプのろ水性の改善、動物飼料の消化能改善、バイオエタノールの製造などの用途に利用することができる。

20

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

【配列表フリーテキスト】

【0096】

配列表における配列番号 5 ~ 27 の各配列は、P C R 用プライマーである。配列番号 28 の配列は、コドン最適化 (改変) 遺伝子である。配列番号 29 の配列は、コドン最適化 (改変) 遺伝子より推定されるアミノ酸配列である。

【配列表】

30

0005193997000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
D 0 6 M	16/00	(2006.01)	D 0 6 M 16/00 A
D 0 6 L	3/11	(2006.01)	D 0 6 L 3/11
D 2 1 C	9/10	(2006.01)	D 2 1 C 9/10 Z
D 2 1 H	21/10	(2006.01)	D 2 1 H 21/10

(72)発明者 辻内 豪
神奈川県小田原市栢山 7 8 8 番地 明治製菓株式会社内

(72)発明者 福島 崇恵
神奈川県小田原市栢山 7 8 8 番地 明治製菓株式会社内

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 特開 2 0 0 4 - 3 1 3 0 2 2 (J P, A)
国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 4 4 7 5 (W O, A 1)
国際公開第 2 0 0 1 / 0 9 0 3 7 5 (W O, A 1)
ロシア国特許出願公開第 0 2 2 3 8 9 7 4 (R U, A)
Bhat K., McCrae S. and Wood T., The endo-(1→4)-β-D-glucanase system of *Penicillium p*
inophilum cellulase : Isolation, purification,, Carbohydrate Research, 1 9 8 9 年, 190
(2), p.279-297

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12N 15/00-15/90
C12N 9/00-9/99
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
WPI