(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/167235 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061759

(22) 国際出願日: 2016 年 4 月 12 日(12.04.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-082133 2015 年 4 月 14 日(14.04.2015) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所 **(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目３番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 井上　宏之 **(INOUE, Hiroyuki)**; 〒7390046 広島県東広島市鏡山３－１１－３２　国立研究開発法人産業技術総合研究所中国センター内 Hiroshima (JP). 藤井　達也 **(FUJII, Tatsuya)**; 〒7390046 広島県東広島市鏡山３－１１－３２　国立研究開発法人産業技術総合研究所中国センター内 Hiroshima (JP). 石川　一彦 **(ISHIKAWA, Kazuhiko)**; 〒5638577 大阪府池田市緑丘１丁目８番３１号　国立研究開発法人産業技術総合研究所　関西センター内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 **(SAEGUSA & PARTNERS)**; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町１－７－１　北浜ＴＮＫビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2016/167235 A1

(54) **Title**: MODIFIED XYLANASE

(54) 発明の名称 : 改変型キシラナーゼ

(57) **Abstract**: Provided is a modified xylanase. The present invention provides a polypeptide that has an amino acid sequence in which at least 12 consecutive amino acid residues of the C-terminal of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence having 90% or greater identity therewith have been deleted, and exhibits xylanase activity.

(57) 要約: 改良されたキシラナーゼを提供すること。 配列番号１のアミノ酸配列又はそれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列のＣ末端の連続する少なくとも１２アミノ酸残基が欠損したアミノ酸配列を有し、且つ、キシラナーゼ活性を有するポリペプチド。

明　細　書

発明の名称 ： 改変型キシラナーゼ

技術分野

[0001] 改変型キシラナーゼ及びそれに関連する技術が開示される。

背景技術

[0002] キシランは広く天然に存在する多糖の１つであり植物の主要構成成分である。その構造は、キシロースを単位とするβ-1,4キシロシド結合により重合した主鎖を有する高分子多糖である。キシランは、天然には、キシロースだけで構成されるホモキシラン、及び、主鎖からアラビノースが分岐した構造を有するアラビノキシランなどのヘテロキシランとして存在する。

[0003] キシラナーゼは、キシランを加水分解する酵素群の総称であり、動植物及び微生物に広く存在する。これまでに細菌、放線菌、酵母、カビ等に由来するキシラナーゼについて主に研究がなされてきた。キシラナーゼは、キシランからのキシロオリゴ糖やキシロースの製造及びバイオマス処理に利用されている。特に近年、リグノセルロース等の植物バイオマス処理における酵素の利用という観点からキシラナーゼの有用性が注目されている。例えば、アルコール燃料用農業廃棄物の酵素分解、動物飼料中の糖を遊離させるための酵素処理、セルロース製造時にパルプを溶解させるための酵素処理、木材パルプ漂白における酵素処理などにおいてキシラナーゼの使用が挙げられる。また、キシラナーゼは、飼料用や食品加工分野でも使用されている（特開平06-261750）。

[0004] タラロマイセス(旧名アクレモニウム)・セルロリティカス（Talaromyces（Acremonium）cellulolyticus）CF-2612株は、セルロースによってキシラナーゼ（以下Xyl10A）を高度に誘導生産することが報告されている（非特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平06-261750

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Protein. Expr. Purif. 94:40-45 (2014)

非特許文献2：Journal of Biotechnology, 57 (1997), 59-69

非特許文献3：Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (1), 41-47, 2001

非特許文献4：Biochem. J. (1995), 307, 191-195

非特許文献5：Enzyme Microb. Technol. 2013, 53(5):351-358

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] より特性が改良されたキシラナーゼを提供することを１つの課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] キシラナーゼが有するセルロース結合ドメイン（又はモジュール）は、それを除去することによって、キシラナーゼ活性を低下するか（非特許文献２及び３）、酵素活性に有意な影響を与えないことがこれまでに報告されている（非特許文献４）。また、キシラナーゼ以外のグルコシルヒドロラーゼについてもセルロース結合ドメイン（又はモジュール）の除去が酵素活性の低下に繋がることが報告されている（非特許文献５）。しかしながら、タラロマイセス・セルロリティカスCF-2612株が生産するキシラナーゼ（Xyl10A）が有するセルロース結合モジュール１（CBM1）を欠損させたところ、キシラナーゼとしての酵素活性が飛躍的に向上することが見出された。斯かる知見に基づき、更なる検討と研究を重ね、下記に代表される発明が提供される。

項１.

配列番号１のアミノ酸配列又はそれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列のＣ末端の連続する少なくとも１２アミノ酸残基が欠損したアミノ酸配列を有し、且つ、キシラナーゼ活性を有するポリペプチド。

項２.

該少なくとも１２アミノ酸残基が、１２アミノ酸残基以上７３アミノ酸残基

以下のアミノ酸残基である、項１に記載のポリペプチド。

項３．

７０℃で安定である、項１又は２に記載のポリペプチド。

項４．

請求項１～３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

項５．

項４に記載のポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクター。

項６．

項４に記載のポリヌクレオチド及び／又は項５に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。項７．

項６に記載の宿主細胞を培養すること、及び

項１～３のいずれかに記載のポリペプチドを回収すること、

を含む項１～３のいずれかに記載のポリペプチドを製造する方法。

発明の効果

[0009] 酵素活性及び／又は他の特性が改良された改変型キシラナーゼが提供される。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例において作成された変異型キシラナーゼの熱安定性が示される。

[図2]実施例において作成された変異型キシラナーゼの各pH下における比活性が示される。

[図3]実施例において作成された変異型キシラナーゼの構造、及びそれらに基づいて想定される他の変異型キシラナーゼの構造が示される。

発明を実施するための形態

[0011] １．ポリペプチド

キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列又はそれと８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列のＣ末端の連続する少なくとも１２アミノ酸残基が欠損したアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0012] 配列番号１のアミノ酸配列は、タラロマイセス・セルロリティカスCF-2612

株が生産するキシラナーゼ（Xyl10A）のアミノ酸配列である。配列番号１のアミノ酸配列の第１位～第３１６位の領域は、キシラナーゼ（Xyl10A）の触媒ドメインであり、第３１７位～３５３位の領域はリンカー配列であり、第３５４位～第３８８位の領域はセルロース結合モジュール（ＣＢＭ）に相当すると考えられている。

[0013] 従って、配列番号１のアミノ酸のＣ末端の連続する１２アミノ酸とは、キシラナーゼ（Xyl10A）のＣＢＭの一部に相当する。前記「連続する少なくとも１２アミノ酸残基」は、好ましくは連続する１２アミノ酸残基以上７３アミノ酸残基以下である。配列番号１のアミノ酸配列のＣ末端の連続する７３アミノ酸残基から成る領域とは、キシラナーゼ（Xyl10A）のＣＢＭ及びリンカー配列の全領域を全て含む領域である。

[0014] 一実施形態において、欠損するアミノ酸残基の数は、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）と比較して、何らかの特性が改良されている限り、特に制限されず、任意に選択できる。例えば、欠損するアミノ酸残基の数は、配列番号１のアミノ酸配列又はそれと８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列のＣ末端の１個以上、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１１個以上、１２個以上、１５個以上、２０個以上、２５個以上、３０個以上、３５個以上、４０個以上、４５個以上、５０個以上、５５個以上、６０個以上、６５個以上、又は７０個以上のアミノ酸であり得、７３個以下、７０個以下、６５個以下、６０個以下、５５個以下、５０個以下、４５個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、２５個以下、２０個以下、１５個以下、１０個以下、又は５個以下であり得る。

[0015] 前記同一性は、好ましくは８５％以上、好ましくは９０％以上、好ましくは９５％以上、好ましくは９６％以上、好ましくは９７％以上、好ましくは９８％以上、好ましくは９９％以上である。配列番号１のアミノ酸配列と一定以上の同一性を有するアミノ酸配列の具体例としては、配列番号７のアミノ酸配列を挙げることができる。配列番号７のアミノ酸配列は、Penicillium

funiculosum由来のキシラナーゼ（XynD）のアミノ酸配列である。配列番号７のアミノ酸配列と配列番号１のアミノ酸配列との同一性は、９７％である。

[0016] アミノ酸配列の同一性は、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、例えば、ＣｌｕｓｔａｌＷ ｖｅｒ２．１Ｐａｉｒｗｉｓｅ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ（ｈｔｔｐ：／／ｃｌｕｓｔａｌｗ．ｄｄｂｊ．ｎｉｇ．ａｃ．ｊｐ／ｉｎｄｅｘ．ｐｈｐ？ｌａｎｇ＝ｊａ）を使用し、デフォルトのパラメータを用いて算出することができる。また、解析全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ）の相同性アルゴリズムＢＬＡＳＴ。（Ｂａｓｉｃ ｌｏｃａｌ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｓｅａｒｃｈ ｔｏｏｌ）ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／においてデフォルト（初期設定）のパラメータを用いることにより、算出することができる。

[0017] 配列番号１のアミノ酸配列と一定以上の同一性を有するアミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸配列と相違するアミノ酸残基の１０％以上、好ましくは２０％以上、好ましくは３０％以上、好ましくは４０％以上、好ましくは５０％以上、好ましくは６０％以上、好ましくは７０％以上、好ましくは８０％以上、好ましく９０％以上、好ましくは９５％以上が保存的に置換されたアミノ酸残基であることが好ましい。保存的に置換されたアミノ酸残基とは、被置換アミノ酸残基と類似の性質を有する側鎖を有するアミノ酸残基を意味する。

[0018] 例えば、アミノ酸残基は、その側鎖によって塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、ト

リプトファン、ヒスチジン）のように、同様の性質を有するファミリーに分類することができる。保存的アミノ酸置換とは、被置換残基と同一ファミリーに属する他のアミノ酸残基で置換することを意味する。

[0019] 一実施形態において、配列番号１のアミノ酸配列と一定以上の同一性を有するアミノ酸配列には、配列番号１のアミノ酸配列の１又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列が包含される。

[0020] 配列番号１のアミノ酸配列の第１２９位のグルタミン酸残基及び第２３６位のグルタミン酸残基は活性中心を構成すると考えられる。第４７位のリジン残基、第８０位のヒスチジン残基、第８４位のトリプトファン残基、第２０４位のグルタミン残基、第２０６位のヒスチジン残基、第２７６位のトリプトファン残基、第２８４位のトリプトファン残基は、基質との相互作用に関与すると考えられる。よって、配列番号１と一定以上の同一性を有するアミノ酸配列においてもこれらのアミノ酸残基は保存されていることが好ましい。一実施形態において、これらのアミノ案残基の前後３アミノ酸残基、前後２アミノ酸残基、又は前後１アミノ酸残基も保存されていることが好ましい。

[0021] キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）と比較して何らかの特性が改良されている限り、配列番号１のアミノ酸配列又はそれと一定以上の同一を有するアミノ酸配列のＮ末端側に任意の配列が付加されていても良い。付加されるアミノ酸残基の数は特に制限されず、例えば、１個以上、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、１０個以上、１１個以上、１２個以上、１５個以上、２０個以上、２５個以上、３０個以上、３５個以上、４０個以上、４５個以上、５０個以上、５５個以上、又は６０個以上である。付加されるアミノ酸残基の数は、例えば、８０個以下、７５個以下、７０個以下、６５個以下、６０個以下、５５個以下、５０個以下、４５個以下、４０個以下、３５個以下、３０個以下、２５個以下、２０個以下、１５個以下、１０個以下、又は５個以下であり得る。

[0022] 上記Ｎ末端側に付加されるアミノ酸残基はシグナルペプチドを構成することが好ましい。シグナルペプチドの具体的なアミノ酸配列は、シグナルペプチドとして機能する限り任意であり、目的及び宿主細胞の種類等に応じて適宜設計することができる。例えば、シグナルペプチドは、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）が有するシグナルペプチドと同一のアミノ酸配列又はそれと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列であり得る。ここで、「同一性」は、好ましくは９０％以上、好ましくは９５％以上、好ましくは９６％以上、好ましくは９７％以上、好ましくは９８％以上、好ましくは９９％以上である。野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）が有するシグナルペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列を有する。配列番号１のアミノ酸配列のＮ末に配列番号２のアミノ酸配列が連結したアミノ酸配列は配列番号３のアミノ酸配列である。尚、図３に示されるキシラナーゼの構造は、配列番号３のアミノ酸配列（即ち、シグナルペプチドを有する一次構造）を基準としている。

[0023] シグナルペプチドの他、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドのN末端またはC末端又はその両方には、ポリペプチドの精製に有用なタグ及び／又は有用なドメイン構造を形成する配列等（例えばセルロース結合性のCBM2a、CBM3、CBM5、CBM10等やキシラン結合性のCBM2b、CBM6, CBM9,CBM22）を付加することもできる。そのようなタグは当該技術分野において知られており、適宜選択して利用することができる。付加される配列は、キシラナーゼ活性が維持される限り任意である。

[0024] キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）よりも高いキシラナーゼとしての酵素活性（即ち、キシラナーゼ活性）を有することが好ましい。キシラナーゼ活性は下記の条件にて測定される。基質として最終濃度１％のバーチウッドキシラン(Birchwood Xylan)を含む５０ｍＭ酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．０）中に最終濃度０．０００５～０．００１ｍｇ/ｍｌの酵素タンパク質を加えて反応を開始し、４５℃、１０分間保温する。反応中に生じた還元糖は、常法に従い、３,５-ジニトロサリチル酸を発色剤として用いるＤＮＳ法（Methods in Enzymology 160:87-176(

1988)））によって定量する。キシロースを標準糖とした検量線より、還元糖量を定量する。酵素活性は、１分間あたり１μmolの還元糖を生成する酵素量を１Uと定義する。

[0025] 一実施形態において、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドのキシラナーゼ活性は、好ましくは野生型キシラナーゼの活性の1.3倍以上、好ましくは１．５倍以上、好ましくは１．６倍以上、好ましくは１．７倍以上、好ましくは１．８倍以上、好ましくは１．９倍以上、好ましくは２倍以上、好ましくは２．５倍以上、好ましくは３倍以上、好ましくは３．５倍以上、好ましくは４倍以上高い。

[0026] キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）と同等以上の温度安定性を有することが好ましい。例えば、キシラナーゼを有するペプチドは、７０℃で安定であることが好ましい。ここで、７０℃で安定であるとは、７０℃の５０ｍM酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ５．０）中で１０分間維持しても実質的に酵素活性が低下しないことを意味する。実質的に酵素活性が低下しないとは、例えば、前記の処理の前と比較して、酵素活性が１５％以上低下しないことを意味する。

[0027] キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、野生型のキシラナーゼ（Xyl10A）と同等以上のｐＨ安定性を有することが好ましい。キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、至適活性ｐＨがｐＨ４～５であることが好ましい。

[0028] ポリペプチドは、後述するポリヌクレオチドを利用して、遺伝子工学的な手法で製造することができる。また、ポリペプチドは、配列番号１～３に示されるアミノ酸配列の情報に基づいて、一般的なタンパク質の化学合成法（例えば、液相法及び固相法）を用いて製造することも可能である。

[0029] ポリペプチドが存在する状態は任意である。例えば、ポリペプチドは、単離されたポリペプチド、精製されたポリペプチド、粗精製されたポリペプチド、培養液中に存在するポリペプチド、酵素活性の維持に適したバッファー中に存在するポリペプチド、凍結乾燥されたポリペプチド、防腐剤又はグリセロール等の安定化剤を加えた溶液に保存されたポリペプチド、噴霧乾燥さ

れたポリペプチド等であり得る。一実施形態において、ポリペプチドは、凍結乾燥された精製ポリペプチド、防腐剤又はグリセロール等の安定化剤を加えた溶液に保存された精製ポリペプチド、噴霧乾燥された精製ポリペプチドであることが好ましい。

[0030] ２．ポリヌクレオチド

上述するキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列は任意であり特に制限されない。例えば、前記ポリヌクレオチドの塩基配列は、配列番号４～６のいずれか塩基配列又はそれと８０％以上の同一性を有する塩基配列である。ここで、同一性は、好ましくは８５％以上、好ましくは９０％以上、好ましくは９５％以上、好ましくは９６％以上、好ましくは９７％以上、好ましくは９８％以上、好ましくは９９％以上である。

[0031] 配列番号４の塩基配列は、配列番号１のアミノ酸配列をコードする塩基配列の一例である。配列番号５の塩基配列は配列番号３のアミノ酸配列（即ち、シグナルペプチドを有するポリペプチド）をコードする塩基配列の一例である。ポリペプチドは、シグナルペプチドを含むポリペプチドをコードしていることが好ましい。よって、ポリペプチドは、配列番号５又はそれと一定以上の同一性を有する塩基配列を有することが好ましい。上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドには、任意のイントロンを含むポリヌクレオチドも含まれる。配列番号６の塩基配列は、そのようなポリヌクレオチドの一例である。配列番号６の塩基配列において、第１９９位～第２５２位、第３８６位～第４５８位、及び第５７３位～６６６位の領域はイントロンである。

[0032] 塩基配列の同一性は、市販の又は電気通信回線（インターネット）を通じて利用可能な解析ツールを用いて算出することができ、例えば、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ、ＰＳＩ－ＢＬＡＳＴ、ＳＳＥＡＲＣＨ等のソフトウェアを用いて計算される。具体的には、ＢＬＡＳＴ検索に一般的に用いられる主な初期条件は、以下の通りである。即ち、Ａｄｖａｎｃｅｄ　ＢＬＡＳＴ　２．

１において、プログラムにｂｌａｓｔｎを用い、各種パラメータはデフォルト値に設定して検索を行うことにより、ヌクレオチド配列の相同性の値（％）を算出することができる。

[0033] 上述するキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号４又は５の塩基配列を有するポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであってもよい。ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。具体的なストリンジェントな条件としては、例えば、４２℃でのハイブリダイゼーション、及び１×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳを含む緩衝液による４２℃での洗浄処理を挙げることができ、好ましくは６５℃でのハイブリダイゼーション、及び０．１×ＳＳＣ、０．１％のＳＤＳを含む緩衝液による６５℃での洗浄処理を挙げることができる。尚、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素は、上記温度条件以外にも種々知られており、当業者はそれらを適宜組み合わせて、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを設計することができる。

[0034] ストリンジェントな条件下で配列番号４又は５の塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドには配列中にストップコドンを有するもの、及び活性中心に変異を有し、それがコードするポリペプチドが所望の活性を有さないものも含まれ得るが、それらのポリペプチドは部位特異的な変異を加えることで回避可能であり、公知の手法で酵素活性を測定して容易に取り除くこともできる。

[0035] ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドであることが好ましい。「単離されたポリヌクレオチド」とは、天然状態において共存するその他の核酸やタンパク質等の成分から分離された状態であることをいう。但し、天然状態において隣接する核酸配列（例えばプロモーター領域の配列やターミネーター配列など）など一部の他の核酸成分を含んでいてもよい。ｃＤＮ

Ａ分子など遺伝子工学的手法によって調製されるポリヌクレオチドは、細胞成分や培養液などを実質的に含まないことが好ましい。同様に、化学合成によって調製されるポリヌクレオチドは、ｄＮＴＰなどの前駆体（原材料）及び合成過程で使用される物質等を実質的に含まないことが好ましい。

[0036] ポリヌクレオチドは、配列番号４～６の塩基配列に基づいて、化学的なＤＮＡの合成法（例えば、フォスフォアミダイト法）又は遺伝子工学的手法を用いて容易に取得することができる。

[0037] ３．発現ベクター

発現ベクターは、上記のポリヌクレオチドを適当な宿主において発現可能な状態で組み込んだ組換えベクターであることが好ましい。発現ベクターは、上記ポリヌクレオチドを発現可能な状態で組み込んでいる限り、その構造は特に制限されず、他のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを更に含んでいてもよい。

[0038] ベクターの種類は、宿主細胞の種類を考慮して適宜選択することができる。例えば、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター、ウイルスベクター（アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター等）等を挙げることができる。

[0039] 大腸菌で発現可能なベクターとしては、例えば、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、及びpET等を挙げることができる。酵母で発現可能なベクターとしては、例えば、pBR322、pJDB207、pSH15、pSH19、pYepSec1、pMFa、pYES2等を挙げることが出来る。昆虫で発現可能なベクターとしては、例えば、pAc及びpVL等を挙げることが出来る。セルフクローニングによってタラロマイセス・セルロリティカスで発現可能なベクターとしては、例えばpANC202（J. Ind. Microbilol. Biotechnol. 40:823-830(2013)）、pbs-pyrF（Biosci. Biotecnol. Biochem. 76:245-249, (2012)）、pCBHEX/DtR2（特許4257759号)等を挙げることが出来る。

[0040] 宿主細胞として真核細胞を使用する場合は、発現ベクターとして、発現し

ようとするポリヌクレオチドの上流にプロモーター、ＲＮＡのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを好適に使用することができ、更に必要により複製起点、エンハンサー、及び／又は選択マーカーを有していてもよい。

[0041] ４．形質転換体

形質転換体は、上記組換えベクターで形質転換されていることが好ましい。形質転換に使用される宿主細胞は、上記ポリペプチドを産生できる限り特に制限されず、原核細胞及び真核細胞のいずれでも良い。例えば、エシェリヒア・コリ属細菌（例えば、HB101、MC1061、JM109、CJ236、MV1184等）、コリネバクテリウム・グルタミカム等のコリネ型細菌、ストレプトミセス属細菌等の放線菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、及びスタフィロコッカス属細菌等の原核細胞；、サッカロミセス属、ピシア属及びクルイベロマイセス属等の酵母、アスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属、アクレモニウム属及びタラロマイセス属等の真菌細胞；、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9、及びカイコ培養細胞等の昆虫細胞；並びに植物細胞等を挙げることができる。一実施形態において、ポリペプチドを細胞（菌体）外に分泌させるという観点から枯草菌、酵母、麹菌、又は放線菌等を宿主とすることが好ましい。

[0042] 組換え発現ベクターの宿主細胞内への導入方法は、慣用的に用いられている方法により行うことができる。例えば、コンピテントセル法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム融合法等の種々の方法が挙げられる。これらの手法から適宜選択して形質転換を実施することができる。

[0043] 形質転換体は、上述のポリペプチドを製造するために用いることができる。

[0044] ５．形質転換体を用いたポリペプチドの製造方法

上記形質転換体を培養し、培養物からキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを回収することにより、上記ポリペプチドを製造することができる。培

養は、宿主に適した培地を適宜選択して実施できる。培養は、例えば、形質転換体の内外に生産されたポリペプチドの活性を指標にして、適当量得られるまで実施することができる。

[0045] 培地としては、宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。例えば、大腸菌の培養にはＬＢ培地などの栄養培地や、Ｍ９培地などの最少培地に炭素源、窒素源、ビタミン源等を添加した培地を用いることができる。

[0046] 培養条件も宿主の種類に応じて適宜設定することができる。例えば、１６～４２℃、好ましくは２５～３７℃で５～１６８時間、好ましくは８～９６時間培養することができる。宿主の種類に応じて、振盪培養及び静置培養のいずれを選択しても良い。必要に応じて培地を攪拌してもよく、通気を行ってもよい。キシラナーゼ発現のために誘導型プロモーターを用いる場合は、培地にプロモーター誘導剤を添加して培養することもできる。

[0047] 培養上清からのキシラナーゼの精製又は単離は、公知の手法を適宜組み合わせて行うことができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、エタノール等の溶媒沈殿、透析、限外濾過、酸抽出、及び各種クロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等）等を用いた手法が挙げられる。アフィニティークロマトグラフィーに用いる担体としては、例えば、キシラナーゼに対する抗体を結合させた担体や、キシラナーゼにペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合した担体を利用することもできる。

[0048] ポリペプチドが宿主の細胞内に蓄積される場合は、形質転換細胞を破砕し、破砕物の遠心上清から上記と同様にしてキシラナーゼを精製又は単離することができる。例えば、培養終了後、遠心により集菌した菌体を菌体破砕用バッファー（２０～１００　ｍＭ　酢酸ナトリウム（ｐＨ５．５）、５ｍＭ

ＥＤＴＡ）に懸濁し、超音波破砕し、破砕処理液を１００００～１５００Ｏｒｐｍで１０～１５分間遠心して上清を得ることができる。遠心後の沈殿は、必要に応じて塩酸グアニジウム又は尿素などで可溶化したのち更に精製することもできる。

[0049] 得られたポリペプチドのキシラナーゼ活性の測定は、キシランを含むバイオマス（例えばバガス）を基質とした糖化試験により確認することができる。また精製された酵素の活性測定は、例えば、Bailey et al. J. Biotech. 23(1992) 257-270記載の方法によって測定することができる。

[0050] ６．キシロース／キシロオリゴ糖の製造方法

キシラナーゼ活性を有するポリペプチドを、キシランを含む試料（例えば、バイオマス資源）に接触させることにより、バイオマス資源を分解し、キシロース及び／又はオリゴキシロースを含む糖液を製造することができる。また、キシランを含む試料として、バイオマス資源を使用する場合は、上記ポリペプチドに加えて、他のセルラーゼ等の酵素を併用し、より効率的に糖液を製造することもできる。

[0051] キシランを含む試料の種類は、上記ポリペプチドによって分解可能である限り特に制限されないが、例えば、バガス、木材、ふすま、麦わら、稲わら、もみがら、大豆粕、大豆オカラ、コーヒー粕、及びコメ糠等を挙げることができる。

[0052] キシランを含む試料からキシロース及び／又はオリゴキシロースを含む糖液を製造する方法は、公知の手法に従って実施できる。利用するバイオマス資源は、乾燥物でも、湿潤物でもよいが、処理効率を高めるために予め１００～１０００μｍサイズに粉砕されていることが好ましい。粉砕はボールミル、振動ミル、カッターミル、ハンマーミル等の装置を用いて行うことができる。そして、粉砕したバイオマス資源を水性媒体中に懸濁し、キシラナーゼとセルラーゼを加え、攪拌しながら加温して、バイオマス資源を分解または糖化することができる。またバイオマス資源を100-300℃、好ましくは130-200の熱水で０．５-６０分間処理することによりキシランを含む可溶性画分の

抽出し、キシラナーゼを加え、キシランを糖化することが出来る。熱水処理残渣は、キシラナーゼとセルラーゼを加えて糖化することが出来る。キシラナーゼは、単独で用いても良いが、効率的にバイオマスを分解するという観点からは、他のセルラーゼやヘミセルラーゼ等と組み合わせて試料に添加することが好ましい。

[0053] ポリペプチドを水溶液中でキシランを含む試料に接触させる場合は、反応液のｐＨおよび温度は、キシラナーゼが失活しない範囲であればよい。キシラナーゼは、至適温度が比較的高く、温度安定性にも優れているため、至適温度又はその付近の温度で反応を行うことが効率的に試料を分解し、糖液を得るという観点から好ましい。例えば、常圧の下、５～９０℃、好ましくは１５～８０℃、より好ましくは３０～７０℃、より好ましくは３０～７５℃、ｐＨ３．５～８の条件で実施することができる。添加するポリペプチドの量は、特に制限されないが、例えば、０．０１～０．５％（ｗ／ｗ）の範囲とすることができる。

[0054] 上記の方法で得られたキシロース及び／又はオリゴキシロースを含有する糖液は、そのまま利用しても良く、水分を除去して乾燥物として使用しても良く、目的に応じて、更に化学反応又は酵素反応によって異性化又は分解することも可能である。糖液又はその分画物は、例えば、発酵法によりメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ブタンジオール等のアルコールの原料として使用することができる。

実施例

[0055] 以下、実施例を示すが、ここに開示される発明は実施例に限定されない。

[0056] １．変異型キシラナーゼをコードするポリヌクレオチドの作成

タラロマイセス・セルロリティカスCF-2612株の染色体DNAからキシラナーゼ（xyl10A）をコードするポリヌクレオチド（DDBJアクセッションNo.AB796434）をPCR法によって増幅し、大腸菌にクローニングした。当該キシラナーゼのCBM1を欠失させるために、配列番号３の373番目のアラニン残基に相当するアミノ酸コドン配列がストップコドン配列になるように変異を施し、野生型X

yl10Aよりも35アミノ酸残基短い変異キシラナーゼ（XylA372）を生成する変異遺伝子を作成した。また、CBM1及びリンカー部分を欠失させるために、同様に配列番号３の335番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸コドン配列がストップコドン配列になるように変異を施し、野生型Xyl10Aよりも73アミノ酸残基短い変異キシラナーゼ（XylA334）をコードする変異遺伝子を作成した。

[0057] ２．変異型キシラナーゼの発現と精製

変異型キシラナーゼXylA372をコードするポリヌクレオチドをグルコアミラーゼ遺伝子（DDBJアクセッションNo.AB781686）のプロモーター配列とターミネーター配列との間に機能的に連結した組換えプラスミドを作成した。変異型キシラナーゼXylA334をコードするポリヌクレオチドについても、同様にグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター配列とターミネーター配列との間に機能的に連結した組換えプラスミドを作成した。これらのプラスミドは、プロトプラスト-PEG法を用いて、文献（J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2013, 40(8):823-830）に記載される方法に従って取得されたアクレモニウム・セルロリティカスのウラシル要求性株（YP-4株）の染色体に非相同的に組み込まれた。得られた各形質転換株は、グルコアミラーゼプロモーターの支配下、デンプンを炭素源とする培地で培養することで菌体外に変異型キシラナーゼを分泌生産した。

[0058] 培養液から菌体を除去し、変異型キシラナーゼを含む培養上清液を各種のカラムクロマトグラフィーに供して各変異型キシラナーゼを精製した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動分析によって精製産物が電気泳動的に単一なタンパク質溶液であることを確認した。野生型キシラナーゼ（Xyl10A）は、文献（Protein. Expr. Purif. 94:40-45 (2014)）に報告される、グルコアミラーゼプロモーターの支配下で野生型Xyl10Aを生産する形質転換株をデンプンを炭素源とする培地で培養し、菌体外に誘導生産した。その後、同文献に従って電気泳動的に単一な酵素を得た。

[0059] ３．変異型キシラナーゼと野生型キシラナーゼの酵素活性の比較

各種キシラン基質を用いて変異型キシラナーゼXylA372、変異型キシラナーゼXylA334、及び野生型キシラナーゼXyl10Aの酵素活性の比較を行った。酵素反応は、基質として最終濃度１％のキシラン基質を含む５０ｍM酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．０）中に最終濃度０．０００５～０．００１ｍｇ/ｍｌの精製酵素タンパク質を加えて反応を開始し、４５または７０℃、１０分間保温した。反応中に生じた還元糖の定量によって酵素活性を算出し、1nmolあたりの野生型キシラナーゼXyl10Aの酵素活性を１００％とした相対活性を求めた。結果を下記表１に示す。

[0060] [表1]

基質	反応温度(℃)	相対活性(%)	
		XylA372	XylA334
1% バーチウッドキシラン	45	140	130
1% バーチウッドキシラン	70	190	170
1% 小麦アラビノキシラン	45	160	130
1% オートスペルトキシラン	45	150	150

[0061] 表１に示される通り、１％バーチウッドキシラン(Birchwood Xylan)、１％小麦アラビノキシラン（Wheat arabinoxylan）、及び１％オートスペルトキシラン（Oat-spelt xylan）を基質とした場合の４５℃での変異型キシラナーゼXylA372及びXylA334の酵素活性は、野生型キシラナーゼXyl10Aの活性と比べて1.3倍から1.6倍であった。また、1%バーチウッドキシラン(Birchwood Xylan)を基質とした場合の７０℃での変異型キシラナーゼXylA372及びXylA334の酵素活性は、野生型酵素の1.7倍から1．9倍であった。

[0062] ４．熱安定性及びｐＨ安定性

野生型キシラナーゼ及び変異型キシラナーゼを５０mM酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ５．０）中で４０－８０℃の各温度で１０分間保温し、室温に戻した後、５０ｍM酢酸ナトリウムバッファー（ｐＨ ５．０）に懸濁したキシラン基質を最終濃度１％になるように酵素溶液に加え、４５℃で１０分間酵素反応を行った。４０℃で熱処理した各酵素の活性をそれぞれ１００％と

した場合の相対活性を算出した結果、いずれの酵素も７０℃まで８５％の酵素活性を維持することが観察され、変異型キシラナーゼも耐熱性が維持していることが確認された（図１）。図１に示される通り、変異型キシラナーゼ（XylA334）の熱安定性は、野生型及び変異型キシラナーゼ（XylA372）よりも若干低下した。これは、キシラナーゼの触媒ドメインのアミノ酸（20-335）が一残基欠けたことに起因していると考えられる。よって、欠けた残基を加えれば（例えばXylA335又はXylA336とすることによって）、安定性は野生型キシラナーゼ（Xyl10A）に近づくと考えられる。

[0063] １％バーチウッドキシランを基質とした場合の各酵素の活性に対するｐＨの影響を比較した。緩衝液はMcllvainバッファー（ｐＨ３.4-８.０）を使用した。酵素反応は４５℃、１０分間で行い、生成した還元糖に基づいて各pHにおける各酵素の比活性（U/nmol）を算出した。野生型酵素の反応最適ｐＨは、5付近、変異型酵素のそれは４．５付近であった。更に変異型キシラナーゼXylA372及びXylA334は、酸性側で安定な酵素活性を示すことが見出された。例えば、ｐＨ３．４での変異型キシラナーゼXylA372及びXylA334の比活性は、野生型Xyl10Aの活性と比べて各々3.8倍及び2.8倍であった（図２）。ｐＨ７．０での変異型キシラナーゼXylA372及びXylA334の活性は、野生型Xyl10Aの比活性と比べて、各々1.6倍及び1.5倍であった（図２）。すなわち、いずれの変異型キシラナーゼも、野生型酵素の耐熱性を維持するだけでなく、様々な温度及びｐＨ環境下において、野生型よりもキシラン加水分解活性が高度に改善されていることが確認された。

[0064] ５．変異型キシラナーゼの構造の検討

野生型キシラナーゼXyl10Aのアミノ酸配列は、構造的な観点からシグナルペプチド配列（アミノ酸残番号１－19）、触媒ドメイン（アミノ酸残番号20－335）、リンカー配列(アミノ酸残番号336－372)、及びCBM1(アミノ酸残番号373－407)に分けられる（図３）。CBM1を完全に欠失したXylA372の活性が野生型よりも高かったことから、当該酵素活性の上昇は、CBM1の欠失に起因すると考えられる。これまでにCBM1を有するキシラナーゼやヘミセルラーゼ

におけるCBM1の欠失は酵素活性の改善に寄与しないことが報告されている。

[0065] CBM1の構造が形成されない変異を施すことによって、キシラナーゼの活性の上昇が期待される。例えば、CBM1の機能的な構造は、配列番号３のアミノ酸配列において379番目と396番目のシステイン残基、390番目と406番目のシステイン残基がそれぞれジスルフィド結合を形成することで強固になる。従って、野生型キシラナーゼXyl10Aのカルボキシ末端から396番目のシステイン残基までの欠失は、２つのジスルフィド結合の形成を不可能にし、CBM1特有の構造が消失すると推測される。このような変異酵素も本発明と同様の酵素活性の改善効果を発揮することが期待される（図３）。すなわち、野生型キシラナーゼXyl10Aのカルボキシ末端から少なくとも396番目のシステイン残基を欠失した変異体であり、且つ、397番目から335番目のアミノ酸までを順次欠失した変異型キシラナーゼにおいても酵素活性の上昇が期待される（図３）。CBM1の欠失によって、キシラナーゼのセルロースへの結合性は失われる。この機能を補うために、変異酵素のC-末端またはN-末端に有用なドメイン構造を形成する配列等（例えばセルロース結合性のCBM2a、CBM3、CBM5、CBM10等やキシラン結合性のCBM2b、CBM6, CBM9,CBM22）を連結させた酵素は、変異型酵素の活性を維持したバイオマス結合性のキシラナーゼとなる可能性が期待される。

[0066] 変異型キシラナーゼの作成には、配列番号６に示すゲノムＤＮＡ配列を用いることが出来るが、xyl10A遺伝子由来の転写RNAから取得されるcDNA配列（例えば、配列番号４又は５）を用いて作成することもできる。

[0067] 野生型キシラナーゼXyl10Aのアミノ酸配列の中で、耐熱性又は酵素活性に寄与しないアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換した酵素、または耐熱性又は酵素活性をさらに増加させる効果を持つアミノ酸残基に置換して更なる改変型キシラナーゼを得ることもできる。活性に影響が出ない範囲で変異キシラナーゼのNまたはC末端にアミノ酸残基を複数残基付加することも可能である。例えば、タンパク質精製用のアミノ酸タグを変異キシラナーゼの末端に付けることが可能である。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１のアミノ酸配列又はそれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列のＣ末端の連続する少なくとも１２アミノ酸残基が欠損したアミノ酸配列を有し、且つ、キシラナーゼ活性を有するポリペプチド。

[請求項2] 該少なくとも１２アミノ酸残基が、１２アミノ酸残基以上７３アミノ酸残基以下のアミノ酸残基である、請求項１に記載のポリペプチド。

[請求項3] ７０℃で安定である、請求項１又は２に記載のポリペプチド。

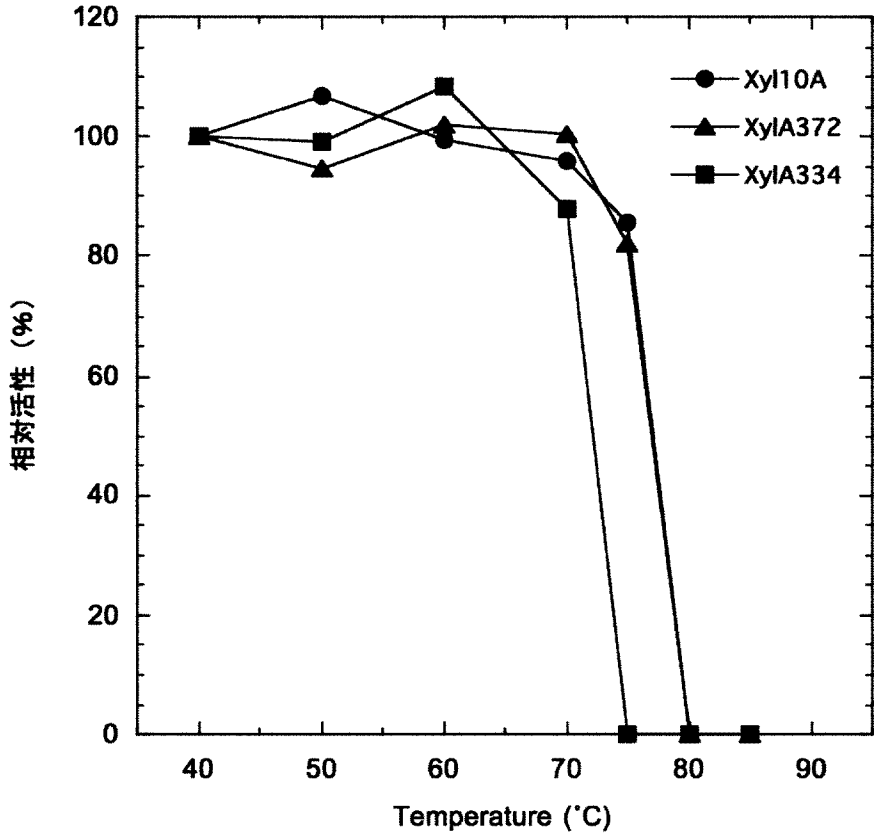
[請求項4] 請求項１～３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項5] 請求項４に記載のポリヌクレオチドを組み込んだ発現ベクター。

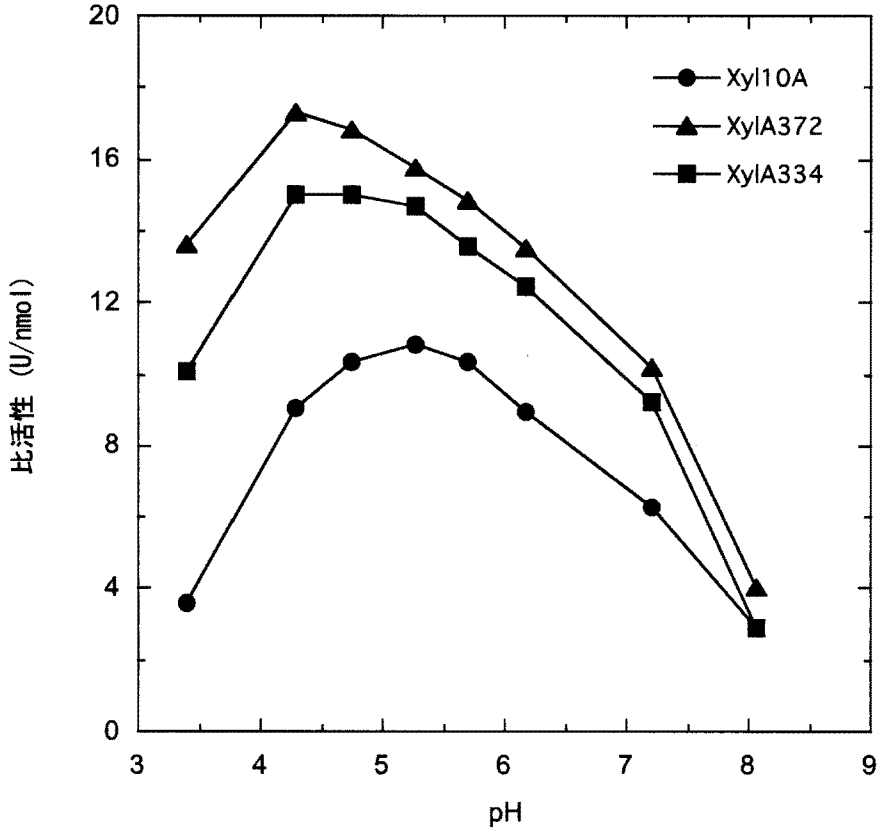
[請求項6] 請求項４に記載のポリヌクレオチド及び／又は請求項５に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

[請求項7] 請求項６に記載の宿主細胞を培養すること、及び
請求項１に記載のポリペプチドを回収すること、
を含む請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチドを製造する方法。

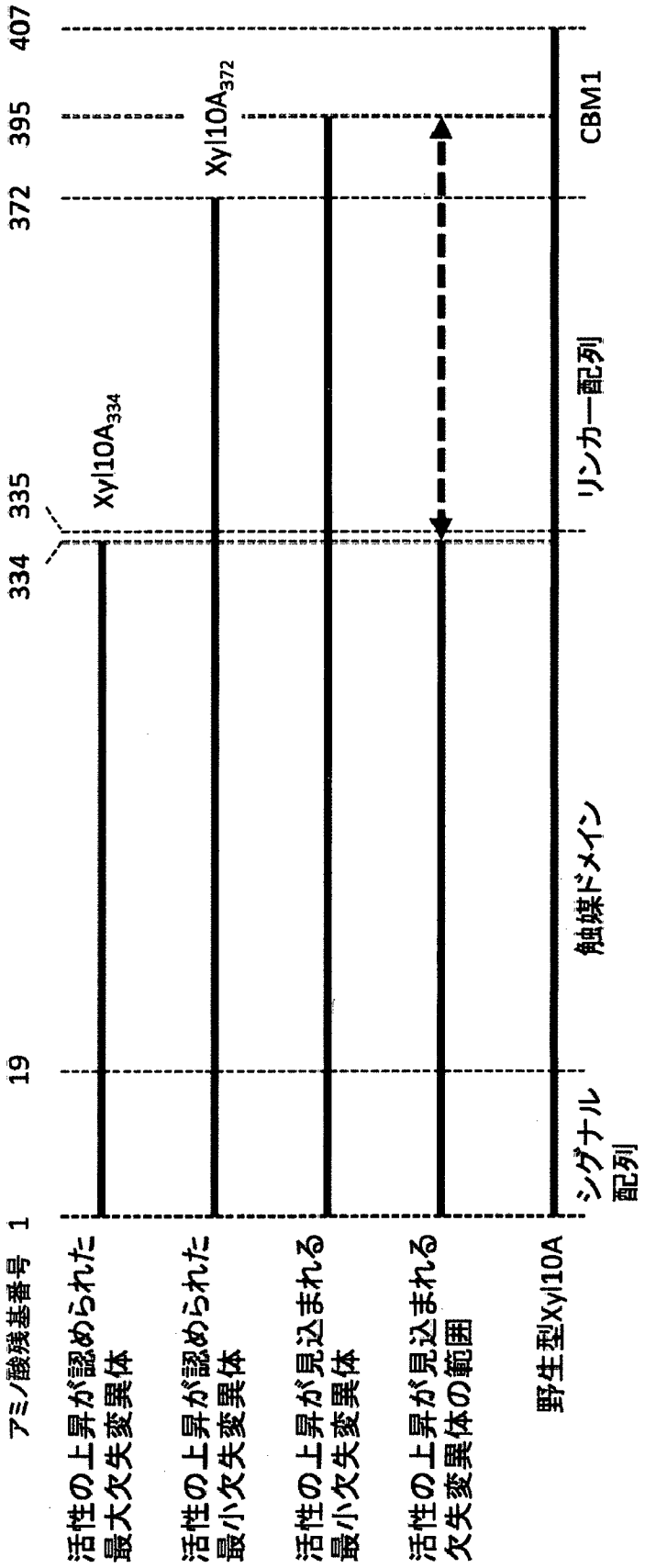
[図1]


120
100
80
60
40
20
0
相対活性（%）
40
50
60
70
80
90
Temperature (°C)
Xyl10A
XylA372
XylA334

[図2]


20
16
12
8
4
0
比活性（U/nmol）
3
4
5
6
7
8
9
pH
Xyl10A
XylA372
XylA334

[図 3]


アミノ酸残基番号
1
19
334
335
372
395
407
Xyl10A334
Xyl10A372
活性の上昇が認められた最大欠失変異体
活性の上昇が認められた最小欠失変異体
活性の上昇が見込まれる最小欠失変異体
活性の上昇が見込まれる欠失変異体の範囲
野生型Xyl10A
シグナル配列
触媒ドメイン
リンカー配列
CBM1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/061759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N9/24*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/24

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/061763 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 24 April 2014 (24.04.2014), entire text; particularly, paragraphs [0016], [0017]; examples & US 2015/0284699 A1 paragraphs [0016], [0017]; examples	1-7
A	KISHISHITA Seiichiro.et al., Cellulose-inducible xylanase Xyl10A from Acremonium cellulolyticus : Purification, cloning and homologous expression, Protein Expression and Purification, 2014, vol.94, p.40-45, Results and discussion, Fig. 2	1-7

☒ 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
01 June 2016 (01.06.16)	14 June 2016 (14.06.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/061759

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MURSHEDA K. A.et al., Importance of the Carbohydrate-Binding Module of Clostridium stercorarium Xyn10B to Xylan Hydrolysis, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014.05.22, Vol.65, p.41-47, Results and discussion, Fig. 1	1-7
A	BLACK Gary W.et al., A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain, Biochemical journal, 1995, Vol.307, p.191-195, abstruct, results	1-7
A	SERMSARHANASWADI Junjarus.et al., The C-terminal region of xylanase domain in Xyn11A from Paenibacillus curdlanolyticus B-6 plays an important rolein structural stability, Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, Vol.98, p.8223-8233, abstract, discussion	1-7
P,X	INOUE Hiroyuki.et al., Contribution of a family 1 carbohydrate-bindingmodule in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from Talaromyces cellulolyticus towardsynergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Biotechnology for Biofuels, 2015.05.13, DOI 10.1186/s13068-015-0259-2, results, discussion, Fig. 4, Table 1	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６１７５９

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/24(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/24

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2014/061763 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014.04.24, 全文、特に[0016]、[0017]、実施例 & US 2015/0284699 A1,[0016],[0017],examples	1-7
A	KISHISHITA Seiichiro.et al., Cellulose-inducible xylanase Xyl10A from Acremonium cellulolyticus : Purification, cloning and homologous expression, Protein Expression and Purification, 2014, vol.94, p.40-45, Results and discussion, Fig. 2	1-7

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０１．０６．２０１６	１４．０６．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４１５４
松原　寛子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	MURSHEDA K. A.et al., Importance of the Carbohydrate-Binding Module of Clostridium stercorarium Xyn10B to Xylan Hydrolysis, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014.05.22, Vol.65, p.41-47, Results and discussion, Fig. 1	1-7
A	BLACK Gary W.et al., A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain, Biochemical journal, 1995, Vol.307, p.191-195, abstruct, results	1-7
A	SERMSARHANASWADI Junjarus.et al., The C-terminal region of xylanase domain in Xyn11A from Paenibacillus curdlanolyticus B-6 plays an important rolein structural stability, Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, Vol.98, p.8223-8233, abstract, discussion	1-7
P,X	INOUE Hiroyuki.et al., Contribution of a family 1 carbohydrate-bindingmodule in thermostable glycoside hydrolase 10 xylanase from Talaromyces cellulolyticus towardsynergistic enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Biotechnology for Biofuels, 2015.05.13, DOI 10.1186/s13068-015-0259-2, results, discussion, Fig. 4, Table 1	1-7