(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117242168 A
(43)申请公布日 2023.12.15

(21)申请号 202280027412.7
(22)申请日 2022.03.30
(30)优先权数据
2021-066415 2021.04.09 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.10.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/015855 2022.03.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/215618 JA 2022.10.13
(71)申请人 花王株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 新井俊阳 儿玉裕司
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 沈央
(51)Int.Cl.
C12N 1/15(2006.01)

权利要求书2页 说明书24页
序列表28页 附图8页

(54)发明名称

变异丝状菌和使用其的蛋白质的制造方法

(57)摘要

本发明提供一种蛋白质生产率提高了的变异丝状菌和使用该变异丝状菌的蛋白质的制造方法。该变异丝状菌表达ACE3变异体,该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域实质上全部缺失的变异体。该蛋白质的制造方法包括培养该变异丝状菌的步骤。

CN 117242168 A

1.一种变异丝状菌,其中,

该变异丝状菌表达ACE3变异体,

该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域实质上全部缺失的变异体。

2.如权利要求1所述的变异丝状菌,其中,

所述ACE3为由序列号1～4中任意的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列构成的多肽。

3.如权利要求2所述的变异丝状菌,其中,

所述$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域为与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域。

4.如权利要求2所述的变异丝状菌,其中,

所述ACE3变异体缺失与序列号1的1～160位氨基酸相当的区域。

5.如权利要求2～4中任一项所述的变异丝状菌,其中,

所述ACE3变异体具有与序列号1的280～701位氨基酸相当的区域。

6.如权利要求2～5中任一项所述的变异丝状菌,其中,

所述ACE3变异体缺失与序列号1的氨基酸序列中的C末端的11个氨基酸相当的区域。

7.如权利要求1～6中任一项所述的变异丝状菌,其中,

导入表达所述ACE3变异体的基因。

8.如权利要求7所述的变异丝状菌,其中,

表达所述ACE3变异体的基因与促进该基因的转录的调控区可操作地连接。

9.如权利要求1～8中任一项所述的变异丝状菌,其中,

所述丝状菌为木霉属。

10.一种蛋白质的制造方法,其中,

包括培养权利要求1～9中任一项所述的变异丝状菌的步骤。

11.如权利要求10所述的方法,其中,

所述蛋白质为纤维素酶和/或半纤维素酶。

12.如权利要求10或11所述的方法,其中,

所述培养在葡萄糖存在下进行。

13.一种变异丝状菌的制造方法,其中,

包括以表达ACE3变异体的方式使亲本丝状菌变异的步骤,

该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域实质上全部缺失的变异体。

14.如权利要求13所述的方法,其中,

所述ACE3为由序列号1的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列构成的多肽。

15.如权利要求14所述的方法,其中,

所述$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域为与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域。

16.如权利要求14所述的方法,其中,

所述ACE3变异体缺失与序列号1的1～160位氨基酸相当的区域。

17.如权利要求14～16中任一项所述的方法,其中,

所述ACE3变异体具有与序列号1的280～701位氨基酸相当的区域。

18.如权利要求14～17中任一项所述的方法,其中,

所述ACE3变异体缺失与序列号1的氨基酸序列中的C末端的11个氨基酸相当的区域。

19.如权利要求13～18中任一项所述的方法,其中,

所述亲本丝状菌的变异包括将表达所述ACE3变异体的基因导入该亲本丝状菌中的步骤。

20.如权利要求19所述的方法,其中,

表达所述ACE3变异体的基因与促进该基因的转录的调控区可操作地连接。

21.如权利要求13～20中任一项所述的方法,其中,

所述丝状菌为木霉属。

变异丝状菌和使用其的蛋白质的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种变异丝状菌和使用其的蛋白质的制造方法。

背景技术

[0002] 丝状菌是生产多种纤维素酶和半纤维素酶的植物性多糖的降解菌。其中,木霉(Trichoderma)能够同时且大量地生产纤维素酶和半纤维素酶,因此作为用于制造纤维素酶系生物质降解酶的微生物受到了关注。

[0003] 希望工业上用于微生物培养的碳源廉价并且是可溶性的。目前,作为微生物培养的碳源,通常使用葡萄糖。另一方面,在利用微生物的酶等蛋白质的生产中,有时需要诱导性物质。例如在利用微生物的纤维素酶生产中,通常诱导性物质是必须的。在木霉中,主要的纤维素酶基因cbh1、cbh2、egl1和egl2等的表达受纤维素、纤维二糖等诱导性物质诱导(非专利文献1)。在不使用诱导性物质的情况下,例如在只使用葡萄糖作为单一碳源的情况下,通常在木霉中几乎不生产糖化酶。

[0004] 作为使用诱导性物质的微生物学的蛋白质生产方法,已知有使用作为微晶性纤维素的阿维塞尔(Avicel)的纤维素酶生产方法。还公开了:不使用纤维素而使用可溶性的乳糖的纤维素酶生产方法(专利文献1);通过使来自木霉的纤维素酶(包括β葡萄糖苷酶、葡聚糖内切酶、纤维二糖水解酶)与葡萄糖在高温下进行反应,由葡萄糖合成槐糖和龙胆二糖等诱导性的糖,诱导纤维素酶生产的方法(专利文献2)。然而,纤维素底物昂贵,大多还是不溶性的,因此给生产工艺增加负荷,从成本和设备的方面考虑,不易用于工业用途。另外,从成本和工艺负荷的方面考虑,使用其它诱导性的糖的纤维素酶生产也存在缺点。

[0005] 因此,为了通过转录调节因子的变异来制作即使不利用诱导性物质也能够表达纤维素酶和木聚糖酶的微生物,进行了纤维素酶表达机理的解析。作为参与木霉的纤维素酶诱导表达的正转录因子,报告了XYR1、ACE2、ACE3、HAP2/3/5等(非专利文献2)。ACE3是主要进行作为纤维素酶的cbh1等启动子的控制的转录因子。ACE3通过位于N末端侧的第120～160位氨基酸的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)与启动子结合(非专利文献3)。另外,在非专利文献3中教导了ACE3和XYR1相互作用,调节里氏木霉的纤维素酶基因表达。

[0006] 在专利文献3和非专利文献4中公开了在里氏木霉中,通过增加和减少tre77513(ACE3)基因的表达而增加和降低其纤维素酶等生产率的方法。在专利文献4和非专利文献5中报告了使全部保留N侧的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域的6个半胱氨酸并且C末端缺失7位氨基酸～17位氨基酸的变异ACE3增强表达的丝状菌在不存在诱导性物质的条件下也提高了纤维素酶表达。在非专利文献5中还记载了一种增强表达该C末端缺失ACE3并且共表达XYR1的野生型或A824V突变体的丝状菌。但是,该丝状菌的该XYR1的共表达对纤维素酶表达的效果在诱导性物质存在下稍微能观察到,但在不存在诱导性物质的条件下观察不到。

[0007] 在非专利文献6中报告了在具有XYR1的A824V突变的木霉中,发生木聚糖酶的调节解除,纤维素酶生产增加。在非专利文献7中报告了在木霉株中,通过使ACE2的增强表达与XYR1的V821F突变组合,在以葡萄糖或蔗糖为碳源的培养基中,蛋白质生产率提高了。

[0008] (专利文献1)日本专利第6169077号公报

[0009] (专利文献2)日本专利第5366286号公报

[0010] (专利文献3)美国专利第9512415号公报

[0011] (专利文献4)国际公开公报第2018/067599号

[0012] (非专利文献1)Curr Genomics,2013,14:230-249

[0013] (非专利文献2)BMC Genomics,2015,16:326

[0014] (非专利文献3)J Biol Chem,2019,doi:10.1074/jbc.RA119.008497

[0015] (非专利文献4)Biotech Biofuels,2014,7:14

[0016] (非专利文献5)Biotech Biofuels,2020,13:137

[0017] (非专利文献6)Biotech Biofuels,2013,6:62

[0018] (非专利文献7)Biotech Biofuels,2017,10:30

发明内容

[0019] 本发明提供一种变异丝状菌,该变异丝状菌表达ACE3变异体,

[0020] 该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域实质上全部缺失的变异体。

[0021] 本发明还提供一种包括培养上述变异丝状菌的步骤的蛋白质的制造方法。

[0022] 本发明还提供一种变异丝状菌的制造方法,其包括以表达ACE3变异体的方式使亲本丝状菌变异的步骤,该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域实质上全部缺失的变异体。

附图说明

[0023] 图1是变异丝状菌所表达的ACE3变异体的结构。

[0024] 图2是变异丝状菌所表达的ACE3变异体的结构。

[0025] 图3是ACE3的DBD缺失对于蛋白质生产率的效果:(A)纵轴的值表示表达ACE3变异体的变异丝状菌的相对蛋白质生产率,横轴的1、2、3表示表达相同的ACE3变异体的3个变异丝状菌株,(B)变异丝状菌的培养物的凝胶电泳图像。

[0026] 图4是来自各种木霉属菌的ACE3变异体的氨基酸序列的比对。

[0027] 图5是表达来自各种木霉属菌的ACE3变异体的变异丝状菌的蛋白质生产:(A)相对蛋白质生产率,(B)变异丝状菌的培养物的凝胶电泳图像。

[0028] 图6是ACE3的C末端缺失对于蛋白质生产率的效果:(A)表达ACE3变异体的变异丝状菌的相对蛋白质生产率,(B)变异丝状菌的培养物的凝胶电泳图像。

[0029] 图7是突变XYR1和ACE3变异体的共表达对于蛋白质生产率的效果:(A)变异丝状菌的培养物的凝胶电泳图像,(B)变异丝状菌的培养物的蛋白质组成比。

[0030] 图8是突变XYR1表达、ACE3的DBD缺失和C末端缺失的组合对于蛋白质生产率的效果:(A)变异丝状菌的培养物的凝胶电泳图像,(B)变异丝状菌的培养物的蛋白质组成比。

具体实施方式

[0031] 在本说明书中引用的全部专利文献、非专利文献和其它的刊行物,其全部在本说明书中作为参考而被引用。

[0032] 在本说明书中,氨基酸序列和核苷酸序列的相同性可以利用Lipman-Pearson法(Science,1985,227:1435-1441)进行计算。具体而言,可以利用遗传信息处理软件Genetyx-Win(Ver.5.1.1;软件开发)的同源性分析(Search homology)程序,将Unit size to compare(ktup)设为2进行分析而算出。

[0033] 在本说明书中,关于氨基酸序列和核苷酸序列的“至少90%的相同性”是指90%以上、优选92%以上、更优选94%以上、进一步优选95%以上、进一步优选96%以上、进一步优选98%以上、进一步优选99%以上的相同性。

[0034] 在本说明书中,只要没有另行定义,关于氨基酸序列和核苷酸序列中的氨基酸和核苷酸的缺失、取代、添加或插入所使用的“1个或多个”例如可以是指1～20个、优选1～16个、更优选1～12个、进一步优选1～8个、进一步优选1～4个。在本说明书中,氨基酸或核苷酸的“添加”包括向序列的一个末端和两个末端添加1个或多个氨基酸或核苷酸。另外,在本说明书中,氨基酸或核苷酸的“插入”包括向规定的位置的5’侧或3’侧插入氨基酸或核苷酸。

[0035] 在本说明书中,氨基酸序列或核苷酸序列上的“相当的位置”或“相当的区域”可以通过以给予最大的相同性的方式使目标序列和参照序列(例如序列号1的氨基酸序列)匹配(比对)而确定。氨基酸序列或核苷酸序列的比对可以利用公知的算法实施,其方法对本领域技术人员来说是公知的。例如,比对可以通过以默认设置使用Clustal W多序列比对程序(Thompson,J.D.et al,1994,Nucleic Acids Res.22:4673-4680)而进行。例如,可以在欧洲生物信息研究所(Europe an Bioinformatics Institute:EBI[www.ebi.ac.uk/index.html])、国立遗传学研究所运营的日本DNA数据库(DDBJ[www.ddbj.nig.ac.jp/search es-j.html])的网站上利用Clustal W。通过上述比对,与参照序列的任意位置匹配的目标序列的位置视为与该任意的位置“相当的位置”。另外,相当的位置所夹的区域或由相当的模体(motif)构成的区域视为“相当的区域”。

[0036] 本领域技术人员能够对上述所得到的氨基酸序列的比对进行微调整,使其最佳化。这样的最佳比对优选考虑氨基酸序列的类似性和所插入的间隙的频率等而确定。其中,氨基酸序列的类似性是指,在对2个氨基酸序列进行比对时,该两个序列中存在相同或类似的氨基酸的位置的个数相对于全长氨基酸数的比例(%)。类似的氨基酸是指,在构成蛋白质的20种氨基酸中,在极性或电荷的方面具有彼此类似的性质并且发生所谓的保守性替换这样的氨基酸。由这样的类似的氨基酸构成的组是本领域技术人员所公知的,例如分别可以列举精氨酸与赖氨酸;谷氨酸与天冬氨酸;丝氨酸与苏氨酸;谷氨酰胺与天冬酰胺;亮氨酸与异亮氨酸等,但并不限定于这些。

[0037] 在本说明书中,“氨基酸”是指构成蛋白质的20种氨基酸、丙氨酸(Ala或A)、精氨酸(Arg或R)、天冬酰胺(Asn或N)、天冬氨酸(Asp或D)、半胱氨酸(Cys或C)、谷氨酰胺(Gln或Q)、谷氨酸(Glu或E)、甘氨酸(Gly或G)、组氨酸(His或H)、异亮氨酸(Ile或I)、亮氨酸(Leu或L)、赖氨酸(Lys或K)、甲硫氨酸(Met或M)、苯丙氨酸(Phe或F)、脯氨酸(Pro或P)、丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、色氨酸(Trp或W)、酪氨酸(Tyr或Y)和缬氨酸(Val或V)。

[0038] 在本说明书中,启动子等调控区与基因的“可操作的连接”是指将基因和调控区以该基因能够在该调控区的控制下表达的方式连接。基因和调控区的“可操作的连接”的方法对于本领域技术人员是众所周知的。

[0039] 在本说明书中,关于基因的“上游”和“下游”是指该基因的转录方向的上游和下游。例如,“配置在启动子下游的基因”是指在DNA有义链中在启动子的3’侧存在该基因,基因的上游是指DNA有义链中的该基因的5’侧的区域。

[0040] 在本说明书中,对于细胞的功能、性状、特质所使用的术语“内源”和“天然(native)”是为了表示该功能、性状、特质原本就存在于该细胞中而使用。相对而言,术语“外源”是为了表示不是原本存在于该细胞而是从外部导入的功能、性状、特质而使用。例如,“外源”基因或多核苷酸是从外部导入细胞内的基因或多核苷酸。外源基因或多核苷酸可以来自与其导入的细胞同种的生物,也可以来自异种的生物(即异种基因或多核苷酸)。

[0041] 本发明涉及提供一种变异丝状菌及其制造方法、以及使用该变异丝状菌的蛋白质的制造方法。

[0042] 本发明的发明人发现,表达缺失了$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(在以下的本说明书中,也简称为“DBD”)的ACE3变异体(variant)的变异丝状菌在纤维素酶、半纤维素酶的生产中不使用目前必须的诱导性物质,大量生产纤维素酶、半纤维素酶等蛋白质。

[0043] 本发明所提供的变异丝状菌在以葡萄糖等纤维素酶非诱导性碳源为主要碳源的环境下也能够高效地生产蛋白质。另外,即使不使用昂贵的纤维素酶诱导性物质,该丝状菌也能够高效地生产纤维素酶、半纤维素酶等蛋白质。利用本发明,能够实现使用丝状菌的蛋白质生产的效率化和成本下降。

[0044] 本发明涉及提高丝状菌的蛋白质生产率。目前,在葡萄糖的存在下培养丝状菌时,由于分解代谢物阻遏,蛋白质生产有时被抑制。特别是丝状菌的纤维素酶、半纤维素酶等纤维素酶系生物质降解酶的表达,通常需要由纤维素、槐糖、纤维寡糖(纤维二糖、纤维三糖、纤维四糖、纤维五糖、纤维六糖等)等纤维素酶诱导性物质诱导,另一方面,在葡萄糖的存在下表达诱导被抑制。

[0045] 丝状菌的因该诱导性物质而产生的纤维素酶系生物质降解酶的诱导表达受XYR1、Cre1、ACE1、ACE2、ACE3、HAP2/3/5等许多转录因子控制。ACE3为丝状菌的纤维素酶和半纤维素酶的转录激活因子。ACE3在乳糖诱导时的纤维素酶基因和一部分木聚糖酶基因的转录中是必须的。另外,ACE3也部分参与xyr1的转录控制。里氏木霉的ACE3在ncbi数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/])中登记为NCBI Reference Sequence:QEM24913.1,其中,ACE3由序列号1的氨基酸序列构成,并且作为序列号6的核苷酸序列所编码的多肽而被规定。另外,根据NCBI Reference Sequence:XP__006966092.1[www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP__006966092.1],在序列号1的氨基酸序列中,523～734位是被推定为与XYR1相互作用的区域,391～522位是被推定为丝状菌特异性转录因子结构域的区域,120～160位是被推定为$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)的区域。编码DBD的基因被内含子分成2个区域。其一方(Exon2)编码DBD的N侧的含有2个Cys的区域(C2),另一方(Exon3)编码含有剩余4个Cys的区域(C4)。在其它的木霉属菌中也存在具有同等的结构的ACE3。

[0046] 报告了ACE3的C末端氨基酸的缺失能够使丝状菌在不存在诱导性物质的条件下生产蛋白质(非专利文献5)。但是,在非专利文献5中公开了该C末端缺失所产生的效果因DBD的C2的缺失而消失。

[0047] 对此,本发明的发明人发现,不仅DBD的C2而且C4也缺失了的ACE3变异体能够对丝状菌赋予在不存在诱导性物质的条件下表达纤维素酶和半纤维素酶的能力,并且该丝状菌

能够在葡萄糖等的纤维素酶非诱导性碳源的存在下高表达纤维素酶和半纤维素酶等蛋白质。另外,该ACE3的C2和C4缺失与C末端缺失组合时,能够协同提高蛋白质生产率。

[0048] 因此,在一个方式中,本发明提供一种表达DBD实质上全部缺失的ACE3变异体的变异丝状菌和该变异丝状菌的制造方法。本发明的变异丝状菌可以通过以表达该DBD实质上全部缺失的ACE3变异体的方式使亲本丝状菌变异来制造。所制造的本发明的变异丝状菌表达该DBD实质上全部缺失的ACE3变异体。

[0049] ACE3的DBD位于ACE3的氨基酸序列的N末端侧、具体位于与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域,其中,120～131位为C2,132～160位为C4。在本说明书中,“DBD实质上全部缺失”是指DBD具有C2的一部分或全部缺失和C4的一部分或全部缺失,优选是指DBD缺失C2的全部和C4的一部分或全部。其中,“C4的一部分”优选是指C4中的含有至少2个Cys的区域,更优选是指C4中的含有至少3个Cys的区域,进一步优选是指C4中的含有4个Cys的区域,例如与序列号1的132～151位氨基酸相当的区域。作为本说明书中的“DBD实质上全部缺失”的例子,可以列举DBD的氨基酸序列的80％以上、优选90％以上、更优选95％以上缺失并且DBD中的6个Cys缺失的状态。

[0050] 本发明的变异丝状菌的亲本丝状菌为经受表达上述DBD实质上全部缺失的ACE3变异体的变异而制备成本发明的变异丝状菌的丝状菌。该亲本丝状菌优选为原本就表达ACE3的丝状菌。例如,该亲本丝状菌优选表达具有全部DBD的天然的ACE3或其变异体。更优选该亲本丝状菌为表达具有全部DBD的天然的ACE3或其变异体并且具有纤维素酶活性的菌。

[0051] 作为本发明所使用的亲本丝状菌的例子,没有限定,可以列举真菌门(Eumycota)和卵菌门(Oomycota)所属的丝状菌。作为更详细的例子,可以列举木霉(Trichoderma)属、曲霉(Aspergillus)属、青霉(Penicillium)属、链孢霉(Neurospora)属、镰刀菌(Fusarium)属、金孢子菌(Chrysosporium)属、腐质霉(Humicola)属、裸胞壳(Emericella)属、肉座菌(Hypocrea)属、枝顶孢(Acremonium)属、毁丝霉(Myceliophthora)属、梨囊鞭菌(Piromyces)属、篮状菌(Talaromyces)属、嗜热子囊菌(Thermoascus)属、梭孢壳(Thielavia)属等丝状菌。其中,优选木霉属的丝状菌。

[0052] 作为该木霉属的丝状菌(以下,也称为木霉属菌)的例子,可以列举里氏木霉(Trichoderma reesei)、长枝木霉(Trichoderma longibrachiatum)、哈茨木霉(Trichoderma harzianum)、康氏木霉(Trichoderma koningii)、绿色木霉(Trichoderma viride)、深绿木霉(Trichoderma atroviride)等,优选列举里氏木霉及其突变株。例如,优选使用里氏木霉QM9414株及其突变株、优选里氏木霉PC-3-7株(ATCC66589)、里氏木霉PCD-10株(FERM P-8172)、里氏木霉E1AB1株(以下,有时也称为JN13株)或它们的突变株等作为亲本丝状菌。E1AB1株是相对于里氏木霉PC-3-7株使用egl1启动子表达来自棘孢曲霉(Aspergillus aculeatus)的β-葡萄糖苷酶(BGL)的株(参照Enzyme and Microbial Technology(2016)82:89-95和WO2013/115305的实施例1～3)。

[0053] 本发明的变异丝状菌所表达的ACE3变异体可以通过以DBD实质上全部缺失的方式使亲本ACE3变异而得到。该亲本ACE3可以为具有部分或全部DBD的天然的ACE3或其变异体等。优选该亲本ACE3可以为至少具有DBD的C4的天然的ACE3或其变异体等。优选该亲本ACE3为来自木霉属菌的ACE3或其变异体。作为该木霉属菌的例子,可以列举上述的木霉属菌,优选列举里氏木霉、哈茨木霉和深绿木霉。

[0054] 作为该亲本ACE3的优选的例子,可以列举由序列号1～4的氨基酸序列构成的ACE3或其变异体。序列号1表示里氏木霉的全长ACE3的氨基酸序列。序列号2表示里氏木霉的DBD部分(C2)缺失ACE3变异体的氨基酸序列。序列号3表示深绿木霉的DBD部分(C2)缺失ACE3变异体的氨基酸序列。序列号4表示哈茨木霉的DBD部分(C2)缺失ACE3变异体的氨基酸序列。

[0055] 作为该亲本ACE3的其它优选的例子,可以列举由与序列号1～4中任意的氨基酸序列至少90％序列相同的氨基酸序列构成的多肽。作为该亲本ACE3的其它优选的例子,可以列举由对于序列号1～4中任意的氨基酸序列缺失、取代、添加或插入1个或多个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽。这些亲本ACE3的多肽具有与天然ACE3(例如序列号1)的DBD的一部分或全部相当的序列,优选如天然ACE3那样,能够作为纤维素酶和半纤维素酶的转录激活因子发挥功能。

[0056] 本发明的变异丝状菌所表达的ACE3变异体的DBD实质上全部缺失。优选该ACE3变异体缺失了至少与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域。另外,该ACE3变异体也可以缺失比DBD更靠N末端侧的区域、比DBD更靠C末端侧的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体缺失了与序列号1的120～151位氨基酸相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体缺失了与序列号1的1～151位氨基酸相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体缺失了与序列号1的1～160位氨基酸相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体缺失了与序列号1的1～200位氨基酸相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体缺失了与序列号1的1～240位氨基酸相当的区域。

[0057] 该ACE3变异体除了上述的DBD缺失以外,C末端区域也可以缺失。作为C末端区域缺失的例子,可以列举作为非专利文献5所公开的导致蛋白质生产率提高的缺失的C末端的7个氨基酸～17个氨基酸的缺失。在一个实施方式中,该ACE3变异体可以缺失与序列号1的氨基酸序列中的C末端的至少7个氨基酸(728位～C末端)～最大17个氨基酸(718位～C末端)相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体可以缺失选自与序列号1的从C末端数起的-7～-17位(718～728位)氨基酸相当的氨基酸中的1个以上的氨基酸。在一个实施方式中,该ACE3变异体可以缺失与序列号1的氨基酸序列中的C末端的11个氨基酸(724位～C末端)相当的区域。在一个实施方式中,该ACE3变异体相对于亲本ACE3没有C末端的缺失。

[0058] 优选在该ACE3变异体中,保留上述的包含DBD的区域和C末端区域以外的氨基酸。

[0059] 在优选的例子中,该ACE3变异体具有至少与序列号1的280～701位氨基酸相当的区域。更优选该ACE3变异体具有与序列号1的280～717位氨基酸相当的区域。更优选该ACE3变异体具有与序列号1的280～723位氨基酸相当的区域。该ACE3变异体也可以含有与序列号1的280～727位氨基酸相当的区域。

[0060] 在更优选的例子中,该ACE3变异体具有与序列号1的260～701位氨基酸相当的区域。进一步优选该ACE3变异体具有与序列号1的260～717位氨基酸相当的区域。进一步优选该ACE3变异体具有与序列号1的260～723位氨基酸相当的区域。该ACE3变异体也可以具有与序列号1的260～727位氨基酸相当的区域。

[0061] 在进一步优选的例子中,该ACE3变异体具有与序列号1的250～701位氨基酸相当的区域。进一步优选该ACE3变异体具有与序列号1的250～717位氨基酸相当的区域。进一步优选该ACE3变异体具有与序列号1的250～723位氨基酸相当的区域。该ACE3变异体也可以具有与序列号1的250～727位氨基酸相当的区域。

[0062] 在进一步优选的例子中,该ACE3变异体具有与序列号1的241～701位氨基酸相当的区域。进一步更优选该ACE3变异体具有与序列号1的241～717位氨基酸相当的区域。进一步优选该ACE3变异体具有与序列号1的241～723位氨基酸相当的区域。该ACE3变异体也可以具有与序列号1的241～727位氨基酸相当的区域。

[0063] 优选上述所列举的与序列号1的各氨基酸区域相当的区域分别相对于该序列号1的各氨基酸区域至少90％序列相同或100％序列相同。

[0064] 或者,在没有C末端区域缺失的情况下,该ACE3变异体优选具有与序列号1的280～734位氨基酸相当的区域,更优选具有与序列号1的260～734位氨基酸相当的区域,进一步优选具有与序列号1的250～734位氨基酸相当的区域,进一步优选具有与序列号1的241～734位氨基酸相当的区域。优选上述所列举的与序列号1的各氨基酸区域相当的区域分别相对于该序列号1的各氨基酸区域至少90％序列相同或100％序列相同。

[0065] 作为以表达前述的DBD实质上全部缺失、以及根据需要缺失C末端区域的ACE3变异体(以下,也称为目标ACE3变异体)的方式使亲本丝状菌变异的方法,例如可以列举:将编码目标ACE3变异体的外源基因导入亲本丝状菌中并使其表达的方法;使编码亲本丝状菌原本就具有的ACE3的基因向编码目标ACE3变异体的基因突变的方法。

[0066] 编码目标ACE3变异体的基因(目标基因)可以通过基因工程或化学方法进行合成。例如从木霉属菌等丝状菌的基因组DNA中分离编码亲本ACE3的基因(亲本基因)的DNA,接着,使编码DBD的区域的一部分或全部、以及根据需要编码C末端区域的部位缺失,从而能够制备目标基因。作为亲本基因的例子,可以列举由序列号6～9的核苷酸序列或与其至少90％序列相同的序列构成的多核苷酸。或者,可以基于公知的序列信息,对编码DBD的区域的一部分或全部、以及编码C末端区域的部位缺失了的目标基因进行化学合成。ACE3的序列信息可以从ncbi数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/])等获得。根据需要,目标基因也可以与导入其的宿主(亲本丝状菌)匹配而进行密码子最佳化。各种生物所使用的密码子信息可以从Codon Usage Database([www.kazusa.or.jp/codon/])获得。

[0067] 作为将编码目标ACE3变异体的外来基因导入亲本丝状菌的方法,例如可以列举利用重组的方法和使用表达载体的方法。例如,可以通过同源重组或非同源重组,将亲本丝状菌的基因组的指定区域替换成目标基因。作为丝状菌用的表达载体的例子,可以列举酵母表达载体pNAN8142(Biosci Biotechnol Biochem,1996,60:383-389)、pMA91(Biosci Biotechnol Biochem,1998,62:1615-1618)等。

[0068] 作为使亲本丝状菌的编码ACE3的基因突变的方法,例如可以列举利用重组的方法。例如,可以通过同源重组或非同源重组,将亲本丝状菌的基因组中的亲本基因替换成编码目标ACE3变异体的基因(目标基因)。或者,通过同源重组或非同源重组,将基因组中的亲本基因的DBD编码区域替换成DBD缺失片段,也可以使亲本基因向目标基因突变。

[0069] 在重组的具体方法的例子中,首先,构建包含目标基因或DBD缺失片段和根据需要的药剂耐受性基因或营养要求基因的重组用DNA构建体,利用通常方法将其导入亲本丝状菌中。接着,将药剂耐受性或营养要求性等作为指标,选择基因组上导入了该重组用构建体的转化株。根据需要,通过基因组分析或酶活性分析,也可以确认所得到的转化株具有目标突变。

[0070] DNA构建体向亲本丝状菌的导入可以使用通常用于质粒等的转化的载体。DNA构建

体或载体向细胞的导入例如可以利用原生质体法、原生质体PEG法、感受态细胞法等通常方法。作为DNA构建体的导入用的载体,只要能够在宿主细胞内稳定保持并增殖,就没有特别限定,例如可以列举质粒、黏粒、噬菌体、病毒、YAC、BAC等常用的载体。其中,优选质粒载体。作为导入用载体的例子,可以列举pUC118等。

[0071] 在优选的实施方式中,本发明的变异丝状菌高表达目标ACE3变异体。通过对亲本丝状菌进一步进行提高目标ACE3变异体的表达这样的变异,能够得到高表达目标ACE3变异体的变异丝状菌。作为提高该ACE3变异体的表达的方法,可以列举通过编码该ACE3变异体的基因(目标基因)的转录量的方法。作为提高目标基因的转录量的方法,例如可以列举:在亲本丝状菌的基因组上的目标基因的调控区取代或插入强烈促进该基因的转录的调控区(强调控区)后,将该强调控区与目标基因可操作地连接。或者,将根据需要与调控区(优选强调控区)可操作地连接的该目标基因片段导入亲本丝状菌的基因组或质粒中,再在细胞内增加能够表达的目标基因的数量,从而能够提高目标基因的转录量。

[0072] 作为能够用于提高该转录量的调控区的例子,关于即使在高葡萄糖条件下转录量也不降低的基因、例如木霉属菌,可以列举甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(gpd)、丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)(pdc)、烯醇化酶(enolase)(eno)、醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)(adh)、磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)(tpi)、醛缩酶(aldolase)(fba)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase)(pyk)、柠檬酸合酶(citrate synthase)(cit)、α-酮戊二酸脱氢酶(α-ketoglutarate dehydrogenase)(kdh)、醛脱氢酶I(aldehyde dehydrogenase I)(ald1)、醛脱氢酶II(aldehyde dehydrogenase II)(ald2)、丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)(pda)、葡糖激酶(glucokinase)(glk)、肌动蛋白(actin)(act1)、翻译延长因子1α(translation elongation factor 1α)(tef1)等基因的调控区。其中,作为优选的强调控区的例子,可以列举pdc基因(TRIREDRAFT__121534)的启动子、act1基因(TRIREDRAFT__44504)的启动子等。

[0073] 优选本发明的变异丝状菌的目标ACE3变异体的表达量比亲本丝状菌的ACE3的表达量提高了。目标ACE3变异体的表达量可以通过定量PCR、微阵列、蛋白质印迹、ELISA、HPLC等公知的方法作为蛋白质的量或编码其的基因的转录量进行定量。

[0074] 优选本发明的变异丝状菌还表达XYR1(木聚糖酶调节因子1、Xylanase regulator 1)。更优选以高表达XYR1的方式,使本发明的变异丝状菌变异。XYR1为丝状菌的纤维素酶和半纤维素酶的转录激活因子。XYR1为具有$Zn(II)_2Cys_6$双核簇域(binuclear cluster domain)的木聚糖酶基因表达调节的主要因子,广泛保存在木霉属(XYR1)、镰刀菌属(XYR1)、链孢霉属(XYR1)、曲霉属(XLNR)等的不包括酵母的子囊菌中。里氏木霉的XYR1控制木聚糖酶木糖代谢基因、纤维素酶基因的全部。里氏木霉的XYR1在ncbi数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/])中登录为NCBI Reference Sequence:XP__006966092.1,其是由被序列号10的核苷酸序列所构成的多核苷酸编码的序列号5的氨基酸序列构成的多肽。

[0075] 作为本发明的变异丝状菌高表达的XYR1的例子,可以列举由序列号5的氨基酸序列构成的多肽。作为该XYR1的其它的例子,可以列举由与序列号5的氨基酸序列至少90%序列相同的氨基酸序列构成的多肽、和由相对于序列号5的氨基酸序列缺失、取代、添加或插入1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽。这些多肽能够作为纤维素酶和半纤维

素酶的转录激活因子发挥功能。

[0076] 本发明的变异丝状菌高表达的XYR1也可以为突变XYR1。作为该突变XYR1的优选的例子,可以列举相对于由序列号5的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列构成的XYR1的多肽(亲本XYR1),与序列号5的810～833位相当的区域中的至少1个氨基酸突变(即取代、缺失、插入或添加)了的突变XYR1。作为这样的突变XYR1,可以列举PCT/JP2020/042489所公开的突变XYR1。

[0077] 优选该突变XYR1相对于亲本XYR1,取代了选自与序列号5的817位、821位、824位、825位和826位相当的位置的氨基酸中的至少1个氨基酸。

[0078] 更优选该突变XYR1由与序列号5的氨基酸序列至少90％序列相同的氨基酸序列构成,并且具有选自以下的任一个以上的氨基酸:

[0079] 与序列号5的817位相当的位置的Tyr;

[0080] 与序列号5的821位相当的位置的Lys、Phe、Trp或Tyr,优选Phe;

[0081] 与序列号5的824位相当的位置的Val、Glu、Ile、Leu、Lys、Phe、Thr、Trp或Tyr,优选Val;

[0082] 与序列号5的825位相当的位置的Tyr;

[0083] 与序列号5的826位相当的位置的Val、Ile、Leu、Phe、Trp或Tyr;

[0084] 更优选该突变XYR1为相对于亲本XYR1,与序列号5的821位相当的位置的Val被Phe取代了的突变体(V821F),或者为与序列号5的824位相当的位置的Ala被Val取代了的突变体(A824V)。

[0085] 作为使XYR1在变异丝状菌中高表达的方法,可以使用与前述的ACE3变异体的高表达方法相同的方法。例如,可以导入与强调控区可操作地连接的编码XYR1的外源基因,使其在该变异丝状菌中进行表达,或者使亲本丝状菌原本就具有的基因组上的XYR1基因与强调控区可操作地连接,或者增加变异丝状菌能够表达的XYR1基因的数量。

[0086] 按照以上的步骤所制造的本发明的变异丝状菌表达前述的DBD实质上全部缺失了的ACE3变异体。这样的本发明的变异丝状菌在不存在纤维素酶诱导性物质的条件下,蛋白质生产率提高了。该变异丝状菌即使在以葡萄糖等纤维素酶非诱导性碳源为主要碳源的环境下,例如在不存在纤维素酶诱导性物质的条件下,也能够高效地生产蛋白质。另外,该变异丝状菌即使在不存在纤维素、槐糖和纤维寡糖等纤维素酶诱导性物质的条件下,也能够表达纤维素酶、半纤维素酶等纤维素酶系生物质降解酶。

[0087] 在优选的实施方式中,本发明的变异丝状菌表达该DBD实质上全部缺失以及前述的具有C末端区域的缺失的ACE3变异体。通过使C末端区域的缺失与该DBD的缺失组合,该变异丝状菌的蛋白质生产率协同提高。

[0088] 在其它的优选的实施方式中,本发明的变异丝状菌除了表达该DBD实质上全部缺失的ACE3变异体以外,如上所述,还高表达XYR1。通过使该ACE3变异体和XYR1的表达组合,变异丝状菌所生产的蛋白质中的纤维素酶含量增加,能够进行有效的纤维素酶生产。

[0089] 在更优选的实施方式中,本发明的变异丝状菌表达前述的具有DBD实质上全部缺失和C末端区域缺失的ACE3变异体,并且高表达XYR1。这样的变异丝状菌同时实现蛋白质生产率的提高和所生产的蛋白质中的纤维素酶含量的增加。

[0090] 因此,在另一个方式中,本发明提供一种使用前述的本发明的变异丝状菌的蛋白

质的制造方法。在本发明的蛋白质的制造方法中,培养本发明的变异丝状菌。通过培养,在培养物中生成并蓄积目标蛋白质。通过从该培养物中分离目标蛋白质,能够制造目标蛋白质。

[0091] 作为所制造的目标蛋白质的例子,可以列举纤维素酶、半纤维素酶等的纤维素酶系生物质降解酶、外切葡聚糖酶、内切葡聚糖酶、β-葡萄糖苷酶、蛋白酶、脂肪酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳糖酶、淀粉酶等,但并不限定于这些。该目标蛋白质可以为1种蛋白质,也可以为多种蛋白质的混合物。优选该目标蛋白质为纤维素酶系生物质降解酶,更优选为纤维素酶和/或半纤维素酶,进一步优选为纤维素酶和半纤维素酶。作为该半纤维素酶的例子,可以列举木聚糖酶、β-木糖苷酶、α-阿拉伯呋喃糖酶等,其中优选木聚糖酶。

[0092] 或者,该目标蛋白质也可以为丝状菌原本不生产的异种蛋白质。在这种情况下,对于本发明的突变丝状菌,通过插入编码异种蛋白质的基因,制作重组丝状菌,通过培养该重组丝状菌,能够得到含有异种蛋白质的蛋白质。另外,通过使编码该异种蛋白质的基因与在丝状菌中发挥功能的分泌信号肽可操作地连接,能够在培养物中分泌生产该异种蛋白质。

[0093] 该蛋白质制造所使用的培养基只要含有碳源、氮源、无机盐、维生素等通常的丝状菌的增殖和蛋白质生产所需的成分,可以为合成培养基、天然培养基中的任意种。

[0094] 作为碳源,只要是该突变丝状菌能够利用的碳源,可以是任意种,例如可以列举葡萄糖、果糖等的糖质、山梨糖醇这样的糖醇、乙醇、甘油这样的醇类、乙酸这样的有机酸类等。这些可以单独使用,或者将多种组合使用。

[0095] 优选在本发明的蛋白质的制造方法中,在以纤维素酶非诱导性碳源为主要碳源的环境下培养该突变丝状菌。作为纤维素酶非诱导性碳源,可以列举葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘油等。其中,从成本的方面考虑,优选葡萄糖。在所制造的目标蛋白质为纤维素酶系生物质降解酶的情况下,本方法中的培养可以在纤维素、槐糖和纤维寡糖等纤维素酶诱导性物质的存在下进行,但即使在不存在该诱导性物质的条件下也能够进行该目标蛋白质的高生产,并不限定于该诱导性物质的使用或不使用的情况。另外,在本发明中,为了进一步降低分解代谢物阻遏,并且高效地生产纤维素酶系生物质降解酶等蛋白质,可以一边流加葡萄糖等非诱导性碳源,一边培养该突变丝状菌。此时,从培养效率、能够抑制培养中的起泡的方面考虑,优选使该纤维素酶非诱导性碳源、例如葡萄糖溶解在作为氮源的氨水或含有铵盐的水溶液中,再流加该溶解液进行培养。

[0096] 作为氮源,可以列举氨、硫酸铵等铵盐、胺等氮化合物、蛋白胨、大豆水解物这样的天然氮源等。

[0097] 作为无机盐,可以列举磷酸钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、碳酸钾等。

[0098] 作为维生素,可以列举生物素、硫胺素等。根据需要,还可以添加本发明的丝状菌生长所要求的物质。

[0099] 培养优选在振荡培养、通气搅拌培养这样的好气条件下进行。培养温度优选为10℃以上,更优选为20℃以上,更优选为25℃以上,并且优选为50℃以下,更优选为42℃以下,更优选为35℃以下。另外,优选为10~50℃,更优选为20~42℃,更优选为25~35℃。培养时的pH为3~9,优选为4~5。培养时间为10小时~10日,优选为2~7日。

[0100] 培养后,利用通常方法从所得到的培养物中分离目标蛋白质。例如,回收培养物,根据需要进行利用超声波、加压等的菌体破碎处理,适当组合过滤、离心分离、超滤、盐析、

透析、色谱等,由此能够从该培养物中分离目标蛋白质。目标蛋白质的分离程度没有特别限定。例如,可以作为含有目标蛋白质的组合物获得培养上清液或其粗分离精制物。

[0101] 作为例示的实施方式,本发明还包含以下的物质、制造方法、用途、方法等。但是,本发明并不限定于这些实施方式。

[0102] 〔1〕一种变异丝状菌,其中,该变异丝状菌表达ACE3变异体,

[0103] 该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)实质上全部缺失的变异体。

[0104] 〔2〕如〔1〕所述的变异丝状菌,其中,优选上述ACE3为由序列号1～4中任意的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列构成的多肽。

[0105] 〔3〕如〔2〕所述的变异丝状菌,其中,优选上述$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)为与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域。

[0106] 〔4〕如〔2〕所述的变异丝状菌,其中,优选上述ACE3变异体为以下的(1)～(4)中的任意种:

[0107] (1)具有上述DBD中的C2的一部分或全部缺失和C4的一部分或全部缺失,其中,该C2为与序列号1的120～131位相当的区域,该C4为与序列号1的132～160位相当的区域,并且该C4的一部分优选是指C4中的含有至少2个Cys的区域,更优选是指C4中的含有至少3个Cys的区域,进一步优选是指C4中的含有4个Cys的区域,进一步优选是指与序列号1的132～151位氨基酸相当的区域;

[0108] (2)与序列号1的120～160位氨基酸相当的区域的氨基酸序列的80％以上、优选90％以上、更优选95％以上缺失,并且该区域中的6个Cys缺失;

[0109] (3)缺失与序列号1的120～151位氨基酸相当的区域;

[0110] (4)缺失与序列号1的1～151位氨基酸相当的区域,或者

[0111] 更优选上述ACE3变异体为以下的(5)～(7)中的任意种:

[0112] (5)缺失与序列号1的1～160位氨基酸相当的区域;

[0113] (6)缺失与序列号1的1～200位氨基酸相当的区域;

[0114] (7)缺失与序列号1的1～240位氨基酸相当的区域。

[0115] 〔5〕如〔2〕～〔4〕中任一项所述的变异丝状菌,其中,关于上述ACE3变异体,

[0116] 优选与序列号1的氨基酸序列中的C末端的至少7个氨基酸～最多17个氨基酸相当的区域缺失,

[0117] 优选选自与序列号1的从C末端数起的-7～-17位(718～728位)氨基酸相当的氨基酸中的1个以上的氨基酸缺失,或者

[0118] 更优选与序列号1的氨基酸序列中的C末端的11个氨基酸相当的区域缺失。

[0119] 〔6〕如〔2〕～〔5〕中任一项所述的变异丝状菌,其中,关于上述ACE3变异体,

[0120] 优选具有与序列号1的280～701位氨基酸相当的区域,

[0121] 优选具有与序列号1的280～717位氨基酸相当的区域,

[0122] 优选具有与序列号1的280～723位氨基酸相当的区域,

[0123] 优选具有与序列号1的280～727位氨基酸相当的区域,

[0124] 优选具有与序列号1的260～701位氨基酸相当的区域,

[0125] 优选具有与序列号1的260～717位氨基酸相当的区域,

[0126] 优选具有与序列号1的260～723位氨基酸相当的区域，

[0127] 优选具有与序列号1的260～727位氨基酸相当的区域，

[0128] 优选具有与序列号1的250～701位氨基酸相当的区域，

[0129] 优选具有与序列号1的250～717位氨基酸相当的区域，

[0130] 优选具有与序列号1的250～723位氨基酸相当的区域，

[0131] 优选具有与序列号1的250～727位氨基酸相当的区域，

[0132] 优选具有与序列号1的241～701位氨基酸相当的区域，

[0133] 优选具有与序列号1的241～717位氨基酸相当的区域，

[0134] 优选具有与序列号1的241～723位氨基酸相当的区域，或者

[0135] 优选具有与序列号1的241～727位氨基酸相当的区域。

[0136] 〔7〕如权利要求〔1〕～〔6〕中任一项所述的变异丝状菌，其中，优选导入表达上述ACE3变异体的基因。

[0137] 〔8〕如〔7〕所述的变异丝状菌，其中，优选表达上述ACE3变异体的基因与促进该基因的转录的调控区可操作地连接，

[0138] 优选该调控区选自pdc启动子和act1启动子。

[0139] 〔9〕如〔1〕～〔8〕中任一项所述的变异丝状菌，其中，上述丝状菌优选为木霉属，更优选为里氏木霉或其突变株。

[0140] 〔10〕如〔1〕～〔9〕中任一项所述的变异丝状菌，其中，上述变异丝状菌优选表达XYR1或突变XYR1，更优选表达突变XYR1，

[0141] 优选该XYR1或突变XYR1为由序列号5的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列构成的多肽，

[0142] 优选该突变XYR1相对于序列号5的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列，与序列号5的810～833位相当的区域中的至少1个氨基酸突变，

[0143] 更优选该突变XYR1相对于序列号5的氨基酸序列或与其至少90％序列相同的氨基酸序列，选自与序列号5的817位、821位、824位、825位和826位相当的位置的氨基酸中的至少1个氨基酸被取代，

[0144] 进一步优选该突变XYR1由与序列号5的氨基酸序列至少90％序列相同的氨基酸序列构成，并且具有选自以下中的任一个以上的氨基酸：

[0145] 与序列号5的817位相当的位置的Tyr；

[0146] 与序列号5的821位相当的位置的Lys、Phe、Trp或Tyr，优选Phe；

[0147] 与序列号5的824位相当的位置的Val、Glu、Ile、Leu、Lys、Phe、Thr、Trp或Tyr，优选Val；

[0148] 与序列号5的825位相当的位置的Tyr；

[0149] 与序列号5的826位相当的位置的Val、Ile、Leu、Phe、Trp或Tyr。

[0150] 〔11〕一种蛋白质的制造方法，其中，包括培养上述〔1〕～〔10〕中任一项所述的变异丝状菌的步骤。

[0151] 〔12〕如〔11〕所述的方法，其中，优选上述蛋白质为纤维素酶和/或半纤维素酶。

[0152] 〔13〕如〔11〕或〔12〕所述的方法，其中，优选上述培养在葡萄糖存在下进行。

[0153] 〔14〕如〔13〕所述的方法，其中，优选上述培养在不存在纤维素酶诱导性物质的条

件下进行。

[0154] 〔15〕一种变异丝状菌的制造方法,其中,该方法包括以表达ACE3变异体的方式使亲本丝状菌变异的步骤,

[0155] 该ACE3变异体为ACE3的$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)实质上全部缺失的变异体。

[0156] 〔16〕如〔15〕所述的方法,其中,优选上述ACE3为由序列号1的氨基酸序列或与其至少90%序列相同的氨基酸序列构成的多肽。

[0157] 〔17〕如〔16〕所述的方法,其中,优选上述$Zn(II)_2Cys_6$型DNA结合结构域(DBD)为与序列号1的120~160位氨基酸相当的区域。

[0158] 〔18〕如〔16〕所述的方法,其中,优选上述ACE3变异体为以下的(1)~(4)中的任意种:

[0159] (1)具有上述DBD中的C2的一部分或全部缺失和C4的一部分或全部缺失,其中,该C2为与序列号1的120~131位相当的区域,该C4为与序列号1的132~160位相当的区域,并且该C4的一部分优选是指C4中的含有至少2个Cys的区域,更优选是指C4中的含有至少3个Cys的区域,进一步优选是指C4中的含有4个Cys的区域,进一步优选是指与序列号1的132~151位氨基酸相当的区域;

[0160] (2)与序列号1的120~160位氨基酸相当的区域的氨基酸序列的80%以上、优选90%以上、更优选95%以上缺失,并且该区域中的6个Cys缺失;

[0161] (3)缺失与序列号1的120~151位氨基酸相当的区域;

[0162] (4)缺失与序列号1的1~151位氨基酸相当的区域,或者

[0163] 更优选上述ACE3变异体为以下的(5)~(7)中的任意种:

[0164] (5)缺失与序列号1的1~160位氨基酸相当的区域;

[0165] (6)缺失与序列号1的1~200位氨基酸相当的区域;

[0166] (7)缺失与序列号1的1~240位氨基酸相当的区域。

[0167] 〔19〕如〔16〕~〔18〕中任一项所述的方法,其中,关于上述ACE3变异体,

[0168] 优选与序列号1的氨基酸序列中的C末端的至少7个氨基酸~最多17个氨基酸相当的区域缺失,

[0169] 优选选自与序列号1的从C末端数起的-7~-17位(718~728位)氨基酸相当的氨基酸中的1个以上的氨基酸缺失,或者

[0170] 更优选与序列号1的氨基酸序列中的C末端的11个氨基酸相当的区域缺失。

[0171] 〔20〕如〔16〕~〔19〕中任一项所述的方法,其中,关于上述ACE3变异体,

[0172] 优选具有与序列号1的280~701位氨基酸相当的区域,

[0173] 优选具有与序列号1的280~717位氨基酸相当的区域,

[0174] 优选具有与序列号1的280~723位氨基酸相当的区域,

[0175] 优选具有与序列号1的280~727位氨基酸相当的区域,

[0176] 优选具有与序列号1的260~701位氨基酸相当的区域,

[0177] 优选具有与序列号1的260~717位氨基酸相当的区域,

[0178] 优选具有与序列号1的260~723位氨基酸相当的区域,

[0179] 优选具有与序列号1的260~727位氨基酸相当的区域,

[0180] 优选具有与序列号1的250～701位氨基酸相当的区域，

[0181] 优选具有与序列号1的250～717位氨基酸相当的区域，

[0182] 优选具有与序列号1的250～723位氨基酸相当的区域，

[0183] 优选具有与序列号1的250～727位氨基酸相当的区域，

[0184] 优选具有与序列号1的241～701位氨基酸相当的区域，

[0185] 优选具有与序列号1的241～717位氨基酸相当的区域，

[0186] 优选具有与序列号1的241～723位氨基酸相当的区域，或者

[0187] 优选具有与序列号1的241～727位氨基酸相当的区域。

[0188] 〔21〕如〔15〕～〔20〕中任一项所述的方法，其中，优选上述亲本丝状菌的变异包括将表达上述ACE3变异体的基因导入该亲本丝状菌中。

[0189] 〔22〕如〔21〕所述的方法，其中，优选表达上述ACE3变异体的基因与促进该基因的转录的调控区可操作地连接，

[0190] 优选该调控区选自pdc启动子和act1启动子。

[0191] 〔23〕如〔15〕～〔22〕中任一项所述的方法，其中，上述丝状菌优选为木霉属，更优选为里氏木霉或其突变株。

[0192] 实施例

[0193] 以下，利用实施例对本发明更具体地进行说明。

[0194] 实施例1基因导入用质粒DNA的构建

[0195] 利用以里氏木霉(T.reesei)的基因组DNA为模板的PCR，制备以下的DNA片段1～5。片段1：act1基因(TRIREDRAFT__44504)的上游约1.5kbp的启动子区域；片段2：编码ACE3的全长多肽(序列号1)的多核苷酸(序列号6、约2.9kbp)；片段3：编码ACE3的DBD部分缺失多肽(序列号2)的多核苷酸(序列号7、约2.0kbp)；片段4：编码XYR1的全长多肽(序列号5)的多核苷酸(序列号10、约3.0kbp)；片段5：cbh1基因(TRIREDRAFT__44504)的下游约0.6kbp的终止子区域；片段6：pyr4基因(TRIREDRAFT__74020)的约2.7kbp区域。

[0196] 将片段1和2结合，构建盒1：Pact1-TrACE3(1-734)。将片段1和3结合，构建盒2：Pact1-TrACE3(1-629)。将片段1和4结合，构建盒3：Pact1-XYR1。在片段6的上游和下游分别配置约0.5kbp的片段7和约1.0kbp的片段8作为弹出(pop-out)用的相同序列，制备转化标记片段。将片段5和该转化标记片段结合，构建盒4：Tcbh1-pyr4。

[0197] 在pUC118(Takara Bio)的HincII限制酶切位点，赋予smiI限制酶位点，并插入rce1基因(TRIREDRAFT__72611)的上游约1.5kbp区域(片段9)和下游约1.4kbp区域(片段10)，构建盒5：ΔRCE1。另外，在pUC118(Takara Bio)的HincII限制酶切位点，赋予smiI限制酶位点，并插入ace1基因(TRIREDRAFT__75418)的上游约1.6kbp区域(片段11)和下游约1.2kbp区域(片段12)，构建盒6：ΔACE1。

[0198] DNA片段的结合按照In-Fusion HD Cloning Kit(Takara Bio)的操作规范实施。将所构建的盒及其所含的DNA片段、以及用于盒的构建的引物示于表1。

[0199] [表1]

[0200]

盒			引物（5'-3'序列）		序列号
盒1 Pact1-TrACE（1-734）	片段1	约1.5 kbp	Fw	ACGGGGTACGCGTGAAATTG	11
			Rv	TGTGACTGATTAATGTATGA	12
	片段2	约2.9 kbp	Fw	TAATCAGTCACAATGGCCACAGCGGCCGCGGCAGC	13
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTAGTGG	14
盒2 Pact1-TrACE3（1-629）	片段1	约1.5 kbp	Fw	ACGGGGTACGCGTGAAATTG	11
			Rv	TGTGACTGATTAATGTATGA	12
	片段3	约2.9 kbp	Fw	CATTAATCAGTCACAATGCTGCGCTACTCCCCCGT	15
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTAGTGG	14
盒3 act1-XYR1	片段1	约1.5 kbp	Fw	ACGGGGTACGCGTGAAATTG	11
			Rv	TGTGACTGATTAATGTATGA	12
	片段4	约3.0 kbp	Fw	CATTAATCAGTCACAATGTTGTCCAATCCTCTCCG	16
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGAGGGCCAGACCGGTTC	17
盒4 Tcbh1-pyr4	片段5	约0.6 kbp	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18
			Rv	CTCGGCTACGTTGTCATCGT	19
	片段7	约0.5 kbp	Fw	GACAACGTAGCCGAGAAGTACCGCGCGCTTGACAA	20
			Rv	ACCTTGGCTGGTTTGCTGAATGCCCGGTGGTAAGC	21
	片段6	约2.7 kbp	Fw	CAAACCAGCCAAGGTAGGTA	22
			Rv	AAGCGCGCGGTACTTCCATCACATGTCAATGTCAC	23
	片段8	约1.0 kbp	Fw	AAGTACCGCGCGCTTGACAA	24
			Rv	TTGGTTCTTGGTTTGGAGGG	25
盒5 ΔRCE1	片段9	约1.5 kbp	Fw	CTAGAGTATTTAAATGGTCAACGGAGGCCAGAAGA	26
			Rv	GACTGCCTGCCTCCCAGTTT	27
	片段10	约1.4 kbp	Fw	CATAACTGAGAGAACCAGAA	28
			Rv	TGCAGGTATTTAAATATTTTGCGCATGACGGGCGA	29
盒6 ΔACE1	片段11	约1.6 kbp	Fw	ATTTAAATTAACCTGATTTCAAC	30
			Rv	GGCGGCCGAGATCTGTGTTC	31
	片段12	约1.2 kbp	Fw	AAAGATTGCGACACATACAA	32
			Rv	ATTTAAATAGAGGTAGTCTAGTC	33

[0201] 利用使用表2的引物的PCR,将盒1和4结合,插入盒5的rce1基因上游区域与下游区域之间,构建全长ace3恒常表达质粒pUC-Pact1-TrACE3(1-734)(质粒1)。利用使用表2的引物的PCR,将盒2和4结合,插入盒5的rce1基因上游区域与下游区域之间,构建DBD部分缺失ace3恒常表达质粒pUC-Pact1-TrACE3(1-629)(质粒2)。质粒1表达由序列号1构成的T.reesei的全长ACE3,质粒2表达相对于序列号1缺失了DBD的一部分(C2)的ACE3变异体(图1)。

[0202] 利用使用表2的引物的PCR,将盒3和4结合,插入盒6的ace1基因上游区域与下游区域之间,构建xyr1基因恒常表达质粒pUC-Pact1-XYR1(质粒3)。质粒3表达木聚糖酶XYR1。

[0203] 利用以质粒1为模板的使用表3的引物的PCR,分别构建pUC-Pact1-TrACE3(161-734)(质粒4)、pUC-Pact1-TrACE3(201-734)(质粒5)、pUC-Pact1-TrACE3(241-734)(质粒6)、pUC-Pact1-TrACE3(281-734)(质粒7)、pUC-Pact1-TrACE3(300-734)(质粒8)。质粒4～8表达相对于序列号1缺失了含有N末端侧的DBD的规定区域的ACE3变异体(图1)。

[0204] 人工合成编码深绿木霉(T.atroviride)的ACE3多肽的变异体(序列号3)的多核苷酸(序列号8、约2.0kbp)、编码哈茨木霉(T.harzianum)的ACE3多肽的变异体(序列号4)的多核苷酸(序列号9、约2.0kbp)。通过使用表4的引物的PCR,将所得到的片段与质粒1结合,由此分别构建pUC-Pact1-TaACE3(1-630)(质粒9)和pUC-Pact1-ThACE3(1-630)(质粒10)。质

粒9～10表达缺失了DBD的一部分(C2)的ACE3变异体。

[0205] 利用以质粒9或质粒10为模板的使用表4的引物的PCR,分别构建pUC-Pact1-TaACE3(137-630)(质粒11)和pUC-Pact1-ThACE3(137-630)(质粒12)。质粒11和12分别表达相对于序列号3和序列号4的ACE3变异体进一步缺失了N末端侧136个氨基酸的DBD完全缺失ACE3变异体。

[0206] 利用以质粒1为模板的使用表5的引物的PCR,构建表达相对于T.reesei的ACE3(序列号1)缺失了C末端侧的规定区域的ACE3变异体的质粒(质粒13)。利用以质粒2或4为模板的使用表5的引物的PCR,构建表达相对于T.reesei的ACE3(序列号1)缺失了N末端侧和C末端侧的规定区域的ACE3变异体的质粒(质粒14～17)。另外,利用以质粒1为模板的使用表5的引物的两阶段PCR,构建表达相对于T.reesei的ACE3(序列号1)缺失了N末端侧和C末端侧的规定区域的ACE3变异体的质粒(质粒18～19)。将质粒13～18所含的ACE3变异体的结构示于图2。

[0207] 利用以质粒3为模板的使用表5的引物的PCR,构建pUC-Pact1-XYR1(V821F)(质粒20)。其是编码对序列号5的氨基酸序列进行V821F的氨基酸取代后的突变XYR1(V821F)的质粒。

[0208] 将本实施例中所构建的质粒1～20、它们所含的片段(盒、质粒等)和它们的构建所使用的引物、以及它们所表达的ACE3示于表2～5。

[0209]

[表 2]

质粒 No.	质粒 名称	含有片段		引物（5'-3' 序列）		序列号	ACE3	ACE3
1	pUC-Pact1-TrACE3（1-734）	盒5	Fw	TCACGCGTACCCCGTGACTGCCTGCCTCCCAGTTT	34	TrACE3（1-734）（序列号1）	T. reesei 全长ACE3	
			Rv	CAAACCAAGAACCAACATAACTGAGAGAACCAGAA	35			
		盒1	Fw	ACGGGGTACGCGTGAAATTG	11			
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTAGTGGACG	36			
		盒4	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18			
			Rv	TTGGTTCTTGGTTTGGAGGG	25			
2	pUC-Pact1-TrACE3（1-629）	盒5	Fw	TCACGCGTACCCCGTGACTGCCTGCCTCCCAGTTT	34	TrACE3（1-629）（序列号2）	T. reesei ACE3的DBD部分缺失体	
			Rv	CAAACCAAGAACCAACATAACTGAGAGAACCAGAA	35			
		盒2	Fw	ACGGGGTACGCGTGAAATTG	11			
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTAGTGGACG	36			
		盒4	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18			
			Rv	TTGGTTCTTGGTTTGGAGGG	25			
3	pUC-Pact1-XYR1	盒6	Fw	CAAACCAAGAACCAAAAAGATTGCGACACATACAA	37	-	-	
			Rv	GGCGGCCGAGATCTGTGTTC	31			
		盒3	Fw	CAGATCTCGGCCGCCACGGGGTACGCGTGAAATTG	38			
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGAGGGCCAGACCGGTTC	17			
		盒4	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18			
			Rv	TTGGTTCTTGGTTTGGAGGG	25			

[0210]

[表 3]

质粒			引物（5’-3’序列）		序列号	ACE3	
No.	名称	含有片段					
4	pUC-Pactl-TrACE3（161-734）	质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGGGCCCCAAAGCGAGGAAGAA	39	TrACE3（161-734）	T. reesei ACE3的DBD完全缺失体
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
5	pUC-Pactl-TrACE3（201-734）	质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGGTAGCCGCGCTGCAGCCCTT	41	TrACE3（201-734）	
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
6	pUC-Pactl-TrACE3（241-734）	质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGCTCTCCACCATCCAGAACAT	42	TrACE3（241-734）	
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
7	pUC-Pactl-TrACE3（281-734）	质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGTACCTCTACCCCCTCACCCC	43	TrACE3（281-734）	
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
8	pUC-Pactl-TrACE3（300-734）	质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGTACATCTTCTCCCAGCCCTT	44	TrACE3（300-734）	
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		

[0211]

[表 4]

质粒			引物（5’-3’序列）		序列号	ACE3	
No.	名称	含有片段					
9	pUC-Pact1-TaACE3（1-630）	质粒1	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18	TaACE3（1-630）（序列号3）	T. atroviridei ACE3的DBD部分缺失体
			Rv	TGTGACTGATTAATGTATGA	12		
		T. atroviride ACE3（合成）	Fw	CATTAATCAGTCACAATGCTGCGCTACGCCGTCCA	45		
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTATTGG	46		
10	pUC-Pact1-ThACE3（1-630）	质粒1	Fw	AGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	18	ThACE3（1-630）（序列号4）	T. harzianumi ACE3的DBD部分缺失体
			Rv	TGTGACTGATTAATGTATGA	12		
		T. harzianum ACE3（合成）	Fw	TAATCAGTCACAATGCTGCGCTACTCCTCCGTCCC	47		
			Rv	TTTCGCCACGGAGCTTTAGCCAACAACGGTATTAG	48		
11	pUC-Pact1-TaACE3（137-630）	质粒9	Fw	TAATCAGTCACAATGCTCTCCACCATCCAAAACAT	49	TaACE3（137-630）	T. atroviridei ACE3的DBD完全缺失体
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
12	pUC-Pact1-ThACE3（137-630）	质粒10	Fw	TAATCAGTCACAATGCTCTCCACAATTCAGAACAT	50	ThACE3（137-630）	T. harzianumi ACE3的DBD完全缺失体
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		

[0212]

[表 5]

No.	质粒 名称	质粒 含有片段	引物（5'-3' 序列）		序列号	ACE3	
13	pUC-Pactl-TrACE3（1-723）	质粒1	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （1-723）	T. reesei ACE3的C末端缺失体
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGTCCGACGCCTTCGAGTCCA	52		
14	pUC-Pactl-TrACE3（1-618）	质粒2	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （1-618）	T. reesei ACE3的DBD部分&C末端缺失体
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGTCCGACGCCTTCGAGTCCA	52		
15	pUC-Pactl-TrACE3（161-723）	质粒4	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （161-723）	T. reesei ACE3的DBD完全&C末端缺失体
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGTCCGACGCCTTCGAGTCCA	52		
16	pUC-Pactl-TrACE3（1-595）	质粒2	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （1-595）	T. reesei ACE3的DBD部分&C末端缺失体
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAAGCCAAGGGTGAATCCTGGT	53		
17	pUC-Pactl-TrACE3（1-455）	质粒2	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （1-455）	T. reesei ACE3的DBD部分&C侧缺失体
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGTTCGGGGGCATGGTCCCTC	54		
18	pUC-Pactl-TrACE3（300-522）	质粒1	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （300-522）	T. reesei ACE3的DBD完全&C侧缺失体
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
		质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGTACATCTTCTCCCAGCCCTT	44		
			Rv	CGCCACGGAGCTTTATATGAAGCTCTTCCGGGGCG	55		
19	pUC-Pactl-TrACE3（300-560）	质粒1	Fw	TAAAGCTCCGTGGCGAAAGCCTG	51	TrACE3 （300-560）	T. reesei ACE3的DBD完全&C侧缺失体
			Rv	CATTGTGACTGATTAATGTATGA	40		
		质粒1	Fw	TAATCAGTCACAATGTACATCTTCTCCCAGCCCTT	44		
			Rv	CGCCACGGAGCTTTAGTTCGGGGGCATGGTCCCTC	54		
20	pUC-Pactl-XYR1（V821F）	质粒3	Fw	CACGCGTTCTCGGCTGCCGAAGCTATT	56	-	-
			Rv	AGCCGAGAACGCGTGGCTCGTCGCCGT	57		

[0213] 复制所构建的质粒。将上述所制作的质粒导入感受态细胞Escherichia coli DH5αCompetent Cells(Takara Bio)中,在添加有氨苄西林的LB培养基中进行培养(37℃、1

日)。使用NucleoSpin ™Plasmid(MACHEREY-NAGEL),从培养后的菌体中回收质粒并进行精制。

[0214] 实施例2变异丝状菌的制作

[0215] 将里氏木霉E1AB1(JN13)的pyr4基因缺失株(JN13Δpyr4株)导入来自实施例1中所构建的质粒的DNA片段中进行转化。通过将实施例1中所构建的质粒在smiI限制酶位点切断来进行线性化,利用原生质体PEG法(Biotechnol Bioeng,2012,109(1):92-99)导入亲本株中进行转化。以pyr4基因为标记,利用选择培养基(2%葡萄糖、1.1M山梨糖醇、2%琼脂、0.2% KH_2PO_4(pH5.5)、0.06% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.06%$CsCl_2$、0.06% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.5% $(NH_4)_2SO_4$、0.1%微量元素1(Trace element 1);%均为w/v%)选取转化体。微量元素1(Trace element1)的组成如下所述:用蒸馏水将0.5g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、0.2g $CoCl_2$、0.16g$MnSO_4 \cdot H_2O$、0.14g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$定容为100mL。从所选取的转化体中,利用PCR确认目标基因片段插入了rce1基因位点或ace1基因位点,得到目标转化体。

[0216] 制作表达突变XYR1(V821F)和ACE3或其变异体的双重转化体。使用含有0.2%的5-氟乳清酸(5-FOA)一水合物的PDA培养基,对导入了质粒20的XYR1(V821F)表达株进行培养,再次选取获得5-FOA耐性并生长的株。获得生长株作为JN13_XYR1(V821F)Δpyr4株。对于所获得的株,再次转化上述ACE3表达用质粒(质粒1~19)。这些株表达突变XYR1(V821F)和ACE3或其变异体。

[0217] 实施例3变异丝状菌的培养

[0218] 对实施例2中所得到的丝状菌株进行培养,生产蛋白质。在预培养中,向500mL的烧瓶加入培养基50mL,以1×10^5个/mL接种实施例2中所制作的株的胞子,以28℃、220rpm进行振荡培养(PRECI公司制造的PRXYg-98R)。预培养的培养基组成如下所述。1%葡萄糖、0.14%$(NH_4)_2SO_4$、0.2% KH_2PO_4、0.03% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.1%高聚蛋白胨N、0.05% Bacto酵母提取物(Yeast extract)、0.1% Tween80、0.1%微量元素2(Trace element 2)、50mM酒石酸缓冲液(pH4.0)(%均为w/v%)。微量元素2(Trace element 2)的组成如下所述。用蒸馏水将6mg H_3BO_3、26mg$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、100mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$、40mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$、8mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、200mg $ZnCl_2$定容为100mL。

[0219] 在2天的预培养后,进行主培养。向500mL的烧瓶中加入培养基50mL,接种预培养液1%(v/v%),以28℃、220rpm进行4天培养。主培养的培养基组成如下所述。3%葡萄糖、0.14%$(NH_4)_2SO_4$、0.2%KH_2PO_4、0.03% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、0.1%高聚蛋白胨N、0.05% Bacto酵母提取物(Yeast extract)、0.1% Tween 80、0.1%微量元素2(Trace element 2)、1.28%柠檬酸氢二铵、50mM酒石酸缓冲液(pH4.0)(%均为w/v%)。

[0220] 实施例4DBD缺失ACE3的恒常表达对蛋白质生产的效果

[0221] 对于恒常表达实施例2中所制作的来自T.reesei的全长ACE3或DBD缺失ACE3变异体的转化体,评价蛋白质生产率和所生产的蛋白质的组成。

[0222] 1)蛋白质生产率的评价

[0223] 利用bradford法测定实施例3的培养物的蛋白质浓度。在bradford法中,使用Quick Start蛋白质检测试剂盒(BioRad),将牛γ球蛋白作为标准蛋白质制成校准曲线,以所制得的校准曲线为基础,计算蛋白质量。将碳源只使用葡萄糖的培养(葡萄糖培养)中的JN13的蛋白质生产率设为1,计算此时的各株的相对蛋白质生产率。

[0224] 图3(A)表示各转化体的相对蛋白质生产率。如图3(A)所示,与全长ACE3(TrACE3(1-734);序列号1)表达株("1-734")和缺失了DBD的一部分(C2)的ACE3变异体(TrACE3(1-629);序列号2)表达株("1-629")相比,在表达相对于序列号1缺失了N末端侧160～240个氨基酸的DBD完全缺失ACE3变异体(TrACE3(161-734)、TrACE3(201-734)和TrACE3(241-734))的株("161-734"、"201-734"和"241-734")中,蛋白质生产率提高了。其中,在相对于序列号1缺失了N末端侧240个氨基酸的情况下("241-734"),蛋白质生产率显著提高,与DBD部分缺失株("1-629")相比,显示约1.6倍的生产率。另一方面,在表达相对于序列号1,N末端侧缺失了280个氨基酸以上的ACE3变异体(TrACE3(281-734)和TrACE3(300-734))的株("281-734"和"300-734")中,蛋白质生产率提高效果消失了。

[0225] 2)蛋白质组成分析

[0226] 对实施例3的培养物的蛋白质组成进行分析。分析使用Mini PROTEAN TGX Stain-Free Gels(Any KD,15well,BIORAD)。作为标准品,使用Precision Plus Protein Unstained standars。将适当稀释后的实施例3的培养物和缓冲液(Buffer)混合,以99℃处理5分钟,将处理后的试样供于凝胶,以200V进行35分钟电泳。根据所得到的图像文件,使用分析软件(Image Lab),计算带强度比率,并计算所生产的糖化酶的组成比。

[0227] 将SDS-PAGE的结果示于图3(B)。在图3(A)所示的蛋白质生产率提高了的DBD缺失ACE3变异体表达株(图3(B)中"161-734"、"201-734"和"241-734")中,确认了作为主要纤维素酶的CBH1、CBH2和EG1的增加。即,显示了DBD缺失ACE3变异体所产生的蛋白质生产率提高主要是纤维素酶成分的增加所产生的。

[0228] 实施例5其它的来自木霉属的ACE3的DBD缺失效果

[0229] 将实施例2中所制作的转化体所表达的来自T.reesei、T.atroviride和T.harzianum的DBD部分缺失ACE3变异体(TrACE3(1-629):序列号2、TaACE3(1-630):序列号3和ThACE3(1-630):序列号4)、以及DBD完全缺失ACE3变异体(TrACE3(241-734、TaACE3(131-630)和ThACE3(131-630))相对于T.reesei全长ACE3(TrACE3(1-734):序列号1)的氨基酸序列的比对示于图4。根据序列比对,显示了来自T.atroviride和T.harzianum的DBD部分缺失ACE3变异体(TaACE3(1-630)和ThACE3(1-630))的序列与来自T.reesei的DBD部分缺失ACE3变异体(TrACE3(1-629))的序列相当。同样显示了,来自T.atroviride和T.harzianum的DBD完全缺失ACE3变异体(TaACE3(131-630)和ThACE3(131-630))的序列与序列号1的N末端侧240个氨基酸缺失了的来自T.reesei的DBD部分缺失ACE3变异体(TrACE3(241-734))的序列相当。

[0230] 对于上述的恒常表达来自T.reesei、T.atroviride和T.harzianum的DBD部分或完全缺失ACE3变异体的转化体,按照与实施例4、1)相同的方法评价蛋白质生产率。将结果示于图5(A)。在T.atroviride和T.harzianum的ACE3中,与T.reesei的ACE3同样,与DBD部分缺失ACE3变异体的表达株相比,在DBD完全缺失ACE3变异体的表达株中,蛋白质生产率也提高了。另外,按照与实施例4、2)相同的方法实施SDS-PAGE,其结果如图5(B)所示,与图3(B)同样,确认了作为主要纤维素酶的CBH1、CBH2和EG1的增加。因此显示了,DBD缺失ACE3变异体所产生的纤维素酶生产率提高不仅在T.reesei的ACE3中,在其它的木霉属菌种的ACE3中也发生了。

[0231] 实施例6DBD缺失和C末端缺失ACE3恒常表达的协同效果已报告了ACE3的C末端缺

失所产生的纤维素酶生产率提高效果(专利文献4和非专利文献5)。在本实施例中,对于实施例2中所制作的恒常表达相对于序列号1缺失了C末端11个氨基酸的ACE3变异体(TrACE3(1-723))、具有C末端缺失和DBD部分缺失的ACE3变异体(TrACE3(1-618))、具有C末端缺失和DBD完全缺失的ACE3变异体(TrACE3(161-723))的转化体,按照与实施例4、1)相同的方法评价蛋白质生产率。将结果示于图6(A)。即使在具有同等的C末端缺失的情况下,与没有N末端缺失或DBD部分缺失ACE3变异体的表达株相比,在DBD完全缺失ACE3变异体的表达株中,蛋白质生产率也大幅度提高了。根据图3(A)和6(A)还可知,通过DBD缺失与C末端缺失的组合,对于蛋白质生产率,能够获得预料不到的高协同效果。另外,按照与实施例4、2)相同的方法实施SDS-PAGE,其结果如图6(B)所示,与图3(B)同样确认了作为主要纤维素酶的CBH1、CBH2和EG1的增加。因此明确了,ACE3中的DBD的完全缺失能够发挥比C末端缺失高的纤维素酶的生产率提高效果,并且通过DBD的完全缺失与C末端缺失的组合,效果协同增加。

[0232] 实施例7DBD缺失ACE3与突变型XYR1恒常表达的组合效果

[0233] 对于实施例2中所制作的突变XYR1(V821F)表达株、以及恒常表达突变XYR1(V821F)和ACE3或其变异体的双重转化体,按照与实施例4、1)和2)相同的方法评价蛋白质生产率。

[0234] 与JN13株相比,在突变XYR1(V821F)表达株中,蛋白质生产率提高了。关于双重转化体,与突变XYR1(V821F)单独表达株相比,全长ACE3(TrACE3(1-734))共表达株的蛋白质生产率提高不多,但DBD部分缺失ACE3变异体(TrACE3(1-629))共表达株的蛋白质生产率提高为约1.5倍。V821F和DBD完全缺失ACE3变异(TrACE3(161-734)、TrACE3(201-734)或TrACE3(241-734))的共表达株的蛋白质生产率与V821F和DBD部分缺失体(TrACE3(1-629))的共表达株同等,没有确认生产量的进一步增加。

[0235] 将SDS-PAGE的结果示于图7(A)。另外,将所生产的糖化酶的组成比示于图7(B)。在恒常表达突变型XYR1和DBD完全缺失ACE3变异体的株中,不仅蛋白质生产率提高,作为主要纤维素酶的CBH1、CBH2和EG1的含有比也增加了。另一方面,与实施例4(图3)的结果同样,在表达N末端侧缺失了280个氨基酸以上的ACE3变异体的株中,蛋白质生产率和纤维素酶含有比提高的效果消失了。因此,通过突变型XYR1与特定的DBD完全缺失ACE3变异体的共表达,与现有的突变型XYR1和ACE3或其变异体的共表达相比,能够进一步提高蛋白质生产率和所生产的蛋白质中的纤维素酶含量,因此提示了能够进行更有效的纤维素酶生产。

[0236] 实施例8DBD缺失和C末端缺失ACE3与突变型XYR1恒常表达的组合效果

[0237] 按照与实施例7相同的步骤,对于实施例2中所制作的恒常表达突变XYR1(V821F)以及DBD和C末端缺失ACE3变异体的双重转化体,按照与实施例4、1)和2)相同的方法评价蛋白质生产率。

[0238] 将SDS-PAGE的结果示于图8(A)。另外,将所生产的糖化酶的组成比示于图8(B)。恒常表达突变XYR1和DBD完全缺失且C末端缺失ACE3变异体(TrACE3(161-723))的株的蛋白质生产率高,并且显示了最高的纤维素酶含有比。可知即使在突变XYR1与C末端缺失的组合中,ACE3的DBD的完全缺失在纤维素酶含有比提高方面也是有效的。另一方面,在其它的C末端缺失ACE3变异体(TrACE3(1-723)、TrACE3(1-618)、TrACE3(1-595)、TrACE3(1-455)、TrACE3(300-522)或TrACE3(300-560))中,与没有C末端缺失的DBD部分缺失ACE3变异体(TrACE3(1-629))相比,未能确认蛋白质生产量的增加。

[0239] 如上所述,完全缺失了Zn(II)$_2$Cys$_6$型DNA结合结构域(DBD)的ACE3变异体的恒常表达能够在不存在诱导性物质的条件下显著提高微生物的蛋白质生产率。这样的ACE3变异体不仅在T.reesei中,在其它的木霉属菌中也是有效,并且在已知的有效突变、即C末端缺失、与突变XYR1(例如V821F)的组合中也是有效的。因此提示了,通过上述DBD完全缺失ACE3变异体的恒常表达,在使用葡萄糖等纤维素酶非诱导性碳源的培养下,能够使微生物的纤维素酶启动子高活性化,并能够实现高效的蛋白质生产。

序列表

<110> 花王株式会社

<120> 变异丝状菌和使用其的蛋白质的制造方法

<130> KS1807

<150> JP 2021-066415

<151> 2021/04/09

<160> 57

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 734

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 1

Met Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Ala Ala
1 5 10 15
Gly Ala Asp Thr Gly Ala Ala Gly Ser Ser Ser Thr Gly Pro Pro Gly
20 25 30
Leu Pro Gly Leu Pro Gly Thr Arg Thr Gly Ser Val Ala Met Gly Ser
35 40 45
Ala Ala Pro Ala Gln Gly Ser Val Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Pro
50 55 60
Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Val His Ala Leu Thr Thr Ser Pro
65 70 75 80
Glu Ser Ala Ser Ala Ser Gln Pro Gly Ser Pro Thr Ala Ser Thr Thr
85 90 95
Pro Pro Gln Asn Ser Leu Val Ser Ala Ala Thr Ser Phe His His His
100 105 110
Pro Arg Gly Arg Leu Val Ser Arg Ala Cys Asp Arg Cys Arg Arg Arg
115 120 125
Lys Ala Lys Cys Glu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Ser Cys Thr His Cys
130 135 140
Arg Asp Ala His Val Gln Cys Thr Phe Asp Leu Pro Leu Ala Arg Arg
145 150 155 160
Gly Pro Lys Ala Arg Lys Lys Ser Asp Gln Pro Gly Gln Pro Pro Pro
165 170 175
Asp Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ala Ala Arg Pro Gly Gln Met Pro Pro
180 185 190
Pro Leu Thr Phe Ser Gly Pro Ala Val Ala Ala Leu Gln Pro Phe Ala

195 200 205

Ser Ser Ser Leu Ser Pro Asp Ala Ala Trp Glu Pro Val Glu Pro Leu

210 215 220

Ser Ile Asp Asn Gly Leu Pro Arg Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Gly

225 230 235 240

Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ile Ser Thr Arg Gln Arg Trp Ile His Leu

245 250 255

Ala Asn Ala Met Thr Leu Arg Asn Thr Thr Leu Glu Arg Val Ser Lys

260 265 270

Arg Cys Ile Asp Leu Phe Phe Asp Tyr Leu Tyr Pro Leu Thr Pro Leu

275 280 285

Val Tyr Glu Pro Ala Leu Arg Asp Val Leu Ala Tyr Ile Phe Ser Gln

290 295 300

Pro Leu Pro Gly Val Asn Gln Pro Ser Pro Leu Ser Gln Leu Thr Pro

305 310 315 320

Asp Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro Leu Asn Ala Ala Glu Ser Trp Ala

325 330 335

Gly Phe Gly Gln Pro Ser Gly Ser Arg Thr Val Gly Ser Arg Leu Ala

340 345 350

Pro Trp Ala Asp Ser Thr Phe Thr Leu Val Thr Ala Val Cys Ala Glu

355 360 365

Ala Ala Phe Met Leu Pro Lys Asp Ile Phe Pro Glu Gly Glu Ser Val

370 375 380

Ser Glu Ile Leu Leu Glu Ala Ser Arg Asp Cys Leu His Gln His Leu

385 390 395 400

Glu Ala Asp Leu Glu Asn Pro Thr Ala Asn Ser Ile Ala Ile Arg Tyr

405 410 415

Phe His Ser Asn Cys Leu His Ala Ala Gly Lys Pro Lys Tyr Ser Trp

420 425 430

His Ile Phe Gly Glu Ala Ile Arg Leu Ala Gln Val Met Gln Leu His

435 440 445

Glu Glu Ala Ala Leu Glu Gly Leu Val Pro Ile Glu Ala Glu Phe Arg

450 455 460

Arg Arg Cys Phe Trp Ile Leu Tyr Leu Gly Asp Lys Ser Ala Ala Ile

465 470 475 480

Leu Asn Asn Arg Pro Ile Thr Ile His Lys Tyr Cys Phe Asp Ala Gly

485 490 495

Ile Thr Thr Leu Tyr Pro Ser Gly Ile Glu Asp Glu Phe Leu Ser Thr

500 505 510

Ala Ser Glu Pro Pro Arg Lys Ser Phe Ile Ser Gly Phe Asn Ala Asn
515 520 525
Val Arg Leu Trp Gln Ser Ala Ala Asp Leu Leu Leu Glu Ile Arg Val
530 535 540
Leu Gln Asp Gln Met Met Gln His Phe Arg Gly Thr Met Pro Pro Asn
545 550 555 560
His Val Leu Pro Ser Ala Asp Arg Gln His Leu Asp Ser Leu Tyr Val
565 570 575
Arg Phe Ile Thr Cys Leu Asp Asp Leu Pro Pro Tyr Leu Gln Ser Cys
580 585 590
Thr Leu Ala Met Ala Ala Met Ala Glu Gly Asn Gly Ser Ala Glu Ser
595 600 605
Lys Gln Tyr Val Ile Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Phe His Cys
610 615 620
Leu Arg Met Val Ile Thr Gln Lys Phe Glu Asp Leu Ser Tyr Phe Ala
625 630 635 640
Pro Gly Val Glu Gln Ala Asp Leu Arg Lys Ser Glu Ile Val Arg Asp
645 650 655
Met Leu Arg Val Met Asn Glu Ala Pro Phe Trp Gly Leu Gln Ala Asn
660 665 670
Gly Glu Pro Asn Val Glu Lys Ile Arg Leu Ile Gly Ala Ser Leu Leu
675 680 685
Ala Ile Ile His Arg Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ala Thr Arg Ala Arg
690 695 700
Ser Asp Phe Ser Val Leu Leu Asp Ile Leu Thr Arg Leu Asp Ser Lys
705 710 715 720
Ala Ser Asp Gln Leu Arg Asn Thr Ser Thr Thr Val Val Gly
725 730

<210> 2
<211> 629
<212> PRT
<213> 里氏木霉
<400> 2

Met Leu Arg Tyr Ser Pro Val Leu His Leu Asp Thr Leu Ser Leu Pro
1 5 10 15
Pro Leu Thr Asn Ala Leu Pro Arg Pro Lys Cys Glu Tyr Leu Ser Ala
20 25 30
Val Asp Ser Cys Thr His Cys Arg Asp Ala His Val Gln Cys Thr Phe
35 40 45

Asp Leu Pro Leu Ala Arg Arg Gly Pro Lys Ala Arg Lys Lys Ser Asp
50 55 60
Gln Pro Gly Gln Pro Pro Pro Asp Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ala Ala
65 70 75 80
Arg Pro Gly Gln Met Pro Pro Pro Leu Thr Phe Ser Gly Pro Ala Val
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Pro Phe Ala Ser Ser Ser Leu Ser Pro Asp Ala Ala
100 105 110
Trp Glu Pro Val Glu Pro Leu Ser Ile Asp Asn Gly Leu Pro Arg Gln
115 120 125
Pro Leu Gly Asp Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ile Ser Thr
130 135 140
Arg Gln Arg Trp Ile His Leu Ala Asn Ala Met Thr Leu Arg Asn Thr
145 150 155 160
Thr Leu Glu Arg Val Ser Lys Arg Cys Ile Asp Leu Phe Phe Asp Tyr
165 170 175
Leu Tyr Pro Leu Thr Pro Leu Val Tyr Glu Pro Ala Leu Arg Asp Val
180 185 190
Leu Ala Tyr Ile Phe Ser Gln Pro Leu Pro Gly Val Asn Gln Pro Ser
195 200 205
Pro Leu Ser Gln Leu Thr Pro Asp Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro Leu
210 215 220
Asn Ala Ala Glu Ser Trp Ala Gly Phe Gly Gln Pro Ser Gly Ser Arg
225 230 235 240
Thr Val Gly Ser Arg Leu Ala Pro Trp Ala Asp Ser Thr Phe Thr Leu
245 250 255
Val Thr Ala Val Cys Ala Glu Ala Ala Phe Met Leu Pro Lys Asp Ile
260 265 270
Phe Pro Glu Gly Glu Ser Val Ser Glu Ile Leu Leu Glu Ala Ser Arg
275 280 285
Asp Cys Leu His Gln His Leu Glu Ala Asp Leu Glu Asn Pro Thr Ala
290 295 300
Asn Ser Ile Ala Ile Arg Tyr Phe His Ser Asn Cys Leu His Ala Ala
305 310 315 320
Gly Lys Pro Lys Tyr Ser Trp His Ile Phe Gly Glu Ala Ile Arg Leu
325 330 335
Ala Gln Val Met Gln Leu His Glu Glu Ala Ala Leu Glu Gly Leu Val
340 345 350
Pro Ile Glu Ala Glu Phe Arg Arg Arg Cys Phe Trp Ile Leu Tyr Leu

355 360 365
Gly Asp Lys Ser Ala Ala Ile Leu Asn Asn Arg Pro Ile Thr Ile His
370 375 380
Lys Tyr Cys Phe Asp Ala Gly Ile Thr Thr Leu Tyr Pro Ser Gly Ile
385 390 395 400
Glu Asp Glu Phe Leu Ser Thr Ala Ser Glu Pro Pro Arg Lys Ser Phe
405 410 415
Ile Ser Gly Phe Asn Ala Asn Val Arg Leu Trp Gln Ser Ala Ala Asp
420 425 430
Leu Leu Leu Glu Ile Arg Val Leu Gln Asp Gln Met Met Gln His Phe
435 440 445
Arg Gly Thr Met Pro Pro Asn His Val Leu Pro Ser Ala Asp Arg Gln
450 455 460
His Leu Asp Ser Leu Tyr Val Arg Phe Ile Thr Cys Leu Asp Asp Leu
465 470 475 480
Pro Pro Tyr Leu Gln Ser Cys Thr Leu Ala Met Ala Ala Met Ala Glu
485 490 495
Gly Asn Gly Ser Ala Glu Ser Lys Gln Tyr Val Ile Gln Cys Ile Asn
500 505 510
Leu Gln Val Thr Phe His Cys Leu Arg Met Val Ile Thr Gln Lys Phe
515 520 525
Glu Asp Leu Ser Tyr Phe Ala Pro Gly Val Glu Gln Ala Asp Leu Arg
530 535 540
Lys Ser Glu Ile Val Arg Asp Met Leu Arg Val Met Asn Glu Ala Pro
545 550 555 560
Phe Trp Gly Leu Gln Ala Asn Gly Glu Pro Asn Val Glu Lys Ile Arg
565 570 575
Leu Ile Gly Ala Ser Leu Leu Ala Ile Ile His Arg Asn Gln Asp Ser
580 585 590
Pro Leu Ala Thr Arg Ala Arg Ser Asp Phe Ser Val Leu Leu Asp Ile
595 600 605
Leu Thr Arg Leu Asp Ser Lys Ala Ser Asp Gln Leu Arg Asn Thr Ser
610 615 620
Thr Thr Val Val Gly
625

<210> 3
<211> 630
<212> PRT
<213> 深绿木霉

<400> 3

Met Leu Arg Tyr Ala Val Gln Tyr Pro Asp Thr Leu Ala Ile Ser Pro
1 5 10 15
Leu Thr Asp Val Phe Pro His Gln Lys Cys Glu Tyr Leu Ser Ala Val
20 25 30
Asp Ser Cys Thr His Cys Arg Asp Ala His Val Gln Cys Thr Phe Asp
35 40 45
Leu Pro Leu Ala Arg Arg Gly Pro Lys Ala Arg Lys Lys Ser Asp Leu
50 55 60
Pro Gly Gln Pro Pro Ser Asp Pro Ser Ala Leu Ser Thr Gly Ala Arg
65 70 75 80
Gly Ala Gly Ala Gln Met Pro Pro Pro Leu Ala Phe Ser Gly Pro Ala
85 90 95
Val Gly Gly Leu Gln Pro Phe Asn Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu Ala
100 105 110
Pro Trp Glu Pro Gly Glu Pro Leu Ser Leu Glu Asn Gly Leu Pro Arg
115 120 125
Gln Gln Met Gly Asp Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ile Ser
130 135 140
Thr Arg Gln Arg Trp Leu His Leu Ala Gln Ala Met Thr Leu Arg Asn
145 150 155 160
Thr Thr Leu Glu Arg Val Ser Lys Arg Cys Ile Asp Leu Phe Phe Asp
165 170 175
Tyr Leu Tyr Pro Leu Thr Pro Leu Val Tyr Glu Pro Ala Leu Arg Glu
180 185 190
Val Leu Ala Tyr Ile Phe Ser Gln Pro Ile Pro Gly Met Asn Gln Pro
195 200 205
Ser Pro Ile Ala Gln Leu Thr Pro Asp Pro Thr Ala Gly Thr Thr Pro
210 215 220
Leu Ser Ala Ala Glu Ser Trp Ala Gly Phe Ala Gln Leu Asn Gly Ser
225 230 235 240
Arg Ala Val Gly Ser Arg Leu Ala Pro Trp Ala Asp Ser Thr Phe Thr
245 250 255
Leu Val Thr Ala Val Cys Ala Glu Ala Ala Phe Met Leu Pro Lys Asp
260 265 270
Ile Phe Pro Glu Gly Glu Ser Val Ser Glu Ile Phe Leu Glu Ala Ser
275 280 285
Arg Asp Cys Leu His Gln His Leu Glu Ala Asp Leu Glu Asn Pro Thr
290 295 300

Ala Asn Ser Ile Ala Ile Arg Tyr Phe His Ser Asn Cys Leu His Ala
305 310 315 320
Ala Gly Lys Pro Lys Tyr Ser Trp His Ile Phe Gly Glu Ala Ile Arg
325 330 335
Leu Ala Gln Val Met His Leu His Glu Glu Ala Ser Leu Glu Gly Leu
340 345 350
Val Pro Ile Glu Ala Glu Phe Arg Arg Arg Cys Phe Trp Ile Leu Tyr
355 360 365
Leu Gly Asp Lys Ser Ala Ala Ile Leu Asn Asn Arg Pro Ile Thr Ile
370 375 380
His Lys Tyr Cys Phe Asp Thr Gly Ile Thr Thr Leu Tyr Pro Ser Gly
385 390 395 400
Ile Glu Asp Glu Phe Leu Ile Thr Ala Ser Glu Pro Pro Arg Lys Ser
405 410 415
Phe Ile Ser Gly Phe Asn Ala Asn Val Arg Leu Trp Gln Ser Ala Ala
420 425 430
Asp Leu Leu Leu Glu Ile Arg Val Leu Gln Asp Gln Met Met Gln His
435 440 445
Phe Arg Gly Asn Leu Pro Pro Asn His Val Leu Pro Ser Ala Asp Arg
450 455 460
Gln His Leu Asp Ser Leu Tyr Val Arg Phe Ile Thr Cys Leu Asp Asp
465 470 475 480
Leu Pro Pro Tyr Leu Gln Ser Cys Thr Leu Ala Met Ala Ala Met Ala
485 490 495
Glu Gly Asn Gly Ser Ala Glu Ser Lys Gln Tyr Val Ile Gln Cys Thr
500 505 510
Asn Leu Gln Val Thr Phe His Cys Leu Arg Met Val Ile Thr Gln Lys
515 520 525
Phe Glu Asp Leu Ser Tyr Phe Ala Pro Gly Val Glu Gln Ala Asp Leu
530 535 540
Arg Lys Ser Glu Ile Val Arg Asp Met Leu Arg Val Met Asn Glu Ala
545 550 555 560
Pro Phe Trp Gly Leu Gln Ala Asn Gly Glu Pro Asn Val Glu Lys Ile
565 570 575
Arg Leu Ile Gly Ala Ser Leu Leu Ala Ile Ile His Arg His Gln Asp
580 585 590
Asn Pro Leu Ala Thr Arg Ala Arg Gly Asp Phe Ser Val Leu Leu Asp
595 600 605
Ile Leu Thr Arg Leu Asp Ser Lys Ala Ser Asp Gln Leu Arg Asn Thr

610 615 620

Ser Asn Thr Val Val Gly
625 630

<210> 4
<211> 630
<212> PRT
<213> 哈茨木霉
<400> 4

Met Leu Arg Tyr Ser Ser Val Pro Ser Val Leu Gln Leu Asp Pro Phe
1 5 10 15
Ser Ser Ile Ser Pro Leu Thr Pro His Lys Cys Glu Tyr Leu Ser Ala
20 25 30
Val Asp Ser Cys Thr His Cys Arg Asp Ala His Val Gln Cys Thr Phe
35 40 45
Asp Leu Pro Leu Ala Arg Arg Gly Pro Lys Ala Arg Lys Lys Ser Asp
50 55 60
Gln Pro Gly Gln Pro Pro Pro Asp Pro Ser Ser Leu Ser Thr Gly Ala
65 70 75 80
Arg Gly Ser Gly Gln Met Pro Pro Pro Leu Ser Phe Ser Gly Pro Ala
85 90 95
Ala Gly Gly Leu Gln Pro Phe Asn Ser Ser Ser Leu Ser Pro Glu Thr
100 105 110
Ala Trp Glu Pro Val Glu Pro Leu Ser Ile Glu Asn Gly Leu Pro Arg
115 120 125
Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ile Gln Asn Ile Ser
130 135 140
Thr Arg Gln Arg Trp Leu His Leu Ala His Ala Met Thr Leu Arg Ser
145 150 155 160
Thr Thr Leu Glu Arg Val Ser Lys Arg Cys Ile Asp Leu Phe Phe Asp
165 170 175
Tyr Leu Tyr Pro Leu Thr Pro Leu Val Tyr Glu Pro Ala Leu Arg Asp
180 185 190
Val Leu Ala Tyr Ile Phe Ser Gln Pro Leu Pro Gly Met Asn Gln Pro
195 200 205
Ser Pro Leu Ser Gln Leu Thr Pro Asp Pro Thr Thr Gly Thr Thr Pro
210 215 220
Ile Ser Ser Ala Glu Ser Trp Thr Gly Phe Gly Gln Pro Ser Gly Ser
225 230 235 240
Arg Ile Val Gly Ser Arg Leu Ala Pro Trp Val Asp Ser Thr Phe Thr

245 250 255

Leu Val Thr Ala Val Cys Ala Glu Ala Ala Phe Met Leu Pro Lys Asp
260 265 270

Ile Phe Pro Glu Gly Glu Ser Val Ser Glu Ile Phe Leu Glu Ala Ser
275 280 285

Arg Asp Cys Leu His Gln His Leu Glu Ala Asp Leu Glu Asn Pro Thr
290 295 300

Ala Asn Ser Ile Ala Ile Arg Tyr Phe His Ser Asn Cys Leu His Ala
305 310 315 320

Ala Gly Lys Pro Lys Tyr Ser Trp His Ile Phe Gly Glu Ala Ile Arg
325 330 335

Leu Ala Gln Val Met His Leu His Glu Glu Ala Ser Leu Glu Gly Leu
340 345 350

Val Pro Ile Glu Ala Glu Phe Arg Arg Arg Cys Phe Trp Ile Leu Tyr
355 360 365

Leu Gly Asp Lys Ser Ala Ala Ile Leu Asn Asn Arg Pro Ile Thr Ile
370 375 380

His Lys Tyr Cys Phe Asp Thr Gly Ile Thr Thr Leu Tyr Pro Ser Gly
385 390 395 400

Ile Glu Asp Glu Phe Leu Asn Thr Ala Ser Glu Pro Pro Arg Lys Ser
405 410 415

Phe Ile Ser Gly Phe Asn Ala Asn Val Arg Leu Trp Gln Ser Ala Ala
420 425 430

Asp Leu Leu Leu Glu Ile Arg Val Leu Gln Asp Gln Met Met Gln His
435 440 445

Phe Arg Gly Ser Met Pro Pro Asn His Val Leu Pro Ser Ala Asp Arg
450 455 460

Gln His Leu Asp Ser Leu Tyr Val Arg Phe Ile Thr Cys Leu Asp Asp
465 470 475 480

Leu Pro Pro Tyr Leu Gln Ser Cys Thr Leu Ala Met Ala Ala Met Ala
485 490 495

Glu Gly Asn Gly Ser Ala Glu Ser Lys Gln Tyr Val Ile Gln Cys Ile
500 505 510

Asn Leu Gln Val Thr Phe His Cys Leu Arg Met Val Ile Thr Gln Lys
515 520 525

Phe Glu Asp Leu Ser Tyr Phe Ala Pro Gly Val Glu Gln Ala Asp Leu
530 535 540

Arg Lys Ser Glu Ile Val Arg Asp Met Leu Arg Val Met Asn Glu Ala
545 550 555 560

Pro Phe Trp Gly Leu Gln Ala Asn Gly Glu Pro Asn Val Glu Lys Ile
565 570 575
Arg Leu Ile Gly Ala Ser Leu Leu Ala Ile Ile His Arg Asn Gln Asp
580 585 590
Ser Pro Leu Ala Thr Arg Ala Arg Ser Asp Phe Thr Val Leu Leu Asp
595 600 605
Ile Leu Thr Arg Leu Asp Ser Lys Ala Ser Asp Gln Leu Arg Asn Thr
610 615 620
Ser Asn Thr Val Val Gly
625 630

<210> 5
<211> 940
<212> PRT
<213> 里氏木霉
<400> 5

Met Leu Ser Asn Pro Leu Arg Arg Tyr Ser Ala Tyr Pro Asp Ile Ser
1 5 10 15
Ser Ala Ser Phe Asp Pro Asn Tyr His Gly Ser Gln Ser His Leu His
20 25 30
Ser Ile Asn Val Asn Thr Phe Gly Asn Ser His Pro Tyr Pro Met Gln
35 40 45
His Leu Ala Gln His Ala Glu Leu Ser Ser Ser Arg Met Ile Arg Ala
50 55 60
Ser Pro Val Gln Pro Lys Gln Arg Gln Gly Ser Leu Ile Ala Ala Arg
65 70 75 80
Lys Asn Ser Thr Gly Thr Ala Gly Pro Ile Arg Arg Arg Ile Ser Arg
85 90 95
Ala Cys Asp Gln Cys Asn Gln Leu Arg Thr Lys Cys Asp Gly Leu His
100 105 110
Pro Cys Ala His Cys Ile Glu Phe Gly Leu Gly Cys Glu Tyr Val Arg
115 120 125
Glu Arg Lys Lys Arg Gly Lys Ala Ser Arg Lys Asp Ile Ala Ala Gln
130 135 140
Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln His Ser Gly Gln Val Gln Asp Gly
145 150 155 160
Pro Glu Asp Gln His Arg Lys Leu Ser Arg Gln Gln Ser Glu Ser Ser
165 170 175
Arg Gly Ser Ala Glu Leu Ala Gln Pro Ala His Asp Pro Pro His Gly
180 185 190

His Ile Glu Gly Ser Val Ser Ser Phe Ser Asp Asn Gly Leu Ser Gln
195 200 205
His Ala Ala Met Gly Gly Met Asp Gly Leu Glu Asp His His Gly His
210 215 220
Val Gly Val Asp Pro Ala Leu Gly Arg Thr Gln Leu Glu Ala Ser Ser
225 230 235 240
Ala Met Gly Leu Gly Ala Tyr Gly Glu Val His Pro Gly Tyr Glu Ser
245 250 255
Pro Gly Met Asn Gly His Val Met Val Pro Pro Ser Tyr Gly Ala Gln
260 265 270
Thr Thr Met Ala Gly Tyr Ser Gly Ile Ser Tyr Ala Ala Gln Ala Pro
275 280 285
Ser Pro Ala Thr Tyr Ser Ser Asp Gly Asn Phe Arg Leu Thr Gly His
290 295 300
Ile His Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Gly Ser Ser Pro Ser Trp Gly Val
305 310 315 320
Ser Leu Ala Ser Pro Ser Asn Gln Phe Gln Leu Gln Leu Ser Gln Pro
325 330 335
Ile Phe Lys Gln Ser Asp Leu Arg Tyr Pro Val Leu Glu Pro Leu Leu
340 345 350
Pro His Leu Gly Asn Ile Leu Pro Val Ser Leu Ala Cys Asp Leu Ile
355 360 365
Asp Leu Tyr Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ala Gln Met His Pro Met Ser
370 375 380
Pro Tyr Val Leu Gly Phe Val Phe Arg Lys Arg Ser Phe Leu His Pro
385 390 395 400
Thr Asn Pro Arg Arg Cys Gln Pro Ala Leu Leu Ala Ser Met Leu Trp
405 410 415
Val Ala Ala Gln Thr Ser Glu Ala Ser Phe Leu Thr Ser Leu Pro Ser
420 425 430
Ala Arg Ser Lys Val Cys Gln Lys Leu Leu Glu Leu Thr Val Gly Leu
435 440 445
Leu Gln Pro Leu Ile His Thr Gly Thr Asn Ser Pro Ser Pro Lys Thr
450 455 460
Ser Pro Val Val Gly Ala Ala Ala Leu Gly Val Leu Gly Val Ala Met
465 470 475 480
Pro Gly Ser Leu Asn Met Asp Ser Leu Ala Gly Glu Thr Gly Ala Phe
485 490 495
Gly Ala Ile Gly Ser Leu Asp Asp Val Ile Thr Tyr Val His Leu Ala

500 505 510

Thr Val Val Ser Ala Ser Glu Tyr Lys Gly Ala Ser Leu Arg Trp Trp
515 520 525

Gly Ala Ala Trp Ser Leu Ala Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Glu Leu
530 535 540

Pro Pro Gly Asn Pro Pro Ala Asn Gln Glu Asp Gly Glu Gly Leu Ser
545 550 555 560

Glu Asp Val Asp Glu His Asp Leu Asn Arg Asn Asn Thr Arg Phe Val
565 570 575

Thr Glu Glu Glu Arg Glu Glu Arg Arg Arg Ala Trp Trp Leu Val Tyr
580 585 590

Ile Val Asp Arg His Leu Ala Leu Cys Tyr Asn Arg Pro Leu Phe Leu
595 600 605

Leu Asp Ser Glu Cys Ser Asp Leu Tyr His Pro Met Asp Asp Ile Lys
610 615 620

Trp Gln Ala Gly Lys Phe Arg Ser His Asp Ala Gly Asn Ser Ser Ile
625 630 635 640

Asn Ile Asp Ser Ser Met Thr Asp Glu Phe Gly Asp Ser Pro Arg Ala
645 650 655

Ala Arg Gly Ala His Tyr Glu Cys Arg Gly Arg Ser Ile Phe Gly Tyr
660 665 670

Phe Leu Ser Leu Met Thr Ile Leu Gly Glu Ile Val Asp Val His His
675 680 685

Ala Lys Ser His Pro Arg Phe Gly Val Gly Phe Arg Ser Ala Arg Asp
690 695 700

Trp Asp Glu Gln Val Ala Glu Ile Thr Arg His Leu Asp Met Tyr Glu
705 710 715 720

Glu Ser Leu Lys Arg Phe Val Ala Lys His Leu Pro Leu Ser Ser Lys
725 730 735

Asp Lys Glu Gln His Glu Met His Asp Ser Gly Ala Val Thr Asp Met
740 745 750

Gln Ser Pro Leu Ser Val Arg Thr Asn Ala Ser Ser Arg Met Thr Glu
755 760 765

Ser Glu Ile Gln Ala Ser Ile Val Val Ala Tyr Ser Thr His Val Met
770 775 780

His Val Leu His Ile Leu Leu Ala Asp Lys Trp Asp Pro Ile Asn Leu
785 790 795 800

Leu Asp Asp Asp Asp Leu Trp Ile Ser Ser Glu Gly Phe Val Thr Ala
805 810 815

Thr Ser His Ala Val Ser Ala Ala Glu Ala Ile Ser Gln Ile Leu Glu
820 825 830
Phe Asp Pro Gly Leu Glu Phe Met Pro Phe Phe Tyr Gly Val Tyr Leu
835 840 845
Leu Gln Gly Ser Phe Leu Leu Leu Leu Ile Ala Asp Lys Leu Gln Ala
850 855 860
Glu Ala Ser Pro Ser Val Ile Lys Ala Cys Glu Thr Ile Val Arg Ala
865 870 875 880
His Glu Ala Cys Val Val Thr Leu Ser Thr Glu Tyr Gln Arg Asn Phe
885 890 895
Ser Lys Val Met Arg Ser Ala Leu Ala Leu Ile Arg Gly Arg Val Pro
900 905 910
Glu Asp Leu Ala Glu Gln Gln Gln Arg Arg Arg Glu Leu Leu Ala Leu
915 920 925
Tyr Arg Trp Thr Gly Asn Gly Thr Gly Leu Ala Leu
930 935 940

<210> 6
<211> 2918
<212> DNA
<213> 里氏木霉
<400> 6

atggccacag cggccgcggc agcagctggc ggcgcggcgg ttgctgcggg tgcagacaca 60
ggtgcgttga gtcccgtccc gtccgctcgc gttccctccc agctgccagc ccgcgtgggt 120
ggcactggaa cgcagtgcag cgcaatcagt gcagtgcggc ccccccaact aacgctgccc 180
cccgtggctc ctcggccaca caggcgctgc aggctccagc tctacaggcc ctccaggcct 240
tccagggctt ccaggcaccc ggacaggctc cgtggcgatg ggctcagcag ctccggccca 300
gggctctgta gctgcagctg caggcggccc tccagctgct ggcgctggcg ctggcgctgt 360
ccacgccctc accacctcgc ccgagtctgc ctcggcctcg cagcccggct cgccaaccgc 420
ctcaaccacg ccgccgcaga actcactcgt gtcggctgca acctcgttcc accaccatcc 480
cagaggccgt ctggtgagca gagcctgcga ccgctgccgc cggcgcaagg ccaaggtcag 540
tctagcccct ttgctgttgc ttgcatctct gttgtcattg ctcctcctcc tgctgctgct 600
gatgctgctg ctcctcctcc tcctcctcct ccccgtctcc tggtccctgg tccctgctct 660
tcatatgtcc ttactgcccg tgtctcctct ccccgttccc gttccccctc ctcccgtcct 720
cttctcctgc gtgtctgtca tgcgtacaaa gcatacatac aatacatcag catacatggc 780
aagcgttgtg ttgtgttgag agttgtgtgt attgtattgc actgccttca caactcgttc 840
atactgctgc agcctcaccc caacaccgac ctcgtcttcc atgctgcgct actcccccgt 900
cttacacctg gatactctct ccttgccacc actgaccaat gctcttcccc gcccaaagtg 960
cgagtacctc agcgctgtcg atagctgcac gcactgccgc gatgcccacg tgcagtgcac 1020
tttcgacctg cccctggcgc gacgcggccc caaagcgagg aagaagagcg accagcccgg 1080

ccagccgcct cctgatccga gctcgctctc caccgcggct cgacccggcc agatgccgcc 1140
gccgctgacc ttctccggcc ccgcagtagc cgcgctgcag cccttcgcct cgtcgtcgct 1200
gtcgcccgac gcggcctggg agcccgtcga gccgctcagc attgacaacg gcctgccccg 1260
gcagccgctg ggcgacctgc ccggcctctc caccatccag aacatctcga cgcgccagcg 1320
atggatacac ctggccaacg ccatgacgct gcgcaacacg acgctagagc gcgtctcgaa 1380
gcgatgtatc gacctcttct tcgactacct ctacccccctc acccccctgg tgtacgagcc 1440
ggccctccgg gacgtgctcg catacatctt ctcccagccc ttgcctggcg tcaaccaacc 1500
atcgccgctg tcacagctca cgccagaccc gaccaccggc accacccccc tcaacgctgc 1560
cgagtcgtgg gccggctttg gccagcccag cggctcgcga accgtcggca gcaggctggc 1620
tccctgggcc gactcgacct tcaccctggt cacggccgtc tgcgcagagg cagcattcat 1680
gctacccaag gacattttcc ccgaaggaga atccgtctct gagatcttgc tcgaagcctc 1740
tcgggactgc ctgcaccagc acctcgaggc cgacctggag aatccgacgg ccaactcgat 1800
tgccattcgc tacttccact ccaactgcct ccacgctgcg gggaagccca agtactcgtg 1860
gcacatattt ggcgaggcca tccgcctggc gcaggtcatg cagctgcacg aggaggctgc 1920
cctcgagggg ctcgtcccca tcgaggcaga gttccgccgt cgctgctttt ggatcctgta 1980
cttgggcgac aagtcagccg ctatactcaa caatcggccc atcaccatcc acaagtactg 2040
cttcgacgcc ggcatcacca cgctataccc gtcgggtatc gaggacgagt tcctgagcac 2100
ggcgtccgag ccgccccgga agagcttcat atccggcttc aacgcaaatg tgcggctctg 2160
gcagtccgcg gctgatttgc tgctggaaat ccgcgtgctg caagatcaga tgatgcagca 2220
ctttcgaggg accatgcccc cgaaccatgt gctgccctcc gccgacaggc agcatctcga 2280
ttctctctat gtccgcttca tcacctgctt ggacgatctc ccgccgtacc tccagtcgtg 2340
cactctggcg atggcagcga tggcagaagg caacgggtct gccgagtcca agcagtacgt 2400
gatacagtgc atcaacctgc aggtgacgtt tcactgtctg cgcatggtaa ttacgcagaa 2460
attcgaagac ctctcttatt ttgctcctgg cgttgagcag gctgatctca gaaagtcgga 2520
gattgtgcga gacatgctga gggtgatgaa cgaggcgccc ttttggggcc tgcaggccaa 2580
tggcgagcca aacgtgagtc gtttccttgt ctcttctctt ttctgcacac ccttttcttc 2640
gacgaccccc cctctctctt tatatccctg cggatatgta tatcatcaag cctcggcact 2700
tgttgctaat ctgtcctgat tatgttgtct ggatgctgca ggttgaaaag attcgcctta 2760
tcggagctag tttgctggcc atcatccatc gcaaccagga ttcacccttg gctacgcgag 2820
ccaggagcga cttttccgtg cttttggata ttctcacgcg gctggactcg aaggcgtcgg 2880
accaactgag gaatacgtcc actaccgttg ttggctaa 2918

<210> 7
<211> 2038
<212> DNA
<213> 里氏木霉
<400> 7

atgctgcgct actcccccgt cttacacctg gatactctct ccttgccacc actgaccaat 60
gctcttcccc gcccaaagtg cgagtacctc agcgctgtcg atagctgcac gcactgccgc 120
gatgcccacg tgcagtgcac tttcgacctg cccctggcgc gacgcggccc caaagcgagg 180

aagaagagcg accagcccgg ccagccgcct cctgatccga gctcgctctc caccgcggct 240
cgacccggcc agatgccgcc gccgctgacc ttctccggcc ccgcagtagc cgcgctgcag 300
cccttcgcct cgtcgtcgct gtcgcccgac gcggcctggg agcccgtcga gccgctcagc 360
attgacaacg gcctgccccg gcagccgctg ggcgacctgc ccggcctctc caccatccag 420
aacatctcga cgcgccagcg atggatacac ctggccaacg ccatgacgct gcgcaacacg 480
acgctagagc gcgtctcgaa gcgatgtatc gacctcttct tcgactacct ctacccctc 540
acccccctgg tgtacgagcc ggccctccgg gacgtgctcg catacatctt ctcccagccc 600
ttgcctggcg tcaaccaacc atcgccgctg tcacagctca cgccagaccc gaccaccggc 660
accacccccc tcaacgctgc cgagtcgtgg gccggctttg gccagcccag cggctcgcga 720
accgtcggca gcaggctggc tccctgggcc gactcgacct tcaccctggt cacggccgtc 780
tgcgcagagg cagcattcat gctacccaag gacattttcc ccgaaggaga atccgtctct 840
gagatcttgc tcgaagcctc tcgggactgc ctgcaccagc acctcgaggc cgacctggag 900
aatccgacgg ccaactcgat tgccattcgc tacttccact ccaactgcct ccacgctgcg 960
gggaagccca agtactcgtg gcacatattt ggcgaggcca tccgcctggc gcaggtcatg 1020
cagctgcacg aggaggctgc cctcgagggg ctcgtcccca tcgaggcaga gttccgccgt 1080
cgctgctttt ggatcctgta cttgggcgac aagtcagccg ctatactcaa caatcggccc 1140
atcaccatcc acaagtactg cttcgacgcc ggcatcacca cgctataccc gtcgggtatc 1200
gaggacgagt tcctgagcac ggcgtccgag ccgccccgga agagcttcat atccggcttc 1260
aacgcaaatg tgcggctctg gcagtccgcg gctgatttgc tgctggaaat ccgcgtgctg 1320
caagatcaga tgatgcagca ctttcgaggg accatgcccc cgaaccatgt gctgccctcc 1380
gccgacaggc agcatctcga ttctctctat gtccgcttca tcacctgctt ggacgatctc 1440
ccgccgtacc tccagtcgtg cactctggcg atggcagcga tggcagaagg caacgggtct 1500
gccgagtcca agcagtacgt gatacagtgc atcaacctgc aggtgacgtt tcactgtctg 1560
cgcatggtaa ttacgcagaa attcgaagac ctctcttatt ttgctcctgg cgttgagcag 1620
gctgatctca gaaagtcgga gattgtgcga gacatgctga gggtgatgaa cgaggcgccc 1680
ttttggggcc tgcaggccaa tggcgagcca aacgtgagtc gtttccttgt ctcttctctt 1740
ttctgcacac ccttttcttc gacgaccccc cctctctctt tatatccctg cggatatgta 1800
tatcatcaag cctcggcact tgttgctaat ctgtcctgat tatgttgtct ggatgctgca 1860
ggttgaaaag attcgcctta tcggagctag tttgctggcc atcatccatc gcaaccagga 1920
ttcacccttg gctacgcgag ccaggagcga cttttccgtg cttttggata ttctcacgcg 1980
gctggactcg aaggcgtcgg accaactgag gaatacgtcc actaccgttg ttggctaa 2038

<210> 8
<211> 2035
<212> DNA
<213> 深绿木霉
<400> 8

atgctgcgct acgccgtcca ataccctgat acgctcgcga tctccccact gacagatgtt 60
ttcccccacc aaaagtgcga atacctcagc gccgtcgata gctgcacgca ctgccgcgat 120
gcacacgtgc agtgcacctt cgacttgcca ctggcccgac gcggtcccaa agccaggaag 180

aaaagcgatc tgcctggcca gccaccttca gatccgagcg cgctctccac cggcgcccgt 240
ggagccggcg cccagatgcc gccgccgttg gccttctccg gccccgcagt aggtggactg 300
cagcccttca actcgtcgtc gctgtcgccc gaggctccgt gggagcccgg cgagcctctc 360
agcctggaga acgggctgcc gcggcagcag atgggcgatc tgccgggcct ctccaccatc 420
caaaacatct cgacgcgcca gcgatggcta cacctcgccc aggccatgac gctgcgcaac 480
acgacgctgg aacgagtgtc gaagcgatgt atcgacctct tctttgacta cctctatcct 540
ctcacccccc tggtgtacga gccggccctg cgggaggtcc ttgcatacat cttctcgcag 600
cccatacccg gcatgaacca gccctcgccc atcgcgcagc tcacgccaga cccgacggcc 660
gggaccaccc ccctcagcgc tgccgagtcg tgggccggct tcgcgcagct caatggctcg 720
cgagccgttg gcagcaggct ggctccctgg gccgattcga cctttaccct ggtcacagct 780
gtttgcgcag aggcagcatt tatgctaccc aaagacattt tccccgaagg agaatccgtc 840
tccgaaatct ttcttgaggc ttctcgagac tgtcttcatc agcatctcga ggccgacctg 900
gaaaatccga cggcaaactc aattgccatt cggtatttcc actccaattg cctccacgcc 960
gcggggaaac caaagtactc gtggcacatc tttggcgagg ccattcgcct ggcccaagtt 1020
atgcatcttc acgaggaggc gtcgctggaa gggcttgtcc ccattgaggc agagttccgt 1080
cggcgctgct tctggattct gtatctgggg gacaaatccg cagccatatt gaacaaccgt 1140
cccataacta tccacaaata ctgctttgat acgggcatca ccaccctgta cccgtcgggg 1200
attgaggacg agttcctgat tacggcctct gagccgccca ggaagagctt tatttccggc 1260
ttcaacgcca atgtgcggct ttggcagtct gcggccgatc ttttactgga aatcagggtg 1320
ctccaagacc agatgatgca acatttccgc ggcaacctgc cccccaatca tgtgctgccg 1380
tctgcggaca ggcagcacct cgactccctc tatgttaggt tcattacctg tttggacgac 1440
ctcccgccgt acctccaatc ctgcactctg gccatggcgg ccatggccga gggtaacggg 1500
tctgcggagt cgaagcagta cgtaattcaa tgcacgaatc tgcaggtgac tttccactgc 1560
ctgcgcatgg taatcacgca gaagtttgag gatctgtctt actttgctcc cggagtagag 1620
caagcagacc tgagaaagtc ggagattgtg cgagatatgc tgagggtgat gaacgaggcg 1680
ccgttttggg gtctccaagc aaacggcgag ccaaatgtaa gctgctttcc ttttttccct 1740
tgccgtcttt ccctgcttgc ctgtccctct cttctcttct ttttttataa tgcctgcggt 1800
atttatactt ttttaagctt cggcatttat atgctaacct tgttatctga tacgacaggt 1860
tgaaaagata cgccttatcg gagctagttt gctagctatt atccatcggc atcaggataa 1920
ccccctggcg acccgagcaa ggggcgactt ttcagtactt ttggatattc tgacgcggct 1980
agactccaag gcgtctgatc agcttcggaa tacttccaat accgttgttg gctaa 2035

<210> 9
<211> 2012
<212> DNA
<213> 哈茨木霉
<400> 9

atgctgcgct actcctccgt cccctccgtc ttacaacttg atcccttctc ctccatctcc 60
ccactgacac cacacaagtg cgaatacctc agcgccgtcg atagctgcac gcactgccgc 120
gatgcccacg tgcagtgcac tttcgacttg ccactggccc gacgcggtcc caaagccagg 180

aagaagagcg atcagcccgg ccagccacct ccagacccga gctctctctc caccggggct 240
cgtggatccg gccagatgcc gccgccgttg agcttctccg gccccgcagc aggtggactg 300
cagcccttca actcgtcctc gctctcgccc gagacggcgt gggagcccgt cgagcctctc 360
agcatcgaga atggcctgcc acggcagccg ctgggcgacc tgccccggcct ctccacaatt 420
cagaacatct cgactcgcca gcggtggcta cacctcgccc acgcaatgac gttgcgcagc 480
acgacgctag aacgggtctc gaagcgatgt atcgacctct tcttcgacta cctctatcct 540
ctcacccccc tggtgtacga gcctgccctc cgggacgtcc ttgcatacat cttctcgcag 600
cccttgcccg gcatgaacca accatcgccg ctgtcccagc tcacgccaga cccgaccact 660
ggcaccaccc ccatcagttc tgccgagtcg tggacgggct tcggccagcc cagcggctcc 720
aggatcgttg gcagcaggtt ggctccttgg gtcgactcga ccttcaccct ggtcacggcc 780
gtctgcgcag aggcagcatt catgctaccc aaggacattt tccccgaagg agaatccgtc 840
tcggaaatct ttctcgaggc ctctcgcgac tgccttcacc agcatctcga ggccgacctg 900
gagaatccga cggccaactc gattgccatc cgctacttcc actccaactg cctccacgcc 960
gcggggaagc cgaaatactc gtggcacatc tttggcgagg ccatccgcct ggcgcaggtc 1020
atgcacctcc acgaggaggc ttcgctcgag gggctcgtcc ccatcgaggc agagttccgg 1080
cgccgttgct tttggatttt gtatctgggc gacaagtccg ccgctatact caataaccgt 1140
cccatcacta tccacaagta ctgcttcgac acgggtatta ctacccttta cccgtctggt 1200
attgaggatg agtttctgaa cacggcctcc gagccgccca gaaaaagctt tatttccggg 1260
ttcaacgcaa acgtgcggct gtggcagtcc gccgccgatc tgctcctgga aatccgggtg 1320
cttcaggacc agatgatgca gcattttagg ggcagcatgc cccccaacca cgttctgcca 1380
tctgccgaca ggcaacacct cgactccctc tatgtcaggt tcatcacctg cttggacgac 1440
ctcccgccgt acctccagtc atgcacgcta gccatggcag caatggccga gggcaacggg 1500
tcggccgagt ccaagcagta cgtgatccaa tgcattaacc tgcaggtgac gtttcactgt 1560
ctgcgcatgg tgattacaca gaaattcgaa gatctctctt attttgctcc tggcgttgag 1620
caggccgatt tgaggaagtc ggagattgta cgagacatgt tgagagtgat gaacgaagcg 1680
ccctttggg gcctccaggc caatggcgag ccgaatgtga gtctttttt cttctttgta 1740
attcttctac cgtttctctc ttatcaccct gcggatattt atattttaaa cttcggcact 1800
tgttttgctg accacttcct atcttgatac cgcaggtgga aaagattcgc cttatcggag 1860
ctagtttgtt agccattatc catcggaacc aggattcacc cctggcgacg cgagctagga 1920
gcgactttac ggtgctcttg gatattctca cgcggctgga ctccaaggcc tcggatcagc 1980
ttaggaacac gtctaatacc gttgttggct aa 2012

〈210〉 10
〈211〉 2950
〈212〉 DNA
〈213〉 里氏木霉
〈400〉 10

atgttgtcca atcctctccg tcgctattct gcctaccccg acatctcctc ggcgtcattt 60
gacccgaact accatggctc acagtcgcat ctccactcga tcaacgtcaa cacattcggc 120
aacagccacc cctatcccat gcagcacctc gcacagcatg cggagctttc gagttcacgc 180

atgataaggg ccagtccggt gcagccaaag cagcgccagg gctctcttat tgctgccagg 240
aagaattcaa cgggtactgc tgggcccatt cggcggagga tcagtcgcgc ttgtgaccag 300
tgcaaccagc ttcgtaccaa gtgcgatggc ttacacccat gtgcccattg tataggtatg 360
tccctttcc tctacacagt gatgctgcgc tcaagcacat gtactgatcg atcttgttta 420
gaattcggcc ttggatgcga atatgtccga gagagaaaga agcgtggcaa agcttcgcgc 480
aaggatattg ctgcccagca agccgcggcg gctgcagcac aacactccgg ccaggtccag 540
gatggtccag aggatcaaca tcgcaaactc tcacgccagc aaagcgaatc ttcgcgtggc 600
agcgctgagc ttgcccagcc tgcccacgac ccgcctcatg gccacattga gggctctgtc 660
agctccttca gcgacaatgg cctttcccag catgctgcca tgggcggcat ggatggcctg 720
gaagatcacc atggccacgt cggagttgat cctgccctgg gccgaactca gctggaagcg 780
tcatcagcaa tgggcctggg cgcatacggt gaagtccacc ccggctatga gagccccggc 840
atgaatggcc atgtgatggt gcccccgtcg tatggcgcgc agaccaccat ggccgggtat 900
tccggtatct cgtatgctgc gcaagccccg agtccggcta cgtatagcag cgacggtaac 960
tttcgactca ccggtcacat ccatgattac ccgctggcaa atgggagctc gccctcatgg 1020
ggagtctcgc tggcctcgcc ttcgaaccag ttccagcttc agctctcgca gcccatcttc 1080
aagcaaagcg atttgcgata tcctgtgctt gagcctctgc tgcctcacct gggaaacatc 1140
ctccccgtgt ctttggcgtg cgatctgatt gacctgtact tctcctcgtc ttcatcagca 1200
cagatgcacc caatgtcccc atacgttctg ggcttcgtct tccggaagcg ctccttcttg 1260
caccccacga acccacgaag gtgccagccc gcgctgcttg cgagcatgct gtgggtggcg 1320
gcacagacta gcgaagcgtc cttcttgacg agcctgccgt cggcgaggag caaggtctgc 1380
cagaagctgc tcgagctgac cgttgggctt cttcagcccc tgatccacac cggcaccaac 1440
agcccgtctc ccaagactag ccccgtcgtc ggtgctgctg ccctgggagt tcttggggtg 1500
gccatgccgg gctcgctgaa catggattca ctggccggcg aaacgggtgc ttttggggcc 1560
atagggagcc ttgacgacgt catcacctat gtgcacctcg ccacggtcgt ctcggccagc 1620
gagtacaagg gcgccagcct gcggtggtgg ggtgcggcat ggtctctcgc cagagagctc 1680
aagcttggcc gtgagctgcc gcctggcaat ccacctgcca accaggagga cggcgagggc 1740
cttagcgaag acgtggatga gcacgacttg aacagaaaca acactcgctt cgtgacggaa 1800
gaggagcgcg aagagcgacg gcgagcatgg tggctcgttt acatcgtcga caggcacctg 1860
gcgctctgct acaaccgccc cttgtttctt ctggacagcg agtgcagcga cttgtaccac 1920
ccgatggacg acatcaagtg gcaggcaggc aaatttcgca gccacgatgc agggaactcc 1980
agcatcaaca tcgatagctc catgacggac gagtttggcg atagtccccg ggcggctcgc 2040
ggcgcacact acgagtgccg cggtcgtagc atttttggct acttcttgtc cttgatgaca 2100
atcctgggcg agattgtcga tgtccaccat gctaaaagcc acccccggtt cggcgttgga 2160
ttccgctccg cgcgggattg ggacgagcag gttgctgaaa tcacccgaca cctggacatg 2220
tatgaggaga gcctcaagag gttcgtggcc aagcatctgc cattgtcctc aaaggacaag 2280
gagcagcatg agatgcacga cagtggagcg gtaacagaca tgcaatctcc actctcggtg 2340
cggaccaacg cgtccagccg catgacggag agcgagatcc aggccagcat cgtggtggct 2400
tacagcaccc atgtgatgca tgtcctccac atcctccttg cggataagtg ggatcccatc 2460
aaccttctag acgacgacga cttgtggatc tcgtcggaag gattcgtgac ggcgacgagc 2520

cacgcggtat cggctgccga agctattagc cagattctcg agtttgaccc tggcctggag 2580
tttatgccat tcttctacgg cgtctatctc ctgcagggtt ccttcctcct cctgctcatc 2640
gccgacaagc tgcaggccga agcgtctcca agcgtcatca aggcttgcga gaccattgtt 2700
agggcacacg aagcttgcgt tgtgacgctg agcacagagt atcaggtaag ccctatcagt 2760
tcaaacgtct atcttgctgt gaatcaaaga ctgacttgga catcagcgca actttagcaa 2820
ggttatgcga agcgcgctgg ctctgattcg gggccgtgtg ccggaagatt tagctgagca 2880
gcagcagcga cgacgcgagc ttcttgcact ataccgatgg actggtaacg gaaccggtct 2940
ggccctctaa 2950

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 11
acggggtacg cgtgaaattg 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 12
tgtgactgat taatgtatga 20

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 13
taatcagtca caatggccac agcggccgcg gcagc 35

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 14

tttcgccacg gagctttagc caacaacggt agtgg 35

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 15

cattaatcag tcacaatgct gcgctactcc cccgt 35

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 16

cattaatcag tcacaatgtt gtccaatcct ctccg 35

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 17

tttcgccacg gagctttaga gggccagacc ggttc 35

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 18

agctccgtgg cgaaagcctg 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 19
ctcggctacg ttgtcatcgt 20
<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 20
gacaacgtag ccgagaagta ccgcgcgctt gacaa 35
<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 21
accttggctg gtttgctgaa tgcccggtgg taagc 35
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 22
caaaccagcc aaggtaggta 20
<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 23
aagcgcgcgg tacttccatc acatgtcaat gtcac 35
<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>

<223> 寡核苷酸引物
<400> 24
aagtaccgcg cgcttgacaa 20
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 25
ttggttcttg gtttggaggg 20
<210> 26
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 26
ctagagtatt taaatggtca acggaggcca gaaga 35
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 27
gactgcctgc ctcccagttt 20
<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 28
cataactgag agaaccagaa 20
<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 29
tgcaggtatt taaatatttt gcgcatgacg ggcga 35
<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 30
atttaaatta acctgatttc aac 23
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 31
ggcggccgag atctgtgttc 20
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 32
aaagattgcg acacatacaa 20
<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 33
atttaaatag aggtagtcta gtc 23
<210> 34
<211> 35
<212> DNA

<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 34
tcacgcgtac cccgtgactg cctgcctccc agttt 35
<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 35
caaaccaaga accaacataa ctgagagaac cagaa 35
<210> 36
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 36
cgccacggag ctttagccaa caacggtagt ggacg 35
<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 37
caaaccaaga accaaaaaga ttgcgacaca tacaa 35
<210> 38
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 38
cagatctcgg ccgccacggg gtacgcgtga aattg 35
<210> 39
<211> 35

<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 39
taatcagtca caatgggccc caaagcgagg aagaa 35
<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 40
cattgtgact gattaatgta tga 23
<210> 41
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 41
taatcagtca caatggtagc cgcgctgcag ccctt 35
<210> 42
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 42
taatcagtca caatgctctc caccatccag aacat 35
<210> 43
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 43
taatcagtca caatgtacct ctacccccctc acccc 35
<210> 44

<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 44
taatcagtca caatgtacat cttctcccag ccctt 35
<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 45
cattaatcag tcacaatgct gcgctacgcc gtcca 35
<210> 46
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 46
tttcgccacg gagctttagc caacaacggt attgg 35
<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 47
taatcagtca caatgctgcg ctactcctcc gtccc 35
<210> 48
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 48
tttcgccacg gagctttagc caacaacggt attag 35

<210> 49
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 49
taatcagtca caatgctctc caccatccaa aacat 35
<210> 50
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 50
taatcagtca caatgctctc cacaattcag aacat 35
<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 51
taaagctccg tggcgaaagc ctg 23
<210> 52
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 52
cgccacggag ctttagtccg acgccttcga gtcca 35
<210> 53
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 寡核苷酸引物
<400> 53

cgccacggag ctttaagcca agggtgaatc ctggt 35

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 54

cgccacggag ctttagttcg ggggcatggt ccctc 35

<210> 55

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 55

cgccacggag ctttatatga agctcttccg gggcg 35

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 56

cacgcgttct cggctgccga agctatt 27

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 57

agccgagaac gcgtggctcg tcgccgt 27

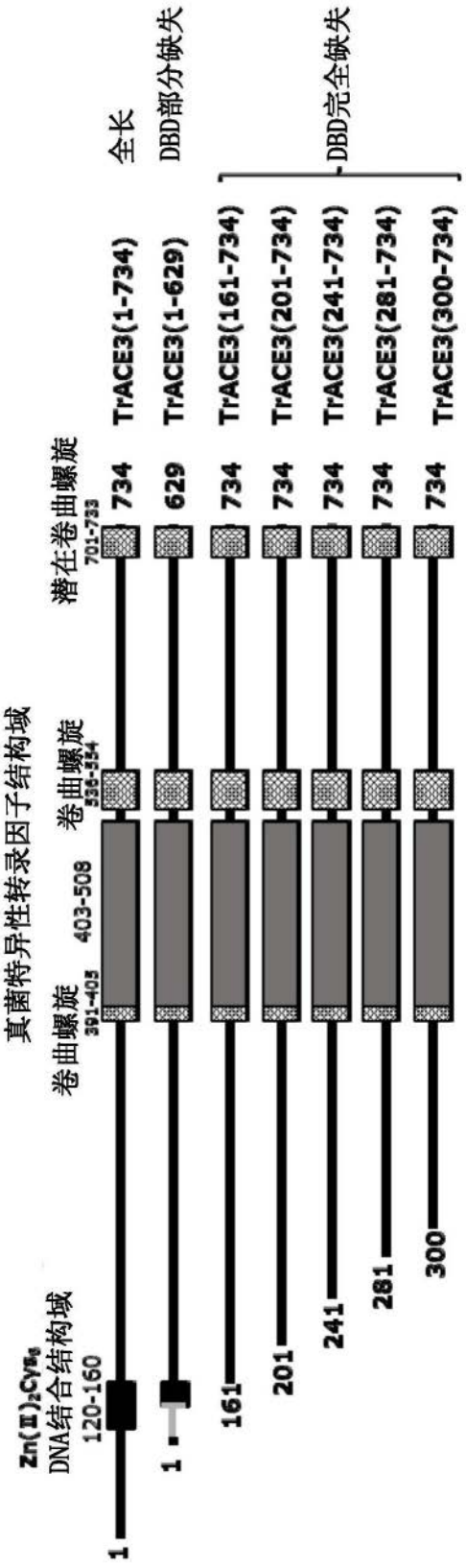

真菌特异性转录因子结构域
Zn(II)2Cys6
DNA结合结构域
120-160
卷曲螺旋
391-403
403-508
卷曲螺旋
536-554
潜在卷曲螺旋
701-733
1
1
161
201
241
281
300
734
629
734
734
734
734
734
TrACE3(1-734)
TrACE3(1-629)
TrACE3(161-734)
TrACE3(201-734)
TrACE3(241-734)
TrACE3(281-734)
TrACE3(300-734)
全长
DBD部分缺失
DBD完全缺失

图1

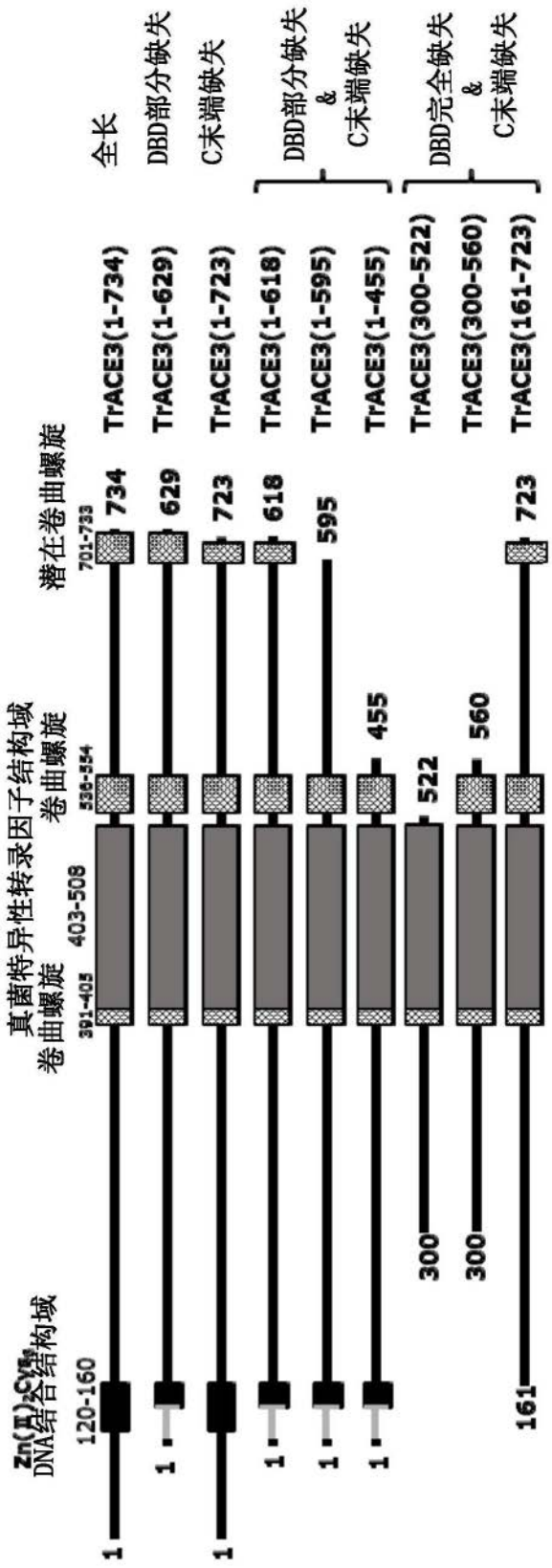

全长
DBD部分缺失
C末端缺失
DBD部分缺失
&
C末端缺失
DBD完全缺失
&
C末端缺失
TrACE3(1-734)
TrACE3(1-629)
TrACE3(1-723)
TrACE3(1-618)
TrACE3(1-595)
TrACE3(1-455)
TrACE3(300-522)
TrACE3(300-560)
TrACE3(161-723)
潜在卷曲螺旋
701-733
734
629
723
618
595
455
522
560
723
真菌特异性转录因子结构域
卷曲螺旋
538-554
403-508
卷曲螺旋
391-405
Zn(II)2Cys6
DNA结合结构域
120-160
1
300
161

图2

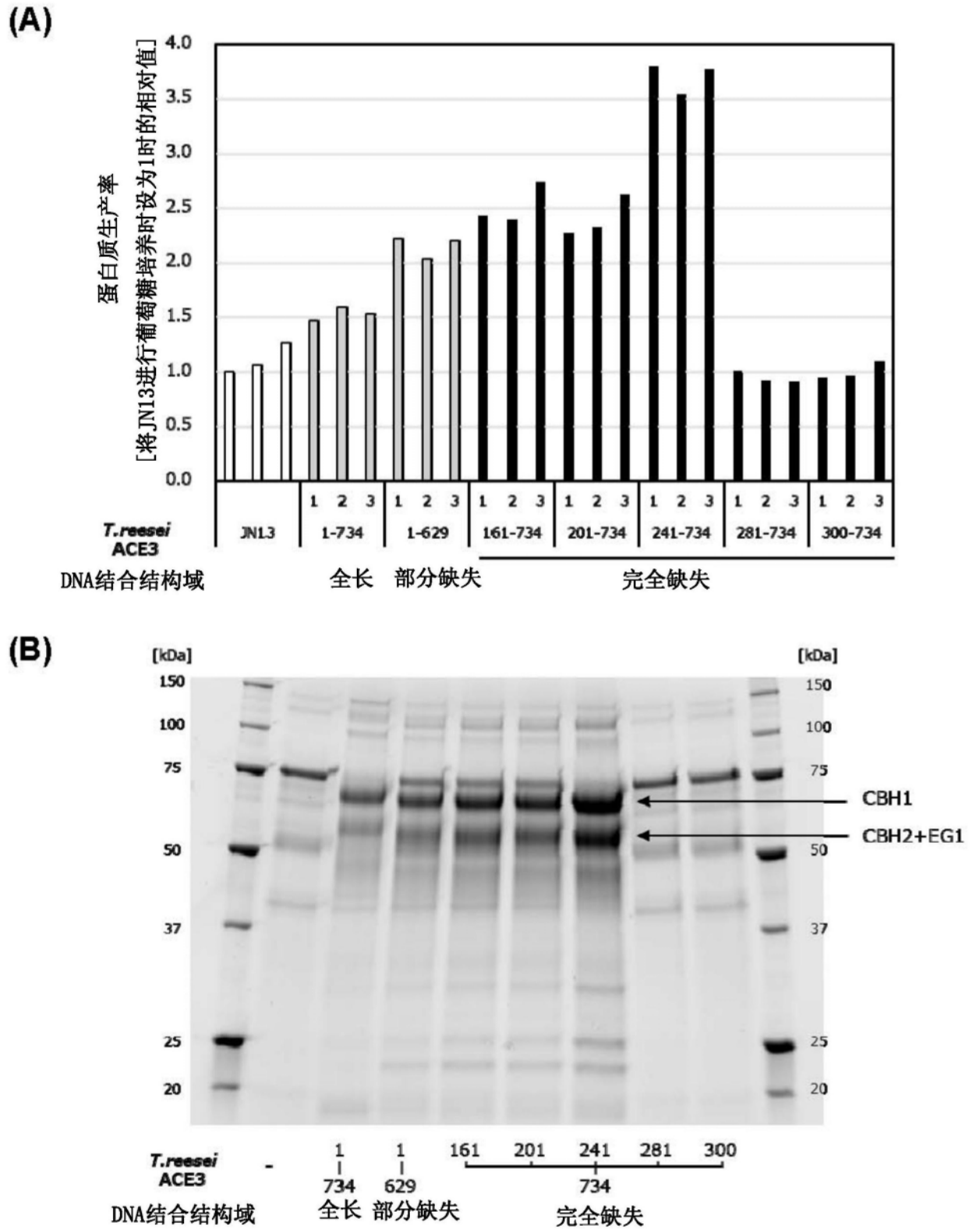

(A)
蛋白质生产率
[将JN13进行葡萄糖培养时设为1时的相对值]
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
T.reesei ACE3
JN13
1-734
1-629
161-734
201-734
241-734
281-734
300-734
DNA结合结构域
全长
部分缺失
完全缺失
(B)
[kDa]
150
100
75
50
37
25
20
CBH1
CBH2+EG1
T.reesei ACE3
1
734
1
629
161
201
241
281
300
734
DNA结合结构域
全长
部分缺失
完全缺失

图3

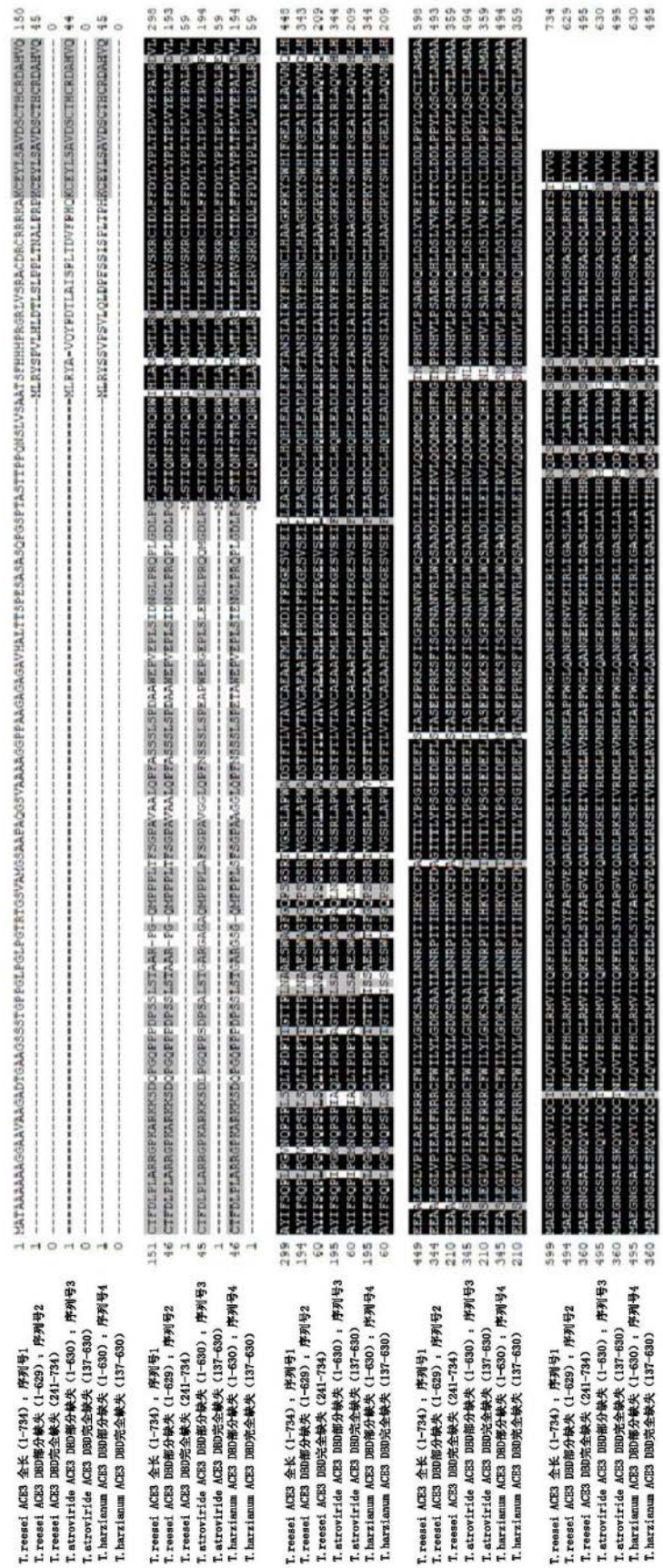


图4

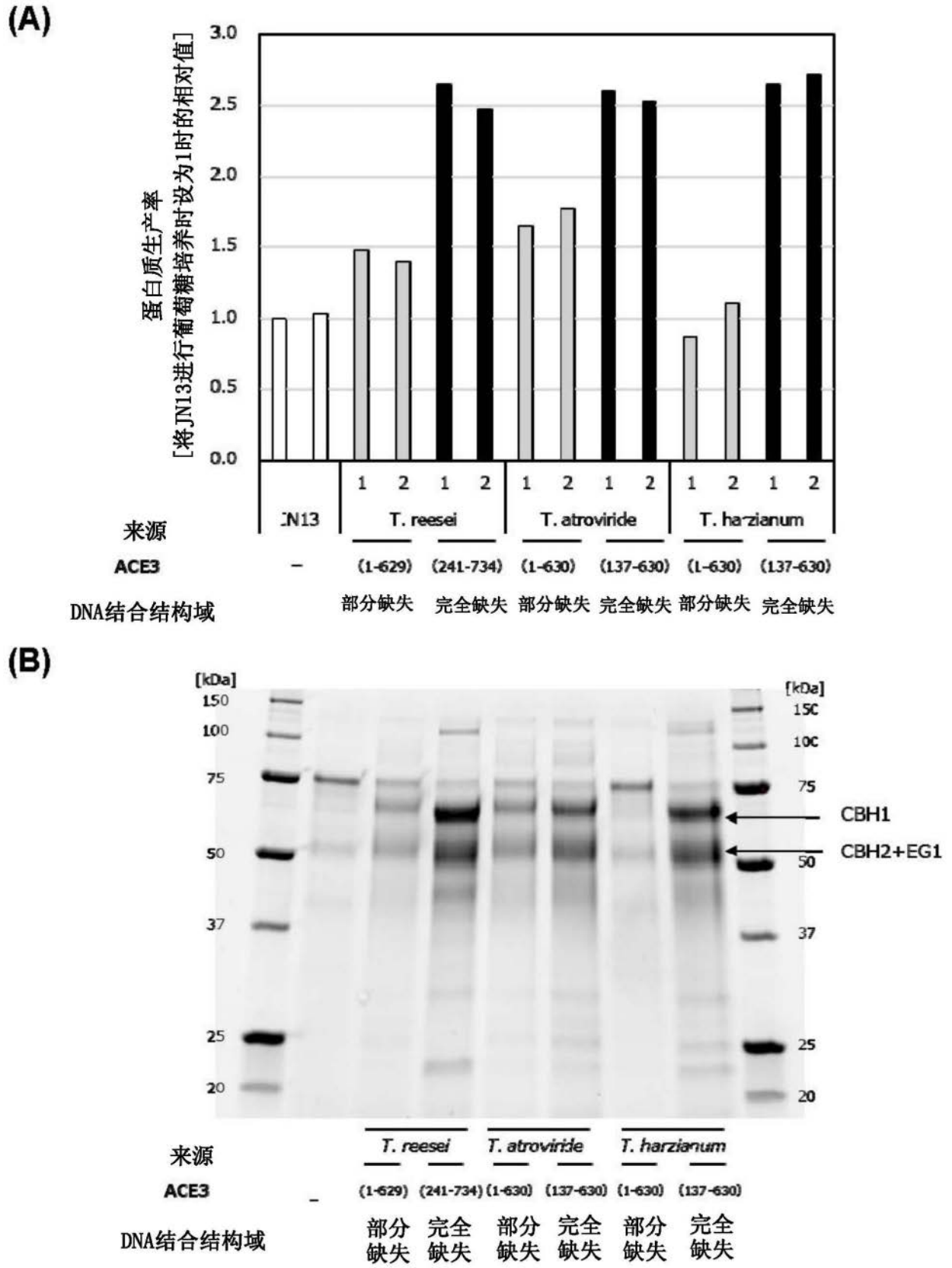

(A)
蛋白质生产率
[将JN13进行葡萄糖培养时设为1时的相对值]
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2
JN13
T. reesei
T. atroviride
T. harzianum
来源
ACE3
DNA结合结构域
–
(1-629)
(241-734)
(1-630)
(137-630)
(1-630)
(137-630)
部分缺失
完全缺失
部分缺失
完全缺失
部分缺失
完全缺失
(B)
[kDa]
150
100
75
50
37
25
20
CBH1
CBH2+EG1
T. reesei
T. atroviride
T. harzianum
来源
ACE3
DNA结合结构域
(1-629)
(241-734)
(1-630)
(137-630)
(1-630)
(137-630)
部分缺失
完全缺失
部分缺失
完全缺失
部分缺失
完全缺失

图5

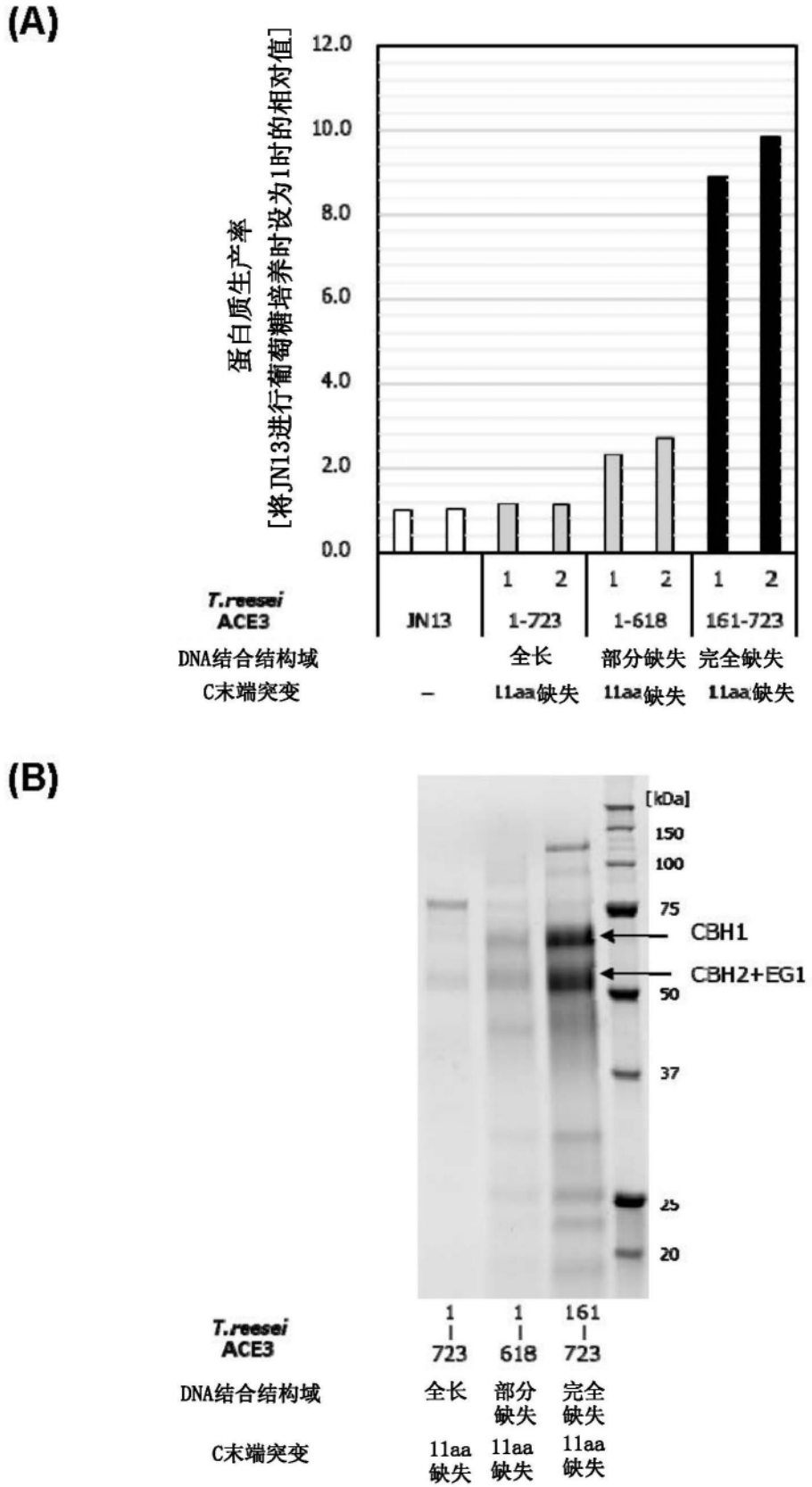

(A)
蛋白质生产率
[将JN13进行葡萄糖培养时设为1时的相对值]
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
T.reesei ACE3
JN13
1-723
1-618
161-723
DNA结合结构域
全长
部分缺失
完全缺失
C末端突变
–
11aa缺失
11aa缺失
11aa缺失
(B)
[kDa]
150
100
75
50
37
25
20
CBH1
CBH2+EG1
T.reesei ACE3
1-723
1-618
161-723
DNA结合结构域
全长
部分缺失
完全缺失
C末端突变
11aa缺失
11aa缺失
11aa缺失

图6

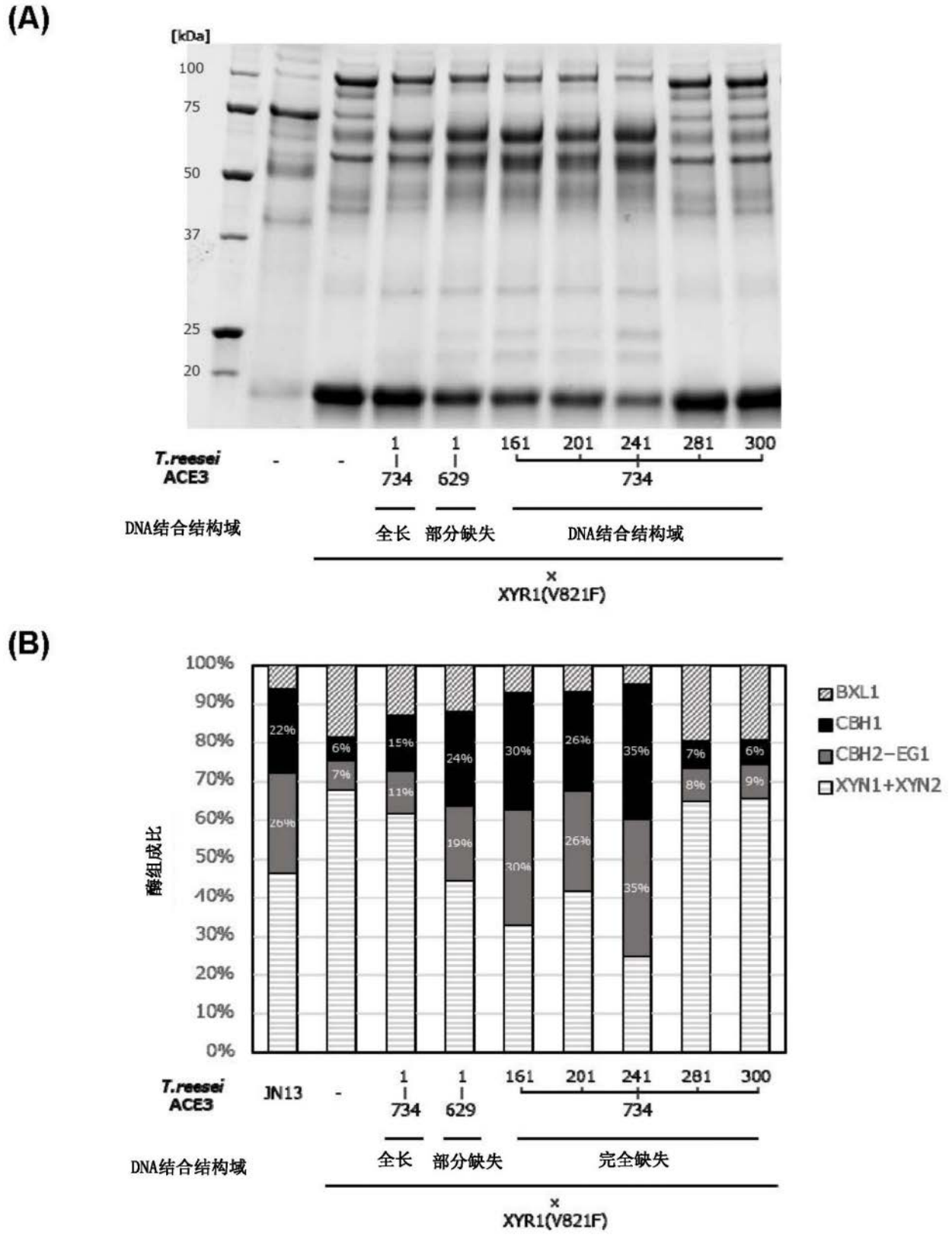

(A)
[kDa]
100
75
50
37
25
20
T.reesei ACE3
-
-
1
734
1
629
161
201
241
281
300
734
DNA结合结构域
全长
部分缺失
DNA结合结构域
×
XYR1(V821F)
(B)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
酶组成比
BXL1
CBH1
CBH2-EG1
XYN1+XYN2
22%
26%
6%
7%
15%
11%
24%
19%
30%
30%
26%
26%
35%
35%
7%
8%
6%
9%
T.reesei ACE3
JN13
-
1
734
1
629
161
201
241
281
300
734
DNA结合结构域
全长
部分缺失
完全缺失
×
XYR1(V821F)

图7

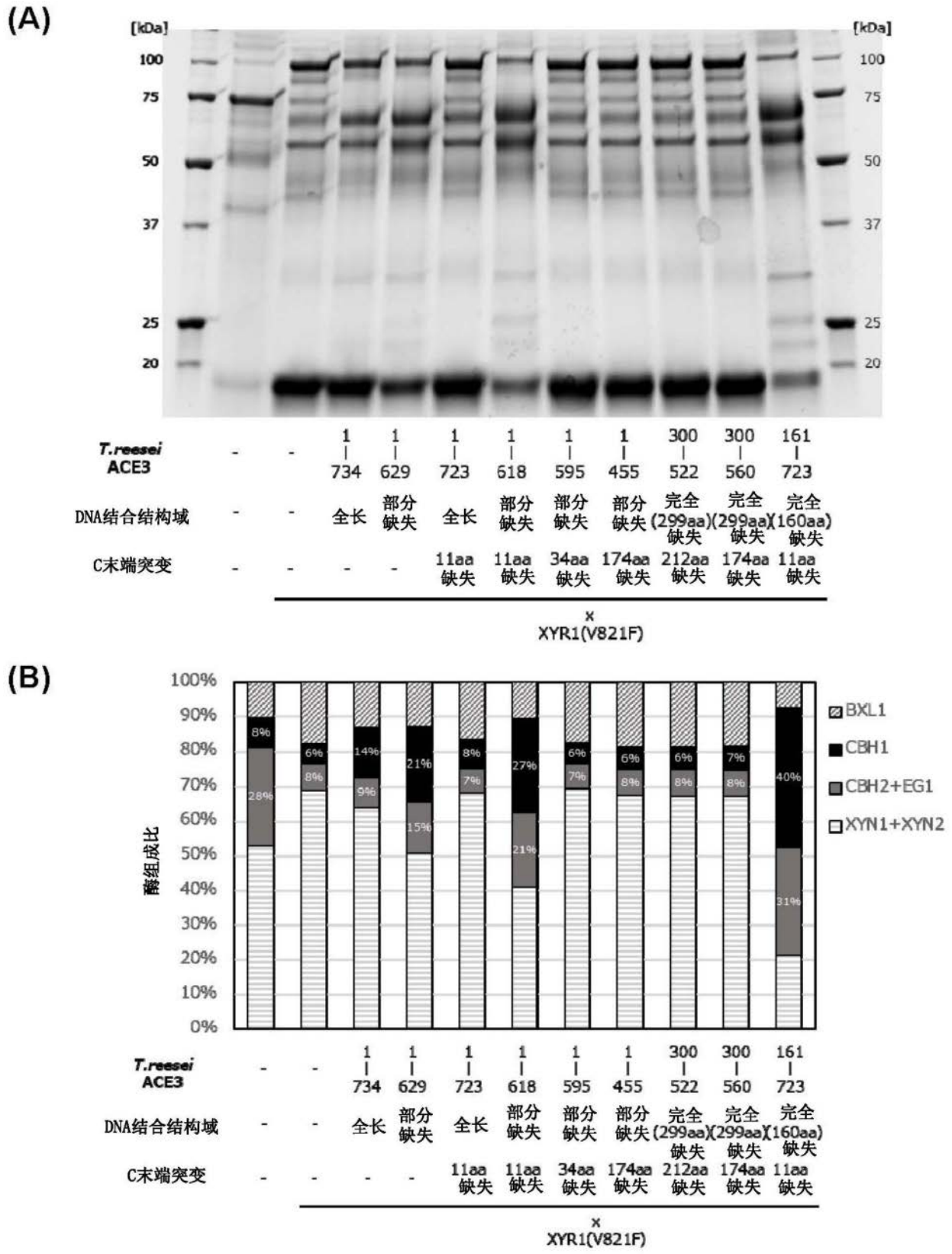

(A)
[kDa]
100
75
50
37
25
20
T.reesei ACE3
DNA结合结构域
C末端突变
1 | 734 全长
1 | 629 部分缺失
1 | 723 全长
1 | 618 部分缺失
1 | 595 部分缺失
1 | 455 部分缺失
300 | 522 完全(299aa)缺失
300 | 560 完全(299aa)缺失
161 | 723 完全(160aa)缺失
11aa缺失
34aa缺失
174aa缺失
212aa缺失
x
XYR1(V821F)
(B)
酶组成比
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
BXL1
CBH1
CBH2+EG1
XYN1+XYN2
8%
28%
6%
8%
14%
9%
21%
15%
8%
7%
27%
21%
6%
7%
6%
8%
6%
8%
7%
8%
40%
31%

图8