

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512545

(P2005-512545A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/24	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-552985 (P2003-552985)	(71) 出願人	500284580
(86) (22) 出願日	平成14年10月30日 (2002.10.30)		ジェネンコー・インターナショナル・イン
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月18日 (2004.6.18)		ク
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034611		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ
(87) 国際公開番号	W02003/052118		・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(87) 国際公開日	平成15年6月26日 (2003.6.26)	(74) 代理人	100071010
(31) 優先権主張番号	10/027,000		弁理士 山崎 行造
(32) 優先日	平成13年12月18日 (2001.12.18)	(74) 代理人	100121762
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 杉山 直人
		(74) 代理人	100126767
			弁理士 白銀 博
		(74) 代理人	100122839
			弁理士 星 貴子
		(74) 代理人	100118647
			弁理士 赤松 利昭
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 b g l 4 β-グルコシダーゼ及びそれをエンコードする核酸

## (57) 【要約】

本発明は、b g l 4 として示す新規な - グルコシダーゼ核酸配列及び対応する B G L 4 アミノ酸配列を提供する。また、本発明は B G L 4、組換え B G L 4 タンパク質をエンコードする核酸配列を含む発現ベクター及び宿主細胞を提供し、それらを生成するための方法も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- グルコシダーゼ活性を有する酵素をエンコードするヌクレオチド配列を含む、真菌源由来の単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 2】

以下からなる群より選択される単離ポリヌクレオチド：

(a) 図 2 (配列番号 2) で表すアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(b) 図 2 (配列番号 2) で表すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(c) 図 2 で表すアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(d) 図 2 で表すアミノ酸配列を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(e) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(f) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードする核酸配列または相補的な核酸配列；

(g) 配列番号 3 として表す核酸配列またはその相補的配列；及び

(h) 高ストリンジェンシーな条件下で配列番号 3 として表す配列にハイブリダイズする核酸配列またはその相補的または断片配列であり、前記単離ポリヌクレオチドが - グルコシダーゼの生物学的活性を有するポリペプチドをエンコードするもの。

## 【請求項 3】

10.0 のオープンギャップペナルティ、0.1 の延長ギャップペナルティ及び B L O S U M 30 類似マトリックスの初期値パラメーターを用いて操作する M a c V e c t o r バージョン 6.5 の C L U S T A L - W プログラムを使用して同一性%を計算する、請求項 2 の単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 4】

50% ホルムアミド、6X S S C、5X D e n h a r d t ' s 溶液、0.5% S D S 及び 100 µg / ml 変性キャリア DNA 中、約 42 でハイブリダイゼーションを行い、続いて室温で 2X S S P E 及び 0.5% S D S 中で 2 回洗浄し及び 42 で 0.1X S S P E 及び 0.5% S D S 中でさらに 2 回洗浄した、請求項 2 の単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

前記ポリヌクレオチドが RNA 分子である、請求項 2 の単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 6】

- グルコシダーゼ活性を有する酵素をエンコードし、該酵素がトリコデルマ源由来である単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 7】

酵素がトリコデルマ r e e s e i 由来である、請求項 6 の単離ポリヌクレオチド。

## 【請求項 8】

以下のいずれかのポリヌクレオチド配列を含む発現構築体；(i) 図 2 (配列番号 2) に表すアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有する配列、または (i i) 図 2 に記載のヌクレオチド配列由来のプロープの中から高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズできる配列、または (i i i) 図 2 (配列番号 2) に表すアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有するヌクレオチド配列に相補的な配列。

## 【請求項 9】

請求項 8 の発現構築体を含むベクター。

## 【請求項 10】

請求項 2 の単離ポリヌクレオチドを含むベクターであって、該ベクターで形質転換した宿

10

20

30

40

50

主細胞により認識される制御配列に作動可能に連結するベクター。

【請求項 1 1】

請求項 9 のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 1 2】

請求項 1 0 のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 1 3】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 1 2 の宿主細胞。

【請求項 1 4】

宿主細胞が真核細胞である、請求項 1 2 の宿主細胞。

【請求項 1 5】

請求項 2 のポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞。

【請求項 1 6】

組換え宿主細胞が原核細胞である、請求項 1 5 の組換え宿主細胞。

【請求項 1 7】

組換え宿主細胞が真核細胞である、請求項 1 5 の組換え宿主細胞。

【請求項 1 8】

以下からなる群より選択される配列を含む、 - グルコシダーゼの生物学的活性を有する精製 B G L 4 ポリペプチド：

( a ) 図 2 ( 配列番号 2 ) に表すアミノ酸配列と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；

( b ) 図 2 ( 配列番号 2 ) に表すアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；

( c ) 図 2 に表すアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；

( d ) 図 2 に表すアミノ酸配列；

( e ) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；

( f ) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列；

( g ) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列の精製された生物学的活性断片。

【請求項 1 9】

- グルコシダーゼ活性を有する酵素を生成する方法であって、以下を含む：

( a ) 請求項 2 で定義するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを用いて宿主細胞を安定に形質転換する工程；

( b ) 前記形質転換宿主細胞を該宿主細胞に適切な条件下で培養し、前記 - グルコシダーゼを生成する工程；及び

( c ) 前記 - グルコシダーゼを再生する工程。

【請求項 2 0】

宿主細胞が糸状菌または酵母菌細胞である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 9 の方法により調製される - グルコシダーゼ活性を有する精製酵素。

【請求項 2 2】

遺伝子を不活化させ、B G L 4 ポリペプチド生成を防ぐ欠失または挿入またはその他の変異を b g l 4 遺伝子内に含む組換え宿主細胞。

【請求項 2 3】

配列番号 2 として表す配列を有する B G L 4 ポリペプチドをエンコードするメッセンジャー R N A に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、 - グルコシダーゼ生成宿主細胞にさらすと、前記宿主細胞による - グルコシダーゼ生成を減少または抑制する前記オリゴヌクレオチド。

【請求項 2 4】

宿主細胞が糸状菌である、請求項 2 3 のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 5】

10

20

30

40

50

以下からなる群より選択されるポリペプチドを含む洗剤組成物：

- (a) 図 2 (配列番号 2) に表すアミノ酸配列と少なくとも 85% の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- (b) 図 2 (配列番号 2) に表すアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- (c) 図 2 に表すアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- (d) 図 2 に表すアミノ酸配列；
- (e) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列；
- (f) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列；
- (g) 配列番号 2 として表すアミノ酸配列の精製された生物学的活性断片。

10

【請求項 26】

アルベルギルス種内で - グルコシダーゼ活性を有する異種ポリペプチドを発現する方法であって、以下を含む：

- (a) 異種 - グルコシダーゼをエンコードするポリヌクレオチドに結合し、それによりキメラポリペプチドをエンコードする、シグナル配列をエンコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを有する宿主アスペルギルスを提供する工程；
- (b) 前記キメラポリペプチドが生成される前記アスペルギルスに適切な条件下で、宿主アスペルギルスを培養し、前記キメラポリペプチドを生成する工程。

20

【請求項 27】

エタノールを生成する方法であって、前記方法は以下の工程を含む：

- (a) バイオマス組成物を - グルコシダーゼ 4 を含む酵素組成物と接触させ、砂糖水を得る工程；
- (b) 砂糖水に発酵生物を加える工程；及び
- (c) エタノールを生成するのに十分な条件下で発酵生物を培養する工程、及びバイオマス組成物は任意で前処理する。

【請求項 28】

さらに、工程 (a) が少なくとも 1 のエンドグルカナーゼを追加する工程を含む、セルロース 27 に記載の方法。

【請求項 29】

工程 (a) がさらに少なくとも 1 のセロビオヒドロラーゼ (cellulohydrolase) を追加する工程を含む、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 30】

工程 (a) がさらに少なくとも 1 のセロビオヒドロラーゼを追加する工程を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前処理は希酸を用いる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

エタノールを生成する方法であって、前記方法は以下の工程を含む：

- (a) バイオマス組成物を - グルコシダーゼ 4 を含む酵素組成物及び発酵生物と接触させる工程；及び
- (b) エタノールを生成するのに十分な条件下で発酵生物を培養する工程、及びバイオマス組成物は任意で前処理する。

40

【請求項 33】

さらに、工程 (a) が少なくとも 1 のエンドグルカナーゼを追加する工程を含む、セルロース 32 に記載の方法。

【請求項 34】

工程 (a) がさらに少なくとも 1 のセロビオヒドロラーゼを追加する工程を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 35】

50

工程 ( a ) がさらに少なくとも 1 のセロピオヒドロラーゼを追加する工程を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前処理は希酸を用いる、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

政府による支援

この研究の一部は、米国エネルギー省との主契約番号 D E - A C 3 6 - 9 9 G O 1 0 3 3 7 の下、再生可能エネルギー研究所との下請け契約番号 Z C O - 3 0 0 1 7 - 0 1 により資金提供されたものである。従って、米国政府は本発明について一定の権利を有する。

【0002】

技術分野

本発明は、 - グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドをエンコードする単離 b g l 4 核酸配列に関する。また、本発明は該核酸配列を含んだ核酸構築体、ベクター及び宿主細胞、並びに組換え B G L 4 ポリペプチドの生成方法に関する。

【0003】

参考文献

- Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990.
- Altschul, S.F., et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. 20
- Aro, N., et al., J. Biol. Chem., 10.1074/M003624200, April 13, 2001.
- Aubert, et al., Ed., p11 et seq., Academic Press, 1988.
- Ausubel G. M., et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1993.
- Baldwin, D., et al., Curr. Opin. Plant Biol. 2(2):96-103, 1999.
- Baulcombe, D., Arch. Virol. Suppl. 15:189-201, 1999.
- Bhikhabhai, R. et al., J. Appl. Biochem. 6:336, 1984
- Brumbauer, A. et al., Bioseparation 7:287-295, 1999.
- Carter et al., Nucl. Acids Res. 13:4331, 1986
- Chem et al., Biochem. Biophys. Acta. 1121:54-60, 1992 30
- Coligan, J. E. et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1991.
- Collen, A., et al., Journal of Chromatography A 910:275-284, 2001.
- Coughlan, et al., BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION.
- Cummings and Fowler, Curr. Genet. 29:227-233, 1996.
- Dayhoff et al. in Atlas of Protein Sequence and Structure, Volume 5, Supplement 3, Chapter22, pp. 345-352, 1978.
- Deutscher, M.P., Methods Enzymol. 182:779-80, 1990.
- Doolittle, R. F., OF URFS AND ORFS, University Science Books, CA, 1986.
- Ellouz, S. et al., J. Chromatography 396:307, 1987.
- Fields and Song, Nature 340:245-246, 1989. 40
- Filho, et al. Can.J. Microbiol. 42:1-5, 1996.
- Fliess, A., et al., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:314, 1983.
- Freer, et al. J. Biol. Chem. 268:9337-9342, 1993
- Freshney, R. I., ed., ANIMAL CELL CULTURE, 1987.
- Goyal, A. et al. Bioresource Technol. 36:37, 1991.
- Halldorsdottir, S et al., Appl Microbiol Biotechnol. 49(3):277-84, 1998.
- Hu et al., Mol Cell Biol. 11:5792-9, 1991.
- Hemmpel, W.H. ITB Dyeing/Printing/Finishing 3:5-14, 1991.
- Herr et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 5:29-36, 1978
- Jakobovits, A, et al., Ann N Y Acad Sci 764:525-35, 1995. 50

- Jakobovits, A, *Curr opin Biotechnol* 6(5):561-6, 1995
- Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986.
- Kawaguchi, T et al., *Gene* 173(2):287-8, 1996
- Kwles, J. et al., *TIBTECH* 5, 255-261, 1987.
- Kohler and Milstein, *Nature* 256:495, 1975.
- Krishna, S. et al., *Bioresource Tech.* 77:193-196, 2001.
- Kumar, A., et al., *Textile Chemist and Colorist* 29:37-42, 1997
- Lehtio, J. et al., *FEMS Microbiology Letters* 195:197-204, 2001.
- Li and Ljungdahl *Appl. Environ. Microbiol.* 62:209-213, 1996.
- Linder, M. and Teeri, T. T., *Biotechnol.* 57:15-28, 1997. 10
- Medve, J. et al., *J. Chromatography A* 808:153, 1998.
- Ohmiya et al., *Biotechnol. Gen. Engineer. Rev.* 14:365-414, 1997.
- Ooi et al., *Nucleic Acids Res.* 18(19):5884, 1990.
- Ortega et al., *International Biodeterioration and Biodegradation* 47:7-14, 2001
- Penttila et al., *Yeast* 3:175-185, 1987.
- Penttila et al., *Gene* 63: 103-112, 1988.
- Pere, J., et al., In *Proc. Tappi Pulping Conf.*, Nashville, TN, 27-31, pp. 693-696, 1996.
- Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988. 20
- Rothstein et al., *Gene* 55:353-356, 1987.
- Saarilahti et al., *Gene* 90:9-14, 1990.
- Sakamoto et al., *Curr. Genet.* 27:435-439, 1995.
- Saloheimo M, et al., *Gene* 63:11-22, 1988.
- Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Second Edition)*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989.
- Schulein, *Methods Enzymol.*, 160, 25, pages 234 et seq, 1988.
- Scopes, *Methods Enzymol.* 90 Pt E:479-90, 1982.
- Spilliaert R, et al., *Eur J Biochem.* 224(3):923-30, 1994.
- Stahlberg, J. et al., *Bio/Techl.* 9:286-290, 1991. 30
- Strathem et al., eds. (1981) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*.
- Suurnakki, A. et al., *Cellulose* 7:189-209, 2000.
- Te'o, J. et al., *FEMS Microbiology Letters* 190:13-19, 2000.
- Tilbeurgh, H. et al., *FEBS Lett.* 16:215, 1984.
- Timberlake et al., *Cell* 1:29-37, 1981.
- Tomaz, C. and Queiroz, J., *J. Chromatography A* 865:123-128, 1999.
- Tomme, P. et al., *Eur. J. Biochem.* 170:575-581, 1988.
- Tormo, J. et al., *EMBO J.* 15:5739-5751, 1996.
- Tyndall, R.M., *Textile Chemist and Colorist* 24:23-26, 1992.
- Van Rensburg et al., *Yeast* 14:67-76, 1998. 40
- Van Tilbeurgh, H. et al., *FEBS Lett.* 204:223-227, 1986.
- Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536, 1988.
- Warrington, et al., *Gemics* 13:803-808, 1992.
- Wells et al., *Gene* 34:315, 1985.
- Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317-415, 1986.
- Wood, *Biochem. Soc. Trans.*, 13, pp. 407-410, 1985.
- Wood et al., *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 160, 25, p. 87 et seq., Academic press, New York, 1988.
- Zoller et al., *Nucl. Acids Res.* 10:6487, 1987.

## 背景技術

セルロース及びヘミセルロースは光合成によって生成される最も豊富な植物性材料である。これらは高分子基質を単糖に加水分解することができる細胞外酵素を生産する細菌、酵母及び真菌などの多くの微生物によって分解され、エネルギー源として使用され得る (Aro et al., 2001)。非再生可能資源の限界が近づいているので、セルロースが主な再生可能エネルギー資源となる可能性は非常に大きい (Krishna et al., 2001)。生物学的プロセスを介したセルロースの効果的活用は食料、飼料及び燃料不足を克服するための1つの手段である (Ohmiya et al., 1997)。

### 【0005】

セルラーゼはセルロース ( - 1, 4 - グルカンまたは D - グルコシド結合 ) を加水分解してグルコース、セロビオース、セロオリゴ糖 ( cellooligosaccharides ) 等を生成する酵素である。セルラーゼは従来から大きく3つに分類されている: エンドグルカナーゼ ( EC 3.2.1.4 ) ( "EG" )、エキソグルカナーゼまたはセロビオヒドロラーゼ ( EC 3.2.1.91 ) ( "CBH" ) 及び - グルコシダーゼ ( [ ] - D - グルコシドグルコヒドロラーゼ; EC 3.2.1.21 ) ( "BG" )。 ( Kwiles et al., 1987; Shulein, 1988 )。エンドグルカナーゼはセルロース繊維のアモルファス部分に主に働くのに対し、セロビオヒドロラーゼは結晶セルロースも分解することができる ( Nevalainen と Penttilä, 1995 )。従って、セルロース系において結晶セルロースを効率的に溶解させるためにはセロビオヒドロラーゼの存在が必要である ( Suurnakki et al., 2000 )。 - グルコシダーゼはセロビオース、セロオリゴ糖及びその他のグルコシドから D - グルコース単位を遊離させるように働く ( Freer, 1993 )。

### 【0006】

セルラーゼは多数の細菌、酵母及び真菌によって生成されることが知られている。特定の真菌はセルロースの結晶形状を分解できる完全なセルラーゼ系を作り出し、発酵によりセルラーゼを大量に敏速に生成する。酵母菌の多くは、例えばサッカロマイセス・セレヴィシエなどはセルロースを加水分解することができないので、糸状菌は特別な役割を果たす。例えば、Aro et al., 2001; Aubert et al., 1988; Wood et al., 1988 及び Coughlan et al. を参照されたい。

### 【0007】

CBH、EG 及び BG の真菌セルロース分類はさらに各々の分類内で多数の構成に広げられる。例えば、多数の CBH、EG 及び BG が糸状菌 ( Trichoderma reesei ) など様々な真菌源から単離され、T. reesei は公知遺伝子である2つの CBH、すなわち CBH I 及び CBH II、少なくとも5つの EG、すなわち、EG I、EG II、EG III、EG IV 及び EG V 及び少なくとも2つの BG、すなわち BG 1 及び BG 2 を含む。

### 【0008】

効率的に結晶セルロースをグルコースに転換するために、CBH、EG 及び BG 各々の分類成分を含む完全なセルラーゼ系が必要であり、単離した成分は結晶セルロースの加水分解にほとんど効果がない ( Filho et al., 1996 )。異なる分類から得たセルラーゼ成分間で相乗関係が観測されている。特に、EG 型セルラーゼ及び CBH 型セルラーゼはより効率的にセルロースを分解するために相助的に相互作用する。例えば、Wood, 1985 を参照されたい。

### 【0009】

セルラーゼは、洗剤組成物の洗浄能力の向上目的、柔軟剤としての使用目的、綿織物の手触り及び外観の改善目的等の織物処理に有用であることが当業界に公知である ( Kumar et al., 1997 )。

### 【0010】

10

20

30

40

50

改善された洗浄能力を有するセルラーゼ含有洗剤組成物（米国特許第4,435,307号；英国出願番号第2,095,275号及び2,094,826号）及び織物の手触り及び外観を改善するための織物処理における使用（米国特許第5,648,263号、第5,691,178号及び第5,776,757号；英国出願番号第1,358,599号；The Shizuoka Prefectural Hammamatsu Textile Industrial Research Institute Report、Vol.24、pp.54-61、1986）が記載されている。

#### 【0011】

従って、真菌及び細菌により生成されるセルラーゼはかなりの注目を集めていた。特に、トリコデルマ菌（*Trichoderma* spp.）の発酵（例えば、トリコデルマ・ロンギブラチアタム（*Trichoderma longibrachiatum*）またはトリコデルマ *reesei*（*T. reesei*））は結晶状セルロースを分解できる完全なセルラーゼ系を作り出すことが示されている。米国特許第5,475,101号はトリコデルマ・ロンギブラチアタム由来のEG IIIで表す特定の有用な酵素の精製及び分子クローニングについて開示している。

#### 【0012】

セルラーゼ組成物の開示は以前からされていたが、家庭用洗剤、ストーンウォッシュ用組成物または洗濯用洗剤等に使用するための新規で改善されたセルラーゼ組成物の必要性が依然として残っている。界面活性剤（例えば、直鎖アルキルスルホン酸塩、LAS）耐性を示すセルラーゼや、熱応力条件下で改善された特性を示すセルラーゼ、増加または減少したセルロース分解能を示すセルラーゼ、及び/または *in vitro* で高レベルの発現を示すセルラーゼについては特に関心が集まっている。

#### 【0013】

##### 発明の概要

本発明は、ここでBGL4として同定される単離セルラーゼタンパク質、及びBGL4をエンコードする核酸を提供する。

#### 【0014】

1の側面において、BGL4ポリペプチドまたはタンパク質は配列番号2で表す配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の配列同一性を有する配列を含む。

#### 【0015】

他の側面において、本発明は(i)BGL4断片、好ましくは少なくとも約20~100アミノ酸長、より好ましくは約100~200アミノ酸長、及び(ii)BGL4を含む医薬組成物を含む。種々の実施形態において、該断片はBGL4のN末端ドメインまたはBGL4のC末端ドメインに対応する。

#### 【0016】

他の側面において、本発明はBGL4をエンコードする配列を有する単離ポリヌクレオチド、bgl4コード配列に相補的な配列及び該ポリヌクレオチドを含む組成物を含む。ポリヌクレオチドはmRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNAまたはこれらのアンチセンス類似体であってもよい。

#### 【0017】

bgl4ポリヌクレオチドは、中から高ストリンジェンシーな条件下で配列番号1として表す核酸の相補体にハイブリダイズする単離核酸分子を含むことができ、該核酸分子は-グルコシダーゼ活性を示すBGL4ポリペプチドをエンコードする。

#### 【0018】

該ポリヌクレオチドは配列番号1として表す配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上の配列同一性を有するBGL4タンパク質をエンコードする。具体的な実施態様において、ポリヌクレオチドは配列番号1と実質的に同一である配列を含む。また、発明はポリヌクレオチド断片、好ましくは少なくとも約15~30ヌクレオチド長の断片を意図するものである。



## 【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、B G L 4 をエンコードする核酸配列またはこれらの断片またはスプライス変異体を含む組換え発現ベクターであって、選択した宿主のタンパク質発現に効果的な規制因子に作動可能に連結するものを提供する。別の側面において、本発明はベクターを含んだ宿主細胞を含む。

## 【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、タンパク質発現を促す効果的な条件下でB G L 4 をエンコードする核酸配列を含む組換え原核または真核宿主細胞の培養により、組換え技術により、B G L 4 を生成する方法を含み、及びそれから宿主細胞または細胞培養基からのタンパク質の回収を含む。

10

## 【 0 0 2 1 】

他の側面において、本発明はセルロースを糖及び／またはエタノールに変換するのに有用な酵素組成物を提供する。好ましい実施態様において酵素組成物はB G L 4 を含む。該組成物はさらにエンドグルカナーゼ及び／またはセルビオヒドロラーゼなどの追加のセルラーゼ酵素を含む。該組成物はB G L 4 で濃縮されていてもよい。

## 【 0 0 2 2 】

さらに他の側面において、本発明はB G L 4 に特異的に免疫反応性である抗体を含む。

## 【 0 0 2 3 】

b g l 4 核酸及びB G L 4 タンパク質を検出する分析方法もまた、本発明の一部を構成する。

20

## 【 0 0 2 4 】

発明の詳細な説明1. 定義

特に示さない限り、ここで用いる全ての技術及び科学用語は本発明の当業界における意味と同じ意味を有する。定義及び技術用語に関しては特にS a m b r o o k e t a l .、1989及びA u s u b e l F M e t a l、1993を参照されたい。本発明は記載した特定の方法、手順及び試薬に限定されないことは当然であり、これらは変更可能である。

## 【 0 0 2 5 】

ここに引用する全ての文献は、本発明に関連して使用する組成物及び方法を記載及び開示する目的のため、明示的にここに引用するものとする。

30

## 【 0 0 2 6 】

ここで用いる“ポリペプチド”の語はペプチド結合で結合したアミノ酸残基の単鎖よりなる化合物をいう。ここで用いる“タンパク質”の語は“ポリペプチド”の語と同義であり、またはさらに2以上のポリペプチドの複合体をいう。

## 【 0 0 2 7 】

“核酸分子”の語は、RNA、DNA及びcDNA分子を含む。遺伝子コードの縮退の結果、B G L 4 などの所定のタンパク質をエンコードする多数のヌクレオチド配列を生じることが理解される。本発明はB G L 4 をエンコードする、全ての可能性のある変異体ヌクレオチド配列を意図するものであり、これら全ては遺伝子コードの所定の縮退が可能である。

40

## 【 0 0 2 8 】

“異種(heterologous)”核酸構築体または配列は、発現する細胞に天然でない配列を一部有する。制御配列に関する異種とは、現在調節している同じ発現、遺伝子を調節するために自然状態では機能しない制御配列(すなわち、プロモータまたはエンハンサー)をいう。通常、異種核酸配列はそれが存在する細胞またはゲノムの一部に内生的なものではなく、感染、トランスフェクション、形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等によりその細胞に加えられたものである。“異種”核酸構築体は天然型細胞中に見られる制御配列/DNAコード配列の組み合わせと同じまたは異なる制御配列/DNAコード配列の組み合わせを含むことができる。

50

## 【 0 0 2 9 】

ここで用いる“ベクター”の語は異なる宿主間を移動するために設計された核酸構築体をいう。“発現ベクター”は異種DNA断片を外来細胞中に組み込み、発現できるベクターをいう。多くの原核及び真核発現ベクターが市販されている。適当な発現ベクターを選択することは当業者の知識の範囲内である。

## 【 0 0 3 0 】

従って、“発現カセット”または“発現ベクター”は標的細胞中に特定の核酸の転写を可能とする一連の特定核酸要素を用いて、組換え技術または合成により生成された核酸構築体である。組換え発現カセットはプラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、色素体DNA、ウイルスまたは核酸断片内に組み込むことができる。通常、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、特に、転写される核酸配列及びプロモータを含む。

10

## 【 0 0 3 1 】

ここで用いる“プラスミド”の語は、クローニングベクターとして用いる環状二本鎖DNA構築体をいい、種々の細菌及び真核生物内で染色体外自己複製遺伝子要素を形成する。

## 【 0 0 3 2 】

ここで用いる“選択マーカー・エンコード核酸配列”の語は細胞中で発現できる核酸配列をいい、選択マーカーの発現により、対応選択試薬の存在中や対応選択成長条件下で該発現遺伝子を含む細胞が成長できるようにする。

## 【 0 0 3 3 】

ここで用いる“プロモータ”の語は、下流遺伝子を直接転写するよう機能する核酸配列をいう。プロモータは通常、標的遺伝子が発現する宿主細胞に適したものである。所定の遺伝子を発現するために、その他の転写及び翻訳調節核酸配列（“制御配列”ともいう）と組み合わせたプロモーターが必要である。通常、転写及び翻訳調節配列は、限定されないが、プロモータ配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列及びエンハンサーまたは活性化配列を含む。

20

## 【 0 0 3 4 】

ここで定義する“キメラ遺伝子”または“異種核酸構築体”は異なる遺伝子、調節部分などの部分を含む非天然遺伝子（すなわち、宿主に導入された遺伝子）をいう。宿主細胞を形質変換するためのキメラ遺伝子構築体は通常、異種タンパク質コード配列に、または選択マーカー・キメラ遺伝子中で、形質転換細胞に耐抗生物質特性を与えるタンパク質をエンコードする選択マーカー遺伝子に作動可能に連結した転写調節領域（プロモータ）からなる。宿主細胞への形質転換のための、本発明の典型的なキメラ遺伝子は、構成的または導入された転写調節領域、タンパク質コード配列及び終結配列を含む。キメラ遺伝子構築体は、標的タンパク質の分泌が必要な場合にシグナルペプチドをエンコードする第2のDNA配列も含む。

30

## 【 0 0 3 5 】

核酸は他の核酸配列と機能的な関係で位置する場合、“作動可能に連結する”。例えば、分泌始端部をエンコードするDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドに関するDNAに作動可能に連結し；プロモータまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結し；またはリボソーム結合部位は翻訳を促進するための位置にある場合、コード配列に作動可能に連結する。一般に、“作動可能に連結”とは結合するDNA配列が隣接し、分泌始端部の場合、隣接しかつリーディング・フレーム中にあることを意味する。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。結合は適宜の制限酵素認識部位で連結反応により達成される。そのような部位が存在しない場合、従来方法によりPCR用の合成オリゴヌクレオチド・アダプタ、リンカーまたはプライマーを用いる。

40

## 【 0 0 3 6 】

ここで用いる“遺伝子”の語は、ポリペプチド鎖生成に関するDNA断片を意味し、例えば5'非翻訳領域（5'UTR）または“リーダー”配列及び3'UTRまたは“トレ

50

ーラ (trailer) ” 配列、及び個々のコード部分 (エキソン) 間の介在配列 (イントロン) などそのコード領域の前及び後の領域は含んでも含まなくてもよい。

#### 【0037】

通常、BGL4 またはその類似体 (アナログ) または相同体 (ホモログ) をエンコードする核酸分子は中から高ストリンジェンシーな条件下で、ここで配列番号 1 で与えられる配列にハイブリダイズする。しかしながら、場合によっては実質的に異なるコドン使用頻度を有する BGL4 エンコードヌクレオチド配列を使用するが、該 BGL4 エンコードヌクレオチド配列によりエンコードされるタンパク質は天然タンパク質と同じまたは実質的に同じアミノ酸配列を有する。例えば、コード配列は、宿主によって利用される特定コドンの頻度に従い、特定の原核生物または真核生物の発現系において BGL4 発現を速くするために修飾され得る。Te'o et al. (2000) は、例えば、糸状菌における遺伝子発現の最適化について記載している。

10

#### 【0038】

核酸配列は、中から高ストリンジェンシー及び洗浄条件下で 2 つの配列が特異的に一方が他方にハイブリダイズする場合、言及した核酸配列に対して “選択的にハイブリダイズ可能” と考えられる。ハイブリダイゼーション条件は核酸結合錯体またはプローブの融点 ( $T_m$ ) に基づく。例えば、“最大ストリンジェンシー” は通常約  $T_m - 5$  であり (プローブの  $T_m$  より  $5^\circ$  低い)、“高ストリンジェンシー” は  $T_m$  より約  $5 - 10^\circ$  低く、“中間ストリンジェンシー” はプローブの  $T_m$  より約  $10 - 20^\circ$  低く、“低ストリンジェンシー” は  $T_m$  より約  $20 - 25^\circ$  低い。機能上、ハイブリダイゼーション・プローブと厳密に同一またはほぼ厳密に同一な配列を同定するために最大ストリンジェンシー条件を用いるが、高ストリンジェンシー条件はプローブと 80% 以上同一性を有する配列を同定するために用いる。

20

#### 【0039】

中から高ストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件は当業界に公知である (例えば、明示的にここに引用する Sambrook et al., 1989, Chapters 9 及び 11 及び Ausubel, F.M., et al., 1993 を参照)。高ストリンジェンシー条件の例としては、50% ホルムアミド、5X SSC、5X Denhardt's 溶液、0.5% SDS 及び  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  変性キャリア DNA 中、約 42 でのハイブリダイゼーション、続いて室温で 2X SSC 及び 0.5% SDS 中で 2 回洗浄及び 42 で 0.1X SSC 及び 0.5% SDS 中でさらに 2 回洗浄を含む。

30

#### 【0040】

ここで用いる、“組換え体” は細胞またはベクターへの言及を含み、異種核酸配列の導入により修飾されたもの、またはそのように修飾された細胞由来の細胞である。従って、例えば、組換え体細胞は、天然 (非組換え体) 型の細胞内に同一の形態では見られない遺伝子を発現、或いは意図的な人間の介入の結果として発現しようがまたは全く発現されまいが、それがなければ異常発現する天然型遺伝子を発現する。

#### 【0041】

ここで用いる、細胞に関する “形質転換”、“安定な形質転換” または “トランスジェニック” の語は、ゲノムに組み込まれ、または複数世代を通して保存されるエピソーム・プラスミドとして非天然 (異種) 核酸配列を有する細胞を意味する。

40

#### 【0042】

ここで用いる、“発現” の語はポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生成されるプロセスをいう。該プロセスは転写及び翻訳の両方を含む。

#### 【0043】

核酸配列を細胞に挿入することに関連する “導入” の語は “トランスフェクション” または “変換” または “形質導入” を意味し、及び核酸配列を真核または原核細胞に組み込むことを含み、該核酸配列が該細胞のゲノム (例えば、染色体、プラスミド、色素体またはミトコンドリア DNA) に組み込まれ、自律レプリコン (autonomous repl

50

i c o n ) に変換され、または一時的に発現される (例えばトランスフェクト m R N A ) ことを意味する。

【 0 0 4 4 】

“ B G L 4 発現 ” の語は b g l 4 遺伝子の転写及び翻訳ということになり、その生成物は前駆体 R N A 、 m R N A 、ポリペプチド、翻訳後処理ポリペプチド、及びそれらの誘導体を含み、トリコデルマ・ロングブラチアタム ( r e e s e i ) 、トリコデルマ・ビリディ、トリコデルマ・コニングー、ヒボクレア j e c o r n i a 及びヒボクレア・シュワイニッチイなどの関連種由来の B G L 4 を含む。例として、B G L 4 発現の分析は B G L 4 タンパク用ウエスタンブロット、B G L 4 m R N A 用のノーザンブロット分析及び逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 ( R T - P C R ) 分析及び C h e n e t a l . ( 1 9 9 2 ) 及び H e r r e t a l . ( 1 9 7 8 ) に記載されたグルコシダーゼ活性分析を含む。

10

【 0 0 4 5 】

“ 選択的スプライシング ” の語はそれによって複数のポリペプチドイソ型が単一遺伝子から生成される方法をいい、該スプライシングは該遺伝子の全部ではないが、いくつかをプロセッシングする間、非連続エキソンをつなげる工程を含む。従って、特定のエキソンはいくつかの選択エキソンの 1 つに接続され、メッセンジャー R N A を形成する。選択的スプライス m R N A はポリペプチド ( “ スプライス変異体 ” ) を生成し、共通する部分もあれば異なる部分もある。

【 0 0 4 6 】

“ シグナル配列 ” の語は、細胞外の成熟型タンパク質の分泌を促進するタンパク質の N 末端部分のアミノ酸配列をいう。細胞外タンパクの成熟型には分泌プロセス時に分裂するシグナル配列がない。

20

【 0 0 4 7 】

“ 宿主細胞 ” の語はベクターを含み、発現構築体の複製、及び / または転写または転写及び翻訳 ( 発現 ) をサポートする細胞を意味する。本発明で用いる宿主細胞は大腸菌などの原核細胞または酵母菌などの真核細胞、植物、昆虫、両生類または哺乳類の細胞である。通常、宿主細胞は糸状菌である。

【 0 0 4 8 】

“ 糸状菌 ” の語は当業者が認めるいかなる糸状菌をも意味する。好ましい菌類はアスペルギルス、トリコデルマ、フサリウム、クリソスポリウム、ペニシリウム、フミコラ、ニューロスポラまたはエメリセラ、ヒボクレアなどそれらの別の有性型からなる群より選択される。

30

【 0 0 4 9 】

“ セロオリゴ糖 ” の語は 2 ~ 8 のグルコース単位を含み、 - 1 , 4 結合を有するオリゴ糖のグループをいい、例えばセロビオースである。

【 0 0 5 0 】

“ セルラーゼ ” の語はセルロースポリマーを加水分解して短いセロオリゴ糖オリゴマー、セロビオース及び / またはグルコースにできる酵素の種類をいう。多くのセルラーゼの例、例えばエキソグルカナーゼ、エキソセルビオヒドラーゼ、エンドグルカナーゼ及びグルコシダーゼなどはセルロース分解性有機体、特に菌類、植物及び細菌から得られる。

40

【 0 0 5 1 】

ここで用いる “ セルロース結合ドメイン ” の語はセルラーゼのアミノ酸配列の一部またはセルラーゼまたはそれらの誘導体のセルロース結合活性に関係する酵素領域をいう。セルロース結合ドメインは一般に、セルロースとセルロース、セルロース誘導体またはそれらのその他の多糖類同等物を非共有結合することにより機能する。セルロース結合ドメインは構造的に異なる触媒コア領域により、セルロース繊維の加水分解を促進また可能にし、通常は触媒コアと独立して働く。従って、セルロース結合ドメインは触媒コアに起因する著しい触媒活性を有さない。言い換えると、セルロース結合ドメインは、触媒活性を有する構造要素とは区別されるセルロース酵素タンパク質三次構造の構造要素である。

50

## 【 0 0 5 2 】

ここで用いる“界面活性剤”の語は界面活性特性を有するものとして当業界に一般に認識されている化合物をいう。従って、例えば、界面活性剤は一般に洗剤に入っている陰イオン性、陽イオン性及び非イオン性界面活性剤を含む。陰イオン性界面活性剤は直鎖または分枝アルキルベンゼンスルホネート；直鎖または分枝アルキル基またはアルケニル基を有するアルキルまたはアルケニルエーテル硫酸塩；アルキルまたはアルケニル硫酸塩；オレフィンスルホネート；及びアルカンスルホネートを含む。両性界面活性剤は4級アンモニウム塩スルホネート及びイン型両性界面活性剤を含む。そのような両性界面活性剤は同じ分子内に正及び負に帯電した基の両方を有する。非イオン性界面活性剤はポリオキシアルキレンエーテル、並びにそれらに高級脂肪酸アルカノールアミドまたはアルキレンオキシドを付加したもの、脂肪酸グリセリンモノエステル及びその類似物を含んでもよい。

10

## 【 0 0 5 3 】

ここで用いる“セルロース含有繊維”は綿または非綿含有セルロースまたは天然セルロース誘導体及び人工セルロース誘導体（ジュート、亜麻、ラミー、レーヨン及びリヨセル）を含む綿または非綿含有セルロースブレンドからできた織布または不織布、糸、繊維をいう。

## 【 0 0 5 4 】

ここで用いる“綿含有繊維”の語は、綿織布、綿ニット、綿デニム、綿糸、綿花及びその類似物などの純粋な綿または綿ブレンドから作られた織布または不織布、糸または繊維をいう。

20

## 【 0 0 5 5 】

ここで用いる“ストーンウォッシュ組成物”の語はセルロース含有繊維をストーンウォッシュするために用いる製剤をいう。ストーンウォッシュ組成物は販売前、すなわち製造工程中にセルロース含有繊維を修正するために用いる。一方、洗剤組成物は汚れた衣類を洗淨するためのものであり、製造工程中には使用しない。

## 【 0 0 5 6 】

ここで用いる“洗剤組成物”の語は汚れたセルロース含有繊維を洗濯するために洗剤手段として用いるための混合物をいう。本発明に照らして、そのような組成物はセルラーゼ及び界面活性剤に加えて、追加の加水分解酵素、ビルダー、漂白剤、漂白活性剤、青味剤及び蛍光染料、固化阻害剤、マスキング剤、セルラーゼ活性剤、酸化防止剤及び溶解剤を含んでもよい。

30

## 【 0 0 5 7 】

ここで用いる“b g l 4 遺伝子発現の減少または除去”の語はb g l 4 遺伝子がゲノムから除去され、従って組換え宿主微生物により発現できないこと、またはb g l 4 遺伝子が機能的なB G L 4 酵素を組換え宿主微生物により生成できないように修飾されたことを意味する。

## 【 0 0 5 8 】

“変質b g l 4”または“変質b g l 4 遺伝子”の語は該遺伝子の核酸配列が除去、付加及び/またはコード反応を操作することにより変化したこと、または発現タンパク質のアミノ酸配列が修飾されたことを意味する。

40

## 【 0 0 5 9 】

ここで用いる“精製”の語は通常、トランスジェニック核酸またはタンパク質含有細胞を生化学的に精製すること、及び/またはカラムクロマトグラフィーにかけることをいう。

## 【 0 0 6 0 】

ここで用いる“活性”及び“生物学的活性”の語は、プロテアーゼに関する酵素活性などの特定のタンパク質に関する生物学的活性をいう。所定のタンパク質の生物学的活性は当業者がそのタンパク質に一般に起因すると考える生物学的活性をいう。

## 【 0 0 6 1 】

ここで用いる“濃縮”の語は、野生型または天然の真菌セルラーゼ組成物中のB G L 4

50

濃度と比較して B G L 4 濃度が濃いことを意味する。濃縮、増加する、及び高める、の語はここで交換可能に用いることができる。

#### 【 0 0 6 2 】

野生型真菌セルラーゼ組成物は天然真菌源により生成されるものであり、1 以上の B G、C B H 及び E G 成分を含み、これら成分の各々は真菌源により生成される割合で検出される。従って、濃縮 B G L 4 組成物は種々の比で B G L 4 を含み、B G L 4 対その他のセルラーゼ成分（すなわち、C B H 及びエンドグルカナーゼ）の比は高められる。この比は増加した B G L 4 または減少した（または除去された）少なくとも 1 のその他の成分により当業者に公知の任意の方法により増加する。

#### 【 0 0 6 3 】

従って、例えば、天然セルラーゼ系は、適当な pH でのイオン交換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、サイズ排除などの文献で開示されている公知の分離技術により実質的に純粋な成分に精製できる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー（通常、アニオン交換クロマトグラフィー）において、セルラーゼ成分を pH 勾配または塩勾配または pH と塩勾配の両方を用いた溶出により分離することができる。精製 B G L 4 はそれから酵素溶液に加え、濃縮 B G L 4 溶液が得られる。

#### 【 0 0 6 4 】

真菌セルラーゼは 1 以上の B G 成分を含む。異なる成分は通常、イオン交換クロマトグラフィー等による分離を可能とする異なる等電点を有する。単一の B G 成分または B G 成分の組み合わせのいずれも酵素溶液中で用いることができる。

#### 【 0 0 6 5 】

酵素溶液中で用いる場合、B G 成分は任意の C B H のセロビオース及びセルラーゼ組成物中のエンドグルカナーゼ成分による阻害を抑制するために十分な量で通常添加する。添加する B G 成分の量はバイオマス糖化工程時に生成されるセロビオースの量に依存し、当業者は容易に決定できる。しかしながら、セルラーゼ組成物中に存在する任意の C B H 型成分と比較した E G V I I I 成分の重量%は、好ましくは約 1、好ましくは約 5、好ましくは約 10、好ましくは約 15、または好ましくは約 20 重量%から好ましくは約 25、好ましくは約 30、好ましくは約 35、好ましくは約 40、好ましくは約 45 または好ましくは約 50 重量%で用いる。さらに、好ましい範囲は約 0.5 ~ 約 15 重量%、約 0.5 ~ 約 20 重量%、約 1 ~ 約 10 重量%、約 1 ~ 約 15 重量%、約 1 ~ 約 20 重量%、約 1 ~ 約 25 重量%、約 5 ~ 約 20 重量%、約 5 ~ 約 25 重量%、約 5 ~ 約 30 重量%、約 5 ~ 約 35 重量%、約 5 ~ 約 40 重量%、約 5 ~ 約 45 重量%、約 5 ~ 約 50 重量%、約 10 ~ 約 20 重量%、約 10 ~ 約 25 重量%、約 10 ~ 約 30 重量%、約 10 ~ 約 35 重量%、約 10 ~ 約 40 重量%、約 10 ~ 約 45 重量%、約 10 ~ 約 50 重量%、約 15 ~ 約 20 重量%、約 15 ~ 約 25 重量%、約 15 ~ 約 30 重量%、約 15 ~ 約 35 重量%、約 15 ~ 約 40 重量%、約 15 ~ 約 45 重量%、約 15 ~ 約 50 重量%である。

#### 【 0 0 6 6 】

### I I . 標的生物

#### A . 糸状菌

糸状菌は真菌門及び卵菌門分類の全ての線状体を含む。糸状菌はキチン、グルカン、キトサン、マンナン及びその他の多糖類複合体からなり、菌糸伸長及び偏性好気性の炭素異化による栄養成長性の細胞壁を有する栄養菌糸により特徴付けられる。

#### 【 0 0 6 7 】

本発明において、糸状菌の親細胞は限定されないが、トリコデルマ属、例えばトリコデルマ・ロンギブラチアタム ( r e e s e i )、トリコデルマ ビリディ、トリコデルマ・コニンギー、トリコデルマ・ハルチアナム；ペニシリウム属；フミコーラ属、例えばフミコーラ・インソレンス；クリソスポリウム属、例えば C . l u c k w e n s e；グリオクラディウム属；アスペルギルス属；フサリウム属、ニューロスポラ属、ヒポクレア属及びエメリセラ属の細胞であってもよい。ここで用いる“トリコデルマ”または“トリコデルマ属”の語はトリコデルマとして以前に分類され、または現在トリコデルマとして分類さ

10

20

30

40

50

れている菌株をいう。

【0068】

好ましい実施態様において、糸状菌の親細胞はアルベルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス *aculeatus*、またはアスペルギルス・ニダランス細胞である。

【0069】

他の好ましい実施態様において、糸状菌の親細胞はトリコデルマ *reesei* 細胞である。

【0070】

III. セルラーゼ

セルラーゼはセルロース（1, 4-グルカンまたは D-グルコシド結合）を加水分解し、グルコース、セロビオース、セロオリゴ糖等の構造を生じる酵素として当業界に公知である。上に示すように、セルラーゼは従来から大きく3つに分類される：エンドグルカナーゼ（EC 3.2.1.4）（“EG”）、エキソグルカナーゼまたはセロビオヒドロラーゼ（EC 3.2.1.91）（“CBH”）及び  $\alpha$ -グルコシダーゼ（EC 3.2.1.21）（“BG”）。（Kwiles, et al., 1987; Schulin, 1988）。

【0071】

特定の菌類は、エキソセロビオヒドロラーゼまたはCBH型セルラーゼ、エンドグルカナーゼまたはEG型セルラーゼ及び  $\alpha$ -グルコシダーゼまたはBG型セルラーゼを含む完全なセルラーゼ系を生じる（Schulin, 1988）しかしながら、これらの系はCBH型セルラーゼを欠く場合があり、また細菌セルラーゼも通常CBH型セルラーゼを全くまたはほとんど含まない場合がある。さらに、EG成分及びCBH成分は相乗的に相互作用し、より効果的にセルロースを分解することが示されている。例えば、Wood、1985を参照されたい。異なる成分、すなわち複数成分または完全なセルラーゼ系における種々のエンドグルカナーゼ及びエキソセロビオヒドロラーゼは通常、等電点、分子量、グリコシル化度、基質特異性及び酵素挙動パターンなど異なる性質を有する。

【0072】

エンドグルカナーゼ型セルラーゼはセルロースの低結晶領域における内部  $\alpha$ -1, 4-グルコシド結合を加水分解し、エキソセロビオヒドロラーゼ型セルラーゼはセルロースの還元または非還元末端由来セロビオースを加水分解すると考えられる。エンドグルカナーゼ成分の挙動は、エキソセロビオヒドロラーゼ成分に認識される新しい鎖末端を作ることによりエキソセロビオヒドロラーゼの挙動を大きく促進できるということである。さらに、 $\alpha$ -グルコシダーゼ型セルラーゼはメチル  $\alpha$ -D-グルコシド及び  $p$ -ニトロフェニルグルコシドなどのアルキル及び/またはアリール  $\alpha$ -D-グルコシド及びセロビオースなどの炭水化物残基のみ含有するグルコシドの加水分解を触媒することが示されている。これにより単一生成物として微生物のためのグルコースが生成され、セロビオヒドロラーゼ及びエンドグルカナーゼを抑制するセロビオースを減少または削除する。

【0073】

従って、 $\alpha$ -グルコシダーゼ型セルラーゼはグルコースへの全体の反応の機動力となるのでセルラーゼ系の必須部分であると考えられる。トリコデルマ *reesei* におけるBGの発現の増加はセルロースからグルコースへの分解の向上を示す。ここに引用する欧州特許第0562003号を参照されたい。さらに、 $\alpha$ -グルコシダーゼは多数の異なる基質の加水分解を触媒でき、従って様々な用途において有用である。 $\alpha$ -グルコシダーゼは最終的にワインの香りを高めるためにワイン製造時にブドウに加えてもよい。さらにその他の用途は  $\alpha$ -グルコシダーゼを香りを高めるために果物に用いてもよい。もしくは、 $\alpha$ -グルコシダーゼは食品添加剤に直接用いてもよく、または風味及び香りを高めるためにワイン加工に用いてもよい。

【0074】

また、セルラーゼには洗剤組成物において洗浄能力を高める、柔軟剤としての使用、綿

10

20

30

40

50

繊維の手触りを向上させるなど多くの使用法がある (Hemmpel、1991; Tyndall、1992; Kumar et al.、1997)。作用メカニズムは本発明の一部ではないが、セルラーゼの柔軟及び色修復特性はセルラーゼ組成物中のアルカリ性エンドグルカナーゼ成分によるものであり、米国特許第5,648,263号、第5,691,178号及び第5,776,757号に示されている。これらの公報は、特定のアルカリ性エンドグルカナーゼ成分中で濃縮されたセルラーゼ組成物を含む洗剤組成物は、該成分に濃縮されていないセルラーゼ組成物と比較して、衣類を扱う際に色修復及び改善された柔軟化特性を有することを開示する。さらに、洗剤組成物中のそのようなアルカリ性エンドグルカナーゼ成分の使用は洗剤組成物のpH要件を補完することが示されている (例えば、米国特許第5,648,263号、第5,691,178号、及び第5,776,757号に記載されているように、pH7.5~10のアルカリ性で最大活性を阻害することによる)。

10

#### 【0075】

セルラーゼ組成物は綿含有繊維を分解し、繊維の強度損失を減少させることも示されており (米国特許第4,822,516号)、市販の洗剤用途においてセルラーゼ組成物の使用を控える原因となっている。エンドグルカナーゼ成分を含有するセルラーゼ組成物は完全なセルラーゼ系を含む組成物と比較して、綿含有繊維に関して減少された強度損失を示すことが示唆されている。

#### 【0076】

またセルラーゼは、セルラーゼ・バイオマスからエタノールへの分解に有用であることが示されており (セルラーゼがセルロースをグルコースに分解し、酵母またはその他の微生物がさらにグルコースをエタノールに発酵させる)、機械パルプの処理 (Pere et al.、1996)、飼料添加剤としての使用 (WO91/04673) 及び穀物湿式粉碎において有用であることが示されている。

20

#### 【0077】

セルラーゼは科学文献に多数記載されており、例としては以下を含む：トリコデルマ reesei: Shoemaker, S. et al., Bio/Technology, 1: 691-696, 1983、CBHIについて記載; Teeri, T. et al., Gene (遺伝子)、51: 43-52、1987、CBHIIについて記載; Penttilä, M. et al., Gene、45: 253-263、1986、EGIについて記載; Saloheimo, M. et al., Gene、63: 11-22、1988、EGIIについて記載; Okada, M. et al., Appl. Environ. Microbiol., 64: 555-563、1988、EGIIIについて記載; Saloheimo, M. et al., Eur. J. Biochem., 249: 584-591、1997、EGIVについて記載; Saloheimo, A. et al., Molecular Microbiology (分子生物学), 13: 219-228、1994、EGVについて記載; Barnett, C. C., et al., Bio/Technology, 9: 562-567、1991 BGL1について記載、及び Takashima, S. et al., J. Biochem., 125: 728-736、1999、BGL2について記載。また、トリコデルマ種以外のセルラーゼも例えば、アスペルギルス aculeatus により生成されるエンドグルカナーゼ F1-CMC をコードする cDNA 配列を開示する Ooi et al., 1990; アスペルギルス aculeatus 由来の - グルコシダーゼをエンコードする cDNA のクローニング及びシーケンシングを開示する Kawagushi T. et al., 1996; アスペルギルス・カワチ IF04308 由来のエンドグルカナーゼ CMCアーゼ-1 をエンコードする cDNA 配列を開示する Sakamoto et al., 1995; エルウィニア・カロドボラ由来のエンドグルカナーゼを開示する Saarilahti et al., 1990; Rhodothermus marinus 由来の熱安定性 (thermostable) - グルカナーゼをコードする、bglA のクローニング及びシーケンシングを開示する Spilliaert R. et al., 1994 及びグリコシルハイドロ

30

40

50



ラーゼ属 12 の熱安定性 ( t h e r m o s t a b l e ) セルラーゼをコードする R h o d o t h e r m u s m a r i n u 遺伝子のクローニング、シーケンシング及び過剰発現を開示する H a l l d o r s d o t t i r S e t a l . 、 1998 に記載されている。しかしながら、依然として熱応力条件下または界面活性剤の存在下での性能改善、比活性度の増加、変化した基質分裂パターン、及び / または i n v i t r o での高レベル発現などの改善された特性を有する、新規なセルラーゼの同定及びキャラクタリゼーションの必要性が残っている。

#### 【 0 0 7 8 】

C B H 型、E G 型及び B G 型セルラーゼを様々な量で含む新しい及び改善されたセルラーゼ組成物の開発は以下の使用を対象としている：( 1 ) 洗浄能力の向上を示し、柔軟剤として機能し、及び / または綿繊維の手触りを改善させる洗剤組成物（例えば、“ストーンウォッシング”または“バイオポリッシング”）；( 2 )、木材パルプまたはその他のバイオマスを糖に分解するための組成物（例えば、バイオ - エタノール生成）；及び / または ( 3 ) 飼料組成物。

10

#### 【 0 0 7 9 】

#### I V . 新規な配列の同定方法

オープン・リーディング・フレーム ( O R F ) をトリコデルマ r e e s e i ゲノムまたはトリコデルマ r e e s e i m R A 由来の c D N A ライブラリーのクローンの全部または一部の配列に従って分析し、さらに配列分析ソフトウェアを用いて、( 公開 / 非公開の ) データベース中の公知の配列のホモロジーを決定することにより分析する。

20

#### 【 0 0 8 0 】

#### V . b g l 4 核酸及び B G L 4 ポリペプチド

##### A . b g l 4 核酸

本発明の核酸分子は b g l 4 の天然コード配列を含む。1 の実施態様において、該配列は、ここで配列番号 1 または配列番号 3 で示す b g l 4 の c D N A 配列、及びその他の種におけるそれらの相同体、天然対立遺伝子多型及びスプライス変異体、核酸断片及び生物学的に活性な ( 機能的 ) それらの誘導体であり、例えば天然分子のアミノ酸配列変異体及び融合タンパク質をエンコードする配列である。該配列は集合的にここでは“ B G L 4 エンコード核酸配列 ” という。

#### 【 0 0 8 1 】

重複のない核酸配列データベースの基本的な B L A S T N サーチ ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ) は 2 0 0 1 年 9 月 1 1 日に実施され、b g l 4 遺伝子配列を図 1 ( 配列番号 1 ) に示し、重要な配列 ( すなわち、 $10^{-5}$  より小さい E 値を有する ) を生成する配列を示さない。

30

#### 【 0 0 8 2 】

図 1 ( 配列番号 1 ) に示される b g l 4 配列の一部は、特許出願 W O 0 0 5 6 7 6 2 に配列番号 7 5 3 2 として開示され、 $\alpha$ -グルコシダーゼとして注記されているトリコデルマ r e e s e i E S T の配列の一部を同じである。

#### 【 0 0 8 3 】

本発明の b g l 4 核酸配列はゲノム D N A、c D N A、m R N A 由来の D N A または R N A 配列であってよく、または全体または一部を合成されたものでもよい。D N A は 2 本鎖でも一本鎖でもよく、一本鎖の場合、コード鎖または非コード ( アンチセンス、相補 ) 鎖であってよい。核酸配列は例えば適当な供給源からゲノム D N A を単離することによる、及びポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を用いる標的配列の増幅オレフィンクローニングによるクローンでもよい。もしくは、核酸配列は完全にまたは部分的に合成でき、特に最適な発現のために宿主好適配列を提供することは望ましい。従って、ポリペプチドまたはタンパク質をエンコードする遺伝子部分である望ましい構造遺伝子の全部または一部は選択した宿主により好ましいコドンを用いて合成できる。

40

#### 【 0 0 8 4 】

遺伝子コードの固有の縮退により、実質的に同じまたは機能的に同等のアミノ酸配列を

50

エンコードする天然型以外の核酸配列は、B G L 4 エンコード核酸をクローン及び/または発現するために用いることができる。従って、所定の B G L 4 エンコード核酸配列は、遺伝子コード縮退の結果として、同じアミノ酸配列を有するタンパク質をエンコードする多数のコード配列が生成され得ることが理解される。例えば、トリプレット C G T はアミノ酸アルギニンをエンコードする。アルギニンはまたは C G A、C G C、C G G、A G A 及び A G G によってもエンコードされる。従って、コード領域のこのような置換は本発明によってカバーされる核酸配列変異体内に含まれる。あらゆるこれらの配列変異体は B G L 4 エンコード核酸配列の天然型のためにここに記載される同じ方法で利用できる。

#### 【0085】

“変異体” B G L 4 エンコード核酸配列は天然ポリペプチド配列から 1 以上のアミノ酸が変化した“変異体” B G L 4 アミノ酸配列をエンコードでき、ポリペプチド配列のいずれかの末端から 1 以上のアミノ酸を除去することにより切断でき、この両方は本発明の範囲内に含まれる。同様に、B G L 4 の“修飾体”の語は天然 B G L 4 タンパク質エンコード核酸配列または天然 B G L 4 アミノ酸配列の誘導体または変異体を意味する。

10

#### 【0086】

同様に、本発明を実施する際に使用するポリヌクレオチドは天然 B G L 4 タンパク質及びそれらのスプライス変異体をエンコードする配列、天然タンパク質コード配列に相補的な配列及び B G L 4 エンコードポリヌクレオチドの新規断片を含む。B G L 4 エンコード核酸配列はゲノム DNA 配列の場合、1 以上のイントロン配列を含む。

#### 【0087】

一般的な実施態様において、B G L 4 エンコードヌクレオチド配列は配列番号 1 でここに示す b g l 4 コード配列と少なくとも 70%、好ましくは 80%、85%、90%、95%、98% またはそれ以上の配列同一性を有する。

20

#### 【0088】

他の実施態様において、B G L 4 エンコードヌクレオチド配列は中から高ストリンジエンシー条件下で B G L 4 タンパク質をエンコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズする。関連する実施態様において、B G L 4 エンコードヌクレオチド配列は配列番号 1 で示すヌクレオチド配列に中から高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする。

#### 【0089】

B G L 4 をエンコードするいくつかの核酸配列変異体は親配列に対して選択的にハイブリダイズしてもしなくてもよいことが理解される。例として、コード配列が遺伝子コードの縮退に基づいて最適化される場合、B G L 4 タンパク質をエンコードする変異体コード配列が生成されるが、中から高ストリンジエンシー条件下で天然型 B G L 4 エンコード核酸配列にハイブリダイズしない。これは、例えば、配列変異体が親ヌクレオチドによりエンコードされる各アミノ酸の異なるコドンを含む場合起こる。

30

#### 【0090】

さらに、ある場合において非天然コドン、例えばイノシンを処理するヌクレオチド配列またはその他の非天然ヌクレオチド類似体を生成することが有利であることは当業者によって当然理解されることである。特定の真核生物宿主に好ましいコドンは例えば、B G L 4 タンパク質発現の速度を高めるために、または天然配列から生成される転写産物よりも長い半減期など望ましい性質を有する組換え RNA 転写産物を生成するために選択できる。従って、天然 B G L 4 エンコードヌクレオチド配列は種々の理由でコード配列を変化させるために設計でき、限定されないが、クローン、処理及び/または細胞による B G L 4 タンパク質の発現を修飾する変化などである。

40

#### 【0091】

特に好ましくは、天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの性質または活性を変化させないようなサイレントな核酸の置換、付加及び欠失である。

#### 【0092】

オリゴヌクレオチド媒介 (mediated) (部位特異的) 突然変異誘発、及び P C R 突然変異誘発など当業界に公知の方法を用いて様々な変更が可能である。部位特異的突

50

然変異誘発 (Carter et al., 1986; Zoller et al., 1987)、カセット式変異誘発 (Wells et al., 1985)、制限選択式 (restriction selection) 変異誘発 (Wells et al., 1986) またはその他の公知の技術が BGL4 ポリペプチド - エンコード変異体 DNA を生成するためにクローン DNA について実施できる。

#### 【0093】

しかしながら、ある場合において天然 bgl4 ポリヌクレオチドまたは BGL4 ポリペプチドの性質または活性を有さない bgl4 の変異体を発現することは有利である。そのような場合、天然 BGL4 エンコード核酸配列の変異体または修飾体は当業者が日常的に用いる技術を使用することにより生成してもよい。

10

#### 【0094】

##### B. BGL4 ポリペプチド

好ましい実施態様において、本発明は BGL4 ポリペプチドを提供し、図 2 (配列番号 2) に示す配列を含んだ天然成熟型または完全長 BGL4 ポリペプチド配列を含む。本発明の BGL4 ポリペプチドは成熟 BGL4 ポリペプチド、融合タンパク質の一部、または図 2 (配列番号 2) に示す BGL4 ポリペプチド配列の断片または変異体であってもよい。

#### 【0095】

通常、本発明の BGL4 ポリペプチドはその全体の長さにわたって BGL4 アミノ酸配列と少なくとも 80% の同一性を有する。より好ましくは BGL4 ポリペプチド配列は、ここに詳細を記載する配列プログラムを用いて、図 2 (配列番号 2) の BGL4 ポリペプチド配列に対して少なくとも 80、85、90、95、98% またはそれ以上の配列同一性を有する領域を含む。

20

#### 【0096】

通常、天然 BGL4 タンパク質の“修飾体”または“変異体” BGL4 タンパク質は少なくとも 1 のそれぞれアミノ酸置換、付加、欠失または挿入を含む誘導体配列を有する。

#### 【0097】

特定のアミノ酸置換はタンパク質の機能に影響を与えずにタンパク質配列中で行うことができることは当業界で公知である。通常、同類アミノ酸置換または類似アミノ酸の置換はタンパク質機能に影響を与えることなく許容されるものである。類似アミノ酸は大きさ及び/または電荷特性が類似のアミノ酸であり、例えばアスパラギン酸塩とグルタミン酸塩、及びイソロイシンとバリンの両方は類似アミノ酸のペアである。アミノ酸ペア間の類似性は多数の方法により当業界で評価されてきた。例えば、ここに引用する Dayhoff et al. (1978) はアミノ酸類似性の指標として用いることができるアミノ酸置換の度数分布表を提供する。Dayhoff らの度数分布表は様々な進化的に異なる供給源から同じ機能を有するタンパク質のアミノ酸配列の比較に基づく。

30

#### 【0098】

図 2 (配列番号 2) の BGL4 ポリペプチド配列の断片及び変異体は本発明の一部である。断片は先に述べてポリペプチドのアミノ酸配列と全部ではないが一部が全く同じアミノ酸配列を有する変異体ポリペプチドである。該断片は“自立構造”であり、または最も好ましくは単一連続領域として部分または領域を形成する断片のより大きいポリペプチド内に含まれる。好ましい断片は本発明のポリペプチド活性を媒介する断片である生物学的に活性な断片であり、類似活性または向上した活性または減少した活性を有するものを含む。また、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性である断片を含む。該側面において、本発明は (i) BGL4 断片、好ましくは少なくとも約 20 ~ 100 アミノ酸長、より好ましくは約 100 - 200 アミノ酸長、及び (ii) BGL4 を含有する医薬組成物を含む。種々の実施態様において、該断片は BGL4 の N 末端ドメインまたは BGL4 の C 末端ドメインに対応する。

40

#### 【0099】

また、本発明の BGL4 ポリペプチドは図 2 (配列番号 2) の BGL4 ポリペプチド配

50

列から変化したポリペプチドを含む。これらの変異体は置換、挿入または欠失変異体である。該変異体は通常、天然型類似体と同質の生物学的活性を示すが、さらに下記に記載する修正された性質を有するものを選択することもできる。

【0100】

“置換”はそれぞれ異なるヌクレオチドまたはアミノ酸により1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の置換が生じる。

【0101】

“挿入”または“付加”は天然型配列と比較して、それぞれ1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の追加を生じるヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化である。

【0102】

“欠失”はそれぞれ1以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基が欠ける、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の変化として定義される。

【0103】

アミノ酸置換は通常1個の残基である；挿入はたいてい1~20アミノ酸程度であるが、かなり大きな挿入も許容され得る。欠失は約1~約20残基の範囲であるが、さらに大きい場合もある。

【0104】

置換、欠失、挿入またはそれらの組み合わせは最終的な誘導体に到達するために使用できる。一般的に、これらの変化は分子変化を最小限にするために2、3のアミノ酸について行う。しかしながら、特定の状況においてはより大きな変化も許容され得る。

【0105】

アミノ酸置換は1のアミノ酸を類似構造及び/または化学的性質を有するその他のアミノ酸で置換することにより達成でき、例えばイソロイシンとバリンの置換、すなわち同類アミノ酸置換である。挿入または欠失は任意で1~5アミノ酸の範囲である。

【0106】

置換は一般的に公知の“同類置換”により行う。“同類置換”はある種類のアミノ酸を同じ種類のアミノ酸で置換することをいい、種類は共通の物理化学アミノ酸側鎖特性及び天然に見られる相同タンパク質において高発生置換頻度により定義される（例えば標準Dayhoff度数(frequency)交換マトリックスまたはBLOSUMマトリックスにより決定される）。(Doolittle, R. F., 1986を参照。)

“非同類置換”はある種類のアミノ酸を別の種類のアミノ酸で置換することをいう。

【0107】

BGL4ポリペプチド変異体は一般的に天然型類似体と同質の生物学的活性を示すが、必要であればBGL4ポリペプチドの性質を修正するための変異体も選択される。例えば、グリコシル化部位及びより具体的には1以上のO結合またはN結合グリコシル化部位が変換または除去される。アミノ酸変化はBGL4ポリペプチドの翻訳後プロセスを変化し得ることを当業者であれば当然に理解するであろう。例えば、グリコシル化部位の数または位置の変化や膜アンカー特性または分泌特性またはその他の細胞局在の変化である。

【0108】

また、BGL4ポリペプチドの定義にその他の関連BGL4ポリペプチドも含む。従って、プローブまたは縮退(degenerate)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマー配列はその他の関連ポリペプチドを探すために用いることができる。有用なプローブまたはプライマー配列はBGL4ポリペプチド配列の全部または一部またはコード領域外側の配列のために設計することができる。当業界によく知られるように、好ましいPCRプライマーは約15~約35ヌクレオチド長であり、好ましくは約20~約30であり、必要であればイノシンを含んでもよい。PCR反応のための条件は当業者に公知である。

【0109】

BGL4ポリペプチドの共有結合修飾も本発明の範囲内である。例えば、本発明は成熟タンパク質であるBGL4ポリペプチドを提供し、さらに該成熟ポリペプチド内にアミノ

10

20

30

40

50

またはカルボキシル末端アミノ酸を含む（例えば、タンパク質の成熟体が1より多くのポリペプチド鎖を有する場合）。このような配列は、例えば前駆体から成熟体へのタンパク質処理の役割果たし、タンパク質輸送、タンパク質半減期の短縮または延長、または分析または生成時にタンパク質の操作を促進することができる。

#### 【0110】

また、修飾は活性部位の変換、pH最適条件、温度最適条件及び/またはBGL4酵素の基質親和性の変化を目的とする。

#### 【0111】

図2は図1に示すヌクレオチド配列に基づく典型的なBGL4ポリペプチドの予想アミノ酸配列（配列番号2）を示す。エンコードされるBGL4ポリペプチドの予想分子量は90.7kDaである。BGL4のアミノ末端にはシグナルペプチドに類似した配列はなく（Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., Protein Engineering（タンパク質工学）、10:1-6、1997）、BGL4ポリペプチドが分泌されていないことを示唆している。

10

#### 【0112】

重複のないタンパク質データベースの基本的なBLASTPサーチ（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>）は2001年9月11日に実施され、BGL4アミノ酸配列はGenBank登録番号X05918（カンディダ・ケフィア（*Kluyveromyces marxianus*）の - グルコシダーゼ前駆体）と46%の配列同一性を示し、GenBank登録番号AL355920（スキゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）の - グルコシダーゼ前駆体）と45%の配列同一性、GenBank登録番号AF329731（クロフクロタケ（*Volvariella volvacea*）の - グルコシダーゼ）と42%の配列同一性、及びGenBank登録番号AJ293760（アガリクス・ビスポラス（*Agaricus bisporus*）の推測 - グルコシダーゼ）と41%の配列同一性を示す。BGL4と最も高い同一性を有するが46%以下の10個の配列を - グルコシダーゼとして注記した。これらの配列類似性はBGL4がグリコシルヒドロラーゼ属3の一種であることを示す（Henrissat, B. and Baïroch, A. (1993) *Biochem. J.* 293: 781-788)

20

30

#### 【0113】

##### C. 抗BGL4抗体

本発明はさらに抗BGL4抗体を提供する。抗体はポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性またはヘテロ共役抗体であってよい。

#### 【0114】

ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に公知である。免疫剤はBGL4ポリペプチドまたはそれらの融合タンパク質であってよい。免疫された哺乳類で免疫原性となることが公知のタンパク質に抗原を結合することは有用である。免疫付与手順は標準的な手順または日常的な実験に基づき当業者により決定される。

#### 【0115】

もしくは、抗BGL4抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は動物内で免疫された細胞によりまたは組換えDNA法を用いて生成することができる。（例えば、Kohler et al., 1975; 米国特許第4,816,567号を参照。）

40

本発明の抗BGL4抗体はさらにヒト化またはヒト抗体を含む。“ヒト化抗体”の語は非ヒト抗体由来の配列を部分的に含む、キメラ抗体、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片である（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>またはその他の抗体の抗原結合部分配列）非ヒト（例えば、ネズミ）抗体のヒト化体をいう。非ヒト抗体をヒト化する方法は当業者に公知であり、さらなる詳細はJones et al., 1986; Reichmann et al., 1988; 及びVerhoeyen et al., 1988にある。ヒト抗体の生成方法も公知である。例えば、Jakobovits, A, e

50

t al.、1995 及び Jakobovits, A、1995 を参照されたい。

【0116】

VI. 組換え BGL4 の発現

本発明の方法は BGL4 を発現するための細胞の使用に依存し、特定の BGL4 発現方法を必要とするものではない。

【0117】

本発明は BGL4 エンコード核酸配列を含む発現ベクターを用いて変換、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。温度、pH 等の培養条件は変換、形質転換またはトランスフェクト前に親宿主細胞にすでに用いた条件とし、当業者に明らかである。

10

【0118】

1つの方法として、糸状菌細胞または酵母細胞は BGL4 が細胞株内で発現するように、細胞株内で機能し、BGL4 をエンコードする DNA 断片に作動可能に連結するプロモーターまたは生物学的に活性なプロモーター断片または 1 以上の（例えば一連の）エンハンサーを有する発現ベクターを用いてトランスフェクトする。

【0119】

A. 核酸構築体 / 発現ベクター

BGL4 をエンコードする天然または合成ポリヌクレオチド断片（“BGL4 エンコード核酸配列”）は導入が可能で糸状菌または酵母細胞内で複製される異種核酸構築体またはベクター内に組み込むことができる。ここに開示するベクター及び方法は BGL4 発現のための宿主細胞での使用に適している。導入される細胞内で複製可能で生存可能ないかなるベクターも使用できる。多くの適したベクター及びプロモーターが当業者に公知であり、市販されている。また、クローニング及び発現ベクターについても各々ここに明示的に引用するものとする Sambrook et al.、1989、Ausubel F M et al.、1989 及び Strathern et al.、1981 に記載されている。菌類に適した発現ベクターは van den Hondel、C. A. M. J. et al. (1991) In: Bennett, J. W. 及び Lasure, L. L. (eds.) More Gene Manipulations in Fungi (菌類における遺伝子操作). Academic Press、pp. 396 - 428 に記載されている。適当な DNA 配列は種々の方法によりプラスミドまたはベクター（ここで集合的に“ベクター等”とする）に挿入できる。一般に、DNA 配列は標準的な方法により適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入する。このような方法及び関連するサブクローニング方法は当業者の知識の範囲内であると考えられる。

20

30

【0120】

BGL4 のためのコード配列を含む組換え糸状菌は BGL4 コード配列を含む異種核酸構築体を糸状菌の選択株細胞内に導入することにより生成できる。

【0121】

bgl4 核酸配列、相同体、変異体またはそれらの断片の望ましい形態を得ると、それは種々の方法で修飾できる。配列が非コードフランキング領域を含む場合、該フランキング領域は切断、突然変異等され得る。従って、転移、塩基転換、欠失及び挿入が天然配列上で起こり得る。

40

【0122】

選択 bgl4 コード配列は公知の組換え技術により適当なベクターに挿入でき、BGL4 発現が可能な糸状菌を形質転換するために用いることができる。遺伝子コードの固有縮退により、実質的に同じまたは機能的に同等なアミノ酸配列をエンコードするその他の核酸配列が BGL4 をクローン及び発現するために使用できる。従って、コード領域内のそのような置換は本発明でカバーされる配列変異体の範囲に当然含まれる。あらゆるこれらの配列変異体はここに記載するように同様に親 BGL4 エンコード核酸配列に利用できる。

【0123】

50

本発明はまた、上述の 1 以上の B G L 4 エンコード核酸配列を含む組換え核酸構築体を含む。該構築体は同方向または逆方向に本発明の配列を挿入したプラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターを含む。

【 0 1 2 4 】

異種核酸構築体は b g l 4 のコード配列または変異体、断片またはそれらのスプライス変異体を含み、これらは ( i ) 単離されたもの ; ( i i ) 例えば融合タンパク質またはシグナルペプチドコード配列など追加のコード配列と組み合わせたものであって、 b g l 4 コード配列が優性コード配列であるもの ; ( i i i ) イントロンや例えばプロモーターや終結要素などの制御要素またはなど非コード配列と組み合わせたもので、適当な宿主内でコード配列の発現に効果的なもの ; 及び / または ( i v ) b g l 4 コード配列が異種遺伝子となるベクターまたは宿主環境内のものである。

10

【 0 1 2 5 】

本発明の 1 の側面において、異種核酸構築体を用いて B G L 4 エンコード核酸配列を i n v i t r o で従来の好ましい糸状菌及び酵母菌株の細胞内に移送する。B G L 4 の長期間、高収率生成に関しては、安定した発現が好ましい。安定した形質転換体を生成するために効果的な方法を本発明の実施に使用するのがよい。

【 0 1 2 6 】

適当なベクターは一般に選択マーカー・エンコード核酸配列、挿入部位、及びプロモーターや終止配列などの適当な制御要素を備える。該ベクターは調節配列を含んでもよく、例えばイントロンや制御要素 ( すなわちプロモーター及び終結要素 ) または 5 ' 及び / または 3 ' 非翻訳領域等の非コード配列であり、コード配列に作動可能に連結する、宿主内でコード配列の発現に効果的なものを ( 及び / または修飾可溶性タンパク質抗原コード配列が通常発現されないベクターまたは宿主細胞環境内において ) 含んでもよい。多数の適当なベクター及びプロモーターが当業界に公知であり、その多くは市販されており、及び / または S a m b r o o k e t a l . 、 ( 上述 ) に記載されている。

20

【 0 1 2 7 】

典型的なプロモーターは構造プロモーター及び誘導プロモーターの両方を含み、例としては C M V プロモーター、S V 4 0 初期プロモーター、R S V プロモーター、E F - 1 プロモーター、t e t - o n または t e t - o f f システムの t e t 応答性要素 ( T R E ) ( C l o n T e c h 及び B A S F に記載 ) を含むプロモーター、 - アクチン・プロモーター及び特定の金属塩の付加により促進されるメタロチオニンプロモーターなどがある。プロモーター配列は発現のために特定の糸状菌により認識される D N A 配列であり、B G L 4 をエンコードする D N A 配列に作動可能に連結する。かかる結合は記載した発現ベクター内において、B G L 4 ポリペプチドをエンコードする D N A 配列の開始コドンに関するプロモーターの位置合わせを含む。プロモーター配列は B G L 4 ポリペプチドの発現を仲介する転写及び翻訳制御配列を含む。例としてアスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリまたはアスペルギルス・オリゼーグルコアミラーゼ、 - アミラーゼまたは - グルコシダーゼエンコード遺伝子 ; アスペルギルス・ニダランス g p d A または t r p C 遺伝子 ; ニューロスボラ・クラッサ c b h 1 または t r p 1 遺伝子 ; アスペルギルス・ニガーまたはリゾムコール・ミエハイアスパルギン酸プロテイナーゼエンコード遺伝子 ; トリコデルマ r e e s e i c b h 1 、 c b h 2 、 e g l 1 、 e g l 2 またはその他のセルラーゼエンコード遺伝子由来のプロモーターを含む。

30

40

【 0 1 2 8 】

適当な選択マーカーの選択は宿主細胞に依存し、種々の宿主に好ましいマーカーが当業界に公知である。一般的な選択マーカー遺伝子はアスペルギルス・ニダランスまたはトリコデルマ r e e s e i 由来 a r g B 、またはアスペルギルス・ニダランス由来 a m d S 、ニューロスボラ・クラッサまたはトリコデルマ r e e s e i 由来 p y r 4 、アスペルギルス・ニガーまたはアスペルギルス・ニダランス由来 p y r G を含む。さらなる典型的な選択マーカーとして、限定されないが、t r p - 、p y r - 、l e u - 等の変異株を形質転換するために用いる異種核酸構築体に含まれる t r p c 、 t r p 1 、 o l i C 3 1 、 n i

50

a D または l e u 2 がある。

【0129】

このような選択マーカーは形質転換体に普通は糸状菌によって代謝されない代謝産物を活用する能力を与える。例えば、酵素アセトアミダーゼをエンコードするトリコデルマ *r e e s e i* 由来 *a m d S* 遺伝子は形質転換細胞が窒素源としてアセトアミド上で成長できるようにする。選択マーカー（例えば *p y r G*）は最小培地上で成長するための栄養要求性変異株の能力を回復させ、または選択マーカー（例えば *o l i c 3 1*）は形質転換体が阻害薬または抗生物質の存在下で成長できる能力を与える。

【0130】

選択マーカーコード配列は当業界で一般的に用いられる方法を用いて適当なプラスミドにクローンする。典型的なプラスミドは *p U C 1 8*、*p B R 3 2 2* 及び *p U C 1 0 0* を含む。

【0131】

本発明の実施は、特に示さない限り当業界の技術の範囲内である分子生物学、微生物学、組換え DNA 及び免疫学の従来技術を用いる。かかる技術は文献に十分説明されている。例えば、*S a m b r o o k e t a l .*、1989；*F r e s h n e y*、1987；*A u s u b e l , e t a l .*、1993；及び *C o l i g a n e t a l .*、1991 を参照されたい。ここに記載する全ての特許出願、論文及び出版物はここに明示的に引用するものとする。

【0132】

B . 高められた B G L 4 生成のための宿主細胞及び培養条件

( i ) 糸状菌

従って、本発明は対応する非形質転換親菌と比較して高められた B G L 4 生成または発現を生じるように効果的に修飾、選択及び培養された細胞を含む糸状菌を提供する。

【0133】

B G L 4 発現を高めるために処理及び/または修飾される親糸状菌種の例としては、限定されないが、トリコデルマ（例えばトリコデルマ *r e e s e i*、トリコデルマ・ロンギプラチアタム、トリコデルマ・ピリディ、トリコデルマ・コニンギー）；ペニシリウム属、フミコーラ属（フミコーラ・インソレンスなど）；アスペルギルス属、クリソスポリウム属、フサリウム属、ヒポクレア属及びエメリセラ属を含む。

【0134】

B G L 4 発現細胞は通常親菌株を培養する際に用いる条件下で培養する。一般的に細胞は、例えば *P o u r q u i e , J . e t a l . , B i o c h e m i s t r y a n d G e n e t i c s o f C e l l u l o s e D e g r a d a t i o n*（セルロース分解の生化学及び遺伝学），*e d s . A u b e r t , J . P . e t a l . , A c a d e m i c P r e s s , p p . 7 1 - 8 6*、1988 及び *I l m e n , M . e t a l . , A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 6 3 : 1 2 9 8 - 1 3 0 6*、1997 に記載されるような、生理学的塩及び栄養素を含む標準培地で培養する。培養条件も標準的なものであり、例えば B G L 4 発現が所望のレベルを達成するまで 28 で振とう培養基または発酵槽内で培養する。

【0135】

所定の糸状菌のための好ましい培養条件は科学文献に記載され、及び/または *A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n*（米国菌培養収集所）（A T C C ; <http://www.atcc.org/>）などの菌供給元から得られる。菌が成長した後、細胞を B G L 4 発現を引き起こすことができる効果的な条件にさらす。

【0136】

B G L 4 コード配列が導入プロモーターの制御下にある場合、誘発剤、例えば糖、金属塩または抗生物質を高レベルの B G L 4 発現を誘導するのに効果的な濃度で培地に加える。

【0137】

10

20

30

40

50



## ( i i ) 酵母菌

また、本発明はBGL4生成用の宿主細胞として酵母菌の使用を目的とする。加水分解酵素をエンコードするその他いくつかの遺伝子は酵母菌サッカロマイセス・セレヴィシエの種々の株において発現される。これらは2つのエンドグルカナーゼ(Penttilä et al., 1987)、2つのセロビオヒドロラーゼ(Penttilä et al., 1988)及びトリコデルマreesei由来の1つのグルコシダーゼ(Cummings and Fowler, 1996)、オーレオバシディウム・プルランス由来キシラナーゼ(Li and Ljungdahl, 1996)、小麦由来の-アミラーゼ(Rothstein et al., 1987)等をエンコードする配列を含む。さらに、ブチリブプリオ・フィブリソルペンズ・エンド-[ ]-1, 4-グルカナーゼ(END1)ファネロキータ・クリソスポリウム・セロビオヒドロラーゼ(CBH1)、ルミノコッカス・フラヴェファシエンス・セロデキストリナーゼ(CEL1)及びエンドマイセスfibrilizerセロビアース(Bgl1)をエンコードするセルラーゼ遺伝子カセットはサッカロマイセス・セレヴィシエの研究所菌株でうまく発現した(Van Rensburg et al., 1998)。

10

## 【0138】

## C. 宿主細胞へBGL4エンコード核酸配列の導入

本発明はさらに、外から供給されたBGL4エンコード核酸配列を含むように遺伝子操作された細胞及び細胞組成物を提供する。親細胞または細胞株はクローニングベクターまたは発現ベクターを用いて遺伝子操作(すなわち、変換、形質転換またはトランスフェク

20

## 【0139】

種々の方法がin vitroで細胞に発現ベクターを運ぶために用いることができる。適当なベクターは構築後、菌類や酵母菌の菌株を形質転換するために用いる。異種核酸配列を発現するために細胞に核酸を導入する一般的な方法は当業者に公知である。このような方法は、限定されないが、エレクトロポレーション;核へのマイクロインジェクションまたは単一細胞への直接マイクロインジェクション;無傷細胞を用いる細菌プロトプラスト(原形質)融合;ポリカチオンの使用、例えばポリブレンまたはポリオルニチン;リポソーム、リポフェクトアミンまたはリポフェクション媒介トランスフェクションを用いる膜融合;DNAコート・マイクロプロジェクティル(microp projectiles)を用いる高速発射(high velocity bombardment);リン酸カルシウムDNA沈殿を用いる培養;DEAE-Dextran媒介トランスフェクション;修飾ウイルス性核酸を用いる感染などである。

30

## 【0140】

糸状菌(例えばT. reesei)に異種核酸構築体(発現ベクター)を導入する好ましい方法は、限定されないが、粒子銃または遺伝子銃の使用、形質転換処理の前の糸状菌細胞壁の透過処理(例えば、高濃度アルカリ、例えば0.05M~0.4M CaCl<sub>2</sub>または酢酸リチウムの使用により)、プロトプラスト融合またはアグロバクテリウム媒介形質転換などである。ポリエチレングリコール及びCaCl<sub>2</sub>を用いるプロトプラストまたはスフェロプラスト処理による糸状菌の形質転換の典型的な方法はCampbell, E. I. et al., Curr. Genet. 16: 53-56、1989及びPenttilä, M. et al. Gene, 63: 11-22、1988に記載されている。

40

## 【0141】

さらに、BGL4エンコード核酸配列を含む異種核酸構築体はin vitroで転写でき、得られたRNAは公知の方法、例えば注入により宿主細胞に導入できる。

## 【0142】

bgl4のコード配列を含む異種核酸構築体の導入後、遺伝子組換え細胞はプロモーターを活性化、形質転換体を選択またはBGL4エンコード核酸配列の発現を増幅するため

50

に修飾した適当な従来の栄養培地で培養できる。温度、pH等の培養条件は発現のために選択した宿主細胞に従来使用されていた条件であり、当業者に明らかである。

【0143】

該異種核酸構築体が導入された細胞の子孫は一般的に異種核酸構築体にあるBGL4エンコード核酸配列を含むものと考えられる。

【0144】

本発明はさらに真菌セルラーゼ組成物を生成するために使用するトリコデルマ *reesei* などの糸状菌の新規で有用な形質転換体を含む。本発明は糸状菌、特にbgl4コード配列を含む真菌、bgl4コード配列の修飾体またはbgl4コード配列の欠失を含む真菌の形質転換体を含む。

10

【0145】

糸状菌の安定な形質転換体は一般に、より早いその成長速度及び固形培地上のでこぼこの輪郭ではなく滑らかな円形コロニーの形成により不安定な形質転換体と区別できる。従って、場合によっては、さらに安定性の試験を固形非選択培地上で形質転換を成長させ、この培養基から孢子を集菌し、選択培地上で続いて発芽、成長したこれらの孢子の割合を決定することにより行うことができる。

【0146】

VII. BGL4 核酸コード配列及び/またはタンパク質発現の分析

BGL4エンコード核酸構築体を用いて形質転換した細胞株によるBGL4の発現を評価するために、分析はタンパク質レベル、RNAレベルで行うことができ、または特にグルコシダーゼ活性及び/または生成に対して機能的バイオアッセイを用いることにより行うことができる。

20

【0147】

ここに記載するbgl4核酸及びタンパク質配列の典型的な用途において、糸状菌（例えばトリコデルマ *reesei*）の遺伝子組換え株は増加したBGL4量を生成するために設計される。かかる遺伝子組換え糸状菌は非常に増加したセルロース分解能を持つセルラーゼ生成物を生成するのに有用である。1つの方法として、bgl4のコード配列を適当な宿主（例えば、トリコデルマ *reesei* などの糸状菌）に導入することにより達成する。

【0148】

従って、本発明はBGL4をエンコードするDNA配列を含む発現ベクターを糸状菌またはその他の適当な宿主の細胞に導入することにより、BGL4を糸状菌またはその他の適当な宿主内で発現する方法を含む。

30

【0149】

他の側面において、本発明は糸状菌またはその他の適当な宿主内でBGL4発現を修飾する方法を含む。かかる修飾は発現の減少または除去、またはBGL4変異体の発現を含む。BGL4変異体は変化したアミノ酸配列または変化した核酸配列を有する。

【0150】

一般に、BGL4発現を分析するために用いる分析法はノーザンブロット法、ドットブロット法（DNAまたはRNA分析）、RT-PCR（逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応）または（核酸コード配列に基づき）適当に標識されたプローブを用いる *in situ* ハイブリダイゼーション、及び従来のサザンブロット法及びオートラジオグラフィなどである。

40

【0151】

さらに、BGL4の生成及び/または発現は、例えばグルコシダーゼ活性、発現及び/または生成の分析によりサンプルを直接測定できる。そのような分析法については例えば、各々ここに明示的に引用するものとするChen et al. (1992)、Herr et al. (1978) 及び米国特許第6,184,018号 (Liet al.; 2001) に記載されている。単離可溶性及び不溶性基質を加水分解するBGL4の能力はSuurnakki et al. (2000) 及びOrtega et al.

50

(2001)に記載の分析法を用いて測定できる。セロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼまたは $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を分析するのに有用な基質は結晶セルロース、ろ紙、リン酸膨張(swellen)セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、セロオリゴ糖、メチルウンベリフェリル・ラクトシド、メチルウンベリフェリル・セロビオシド、オルトニトロフェニル・ラクトシド、パラニトロフェニル・ラクトシド、オルトニトロフェニル・セロビオシド、パラニトロフェニル・セロビオシド、オルトニトロフェニル・グルコシド、パラニトロフェニル・グルコシド、メチルウンベリフェリル・グルコシドなどである。最後の3つは特に $\alpha$ -グルコシダーゼの分析に有用である。 $\alpha$ -グルコシダーゼ分析は当業界で公知である。Cummings and Fowler (1996)を参照されたい。

10

#### 【0152】

さらに、タンパク質発現は細胞の免疫組織化学的着色、組織分泌または組織培養基のイムノアッセイ(免疫学的分析)、例えばウエスタンブロット法またはELISAなどの免疫学的方法により評価できる。かかるイムノアッセイはBGL4の定性的及び定量的評価に用いることができる。そのような方法の詳細は当業者に公知であり、該方法を実施するための多くの試薬が市販されている。

#### 【0153】

BGL4の精製体は種々のイムノアッセイに使用する発現タンパク質に特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を生成するために使用できる。(例えば、Huet al., 1991を参照されたい。)典型的な分析法はELISA、競合イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロット法、間接免疫蛍光分析などである。一般に、市販の抗体及び/またはキットはグルコシダーゼタンパク質の発現レベルの定量イムノアッセイに用いることができる。

20

#### 【0154】

##### VIII. 組換えBGL4タンパク質の単離及び精製

一般に、細胞培養で生成したBGL4タンパク質は培地内に分泌され、例えば、不要成分を培養基から除去することにより精製または単離する。しかし、場合によってはBGL4タンパク質は細胞溶解物から必然的に再生した細胞の形で生成する。その場合、BGL4タンパク質を細胞から精製し、当業者が日常的に用いる技術を用いて生成した。例として、限定されないが、アフィニティ・クロマトグラフィ(Tilbeurgh et al., 1984)、イオン交換クロマトグラフィ法(Goyal et al., 1991; Flies et al., 1983; Bhikhabhai et al., 1984; Ellouz et al., 1987)などがあり、高分解能を有する物質を用いるイオン交換(Medve et al., 1988)、疎水性相互作用クロマトグラフィ(Tomaz and Queiroz, 1999)及び2相分割(two-phase partitioning)(Brumbauer, et al., 1999)を含む。

30

#### 【0155】

一般的に、BGL4タンパク質は、例えば特定の結合剤(例えば抗体または受容体)への結合親和力など選択した性質を有するタンパク質または選択した分子量範囲または等電点の範囲を有するタンパク質を分離するために断片化する。

40

#### 【0156】

所定のBGL4タンパク質発現を達成すると、それによって生成されたBGL4タンパク質を細胞または細胞培地から精製する。そのような精製に適した典型的な手順は以下のものを含む:抗体アフィニティ・カラムクロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ;エタノール沈殿;逆相HPLC;シリカ系クロマトグラフィまたはDEAEなどカチオン交換樹脂系クロマトグラフィ;等電点クロマトグラフィ(chromatofocusing);SDS-PAGE;硫酸アンモニウム沈殿;例えばSephadex G-75を用いるゲルろ過法。タンパク質精製の種々の方法を用いることができ、該方法は当業界に公知であり、例えばDeutscher, 1990; Scopes, 1982に記

50

載されている。選択する精製工程は例えば使用する生成プロセス及び生成する特定のタンパク質の性質により決まる。

【0157】

I X . b g l 4 及び B G L 4 の有用性

b g l 4 ヌクレオチド、b g l 4 タンパク質及び b g l 4 タンパク質活性を含む組成物は多種多様の用途において有用であることがわかる。そのいくつかを以下に説明する。

【0158】

種々の量の C B H 型、E G 型及び B G 型セルロースを含む新規で改善されたセルラーゼ組成物は洗剤組成物に有用であり、柔軟剤として機能し、洗剤能力の向上を示し、及び/または綿繊維の手触りを改善する(例えば、“ストーンウォッシング”または“バイオポリッシング”)。また、木材パルプを糖に分解するための組成物(例えば、バイオ-エタノール生成)及び/または飼料組成物において有用である。各々の型のセルラーゼの単離及び同定(characterization)により該組成物の特徴を制御することができる。

【0159】

好ましい方法において、本発明のセルラーゼは洗剤組成物または手触り及び外観を向上するための繊維処理において有用である。

【0160】

本発明の - グルコシダーゼは多種多様の用途において使用できる。例えば、 - グルコシダーゼはワイン製造時にブドウに加えて最終製品のワインの香りを高めることができる。さらに別の用途では - グルコシダーゼは香りを高めるために果物に用いることができる。もしくは、増加した - グルコシダーゼを含む単離組換え発酵生成物は食品添加剤に直接用いてもよく、または風味及び香りを高めるためにワイン加工に用いてもよい。

【0161】

セルロース誘導体の加水分解速度はゲノムに挿入された b g l 4 遺伝子の少なくとも 1 の付加的コピーを有する形質転換体を用いることにより増加するので、セルロースまたはヘテログリカンを含む生成物はより速い速度、より広い範囲で分解され得る。紙、綿、セルロース誘導体おむつ等のセルロースから作られる製品はごみ廃棄場でより効率的に分解され得る。従って、該形質転換体からまたは形質転換体のみから得られる発酵生成物は、ごみ廃棄場に満杯になった様々なセルロース製品の液化による分解を助けるために組成物に使用できる。

【0162】

糖化及び発酵の分離はバイオマス中のセルロースのプロセスである。例えば c o r n s t o v e r はグルコースに変換され、続いて酵母株はグルコースをエタノールに変換する。糖化及び発酵の同時発生はセルロースがバイオマスに存在することによって起こるプロセスである。例えば c o r n s t o v e r はグルコースに変換され、同時に同じ反応器内で酵母株がグルコースをエタノールに変換する。従って、他の好ましい方法において、本発明のグルコシダーゼ型セルラーゼはバイオマスをエタノールに分解するのに有用である。容易に利用できるセルロース源由来のエタノール生成物は安定で再生可能な燃料源を提供する。

【0163】

セルロースベースの供給原料は農業廃棄物、草及び木材及び都市ごみ(例えば、再生紙、庭切り(yard clippings)等)などその他の安価バイオマスを含む。エタノールはこれらセルロース誘導体供給原料のいずれかから発酵により生成できる。しかし、セルロースはエタノールへの変換の前にまず糖に変換されなければならない。

【0164】

本発明の - グルコシダーゼと一緒に様々な供給原料が使用でき、使用する原料の選択は変換が行われる地域によって変わる。例えば、アメリカ中西部においては麦かん、c o r n s t o v e r 及びパガスなどの農業廃棄物が主流であるのに対し、カリフォルニアでは稲わら(rice straw)が主流である。しかし、いかなる地域においても任

10

20

30

40

50

意の入手可能なセルロース誘導体バイオマスが使用できることは当然のことである。

【0165】

増加した量の - グルコシダーゼを含むセルラーゼ組成物はエタノール生成に有用である。この方法から得たエタノールはさらにオクタンエンハンサー (octane enhancer) としてまたはガソリンの代わりに直接燃料として使用でき、燃料源としてのエタノールは石油由来生成物よりも環境に優しいので都合がよい。エタノールの使用が大気環境を改善し、局所オゾンレベル及びスモッグを減少させる可能性があることは公知である。さらに、ガソリンの代わりにエタノールを用いることは非再生可能エネルギー及び石油化学供給が突然の変更された際の影響を和らげるためにも戦略的に重要である。

【0166】

エタノールは例えば木、葉状植物、都市ごみ及び農業及び林業残留物などのセルロース誘導体バイオマスから糖化及び発酵により生成できる。しかしながら、この方法が直面する1つの大きな問題はセロピオースをグルコースに変換するためのシステム中における - グルコシダーゼの欠如である。セロピオースはセロピオヒドロラーゼ及びエンドグルカナーゼの阻害剤として働き、それによりセルラーゼ系全体の加水分解速度を減少させることは公知である。従って、増加した - グルコシダーゼ活性の使用はセロピオースを素早くグルコースに変換し、エタノール生成を大きく増進させると考えられる。

【0167】

従って、本発明の - グルコシダーゼはセルロースから糖成分への加水分解においても使用できる。1の実施態様において、 - グルコシダーゼは発酵生物を加える前にバイオマスに加える。第2の実施態様において、 - グルコシダーゼは発酵生物と同時にバイオマスに加える。任意で、いずれの実施態様においてもその他のセルラーゼ成分を含んでもよい。

【0168】

他の実施態様において、セルロース誘導体供給原料を前処理する。前処理は加熱及び希酸、濃酸または希アルカリ溶液のいずれかを加える。前処理溶液はヘミセルロース成分を少なくとも部分的に加水分解し、それから中和するのに十分な時間で加える。

【0169】

別の方法において、 - グルコシダーゼが不足または欠如しているセルラーゼ組成物は好ましい。本発明の - グルコシダーゼ遺伝子の欠失は洗剤に使用するためのセルラーゼ組成物を調製する際に特に有用である。従って、かかる組成物はセロピオース及びその他のセロオリゴ糖生成に有用である。T. reesei 菌株由来 bgl4 遺伝子の欠失は洗剤に用いるセルラーゼ組成物の調製及びセロピオースの単離に特に有用である。セルラーゼ酵素は酵素的に衣服を洗濯するために種々の洗剤組成物に使用されている。しかしながら、セルラーゼ酵素の使用は衣服のセルロース繊維の分解に影響することが知られている。分解効果を減少させる1つの可能性としては - グルコシダーゼを含まない洗剤を製造することである。従って、このタンパク質の欠失はセルラーゼ系に効果的であり、その他の成分をセロピオースの蓄積により阻害する。本発明の修飾微生物は、残留CBH及びEG成分を取除いて bgl4 遺伝子を欠失させることができるので該組成物を調製するために特に適しており、分解効果のない組成物において洗浄及び柔軟効果が改善される。

【0170】

本発明の洗剤組成物はセルラーゼ組成物に加えて ( - グルコシダーゼ含量に関係なく、すなわち - グルコシダーゼを含まない、実質的に - グルコシダーゼを含まない、または - グルコシダーゼを多く含むなど)、陰イオン性、非イオン性及び両性界面活性剤を含む界面活性剤、ヒドロラーゼ、ビルダー (building agent)、漂白剤、青味剤及び蛍光染料、固化阻害剤、溶解剤、陽イオン性界面活性剤等を用いてもよい。これら成分の全ては洗剤業界において公知である。上述のセルラーゼ組成物は希釈液、顆粒、乳液、ゲル、ペースト等の形態で洗剤組成物に加えることができる。かかる形態は当業者に公知である。固形洗剤組成物を用いる場合、セルラーゼ組成物は顆粒として処方するのが好ましい。好ましくは、顆粒はセルラーゼ保護剤を含むように処方する。より詳細

10

20

30

40

50

な議論は、ここに引用する米国特許第 6, 162, 782 号、タイトル “C B H I 型成分が欠如したセルラーゼ組成物を含有する洗剤組成物” を参照されたい。

【0171】

他の実施態様において、洗剤組成物は高レベルの - グルコシダーゼまたは変化した - グルコシダーゼも含む。この点は、洗剤組成物に使用して適切な効果を得たいその製品タイプに実際に依存する。

【0172】

好ましくは、セルラーゼ組成物は全洗剤組成物に関して約 0.00005 重量% ~ 約 5 重量% 用いる。より好ましくは、セルラーゼ組成物は全洗剤組成物に関して約 0.0002 重量% ~ 約 2 重量% 用いる。

10

【0173】

また、bgl4 遺伝子の欠失はセルラーゼ系でセロピオースの蓄積を提供し、そこから精製できる。この点において、本発明は微生物からセロピオースを容易で効果的な方法で単離できる可能性を示す。

【0174】

Lehtio et al., 2001 に記載されるように、セルロースに結合可能な bgl4 核酸配列の一部は、セルロースフィルターまたはその他の繊維性担体上に細胞全体を固定化できる細菌性キメラ表面タンパクを生成するために使用できる。

【0175】

さらに、bgl4 核酸配列は関連する核酸配列の同定及びキャラクタリゼーションに有用であることがわかった。関連遺伝子または遺伝子産物の機能を測定（予測または確認）するために有用な多数の技術としては、限定されないが、(A) DNA/RNA 分析、例えば (1) 過剰発現、異所発現及びその他の種での発現；(2) 遺伝子ノックアウト（逆遺伝学、標的ノックアウト、ウイルス誘発性遺伝子サイレンシング (VIGS, Baulcombe, 1999 参照)；(3) 遺伝子、特にフランキング調節領域のメチル化状態の分析；及び (4) in situ ハイブリダイゼーション；(B) 遺伝子産物分析、例えば (1) 組換えタンパク質発現；(2) 抗血清生成、(3) 免疫学的局在決定；(4) 触媒的またはその他の活性の生化学分析；(5) リン酸化反応状態；及び (6) 酵母 2 ハイブリッド分析によるその他のタンパク質との相互作用；(C) 経路分析法、例えば遺伝子または遺伝子産物をその過剰発現表現型に基づきまたは関連遺伝子に相同な配列により特定の生化学的またはシグナル経路内へプレーシング (placing) する；及び (D) 特定の代謝またはシグナル経路における単離遺伝子及びその生産物の関与を測定または確認するために実施できる及び遺伝子機能測定を助けるその他の分析法などがある。

20

30

【0176】

エンドグルカナーゼ及び - グルコシダーゼはセロオリゴ糖及びグルコースからトランスグリコシル化反応によりソホロースなどの二糖類生成をもたらす。ソホロースはセルラーゼ遺伝子発現の非常に強力な誘発剤として知られる (Ilmen, Met al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306 及びその中に記載の文献)。このように、EG 及び BGL はセルラーゼ遺伝子発現を誘発するプロセスにおいて重要な役割を果たす。真菌株内の特定 EG または BGL の過剰発現はその菌株により高い全体的なセルラーゼ生産力をもたらす。

40

【0177】

A. 公知配列との相同性

関連 BGL4 エンコード核酸配列の機能は特定機能を有する公知の遺伝子との相同性により決定できる。例えば、同定した核酸分子のコード配列と公開されている核酸配列データベースとの比較は公知遺伝子との相同性によりまたは同定核酸配列の伸長 (extension) により機能を確認するために用いる。

【0178】

ここで “相同性%” の語は “同一性%” の語と交換可能に用いられ、配列アラインメントプログラムを用いて配置した際の、BGL4 をエンコードする核酸配列または BGL4

50

アミノ酸配列間の核酸またはアミノ酸配列の同一性レベルをいう。

【0179】

例えば、ここで用いる、相同性80%とは定義したアルゴリズムにより決定される配列同一性が80%であることと同じ意味であり、従って所定の配列の相団体は所定の配列長さと80%以上の配列同一性を有する。配列同一性の典型的なレベルは、限定されないが、所定の配列に対して80、85、90、95、98%またはそれ以上の配列同一性を含み、例えばここに記載するb g l 4のコード配列である。

【0180】

2つの配列間の同一性を決定するために使用できる典型的なコンピュータプログラムは、限定されないが、一連のBLASTプログラム、例えばBLASTN、BLASTX、及びTBLASTX、BLASTP及びTBLASTNなどであり、インターネット上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で公に公開されている。また、Altschul et al.、1990及びAltschul et al.、1997を参照されたい。

10

【0181】

配列サーチは所定の核酸配列をGenBank DNA配列及びその他の公共データベースにおける核酸配列と比較して評価する場合、一般的にBLASTNプログラムを用いて行う。BLASTXプログラムはGenBankタンパク質配列及びその他の公共データベース中のアミノ酸配列に対して全リーディングフレーム内で翻訳されている核酸配列をサーチするのに好ましい。BLASTN及びBLASTXの両方は11.0のオープンギャップ・ペナルティの初期値パラメーターを及び1.0の延長ギャップペナルティを用いて操作し、BLOSUM-62マトリックスを利用する。(Altschul et al.、1997を参照。)

20

2つ以上の配列間の“%同一性”を決定するために選択された配列の好ましいアラインメントは例えば、MacVectorバージョン6.5のCLUSTAL-Wプログラムを用いて実行し、10.0のオープンギャップペナルティ、0.1の延長ギャップペナルティ及びBLOSUM30類似マトリックス等の初期値パラメーターを用いて操作する。

【0182】

典型的な方法として、b g l 4をエンコードする核酸の配列伸長は上述のSambrook et al.に記載するような従来のプライマー伸長手順を用いて行い、b g l 4前駆体を検出してcDNAに逆転写されてないmRNAの中間体を処理し、及び/または完全長タンパク質をエンコードするORFを同定する。

30

【0183】

他の側面において、本発明はプローブとして用いるb g l 4核酸配列のヌクレオチド配列の全体または一部を含む。このようなプローブは関連有機体から相同性核酸配列を同定及びクローンするために使用できる。

【0184】

選択プローブのcDNAまたはゲノムライブラリーのスクリーニングはSambrook et al.、(1989)に記載されているような標準的な手段を用いて行うことができる。中ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーなどのハイブリダイゼーション条件は上述のSambrook et al.に記載されている。

40

【0185】

またプローブまたはその一部は、密接に関連するb g l 4配列の同定用の配列プールを作るためのPCR技術に用いることができる。b g l 4配列をプローブとして用いる場合、BGL4エンコード配列の特定部分、例えば高度に保存されたコード配列部分を使用するのがよい。例えば、b g l 4ヌクレオチド配列は遺伝子を単離するためcDNAライブラリー用ハイブリダイゼーション・プローブとして用いることができ、例えば他の菌類、細菌または植物種由来のBGL4の天然型変異体をエンコードする遺伝子、図1(配列番号1)に開示するb g l 4ヌクレオチド配列と望ましいレベルの配列同一性を有する遺伝子である。典型的なプローブは約20~約50塩基長である。

50

## 【0186】

B. 2 ハイブリッド分析

本発明により同定されるタンパク質は酵母2ハイブリッドシステムにおいて使用でき、推測シグナル経路タンパク質であるタンパク質を結合するタンパク質を“捕捉”する。酵母2ハイブリッドシステムはFields and Song, Nature 340: 245-246 (1989)に記載されている。つまり、2ハイブリッドシステムでは、DNA結合ドメイン-bgl4の融合体(例えば、GAL4-bgl4融合体)が構築され、酵母細菌内にトランスフェクトされる。全bgl4遺伝子またはbgl4遺伝子のサブ領域が使用できる。DNA活性ドメインに融合される潜在的な結合パートナーのライブラリーを含む第2の構築体をコトランスフェクトする。BGL4タンパク質に結合する酵母共形質転換体含有(harboring)タンパク質は例えば使用するベクターに応じて、-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼ生成(スクリーン)または必須栄養素が欠如したプレート上での残存(選別)により同定する。

10

## 【0187】

C. マイクロアレイ分析

さらに、発現プロファイリングまたは転写プロファイリングとしても知られるマイクロアレイ分析は所定のDNA配列の存在または発現、または様々な遺伝子の発現変化を同時に評価するために用いる。1の方法において、DNA配列の大きなセット(プローブ)、通常は発現した配列タグの大きなセット、cDNA、cDNA断片または配列特異オリゴヌクレオチドをスライド・ガラスまたはナイロン膜などの固形担体上に配置する。プローブへのハイブリダイゼーションのために標識した標的は制御及び導入組織からmRNAを単離することにより生成し、それから各mRNAプールを通常は蛍光染料などの明確なマーカーを用いて、直接またはcDNAやcRNA中間体を用いて標識する。マイクロアレイは複合プローブを用いてハイブリダイズし、アレイ上の各配置に関する関連ハイブリダイゼーション・シグナル強度は各マーカー染料について量ることができる。制御及び導入状態間の発現の違いは2つのマーカー染料からのシグナル比として測定できる(Baldwin, Det al., 1999を参照。)

20

bgl4を生じる供給有機体のマイクロアレイ分析が実施でき、bgl4過剰発現の結果として協調して調節されるその他の遺伝子を同定することにより遺伝子機能の理解を助ける。協調して調節される遺伝子の同定はbgl4遺伝子を特定経路に位置付けするのに役立つ。もしくは、そのような分析はマイクロアレイ分析を用いる同じ経路に係するその他の遺伝子を同定するのに役立つ。

30

## 【0188】

ここに記載する全ての文献、特許及び特許出願はその全体をここに明示的に引用するものとする。

## 【0189】

本発明は特定の方法及び実施態様を参照することにより説明されているが、本発明の範囲を逸脱することなく種々の修正及び変更が可能であることは当然理解されることである。

## 【0190】

40

実施例1

1の典型的な方法において、プローブとして用いるcDNA断片はセルラーゼ生産を誘発することが公知の条件下で成長させたT. reesei株の菌糸体から全RNAを抽出し、そこからポリアデニル酸(poly A)断片を得ることにより単離する。poly A RNAはcDNAプールを生成するために用い、該cDNAプールはそれからここで提供するbgl4核酸配列に基づく特異的プライマーを用いて増幅する。

## 【0191】

全RNAは、例えばここに明示的に引用するものとするTimberlake et al., 1981; Maniatis, et al., 1989; Ausubel, et al., 1993及びSambrook, et al., 1989に記載されている当

50



業者に公知の方法を用いて菌系体から単離する。いったん単離すると、ノーザンブロット法を行いセルラーゼ発現を確認し、セルラーゼ発現及び対応RNA単離のための最適誘発時間を選択する。

【0192】

3'末端にポリ(A)テイルを有する、メッセンジャーRNA(mRNA)は当業者に公知の方法を用いて全RNAから精製できる。

【0193】

T. reesei RNAは当業者に公知の方法を用いてRT-PCR用のテンプレートとして使用する(Loftus, J. et al., Science, 249:915-918, 1990)。この手順の間、mRNAは第1のストランドcDNAを生成するために逆転写される。cDNAは続いて配列番号1または配列番号4に従って設計した特異的オリゴヌクレオチド・プライマーを用いるbgl4 cDNA配列のPCR増幅に関して、テンプレートとして働く。

【0194】

【表1】

表1. 本発明を支持する配列

記述	配列番号
完全長 T. reesei bgl4 cDNA 核酸配列 TTATAGTCGCTTTGTTAAATTGGCCTCGAGGTCGACCCACGCGTCC GGCTGCTTGTCCCGTTCCTGTGCCTGATGTCTATCTGCCGTTGGCC TCCTCATCCTCATCTCCCTGTTGTCTGTCTCCTCTTAGTGCTTCAG TGACGCTAGGTTCCGGTCACTTTGTCCCCCCTTCGTTGCTCTGGTGT GTCCAAGGTCTACCCTGCAGTGGTTTTGAACCCTTGATATCCTGCT TGAGCATCCGCGTCGCCATATAGAGCAGCATATTCCTTCTATCTCCA AAGATCCCCCTACCGAGAGTTCTATTCACCCGACCCCTGCCTTGTC ATCCAGTCCTTCCATCATGGCTGATATTGATGTTGAGGCCATCTTGAA GAAGCTCACCCCTGGCCGAGAAGGTCGATCTGCTGGCTGGTATCGACTT CTGGCACACAAAGGCTCTCCCCAAGCATGGAGTCCCCTCTCTCCGCTTT ACAGATGGCCCCCAACGGCGTAAGAGGGACCAAGTTCTTCAATGGCGTC CCTGCGGCTGCTTCCCTTGCAGCACGTCGCTCGGTTCCACATTCAACC AAACTCTGCTCGAAGAGGCAGGTAAGATGATGGGCAAAGAGGCCATC GCTAAGAGTGCGCATGTGATCCTCGGCCGACTATCAACATGCAACGC TCCCCTCTCGGTGGACGTGGCTTCGAGTCGATTGGTGAGGATCCGTTCC TGGCGGGCTTGGGAGCTGCGGCTCTCATCCGCGGCATTACAGAGCACTG GAGTGCAAGGCTACGATCAAGCACTTTTTGTGCAATGATCAGGAGGACA GGCGCATGATGGTGACAGCATCGTCACGGAGCGGGCTCTCCGTGAAA TCTACGCACTCCCGTTCCAGATTGCTGTGCGAGACTCCAGCCGGGTG CGTTTCATGACGGCGTACAATGGCATCAATGGCGTGTCTGTCAGCGAGA ACCCTAAATATCTTGATGGGATGCTTCGAAAGGAATGGGGTTGGGATG GCCTAATCATGAGCGACTGGTACGGCACATACAGTACCACAGAAGCCG TTGTGGCAGGCCTCGACCTCGAGATGCCCCGACCTCCACGCTTCCGAG GAGAAACACTCAAGTTCAACGTCTCCAACGAAAGCCCTTTATCCACG TCATTGACCAGAGGGCTAGGGAAGTTCTTCAGTTTCGTCAAGAAGTGTG CTGCCTCCGGAGTGACGGAGAACGGCCCCGAGACGACTGTCAACAAC ACCCCCGAAACGGCAGCTCTCCTCCGGAAGGTTGGCAACGAGGCGATC GTGCTGCTGAAGAACGAGAACAACGTTCTGCCCTTGAGCAAGAAGAA GAAGACGCTGATTGTGCGCCCCAACGCCAAGCAGGCCACATACCACG GCGGAGGCTCTGCCGCACTCAGGGCCTACTACGCAGTCACTCCCTTTG ACGGCCTCAGCAAGCAGCTCGAGACGCCGCCATCGTACACCGTCGGCG CCTACACCAACCGTTCTCCCATTTAGGCGAGCAGTGCCTCACGCCCG ACGGCGCTCCGGGCATGCGCTGGAGGGTCTTCAACGAGCCCCCTGGTA CCCCTAACCGCCAGCACATTGACGAGCTCTTCTTCAACCAAGACGGACA TGCACCTGGTGGACTACTACCACCCCAAGGCGGCAGACACGTGGTACG CCGACATGGAGGGCACGTACACCGCCGACGAGGACTGCACCTACGAG	1

<p>CTCGGCCTCGTCTGCGGCACGGCAAAGGCGTACGTAGACGACCAG  CTCGTCTGACACAACGCCACCAAGCAGGTCCCCGGCGATGCCTTCTTC  GGCTCCGCCACCCGCGAGGAGACGGGCCGATCAATCTCGTCAAGGGC  AACACGTACAAGTTCAAGATCGAGTTCCGGTCCGCACCCACCTACACC  CTCAAGGGCGACACCATCGTCCCCGGCCACGGCTCCCTCCGCGTGGC  GGCTGCAAGGTCATTGACGACCAGGCCGAAATCGAAAAGTCCGTCGCC  CTCGCAAGGAGCACGACCAGGTATCATCTGCGCGGGCCTTAACGCC  GACTGGGAGACCGAGGGCGCCGACCGCGCGAGCATGAAGCTCCCCGG  CGTGCTGGACAGCTCATTGCCGACGTGGCCGCGCGAACCACAAACAC  CGTCGTCGTCATGCAGACGGGCACCCCCGAGGAGATGCCCTGGCTCGA  CGCCACGCCCCGCCGTCATCCAGGCCTGGTACGGCGGCAACGAGACGG  GCAACTCCATTGCCGACGTCGTCCTTTGGCGACTACAACCCCTCGGGCA  AGCTGTCCCTCAGCTTCCCCAAGCGCCTGCAGGACAACCCCGCGTTTCT  CAACTTCCGCACCGAGGCCGGGCGCACGCTGTACGGCGAGGACGTCTA  CGTCGGGTACAGGTACTACGAGTTTGCCGACAAGGACGTCAATTTCCC  CTTTGGCCACGGCCTGTCTACACCACCTTTTGCTTTTCCAATCTCTCCG  TGTCTCACAAGGACGGCAAGCTGAGCGTGTCCCTCTCCGTGAAGAACA  CCGGCTCCGTGCCCGGCGCACAGGTGGCCAGCTCTACGTCAAGCCCC  TCCAAAGCGGCCAAGATTAACCGCCCCGTCAAGGAGCTCAAGGGCTTCG  CAAAGGTGCAACTGCAGCCCGCGAGACGAAGGCGGTGACAATCGAG  GAGCAGGAGAAGTACGTGCTGCGTATTTGATGAGGAGCGGGATCA  GTGGTGTGTCGAAAAGGGTGACTATGAGGTATCGTGAGCGACAGCAG  CGCAGCGAAGGATGGGGTTGCGCTCAGGGGTAAGTTTACGGTGGGAG  AGACGTATTGGTGGTCTGGCGTGTAAGTCTGTGCATCATCTTTGGCA  GATTGAATCCAGTCACTTTGCATATAGCGCCGATGAAATGAGAAC  CAACGATCATTGTGTAAAAA  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</p>		10
<p>T. reesei BGL4 予想アミノ酸配列  MADIDVEAILKKLTAEKVDLLAGIDFWHTKALPKHGVPSLRFTDGPNGVRG  TKFFNGVPAACFPCTSLGSTFNQTLLEEAGKMMGKEAIAKSAHVILGPTNM  QRSPLGGRGFESIGEDPFLAGLGAALIRGIQSTGVQATIKHFLCNDQEDRM  MVQSIATERALREIYALPFQIAVRDSQPGAFMTAYNGINGVSCSENPXYLDGM  LRKEWGWDLMSDWYGTYSTTEAVVAGLDLEMPGPPRFRGETLKFNVSN  KPFHVIDQRAREVLQFVKKCAASGVTENGPETTNNTPETAALLRKVNGE  VLLKNENNVLPLSKKKKTIVGPNKQATYHGGGSAALRAYYAVTPFDGLSK  QLETTPSYTVGAYTTVPILGEQCLTPDGAPGMRWRVFNPPGTPNRQHIDELF  FTKTDMLHVDYYHPKAADTWYADMEGTYTADEDCTYELGLVVCGTAKAYV  DDQLVVDNATKQVPDAFFGSATREETGRINLVKGNTYKFKIEFGSAPTYTLK  GDTIVPGHSLRVGGCKVIDDQAEIEKSVALAKEHDQVICAAGLNADWETEGA  DRASMKLPGVLDQLIADVAAANPNTVVVMQTGTPEEMPWLDATPAVIQAWY  GGNETGNSIADVFGDYNPSGKLSLSPKRLQDNPAFLNFRTEAGRTLYGEDV  YVGYYEFADKDVNFPFGHLSYTTFAFSNLSVSHKDGLSVLSVKNTGS  VPGAQVAQLYVKPLQAAKINRPVKELKGFVKVELQPGETKAVTIEEQEKYVA  AYFDEERDQWCVEKGDYEVIVSDSSAAKDGVALRGKFTVGETYWWSGV</p>	2	30
<p>T. reesei bgl4 核酸コード配列  ATGGCTGATATTGATGTTGAGGCCATCTTGAAGAAGCTCACCCCTGGCCGAG  AAGGTGCGATCTGCTGGCTGGTATCGACTTCTGGCACACAAAGGCTCTCCCC  AAGCATGGAGTCCCCTCTCTCCGCTTTACAGATGGCCCCAACGGCGTAAGA  GGGACCAAGTTCTTCAATGGCGTCCCTGCGGCCTGCTTCCCTTGCGGCACG  TCGCTCGGTTCCACATTCAACCAAACTCTGCTCGAAGAGGCGAGGTAAGATG  ATGGGCAAAGAGGCCATCGCTAAGAGTGCGCATGTGATCCTCGGCCCGAC  TATCAACATGCAACGCTCCCCTCTCGGTGGACGTGGCTTCGAGTCGATTGG  TGAGGATCCGTTCTGCGGGCTTGGGAGCTGCGGCTCTCATCCGCGGCAT</p>	3	40

TCAGAGCACTGGAGTGCAGGCTACGATCAAGCACTTTTTGTGCAATGATCA  
 GGAGGACAGGCGCATGATGGTGCAGAGCATCGTCACGGAGCGGGCTCTCC  
 GTGAAATCTACGCACTCCCGTTCCAGATTGCTGTGCGAGACTCCCAGCCGG  
 GTGCGTTTCATGACGGCGTACAATGGCATCAATGGCGTGTCTGTCAGCGAG  
 AACCTAAATATCTTGTATGGGATGCTTCGAAAGGAATGGGGTTGGGATGG  
 CCTAATCATGAGCGACTGGTACGGCACATACAGTACCACAGAAGCCGTTG  
 TGGCAGGCCCTCGACCTCGAGATGCCCGGACCTCCACGCTTCCGAGGAGAA  
 ACACTCAAGTTCAACGTCTCCAACGGAAGCCCTTTATCCACGTCATTGAC  
 CAGAGGGCTAGGGAAGTTCTTCAGTTCGTCAAGAAGTGTGCTGCCTCCGGA  
 GTGACGGAGAACGGCCCCGAGACGACTGTCAACAACACCCCCGAAACGGC  
 AGCTCTCCTCCGGAAGGTTGGCAACGAGGGCATCGTGTCTGCTGAAGAACG  
 AGAACAAAGTTCTGCCCTTGAGCAAGAAGAAGAAGACGCTGATTGTGCGC  
 CCCAACGCCAAGCAGGCCACATACCACGGCGGAGGCTCTGCCGCACTCAG  
 GGCTACTACGCAGTCACTCCCTTTGACGGCCTCAGCAAGCAGCTCGAGAC  
 GCCGCCATCGTACACCGTCGGCGCCTACACCACCGTTCTCCATTCTAGG  
 CGAGCAGTGCCTCACGCCCCGACGGCGCTCCGGGCATGCGCTGGAGGGTCT  
 TCAACGAGCCCCCTGGTACCCCTAACCGCCAGCACATTGACGAGCTCTTCT  
 TCACCAAGACGGACATGCACCTGGTGGACTACTACCAACCCCAAGGCGGCA  
 GACACGTGGTACGCCGACATGGAGGGCACGTACACCGCCGACGAGGACTG  
 CACCTACGAGCTCGGCCTCGTCTGCGGCACGGCAAAGGCGTACGTAG  
 ACGACCAGCTCGTCTGCGACAACGCCACCAAGCAGGTCCCCGGCGATGCC  
 TTCTTCGGCTCCGCCACCCGCGAGGAGACGGGCCGCATCAATCTCGTCAAG  
 GGCAACACGTACAAGTTCAAGATCGAGTTTCGGCTCCGCACCCACCTACACC  
 CTCAAGGGCGACACCATCGTCCCCGGCCACGGCTCCCTCCGCGTCGGCGGC  
 TGCAAGGTCAATTGACGACACAGGCCGAAATCGAAAAGTCCGTCGCCCTCGC  
 CAAGGAGCACGACCAAGGTCATCATCTGCGCGGGCCTTAACGCCGACTGGG  
 AGACCGAGGGCGCCGACCGCGCGAGCATGAAGCTCCCCGGCGTGTGGAC  
 CAGCTCATTGCCGACGTGGCCGCGCGAACCACCAACACCGTCGTCTCATG  
 CAGACGGGCACCCCCGAGGAGATGCCCTGGCTCGACGCCACGCCCGCGT  
 CATCCAGGCCTGGTACGGCGGCAACGAGACGGGCAACTCCATTGCCGACG  
 TCGTCTTTGGCGACTACAACCCCTCGGGCAAGCTGTCCCTCAGCTTCCCA  
 AGCGCCTGCAGGACAACCCCGCGTTTCTCAACTTCCGCACCGAGGCCGGGC  
 GCACGCTGTACGGCGAGGACGTCTACGTGGGTACAGGTACTACGAGTTT  
 GCCGACAAGGACGTCAATTTCCCTTTGGCCACGGCCTGTCTACACCACT  
 TTTGCCCTTTCCAATCTCTCCGTGTCTACAAGGACGGCAAGCTGAGCGTG  
 TCCCTCTCCGTGAAGAACACCGGCTCCGTGCCCGGCGCACAGGTGGCCAG  
 CTCTACGTCAAGCCCCCTCAAGCGGCCAAGATTAAACCGCCCCGTCAAGGA  
 GCTCAAGGGCTTCGCAAGGTGCAACTGCAAGCCCGGAGACGAAGGCGG  
 TGACAATCGAGGAGCAGGAGAAGTACGTGCGTATTTTGTATGAGGAG  
 CGGGATCAGTGGTGTGTCGAAAAGGGTGACTATGAGGTTATCGTGAGCGA  
 CAGCAGCGCAGCGAAGGATGGGGTTGCGCTCAGGGGTAAGTTACGGTGG  
 GAGAGACGTATTGTTGGTCTGGCGTGTAA

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0195】

【図1A】図1Aはトリコデルマ *reesei* bgl4 cDNAの核酸配列（配列番号1）の一本鎖の記述であり、非コード配列を太字で示す。

【図1B】図1Bはトリコデルマ *reesei* bgl4 cDNAの核酸配列（配列番号1）の一本鎖の記述であり、非コード配列を太字で示す。

【図2A】図2Aは、図1で示すヌクレオチド配列に基づく予想アミノ酸配列（配列番号2）である。

40

【図2B】図2Bは、図1で示すヌクレオチド配列に基づく予想アミノ酸配列（配列番号2）である。



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/34611										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>												
IPC(7) : C12P 21/06; C12N 9/00, 9/24, 9/42, 1/20, 15/00; C07H 21/04 US CL : 435/69.1, 183, 200, 209, 252.3, 2554.1, 254.3, 254.6, 320, 325; 536/23.2, 23.4, 23.7, 23.74; 510/114, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 183, 200, 209, 252.3, 2554.1, 254.3, 254.6, 320, 325; 536/23.2, 23.4, 23.7, 23.74; 510/114,												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE, BIOTECHNO, BIOTECHABS, USPTO WEST, GENBANK												
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	TAKASHIMA. S. et al. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from <i>Humicola grisea</i> and <i>Trichoderma reesei</i> . J. Biochem. January 1999, Vol. 125, pages 728-736.	1, 6-7, 19-20										
A	SALOHEIMO. M. et al. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel <i>Trichoderma reesei</i> beta-glucosidase BGLII (Cell A). September 2002, Appl. Environ. Microbiol. Vol. 68, No. 9, pages 4546-4553.	1-21, 23-25										
A	SAWKAR. A.R. et al. Chemical Chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: A therapeutic strategy for Gaucher disease. 26 November 2002, PNAS, Vol. 99, No. 24, pages 15428-15433.	1-21, 25										
A	BELANCIC. A. et al. Beta-glucosidase from the grape native yeast <i>Debaryomyces hansenii</i> : Purification, characterization and its effect on monoterpene content of Muscat grape juice. 26 February 2003, J. Agric. Food Chem., Vol. 51, No. 5, pages 1453-1459.	1-21, 25										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&amp;" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 11 July 2003 (11.07.2003)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Manjunath N. Rao Telephone No. 703-308-0196										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/34611

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-21, 23-25, drawn to Polypeptides, DNA, vectors, host cells, and detergent composition comprising the polypeptide.

Group II, claim 22, drawn to a recombinant host cell in which the *bgl4* gene is deleted.

Group III, claim 26, drawn to a method of expression of heterologous polypeptide in a fungal host cell.

Group IV, claims 27-36, drawn to a method for production of ethanol.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, a polypeptide and polynucleotide encoding the same, a vector, a host cell, a method for producing polypeptide. Further pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/34611

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

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

1. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-21, 23-25

Remark on Protest

☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/24	C 1 2 P 7/10	
C 1 2 P 7/10	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(72) 発明者 ダン - コールマン、ナイジェル

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 5 0 3 2、ロス・ガトス、ジョンソン・アベニュー 1 4 2

(72) 発明者 ワード、マイケル

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 1 1 4、サンフランシスコ、トゥエンティーフォース・ストリート 4 3 7 2

(72) 発明者 ヤオ、ジアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 0 8 7、サニーベイル、ライト・アベニュー 1 7 6 1

(72) 発明者 ギューデギュバー、フリッツ

オランダ国、エヌエル - 3 1 3 5・エックスバイ・ブラールディンゲン、ローゼンラーン 1 2 8

F ターム (参考) 4B024 AA03 BA12 CA04 DA11 DA12 EA02 EA03 EA04 GA11 HA14

4B050 CC03 DD03 LL04 LL05

4B064 AC03 CA06 CA21 CB07 DA20

4B065 AA58X AA70X AA70Y AA80X AB01 AC14 BA02 CA31 CA55 CA57