

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2016年5月12日(12.05.2016)



(10) 国際公開番号  
WO 2016/072448 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 9/42 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01) C12P 19/14 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/081151
- (22) 国際出願日: 2015年11月5日(05.11.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2014-225543 2014年11月5日(05.11.2014) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)  
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 栗原 宏征(KURIHARA Hiroyuki); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 笠原 拓也(KASAHARA Takuya); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 千晶(YAMADA Chiaki); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 村上 奈津子(MURAKAMI Natsuko); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成(YAMADA Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 石川 一彦(ISHIKAWA Kazuhiko); 〒7390046 広島県東広島市鏡山3丁目11番32号 国立研究開発法人産業技術総合研究所 中国センター内 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

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



WO 2016/072448 A1

(54) Title: ENDOXYLANASE MUTANT, ENZYME COMPOSITION FOR BIOMASS DECOMPOSITION, AND METHOD FOR PRODUCING SUGAR SOLUTION

(54) 発明の名称: エンドキシラナーゼ変異体、バイオマス分解用酵素組成物及び糖液の製造方法

(57) Abstract: Provided is an endoxylanase mutant having improved thermal stability. An endoxylanase mutant having endoxylanase activity and including an amino acid sequence in which one or more amino acid residues selected from positions corresponding to positions 35, 44, 62, 63, 101, and 102 of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 have been substituted in an amino acid sequence of endoxylanase derived from filamentous fungi.

(57) 要約: 熱安定性の向上したエンドキシラナーゼ変異体を提供する。糸状菌由来のエンドキシラナーゼのアミノ酸配列において、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される一以上のアミノ酸残基が置換されているアミノ酸配列を含み、かつ、エンドキシラナーゼ活性を有する、エンドキシラナーゼ変異体。

## 明 細 書

発明の名称：

エンドキシラナーゼ変異体、バイオマス分解用酵素組成物及び糖液の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、新規なエンドキシラナーゼ変異体およびこれを含むバイオマス分解用酵素組成物、および糖液の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] セルロースの糖化には様々な手法があるが、エネルギー使用量が少なく、かつ糖収率の高い酵素糖化法が開発の主流となっている。セルロースは、草本系植物、木本系植物中に多く含まれ、これら植物を総称してセルロース含有バイオマスと呼ぶ。セルロース含有バイオマスは、セルロースに加え、キシラン、アラビナンといったヘミセルロース、およびリグニンを含んでいる。キシランは、 $\beta$ -1, 4結合したD-キシロースを主鎖として有しており、この主鎖に対して、O-アセチル、 $\beta$ -アラビノフラノシル、グルクロン酸、フェノール酸が部分的に修飾される場合もある（非特許文献1）。キシラナーゼは、 $\beta$ -1, 4結合したキシロース主鎖に作用することで、セルロース含有バイオマスを分解する重要な酵素の1種である。

[0003] キシラナーゼは、アミノ酸配列の相同性にて、ファミリー10（GH10）とファミリー11（GH11）に分類される（非特許文献2）。GH10のキシラナーゼは、一般的に分子量が30kDa以上である、一方、GH11のキシラナーゼは一般的に分子量が20kDa程度と比較的小さいと言われている（非特許文献3）。

[0004] 糸状菌は、広い種類のセルロース系バイオマスを分解する微生物として知られている。アクレモニウム・セルロリチカス（*Acremonium cellulolyticus*）が培養液中に産生するセルラーゼは、セルロース含有バイオマスの分解において、トリコデルマ・リーセイの産生するセ

ルラーゼよりも高いグルコース収量が得られることが知られている（非特許文献4）。近年、アクレモニウム・セルロリチカスより7つのキシラナーゼがクローニングされており、その野生型酵素の機能解析が実施されている（非特許文献5）。Watanabeらの報告においては、7つのキシラナーゼのうち、XylCが、アクレモニウム・セルロリチカスでの発現量が最も少ないものの、最も高いキシラン分解活性を保有することが報告されている。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Coughlan, M. P. ら, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 259–289 (1993)
- 非特許文献2: Coutinho, P. M. ら, *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, 246, 3–12 (1999)
- 非特許文献3: Beaugrandら, *Carbohydr. Res.* 339, 2529–2540 (2004)
- 非特許文献4: Fujiiら, *Biotechnol. Biofuels.* 2, 24 (2009)
- 非特許文献5: Watanabeら, *AMB Express.* 4, 27.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の課題は、熱安定性が向上した新規なエンドキシラナーゼ変異体を提供することにある。また、これを含む酵素剤および、効率的な糖液の製造方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究した結果、糸状菌由来のエンドキシラナーゼのアミノ酸配列において、配列番号1のアミノ酸配列の

位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102から選択される1または2以上の位置に相当する位置のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換することによって、当該エンドキシラナーゼの熱安定性を向上できることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は以下の構成からなる。

[1] 糸状菌由来のエンドキシラナーゼのアミノ酸配列において、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される一以上のアミノ酸残基が置換されているアミノ酸配列を含み、かつ、エンドキシラナーゼ活性を有する、エンドキシラナーゼ変異体。

[2] 配列番号1のアミノ酸配列の位置35、及び／又は位置62に相当する位置のアミノ酸残基が、システインに置換されている[1]のエンドキシラナーゼ変異体。

[3] 配列番号1のアミノ酸配列の位置44、及び／又は位置63に相当する位置のアミノ酸残基が、ヒスチジン、グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンから、それぞれ独立して選択されるいずれかのアミノ酸に置換されている、[1]又は[2]のエンドキシラナーゼ変異体。

[4] 配列番号1のアミノ酸配列の位置101、及び／又は位置102に相当する位置のアミノ酸残基が、プロリン、及びアスパラギンから、それぞれ独立して選択されるいずれかのアミノ酸に置換されている、[1]～[3]のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体。

[5] さらに、配列番号1のアミノ酸配列の位置61、位置65、及び位置66に相当する位置から選択される一以上のアミノ酸残基が置換されている、[1]～[4]のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体。

[6] 配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置61、位置62、位置63、位置65、位置66、位置101、及び位置102に相当する位置のアミノ酸残基が全て置換されている、[1]～[5]のいずれか

のエンドキシラナーゼ変異体。

[7] 糸状菌由来のエンドキシラナーゼが、アクレモニウム・セルロリチカス (*Acromonium cellulolyticus*) に由来する、[1] ~ [6] のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体。

[8] 以下の (a) から (c) のいずれかのアミノ酸配列からなり、かつエンドキシラナーゼ活性を有する、[1] ~ [7] のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体：

(a) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列において、位置 35、位置 44、位置 61、位置 62、位置 63、位置 65、位置 66、位置 101、及び位置 102 における置換されたアミノ酸は変異せず、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列；あるいは

(c) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列において、位置 35、位置 44、位置 61、位置 62、位置 63、位置 65、位置 66、位置 101、及び位置 102 における置換されたアミノ酸は変異せず、該アミノ酸を除いて、配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

[9] [1] ~ [8] のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体をコードする DNA。

[10] [9] の DNA を含む、発現ベクター。

[11] [10] の発現ベクターを用いた形質転換により作製された、形質転換細胞。

[12] [11] の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞により生産されたエンドキシラナーゼ変異体を得る工程を含む、エンドキシラナーゼ変異体の製造方法。

[13] [1] ~ [8] のいずれかのエンドキシラナーゼ変異体を含むバイオマス分解用酵素組成物。

[14] 前記酵素組成物が、セロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、マンナーゼ、マンノシダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、エステラーゼ、リパーゼからなる群から選択される1または2種以上の酵素をさらに含む、[13]のバイオマス分解用酵素組成物。

[15] [13] 又は [14] のバイオマス分解用酵素組成物を、バイオマスに添加することを含む、該バイオマスより糖液を製造する方法。

[0008] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2014-225543号の開示内容を包含する。

### 発明の効果

[0009] 本発明では、熱安定性が向上したエンドキシラナーゼ変異体を提供することができる。特に本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、高温条件、具体的には65℃以上における熱安定性が向上しており、かつキシラン分解活性も向上しているという効果を有する。したがって、本発明のエンドキシラナーゼ変異体および本発明のエンドキシラナーゼ変異体を含む酵素組成物は、セルロース含有バイオマスからの糖液製造に好適に使用することができる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、野生型エンドキシラナーゼ又はいずれかのエンドキシラナーゼ変異体を発現する酵母ピキア・パストリスの培養上清をSDS-PAGEした結果を示す写真図である。図中、Mはマーカー、ならびに1は野生型エンドキシラナーゼ、2は位置35及び位置62に置換を含むエンドキシラナーゼ変異体、3は位置35、位置44、位置62、位置61、位置65、位置63、位置66に置換を含むエンドキシラナーゼ変異体、4は位置35、位置44、位置62、位置101、位置102、位置61、位置65、位置63、位置66に置換を含むエンドキシラナーゼ変異体を含む培養上清を示す。

## 発明を実施するための形態

[0011] 以下に、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

### (1) エンドキシラナーゼ変異体

本発明において「エンドキシラナーゼ」とは、 $\beta$ -1, 4結合したキシロース主鎖に作用することでヘミセルロースを加水分解する活性（エンドキシラナーゼ活性）を有する酵素であり、EC番号3. 3. 1. 8に分類される酵素である。エンドキシラナーゼは、ファミリー10（GH10）とファミリー11（GH11）の2種に分類されるが、本発明のエンドキシラナーゼは、ファミリー11（GH11）に分類される酵素であり、 $\beta$ -ジェリーロール構造を保有する。「エンドキシラナーゼ活性」の測定は、 $\beta$ -1, 4結合したD-キシロースを基質として、好ましくは、試薬として販売されているバーチウッドキシラン（Birchwood xylan）を基質として使用して行うことができる。基質であるキシランが分解されたか否かは、反応後の反応液に含まれる還元糖量を測定することで確認することができる。還元糖量は、ジニトロサリチル酸法（DNS法）を使用することで測定することができ、Baileyら“Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity” J. Biotechnol. 23, 257-270に記載の方法が好ましく使用できる。活性を測定する条件は、前述した方法で、エンドキシラナーゼの活性を測定できれば特に限定はされない。活性測定のための、好ましい温度条件としては20℃～90℃の範囲、好ましくは、40℃～75℃の範囲、pHは4～9の範囲が好ましく、さらに好ましくはpH5～7、反応時間は、1秒から600分であることが好ましく、最も好ましくは1分から60分である。また活性測定時に基質として使用するキシランは、0.1重量%～10重量%の範囲が好ましく、最も好ましくは0.5重量%～2重量%の範囲である。

[0012] 本発明においてエンドキシラナーゼは、糸状菌由来であるものを利用することができ、トリコデルマ属（Trichoderma）、アスペルギルス

属 (*Aspergillus*)、セルロモナス属 (*Cellulomonas*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、フミコラ属 (*Humicola*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、イルペックス属 (*Irpex*)、ムコール属 (*Mucor*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces*) など、好ましくはアクレモニウム属由来のものを利用することができる。本発明のエンドキシラナーゼとして特に好ましくは、アクレモニウム・セルロリチカス (*Acremonium cellulolyticus*) から単離されたエンドキシラナーゼを利用することができる。アクレモニウム・セルロリチカスのエンドキシラナーゼは公知であり、例えば GenBank などに AB874990、AB874991、AB874992、AB874993、AB874994、AB874995、AB874995、AB874996、として登録されており、本発明においてはこれらの遺伝子情報等を利用することができる。

[0013] 本発明において好ましくは、エンドキシラナーゼは配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる。

[0014] また、本発明においてエンドキシラナーゼには、エンドキシラナーゼ活性を保持する限り、上記エンドキシラナーゼの一部が含まれる。ここで「エンドキシラナーゼの一部」とは、元のエンドキシラナーゼ活性の少なくとも 40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上を保持する限り、任意の一部の領域が除去されたエンドキシラナーゼの断片からなり、例えばこのような断片としては、エンドキシラナーゼよりシグナルペプチドの領域が除去されたものが挙げられる。シグナルペプチドとしては、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のうち、位置 1 から位置 34 までのアミノ酸配列で表わされる領域が挙げられる。本発明において好ましくは、エンドキシラナーゼの一部は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる。

[0015] 本発明の「エンドキシラナーゼ変異体」は、上記の「エンドキシラナーゼ

」のアミノ酸配列において、配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される1または2以上の位置におけるアミノ酸残基が別のアミノ酸に置換されており、かつエンドキシラナーゼ活性を有するタンパク質を意味する。より好ましくは、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのアミノ酸置換を含む。特に好ましくは、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する6つの位置全てにおいてアミノ酸置換を含む。

[0016] 本発明の「エンドキシラナーゼ変異体」は、上記位置にアミノ酸置換を含むことにより、当該アミノ酸置換を含まないエンドキシラナーゼと比べて、高い耐熱性を有する。

[0017] 上記エンドキシラナーゼのアミノ酸配列における、「配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置」にて特定されるアミノ酸位置は、以下の手順1)～3)を含む手法にて決定することができる。

[0018] 手順1) 配列番号1のアミノ酸配列において、開始メチオニンを位置1と定義する。以降のアミノ酸配列については、位置2、3、4...と順次番号付けをし、各位置を定義する。

[0019] 手順2) 次に、上記エンドキシラナーゼのアミノ酸配列において配列番号1で表されるアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び、位置102に相当するアミノ酸位置を決定する。当該相当するアミノ酸位置は、上記エンドキシラナーゼのアミノ酸配列を配列番号1のアミノ酸配列と整列させることによって明らかにすることができる。このような操作はアミノ酸配列のアライメントと呼ばれる。アライメントツールとしては、ClustalWなどの多数の良く知られたソフトウェアを用い

、デフォルトのパラメータを用いておこなう。当業者は異なる長さのアミノ酸配列の間で、アライメントにより、上記エンドキシラナーゼのアミノ酸配列における、配列番号1で表されるアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び、位置102に相当するアミノ酸位置を明らかにすることができる。

[0020] 手順3) 上記アライメント解析で、配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び、位置102に相当する箇所を、上記「エンドキシラナーゼ」のアミノ酸配列における、「配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置」とする。

[0021] なお、上記エンドキシラナーゼにおいて、上記「配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置」以外の位置にアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入などの変異を伴うとき、又は上記エンドキシラナーゼの一部である場合には、「配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置」がそれぞれ、N末端からカウントした35番目、44番目、62番目、63番目、101番目、及び102番目ではない場合がある。このような場合においても、上記方法により決定された位置を、「配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置」とする。

[0022] 各位置におけるアミノ酸置換は、別のアミノ酸への置換であればよく、特に限定されないが、それぞれ以下のアミノ酸への置換を含むことが好ましい：

位置35：システイン；

位置44：ヒスチジン、グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、又はイソロイシン、好ましくはヒスチジン；

位置62：システイン；

位置63：ヒスチジン、グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン

、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、又はイソロイシン、好ましくはロイシン；

位置101：プロリン、又はアスパラギン、好ましくはプロリン；

位置102：プロリン、又はアスパラギン、好ましくはアスパラギン。

[0023] 位置35及び位置62に相当する位置のアミノ酸が共にシステインへ置換されることによって、当該位置のシステイン側鎖でのジスルフィド結合を形成することができ、好ましい。

[0024] 位置101及び位置102に相当する位置のアミノ酸については、真核生物を宿主としてエンドキシラナーゼ変異体を発現する場合、置換されることなく野生型のアミノ酸のままであってもよい。位置101及び位置102に相当する位置は、真核生物において糖鎖修飾を受けるアミノ酸配列に含まれる場合がある。

[0025] 本発明の「エンドキシラナーゼ変異体」は、配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される位置におけるアミノ酸置換に加えて、配列番号1のアミノ酸配列の位置61、位置65、及び位置66に相当する位置から選択される1または2以上の位置におけるアミノ酸置換を含んでもよい。これらの位置にアミノ酸置換をさらに含むことにより、耐熱性をさらに高めることができる。好ましくは、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列の位置61、位置65、及び、位置66に相当する位置から選択される2つ、又は3つのアミノ酸置換をさらに含む。より好ましくは、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列の位置61、位置65、及び位置66に相当する3つの位置のアミノ酸置換をさらに含む。

[0026] 各位置におけるアミノ酸置換は、別のアミノ酸への置換であればよく、特に限定されないが、それぞれ以下のアミノ酸への置換を含む：

位置61：グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、又はイソロイシン、好ましくはメチ

オニン；

位置 65：プロリン；

位置 66：グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、又はイソロイシン、好ましくはグリシン。

[0027] 一態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号 1 のアミノ酸配列において、位置 35、位置 44、位置 62、位置 63、位置 101、及び、位置 102 から選択される 1 又は 2 以上の位置におけるアミノ酸が置換されたアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを含むか、当該ポリペプチドからなる。「その一部」としては、上記シグナルペプチドの領域が除去されたポリペプチドが挙げられる。このようなエンドキシラナーゼ変異体として、より詳細には、以下のものが含まれる：

位置 35 にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号 3 のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない）；

位置 62 にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号 5 のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない）；

位置 35 および位置 62 の両方の位置にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号 9 のアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号 9 のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない）；

位置 44 にヒスチジンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号 4 のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない）；

位置 63 にロイシンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号 6 のアミノ酸配列を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号 6

のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない) ;

位置101にプロリンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号7のアミノ酸を含むか、当該アミノ酸配列からなる(配列番号7のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない) ;

位置102にアスパラギンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体であり、配列番号8のアミノ酸を含むか、当該アミノ酸配列からなる(配列番号8のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない) ;

特に好ましいエンドキシラナーゼ変異体は、前述した位置35、位置44、位置62、位置63、位置101及び位置102の6つの置換の全てを含むエンドキシラナーゼ変異体又はその一部である。

[0028] 別の態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において、位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102から選択される位置の置換に加えて、位置61、位置65、及び位置66から選択される1または2以上の位置におけるアミノ酸が置換されたアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを含むか、当該ポリペプチドからなる。

[0029] また、別の態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において、位置35、位置44、位置62、位置63、位置61、位置65、及び位置66の7つの位置におけるアミノ酸が置換されたアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを含むか、当該ポリペプチドからなる。このようなエンドキシラナーゼ変異体として、より詳細には、配列番号45のアミノ酸を含むか、当該アミノ酸配列からなる(配列番号45のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない)。

[0030] さらに別の態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、配列番号1のアミノ酸配列において、位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102、位置61、位置65、及び、位置66の9つの位置におけるアミノ酸が置換されたアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエ

ンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを含むか、当該ポリペプチドからなる。このようなエンドキシラナーゼ変異体として、より詳細には、配列番号10のアミノ酸を含むか、当該アミノ酸配列からなる（配列番号10のアミノ酸配列には、上記シグナルペプチドの領域が含まれていない）。

[0031] 本発明のエンドキシラナーゼ変異体には、上記エンドキシラナーゼ変異体又はその一部のアミノ酸配列において、上記のアミノ酸位置35、位置44、位置61、位置62、位置63、位置65、位置66、位置101、及び、位置102における置換されたアミノ酸は変異せず、1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換、付加又は挿入を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するタンパク質も含まれる。ここで「1もしくは数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、10個以内、さらに好ましくは5個以内、特に好ましくは4個以内、あるいは1個又は2個である。

[0032] 本発明のエンドキシラナーゼ変異体にはまた、上記エンドキシラナーゼ変異体又はその一部のアミノ酸配列において、上記のアミノ酸位置35、位置44、位置61、位置62、位置63、位置65、位置66、位置101、及び、位置102における置換されたアミノ酸は変異せず、当該アミノ酸を除いて、上記エンドキシラナーゼ変異体又はその一部のアミノ酸配列とBLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information) (米国国立生物学情報センターの基本ローカルアラインメント検索ツール) 等 (例えば、デフォルトすなわち初期設定のパラメータ) を用いて計算したときに、90%、95%、99%、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、好ましくは当該アミノ酸列からなり、かつエンドキシラナーゼ活性を有するタンパク質も含まれる。ここで、「同一性」とは、2つのアミノ酸配列にギャップを導入して、またはギャップを導入しないで整列させた場合の、最適なアライメントにおいて、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合 (パーセンテージ) を意味する。同一性は、当業者

に周知の方法、配列解析ソフトウェア等（例えばBLAST、FASTAなどの公知のアルゴリズム）を使用して求めることができる。

[0033] 本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、N末端及び／又はC末端にさらなるペプチド又はタンパク質が付加されていてもよい。このようなペプチド又はタンパク質としては、例えば、翻訳開始点となるメチオニン、分泌シグナル配列、輸送タンパク質、結合タンパク質、精製用のタグペプチド、異種加水分解酵素、蛍光タンパク質等を含むものが例示できる。こうしたペプチド又はタンパク質に関しては、当業者が目的に応じて、付加する機能を有するペプチド又はタンパク質を選択して、本発明のエンドキシラナーゼ変異体に付加することができる。

#### (2) エンドキシラナーゼ変異体の製造方法

本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、例えば前記(1)で述べたエンドキシラナーゼ変異体のアミノ酸配列をコードするDNAを調製し、これを発現ベクターに連結し、発現ベクターを宿主に導入し、異種あるいは同種タンパク質として生産し、単離および精製することで製造することができる。アミノ酸配列をコードするコドン使用頻度は、エンドキシラナーゼが由来とする糸状菌、例えば*Acromonium cellulolyticus*（アクレモニウム・セルロリチカス）と同じものでもあってもよいし、宿主のコドン使用頻度に合わせて変更してもよい。

[0034] 上述のエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの調製方法としては、従来公知の手法を用いることが可能であり、例えば、遺伝子合成により目的のアミノ酸配列をコードするDNAを全合成する方法、あるいは、糸状菌より単離されたエンドキシラナーゼ又はその一部をコードするDNAに対して、部位特異的変異導入法により、上記所定の位置のアミノ酸をコードするDNAが別の所定のアミノ酸をコードするように変異を導入する方法等が挙げられる。DNAの目的部位に変異を起こす部位特異的変異導入法としては、従来の慣用的に用いられているPCR法によりおこなうことができる。

[0035] 本発明のエンドキシラナーゼをコードするDNAとして特に好ましくは、

アクレモニウム・セルロリチカス (*Acremonium cellulolyticus*) から単離されたエンドキシラナーゼをコードするDNAを利用することができる。例えば、本発明において、エンドキシラナーゼをコードするDNAは、配列番号32で示される塩基配列を含むDNAか、当該塩基配列からなるDNA、あるいは、配列番号32で示される塩基配列より、シグナルペプチドをコードする領域が除去された配列番号33で示される塩基配列を含むDNAか、当該塩基配列からなるDNAを利用することができる。これらのDNAは、*Acremonium cellulolyticus* (アクレモニウム・セルロリチカス) より公知の方法に準じてDNAを単離し、PCR等の手法によってDNA増幅させることで取得することができる。

[0036] 一態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102から選択される1または2以上の位置におけるアミノ酸が置換されたアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含むか、当該DNAからなる。このようなエンドキシラナーゼ変異体コードするDNAとして、より詳細には、以下のものが含まれる：

位置35にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号34の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置62にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号36の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置35および位置62の両方の位置にシステインへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号40の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置44にヒスチジンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号35の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置63にロイシンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号37の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置101にプロリンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号38の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）；

位置102にアスパラギンへの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAであり、配列番号39の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）。

[0037] また別の態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは、配列番号1のアミノ酸配列において前述した位置35、位置44、位置62及び位置63の4つの置換に加えて、位置61にメチオニンへの置換、位置65にアスパラギン酸への置換、及び位置66にアスパラギンへの置換の3つの置換を含むアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含むか、当該DNAからなる。このようなエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAとして、配列番号49の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）。

[0038] また別の態様において、本発明のエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは、配列番号1のアミノ酸配列において前述した位置35、位置44、位置62、位置63、位置101及び位置102の6つの置換に加えて、位置61にメチオニンへの置換、位置65にアスパラギン酸への置換、及び位置66にアスパラギンへの置換の3つの置換を含むアミノ酸配列又はその一部を有し、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードす

るDNAを含むか、当該DNAからなる。このようなエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAとして、配列番号41の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなる（当該DNAは、上記シグナルペプチドの領域をコードしていない）。

[0039] 本発明のエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAには、上記のアミノ酸位置35、位置44、位置61、位置62、位置63、位置65、位置66、位置101、及び、位置102における置換されたアミノ酸の変異を生じるものではなく、かつエンドキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする限り、以下の塩基配列を含むか、当該塩基配列からなるDNAも含む：

上記塩基配列において、1～複数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列。例えば、配列番号1に表される塩基配列において、1～100個の塩基、好ましくは1～50個の塩基、より好ましくは1～10個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；

上記塩基配列と80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは99%以上の配列同一性を有する塩基配列。塩基配列の比較は公知の手法によって行うことができ、例えば、BLAST等を例えば、デフォルトの設定で用いて実施できる；

上記塩基配列と相補的な配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列。「ストリンジентな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、例えば、2～6×SSC（1×SSCの組成：0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム, pH7.0）及び0.1～0.5% SDSを含有する溶液中42～55℃にてハイブリダイズを行い、0.1～0.2×SSC及び0.1～0.5% SDSを含有する溶液中55～65℃にて洗浄を行う条件をいう。

[0040] 上記のようにして調製したエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを、制限酵素およびDNAリガーゼを用いて、適切な発現ベクター中のプロ

モーター下流に連結することにより、該DNAを含む発現ベクターを製造することができる。

[0041] 発現ベクターとしては、細菌プラスミド、酵母プラスミド、ファージDNA（ラムダファージなど）、レトロウイルス、バキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40の誘導体など、植物細胞用のベクターとしてのアグロバクテリウムなどが挙げられるが、宿主細胞において複製および生存可能ある限り他のいかなるベクターも用いることができる。例えば、宿主が大腸菌である場合、pUC、pET、pBADなどを例示することができる。また、宿主が酵母である場合、pPink-HC、pPink-LC、pPink $\alpha$ -HC、pPCIZ、pPCIZ $\alpha$ 、pPC16、pPC16 $\alpha$ 、pFLD1、pFLD1 $\alpha$ 、pGAPZ、pGAPZ $\alpha$ 、pPIC9K、pPIC9、pD912、pD915などが挙げられる。

[0042] プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合、lacプロモーター、Trpプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等が、酵母である場合、AOX1プロモーター、TEF1プロモーター、ADE2プロモーター、CYC1プロモーター、GAL-L1プロモーター、GAPプロモーターなどが挙げられる。

[0043] 本発明において用いる宿主細胞としては、大腸菌、バクテリア細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞などが好ましい。酵母細胞としては、例えば、ピキア属（*Pichia*）、サッカロマイセス属（*Saccharomyces*）、シゾサッカロマイセス属（*Schizosaccharomyces*）などが挙げられる。真菌細胞としては、アスペルギルス属（*Aspergillus*）、トリコデルマ属（*Trichoderma*）などが挙げられる。昆虫細胞としてはSf9など、植物細胞としては双子葉植物など、動物細胞としては、CHO、HeLa、HEK293などが挙げられる。本発明において用いる宿主としては、好ましくは真核微生物

であり、さらに好ましくは、酵母細胞、真菌細胞である。酵母細胞、真菌細胞を宿主として用いる場合、酵素生産量が多い、酵素を細胞外に分泌生産できる、及び／又は、酵素の耐熱性を高めることができる、といった利点を有し得る。

[0044] 形質転換または、トランスフェクションは、リン酸カルシウム法、電気穿孔法などの公知の方法で行うことができる。本発明のエンドキシラナーゼ変異体は、上記のように形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞においてプロモーターの制御下にて発現させ、産生物を回収して得ることができる。発現に際しては、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を適切な細胞密度まで増殖または成長させた後、温度シフトまたはイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド (IPTG) 添加などの化学的誘発手段によってプロモーターを誘発させ、細胞をさらに一定期間培養する。あるいは、培地中に含まれる糖によってプロモーターを誘発させ、細胞の培養と発現を同時に行うことができる。

[0045] 目的とするエンドキシラナーゼ変異体が細胞外に排出される場合には、培地から直接に、また細胞外に存在する場合には、超音波破碎や機械的破碎などの物理的手段もしくは細胞溶解剤などの化学的手段によって、細胞を破壊した後にエンドキシラナーゼ変異体を精製する。具体的には、エンドキシラナーゼ変異体は、組換え細胞の培地から、硫酸アンモニウムもしくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体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、ゲルろ過クロマトグラフィー、電気泳動などの技術を組み合わせて、部分的にまたは完全に精製することができる。

### (3) エンドキシラナーゼ変異体を含むバイオマス分解用酵素組成物

本発明のバイオマス酵素組成物は、少なくとも本発明のエンドキシラナーゼ変異体を、バイオマスを加水分解するための有効成分として含み、バイオマスを分解する用途に使用される酵素組成物である。ここで、バイオマスとは、生物系の植物体のことを指し、草本系植物、木質系植物、藻類、海草類

、製糖作物、資源作物、穀物、などが例示される。これらのバイオマスは、いずれも、2糖以上の多糖類を含んでおり、本発明のバイオマス分解用酵素組成物による多糖類の加水分解を行うことができる。特に好ましく使用できるのは、セルロース含有バイオマスである。セルロース含有バイオマスは、セルロース成分を含む生物資源である。具体的には、バガス、スイッチグラス、ネピアグラス、エリアンサス、コーンストーバー、稲藁、麦藁などの草本系バイオマス、あるいは樹木、廃建材などの木質系バイオマス、さらに藻類、海草、など水生環境由来のバイオマスのことを指す。こうしたセルロース系バイオマスには、セルロースおよびヘミセルロース（以下、セルロースとヘミセルロースの総称として「セルロース」という。）の他に芳香族高分子であるリグニン等を含有している。

[0046] 本発明のバイオマス分解用酵素組成物に含まれるエンドキシラナーゼ変異体は、精製されたものであっても、粗精製されたものであっても使用することができる。また、本発明のバイオマス分解用酵素組成物に含まれるエンドキシラナーゼ変異体は、固相に固定化されていても良い。固相としては例えば、ポリアクリルアミドゲル、ポリスチレン樹脂、多孔性ガラス、金属酸化物などが挙げられる（特にこれらに限定されない）。本発明のエンドキシラナーゼ変異体が固相に固定されることによって、連続反復使用が可能となる点において有利である。さらに、上記エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを用いて形質転換した細胞の処理物も、粗精製されたエンドキシラナーゼ変異体として利用することができる。当該「形質転換した細胞の処理物」には、固相に固定化した形質転換細胞、ならびに形質転換細胞の死菌、破砕物、およびそれらを固相に固定化したものなどが含まれる。

[0047] 本発明のバイオマス分解用酵素組成物は、本発明のエンドキシラナーゼ変異体のほかに、他の酵素を含んでいてもよい。好ましくは、バイオマス分解に関連する加水分解酵素を含むことが好ましい。このような他の酵素としては、例えばセロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、マンナーゼ、マンノシダーゼ、グルコアミラ

ーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、エステラーゼ、リパーゼ、などが挙げられる。

[0048] これらの他の酵素は、糸状菌等の微生物が産生する酵素であることが好ましい。糸状菌としては、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、セルロモナス属 (*Cellulomonas*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、フミコラ属 (*Humicola*)、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、イルペックス属 (*Irpex*)、ムコール属 (*Mucor*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces*)、などの微生物を挙げることができる。これら微生物は、培養液中に酵素を産生することから、その培養液を未精製の酵素としてそのまま本発明のエンドキシラナーゼ変異体とあわせて本発明の酵素組成物としてもよいし、また培養液を精製し、製剤化したものを本発明のエンドキシラナーゼ変異体とあわせて本発明の酵素組成物としてもよい。

[0049] 前記他の酵素を産生するための糸状菌としては、トリコデルマ属由来の糸状菌であることが好ましい。トリコデルマ属のうち、より好ましく用いることができるものは、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) 由来のセルラーゼ混合物である。トリコデルマ・リーセイ由来のセルラーゼ混合物としては、トリコデルマ・リーセイ QM9414 (*Trichoderma reesei* QM9414)、トリコデルマ・リーセイ QM9123 (*Trichoderma reesei* QM9123)、トリコデルマ・リーセイ RutC-30 (*Trichoderma reesei* Rut-30)、トリコデルマ・リーセイ PC3-7 (*Trichoderma reesei* PC3-7)、トリコデルマ・リーセイ CL-847 (*Trichoderma reesei* CL-847)、トリコデルマ・リーセイ MCG77 (*Trichoderma reesei* MCG77)、トリコデルマ・リーセイ MCG80 (*Trichoderma reesei* MCG80)、トリコデルマ・ピリデ QM9123 (*Trichoderma viride* QM9123) に由来するセルラーゼ混合物が挙げら

れる。また、前記トリコデルマ属に由来し、変異剤あるいは紫外線照射などで変異処理を施し、セルラーゼ生産性が向上した変異株であってもよい。

[0050] また、本発明のバイオマス分解用酵素組成物は、プロテアーゼ阻害剤、分散剤、溶解促進剤、安定化剤、緩衝剤、防腐剤、など、酵素以外の物質を添加したものであってもよい。

[0051] 本発明のバイオマス分解用酵素組成物は、バイオマスに添加することで、糖液の製造方法に使用することができる。ここで言う糖液とは、少なくともバイオマスに由来する多糖がより低分子量の糖に加水分解された糖類を含む溶液のことを指す。糖液中の糖成分としては、キシロース、グルコース、セロビオース、キシロビオース、キシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオース、マンノース、アラビノース、シュクロース、フルクトースなどが例示できる。本発明のバイオマス分解用酵素組成物は、少なくともエンドキシラナーゼ変異体を含むことから、本酵素組成物を使用して得た糖液には、キシロース、キシロビオース、キシロトリオース、キシロテトラオース、キシロペンタオースを含むことが多い。糖液の製造で使用するバイオマスは、前述したバイオマスであればいずれであってもよく、好ましくは、バイオマスからの糖収量を上げる目的で前処理したものが使用できる。前処理とは、予めバイオマスを、酸、アルカリ、加圧熱水などを用いて、リグニンやヘミセルロースを部分的に分解しておくことを指す。本発明の糖液の製造方法では、バイオマスにバイオマス分解用酵素組成物を添加し、温度40℃～100℃、処理pH3～7、バイオマス濃度0.1～30%の条件において、1分から240時間反応させることが好ましい。該範囲に設定することにより、本発明のバイオマス分解用酵素組成物の分解効率を最大限発揮することができる。

[0052] 本発明の糖液の製造方法に使用したバイオマス分解用酵素組成物は、回収し、さらに再利用することができる。回収されたバイオマス分解用酵素組成物中に含まれるエンドキシラナーゼ変異体は、糖液の製造方法に付される前の50%以上、60%以上、70%以上、又は80%以上、好ましくは90

%以上の活性を保持し得る。バイオマス分解用酵素組成物の回収は以下の手法によって行うことができる。バイオマスにバイオマス分解用酵素組成物を添加し加水分解反応を行った後、加水分解物を固液分離する。固液分離により得られる溶液成分には、前記バイオマス分解用酵素組成物および糖成分が含まれ、バイオマス分解用酵素組成物と糖成分とは、限外濾過膜を用いた濾過によって分離する。限外濾過膜を用いたバイオマス分解用酵素組成物と糖成分の分離においては、その分画分子量は、単糖、オリゴ糖（2糖～10糖）を透過でき、バイオマス分解用酵素組成物を阻止できるものであれば限定されない。具体的には分画分子量2,000～50,000の範囲であればよく、酵素反応に阻害的作用を示す夾雑物質を酵素と分離するという観点から、より好ましくは分画分子量5,000～50,000の範囲であり、さらに好ましくは分画分子量10,000～30,000の範囲である。限外濾過膜の素材としては、ポリエーテルスルホン（PES）、ポリスルホン（PS）、ポリアクリロニトリル（PAN）、ポリフッ化ビニルデン（PVDF）、再生セルロース、セルロース、セルロースエステル、スルホン化ポリスルホン、スルホン化ポリエーテルスルホン、ポリオレフィン、ポリビニルアルコール、ポリメチルメタクリレート、ポリ4フッ化エチレンなどを使用することができるが、PES、PVDFなどの合成高分子を素材とした限外濾過膜を使用することが好ましい。本発明のバイオマス分解用酵素組成物の回収および／または再利用において、バイオマス分解用酵素組成物に含まれるエンドキシラナーゼ変異体としては、配列番号1のアミノ酸配列において位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102、位置61、位置65、及び、位置66の9つの位置におけるアミノ酸が置換された配列番号10のアミノ酸配列を有するエンドキシラナーゼ変異体を含むことがより好ましい。

[0053] 本発明の糖液の製造方法で得られた糖液は、グルコース、キシロースなどの単糖成分を含むため、エタノール、乳酸などの原料糖として使用することが可能である。また、本発明の糖液の製造方法で得られた糖液は、キシロオ

リゴ糖、キシロピオース、キシロトリオースなどを含むため、オリゴ糖として、プレバイオティクス用途に用いることが可能であり、ヒト健康食品、家畜飼料として使用することができる。

## 実施例

[0054] 以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれらに限定されるものではない。

### (参考例1) タンパク質濃度の測定

本発明で使用したエンドキシラーゼおよびエンドキシラーゼ変異体のタンパク質濃度は、BCA法にて測定した。エンドキシラーゼ又はエンドキシラーゼ変異体を含む溶液25 $\mu$ Lを200 $\mu$ LのBCA試薬と混合し、37 $^{\circ}$ Cで30分反応させることで発色させた。タンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準品として、570nmの吸光度を測定、比色定量することで決定した。

### (参考例2) トリコデルマ由来セルラーゼの調製

トリコデルマ由来セルラーゼは以下の方法で調製した。

#### [前培養]

コーンスティップリカー5% (w/vol)、グルコース2% (w/vol)、酒石酸アンモニウム0.37% (w/vol)、硫酸アンモニウム0.14% (w/vol)、リン酸二水素カリウム0.2% (w/vol)、塩化カルシウム二水和物0.03% (w/vol)、硫酸マグネシウム七水和物0.03% (w/vol)、塩化亜鉛0.02% (w/vol)、塩化鉄(III)六水和物0.01% (w/vol)、硫酸銅(II)五水和物0.004% (w/vol)、塩化マンガン四水和物0.0008% (w/vol)、ホウ酸0.0006% (w/vol)、セモリブデン酸六アンモニウム四水和物0.0026% (w/vol)となるよう蒸留水に添加し、100mLを500mLバツフル付き三角フラスコに張り込み、121 $^{\circ}$ Cで15分間オートクレーブ滅菌した。放冷後、これとは別にそれぞれ121 $^{\circ}$ Cで15分間オートクレーブ滅菌したPE-MとTween 80をそれぞれ0.0

1% (w/vol) 添加した。この前培養培地にトリコデルマ・リーセイ ATCC 66589 (ATCCより分譲) を  $1 \times 10^5$  個/mL になるように植菌し、28℃、72時間、180 rpm で振とう培養し、前培養とした (振とう装置: TAITEC社製 BIO-SHAKER BR-40LF)。

[本培養]

コーンスティップリカー5% (w/vol)、グルコース2% (w/vol)、セルロース (アビセル) 10% (w/vol)、酒石酸アンモニウム 0.37% (w/vol)、硫酸アンモニウム 0.14% (w/vol)、リン酸二水素カリウム 0.2% (w/vol)、塩化カルシウム二水和物 0.03% (w/vol)、硫酸マグネシウム七水和物 0.03% (w/vol)、塩化亜鉛 0.02% (w/vol)、塩化鉄(III)六水和物 0.01% (w/vol)、硫酸銅(II)五水和物 0.004% (w/vol)、塩化マンガン四水和物 0.0008% (w/vol)、ホウ酸 0.0006% (w/vol)、セモリブデン酸六アンモニウム四水和物 0.0026% (w/vol) となるよう蒸留水に添加し、2.5Lを5L容攪拌ジャー (ABLE社製 DPC-2A) 容器に張り込み、121℃で15分間オートクレーブ滅菌した。放冷後、これとは別にそれぞれ121℃で15分間オートクレーブ滅菌したPE-MとTween 80をそれぞれ0.1%添加し、あらかじめ前記の方法にて液体培地で前培養したトリコデルマ・リーセイ PC3-7を250mL接種した。その後、28℃、87時間、300 rpm、通気量1vvmにて培養を行い、遠心分離後、上清を膜濾過 (ミリポア社製 ステリカップ-GV 材質: PVDF) した。この前述条件で調製した培養液に対し、βグルコシダーゼ (Novozyme 188) をタンパク質重量比として、1/100量添加し、これをトリコデルマ由来セルラーゼとして、以下、実施例に使用した。

(比較例1) アクレモニウム・セルロリチカス (*Acromonium cellulolyticus*) から単離された野生型エンドキシラーゼ (配列番号1のアミノ酸配列を有する) のクローニング

配列番号1のアミノ酸配列を有する野生型エンドキシラナーゼをコードするDNAは、アクレモニウム・セルロリチカス (*Acremonium cellulolyticus*) CF株よりRT-PCRで単離し、pET11a (Novagen) のNdeI部位、BamHI部位に、野生型エンドキシラナーゼよりシグナルペプチド領域を除去したタンパク質をコードする、配列番号33の塩基配列を有するDNAのクローニングを実施した。pET11aのNdeI部位の塩基配列CATATGにおける、“ATG”は、メチオニンコドンとして翻訳開始点として使用し、3'末端にはストップコドン“TAG”を含んでいる。

[0055] 前記配列番号33の塩基配列を含むpET11aは、BL21 (DE3)株 (Novagen社) にクローニングした。得られた組換えBL21 (DE3)株は、アンピシリンナトリウム100mg/L含むLB培地にて37℃でOD600が0.6になるまで培養し、その後、イソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) 200 μMを添加し、配列番号2のアミノ酸配列を有する野生型エンドキシラナーゼの発現誘導を行った。発現誘導は、培地を16℃で20時間保温して行い、その後組換えBL21 (DE3)株を4℃、5,000 × gにて15分遠心分離を行うことで集菌した。集菌した菌体は、トリス緩衝液pH8 (20mM Tris HCl、50mM NaCl) に再懸濁した。菌体を含む緩衝液は、-80℃にて1時間完全に凍結させた後、室温にて融解する操作を合計3回繰り返すことで、菌体中の可溶性タンパク質の緩衝液への抽出を行った。その後、緩衝液を18,000 rpmにて、20分、4℃で遠心分離を行い上清と菌体残さに分離した。前記上清はトリス緩衝液 (20mM、pH8) で予め平衡化しておいたQ-HPカラム (GE社) に通し、目的のエンドキシラナーゼをカラムに吸着させた後、NaCl濃度勾配により溶出を行った。エンドキシラナーゼ画分として、200~400mMのNaCl濃度時の溶液を回収した。その後、エンドキシラナーゼ画分は、さらにトリス緩衝液 (20mM、pH8、2M NaCl) で透析した後、Butyl HPカラム (GE社) に通じ、

エンドキシラナーゼを吸着した。エンドキシラナーゼは、NaCl濃度勾配により溶出し、1M NaClで溶出される画分を回収した。前記画分をさらに、Superdex 200 16/60ゲルろ過カラム（GE社）に通じて精製した。得られた精製エンドキシラナーゼは、SDS-PAGEによる不純物の確認を行った。

（実施例1）位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102のいずれか1つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの作製と大腸菌による組換え発現

実施例として、位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102のいずれか1つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの作製を以下手順にて実施した。

[0056] 野生型エンドキシラナーゼからN末端の34アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを除くアミノ酸配列（配列番号2）をコードする塩基配列（配列番号33）を含むpET11aを鋳型（比較例1）として、表1に記載のプライマー対（Fw：フォワードプライマー、Rv：リバースプライマー）を使用して、PCRを行うことで、所定の位置にアミノ酸置換を有するエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを作製した。PCRにはPrimeSTAR Max DNA Polymerase kit（タカラバイオ株式会社）を用いた。使用したプライマー対を表1（配列番号14～配列番号25）に示す。また、得られたエンドキシラナーゼ変異体（位置35のアミノ酸を開始点とする）コードするDNAの塩基配列を配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、に示す（表1）。またそれぞれのエンドキシラナーゼ変異体のアミノ酸配列を、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、に示す。得られたエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは比較例1の手順に準じてpET11aにクローニングした。次いで、エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを含むpET11aを用いて、比較例1の手順に準じて、タンパク質の発現および精製を行い、各エンドキシラナー

ゼ変異体を得た。

[0057] [表1]

実施例 1 で使用した変異導入用プライマー対と対応するエンドキシラナーゼ変異体 (アミノ酸配列・塩基配列)  
下線は変異導入箇所を示す。

位置	置換前の アミノ酸	置換後の アミノ酸	Fw/Rv	プライマー塩基配列 (5'→3')	エンドキシラナーゼ変異体	
					アミノ酸配列	塩基配列
位置 35	セリン	システイン	Fw	GATATACATATGIGTATCAGGAGG	配列番号 14	配列番号 34
			Rv	GCTCGTCGTGATACACATATGTATATC	配列番号 15	
位置 44	アスパラギン	ヒスチジン	Fw	ACTGGGACGGCACAACGGCTACTACTCTCG	配列番号 16	配列番号 35
			Rv	CGAGTAGTAGTAGGCGGTTGTGCGTCCGAG	配列番号 17	
位置 62	スレオニン	システイン	Fw	GTACCGTACTGTAAATGGTGACAAATGGCG	配列番号 18	配列番号 36
			Rv	TTCGGCATTGTCACGATTACAGTAGGTGAC	配列番号 19	
位置 63	アスパラギン	ロイシン	Fw	ACCTACACAGATTAGGTGACAAATGGGGAATAG	配列番号 20	配列番号 37
			Rv	GTATTGGCATTGTCACCAATATGTGTAGG	配列番号 21	
位置 101	スレオニン	プロリン	Fw	GGAGAAITTAATCCGAGCGGAAACGGCT	配列番号 22	配列番号 38
			Rv	AGCGTTCGGCTGGGATTAAATTCGCC	配列番号 23	
位置 102	セリン	アスパラギン	Fw	GAATTTAATACAAACGGAAACGGCTTAT	配列番号 24	配列番号 39
			Rv	ATAAGGTTCCGGTTTGTATTAAATTC	配列番号 25	

[0058] (実施例2) 位置35および位置62の2つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの作製と大腸菌による組換え発現

実施例1にて作製した、位置35に変異を導入したエンドキシラナーゼ変異体(配列番号3)をコードするDNAを含むpET11に対して、さらに、位置62に変異を導入するプライマー対(配列番号18および配列番号19)を使用して、位置35と位置62においてそれぞれシステインへの2つの置換を有するエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNA(配列番号40)を作製した。本変異導入に使用したプライマー対は表2に示す2種である。作製したエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの塩基配列を配列番号9に示す。得られたエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは比較例1の手順に準じてpET11aにクローニングした。次いで、当該エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを含むpET11aを用いて、比較例1の手順に準じて、タンパク質の発現および精製を行い、実施例2のエンドキシラナーゼ変異体(配列番号9)を得た。

[0059]

[表2]

実施例 2 で使用した変異導入用プライマー対と対応するエンドキシラナーゼ変異体 (アミノ酸配列・塩基配列)  
 下線は変異導入箇所を示す。

位置	置換前の アミノ酸	置換後の アミノ酸	Fw/Rv	プライマー塩基配列 (5'→3')	エンドキシラナーゼ変異体	
					アミノ酸配列	塩基配列
位置 35	セリン	システイン	Fw	GATATACATATG <u>TGTATC</u> ACGCGAGC	配列番号 9	配列番号 40
			Rv	GCTCGT <u>CGTGATAC</u> ACATATGTATATC		
位置 62	スレオニン	システイン	Fw	GTCACCTAC <u>IGTAATGG</u> TGACAATGGCG	配列番号 18	配列番号 19
			Rv	TTCGCCATTGTCACCATT <u>ACAGTAGG</u> TGAC		

[0060] (比較例2) 位置61、位置65、位置66のいずれか1つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの作製と大腸菌による組換え発現

比較例として位置61、位置65、位置66のいずれか1つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体を作製した。野生型エンドキシラナーゼの塩基配列(配列番号2)を含むpET11aを鋳型として、表3に記載のプライマー対(Fw:フォワードプライマー、Rv:リバープライマー)を使用して、PCRを行うことで、各エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを作製した。PCRにはPrimeSTAR Max DNA Polymerase kit(タカラバイオ株式会社)を用いた。使用したプライマー対と得られたエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの塩基配列を配列番号42、配列番号43、配列番号44、に示す(表3)。またそれぞれのエンドキシラナーゼ変異体のアミノ酸配列を、配列番号11、配列番号12、配列番号13に示す(開始メチオニンを除く)。得られたエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは比較例1の手順に準じてpET11aにクローニングした。次いで、当該エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを含むpET11aは、比較例1の手順に準じて、タンパク質の発現および精製を行い、比較例2の変異体を得た。

[0061]

[表3]

比較例 2 で使用した変異導入用プライマー対と対応する変異体 (アミノ酸配列・塩基配列)  
 下線は変異導入箇所を示す。

位置	置換前の アミノ酸	置換後の アミノ酸	Fw/Rv	プライマー塩基配列 (5'→3')		エンドキシラナーゼ変異体	
				アミノ酸配列	塩基配列	アミノ酸配列	塩基配列
位置 61	チロシン	メチオニン	Fw	GAAGTCACCATGACAATGGTGACAATGGC	配列番号 26	アミノ酸配列	配列番号 42
			Rv	GCCATTGTCACCAATTTGTCATGGTGACTTC	配列番号 27	塩基配列	配列番号 42
位置 65	アスパラギン酸	プロリン	Fw	CCTACACAAAATGGTCCTAACGGGGAATAC	配列番号 28	アミノ酸配列	配列番号 43
			Rv	GTATTGGCCGTTAGGACCAATTTGTGTAGG	配列番号 29	塩基配列	配列番号 43
位置 66	アスパラギン	グリシン	Fw	ACAAAATGGTGTATGGAGGGGAATACAGC	配列番号 30	アミノ酸配列	配列番号 44
			Rv	GCTGTATTCCGCCATCACCATTGTG	配列番号 31	塩基配列	配列番号 44

[0062] (実施例3) 位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102、位置61、位置65、位置66の9つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの作製と大腸菌による組換え発現

実施例2にて作製した、位置35と位置62においてそれぞれシステインへの2つの置換を有するエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNA（配列番号40）を含むpET11に対して、さらに、位置44、位置63、位置101、位置102、位置61、位置65、位置66に変異を導入するプライマー対を使用して、各位置に置換を有するエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを作製した。本変異導入に使用したプライマー対は表4に示す9種である。作製したエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAの塩基配列を配列番号41に示す。また当該エンドキシラナーゼ変異体のアミノ酸配列を配列番号10に示す。得られたエンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAは比較例1の手順に準じてpET11aにクローニングした。次いで、エンドキシラナーゼ変異体をコードするDNAを含むpET11aは、比較例1の手順に準じて、タンパク質の発現および精製を行い、実施例3のエンドキシラナーゼ変異体（配列番号10）を得た。

[0063]

[表4]

実施例 3 で使用した変異導入用プライマー対と対応するエンドキシラナーゼ変異体 (アミノ酸配列・塩基配列)  
 下線は変異導入箇所を示す。

位置	置換前の アミノ酸	置換後の アミノ酸	Fw/Rv	プライマー塩基配列 (5'→3')	エンドグルカナーゼ変異体	
					アミノ酸配列	塩基配列
位置 35	セリン	システイン	Fw Rv	GATATACATATG <u>GTATC</u> ACGACGAGC GCTGGTCGTGATACACATATGATATC	配列番号 14 配列番号 15	
位置 44	アスパラギン	ヒスチジン	Fw Rv	ACTG6GAGGCACAAGGGCTACTACTCG CGAGTAGTAGTAGCGGT <u>TGTGGTCC</u> CAG	配列番号 16 配列番号 17	
位置 62	スレオニン	システイン	Fw Rv	GTCACCTACTGTAATGGTGACAATGGCG TTGGCCATTGCACCAITTAGAGTAGGTGAC	配列番号 18 配列番号 19	
位置 63	アスパラギン	ロイシン	Fw Rv	ACCTACACATTAGGTGACAATGGGGAATAC GTATTGGCCATTGTCACCTAA <u>TGTGTAGG</u>	配列番号 20 配列番号 21	
位置 101	スレオニン	プロリン	Fw Rv	GGAGAAITTAATCCCGCGGAAACCGCT AGCGTTCGGCTGGGATTAAATCTCC	配列番号 22 配列番号 23	配列番号 41
位置 102	セリン	アスパラギン	Fw Rv	GAATTTAATACAAAGGAAACCGCTAT ATAAGCGTTCCGTTTGTATTAAATTC	配列番号 24 配列番号 25	配列番号 10
位置 61	チロシン	メチオニン	Fw Rv	GAAGTCACCAIGACAAATGGTGACAATGGC GCCATTGTCACCAATTGTCATGGTGACTTC	配列番号 26 配列番号 27	
位置 65	アスパラギン酸	プロリン	Fw Rv	CCTACACAAATGGTCTAACGGGGAATAC GTATTCCCGTTAGGACCAITTTGTGTAGG	配列番号 28 配列番号 29	
位置 66	アスパラギン	グリシン	Fw Rv	ACAAA <u>TGGTGTG</u> AGGAGGGAATACAGC GCTGATTCGCCTCCATCACCATTGT	配列番号 30 配列番号 31	

[0064] (実施例4) 実施例1～3のエンドキシラナーゼ変異体および比較例1の野生型エンドキシラナーゼ、比較例2のエンドキシラナーゼ変異体の各温度でのエンドキシラナーゼ活性測定

エンドキシラナーゼ活性は、1%のバーチウッドキシラン(シグマアルドリッチ社)を基質として使用して、測定を行った。エンドキシラナーゼによるバーチウッドキシランが加水分解され、生成した還元糖の量は、ジニトロサリチル酸法(DNS)法でキシロースを標品として使用して測定した。反応は、各種エンドキシラナーゼ変異体(実施例1、実施例2、実施例3)および野生型エンドキシラナーゼ(比較例1)、エンドキシラナーゼ変異体(比較例2)を1mg/mLとなるよう添加し、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃の各温度において、10分間保温することでバーチウッドキシランの分解を実施した。タンパク質濃度は参考例1に準じて濃度測定を行い調整した。反応後、還元糖量を測定するためDNS溶液を0.75mL添加することで開始し、5分煮沸することで反応を停止した。反応停止後の反応液は、540nmの吸光度を測定することで還元糖量を測定した。1unitのエンドキシラナーゼ活性は、50℃・1分間において、1μmolのキシロースをバーチウッドキシランより生成するために必要な酵素量と定義しユニット数を算出した。また、算出した各ユニット値を元に、特に野生型(比較例1)における55℃の活性値を基準(100%)として相対的な活性値を表5にまとめた。

[0065] 結果、位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102より選択される位置に置換を含むエンドキシラナーゼ変異体は、野生型エンドキシラナーゼと比べて、高温条件下においても高い活性を保持しており、当該変異により耐熱性が高められたことが明らかとなった。特に、位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、位置102に加えて、位置61、位置65、位置66にも置換を含むエンドキシラナーゼ変異体において、高い耐熱性が認められた。

[0066]

[表5]

各温度におけるバーチウッドキシランの分解活性相対値  
太字・斜体は高い耐熱性を示す。

	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
野生型 (比較例1)	97	100	99	16	11
T101P (実施例1)	94	97	108	<b>41</b>	<b>41</b>
S102N (実施例1)	97	99	115	<b>52</b>	<b>32</b>
N44H (実施例1)	103	101	107	<b>67</b>	<b>25</b>
S35C (実施例1)	87	80	79	<b>80</b>	<b>36</b>
T62C (実施例1)	90	98	103	<b>104</b>	<b>88</b>
S35C (実施例1)	87	80	79	<b>80</b>	<b>36</b>
S35C/T62C (実施例2)	105	122	147	<b>154</b>	<b>150</b>
S35C/N44H/Y61M/T62C/ N63L/T101P/S102N/D65P/ N66G (実施例3)	114	133	169	<b>177</b>	<b>189</b>
Y61M (比較例2)	88	73	22	11	17
D65P (比較例2)	88	67	31	16	14
N63L (比較例2)	81	71	32	16	14
N66G (比較例2)	84	67	35	15	11

[0067] (実施例5) エンドキシラナーゼ変異体を用いた糖液の製造方法1

サトウキビ搾汁後の残渣であるバガスを原料にして、オリゴ糖液製造を試みた。エンドキシラナーゼとしては、比較例1の野生型エンドキシラナーゼもしくは実施例3のエンドキシラナーゼ変異体を使用した。前処理として、バイオマス重量が30% (w/w) となるように1N苛性ソーダ水溶液中で6日間浸漬処理した。前処理物を0.5gずつ2mLチューブに秤量し、バイオマスの終濃度が10% (w/w) となるように加水後、希釈硫酸を用いてpH5に調整した。pHを調整した本組成物に、野生型エンドキシラナーゼもしくはエンドキシラナーゼ変異体を0.05mg/g-BM添加し、サーモブロック回転器(日伸理化製 SN-48BN)を用いて50°Cで24時間反応させた。反応後の上清における糖組成を表6に示す。野生型エンドキシラナーゼと比較して、エンドキシラナーゼ変異体の方がキシロオリゴ糖であるキシロピオースを多く得ることができた。

[0068] [表6]

エンドキシラナーゼ変異体を用いた糖液の製造 1

	キシロビオース
野生型 (比較例 1)	3.5 g/L
変異体 (実施例 3)	6.9 g/L

[0069] (実施例 6) エンドキシラナーゼ変異体を用いた糖液の製造方法 2

実施例 5 において、酵素としてエンドキシラナーゼ変異体に加えてトリコデルマ由来セルラーゼ (参考例 2) を用いて糖液の製造を試みた。実施例 5 と同様の方法で pH 調整まで行った組成物に対して、トリコデルマ由来セルラーゼをタンパク質量で 10 mg / g - BM およびエンドキシラナーゼ変異体 (実施例 3) を 0.05 mg / g - BM 添加し、サーモブロック回転器 (日伸理化製 SN-48BN) を用いて 50°C で 48 時間反応させた。比較として、トリコデルマ由来セルラーゼのみを添加して反応させた。反応後の上清における糖組成を表 7 に示す。トリコデルマ由来セルラーゼだけのものと比較して、エンドキシラナーゼ変異体を加えた方が糖収量を向上させることができた。

[0070] [表7]

エンドキシラナーゼ変異体を用いた糖液の製造 2

	グルコース	キシロース
セルラーゼ (参考例 2)	32.9 g/L	21.0 g/L
セルラーゼ (参考例 2) +変異体 (実施例 3)	35.0 g/L	22.3 g/L

[0071] (実施例 7) 実施例 5 における反応後のエンドキシラナーゼ残存活性

実施例 5 にて得られた反応後の上清 500  $\mu$ l を、VIVASPIN 500 (PES、分画分子量 10,000) (ザルトリウス社) を用いて限外濾過し、比較例 1 の野生型エンドキシラナーゼもしくは実施例 3 のエンドキシラナーゼ変異体を回収した。回収した比較例 1 の野生型エンドキシラナーゼもしくは実施例 3 のエンドキシラナーゼ変異体と、キシラン分解時の濃度 (

2. 5 mg / l) に希釈した比較例 1 の野生型エンドキシラナーゼ、実施例 3 のエンドキシラナーゼ変異体のエンドキシラナーゼ活性を測定した。エンドキシラナーゼ活性は、回収エンドキシラナーゼもしくは希釈エンドキシラナーゼを反応液の 1 / 10 量添加した点、反応温度を 50 °C で行った点以外は、実施例 4 と同様に行った。希釈した比較例 1 の野生型エンドキシラナーゼ、実施例 3 のエンドキシラナーゼ変異体の活性値をそれぞれ基準 (100 %) として、回収した比較例 1 の野生型エンドキシラナーゼ、実施例 3 のエンドキシラナーゼ変異体の相対的な活性値を残存活性とした。表 8 に回収後の残存活性を示す。エンドキシラナーゼ変異体ではキシラン分解後も活性が高く残っており、キシラン分解に有意に再利用出来ることが確認できた。

[0072] [表8]

エンドキシラナーゼ変異体を用いたキシラン分解後の残存活性

	残存活性
野生型(比較例 1)	7%
変異体(実施例 3)	94%

[0073] (実施例 8) 酵母ピキア・パストリスによる野生型エンドキシラナーゼ及びエンドキシラナーゼ変異体の発現

野生型エンドキシラナーゼから N 末端の 34 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドを除くアミノ酸配列 (配列番号 2) をコードする塩基配列 (配列番号 33) を含む pET11a を鋳型 (比較例 1) として、配列番号 51 と配列番号 53 のプライマー対を使用して PCR を行うことで、配列番号 54、配列番号 47、配列番号 55 を順にコードする DNA を作製した。

[0074] また、位置 35、位置 44、位置 62、位置 63、位置 101、位置 102、位置 61、位置 65、位置 66 の 9 つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体 (配列番号 10) をコードする DNA (配列番号 41) を含む pET11a を鋳型 (実施例 3) として、配列番号 52 と配列番号 53 のプライマー対を使用して PCR を行うことで、配列番号 54、配列番号 50、配列番号 55 を順にコードする DNA を作製した。PCR には PrimeSTAR

MaxDNA Polymerase kit (タカラバイオ株式会社) を用いた。

[0075] さらに、位置35および位置62の2つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体(配列番号9)をコードする塩基配列(配列番号48)の上流に配列番号54の塩基配列、下流に配列番号55の塩基配列を付加したDNAと、位置35、位置44、位置62、位置63、位置61、位置65、位置66の7つの置換を含むエンドキシラナーゼ変異体(配列番号45)をコードする塩基配列(配列番号49)の上流に配列番号54の塩基配列、下流に配列番号55の塩基配列を付加したDNAを、人工遺伝子合成した。DNA2.0社のElectra Vector Systemを用いて、前記PCRにて得られたDNA2種と前記人工遺伝子合成したDNA2種の計4種のDNAをSapI部位で切断し、pD915へのクローニングを行った。前記4種のDNAは配列番号56の塩基配列の下流にクローニングされ、これにより配列番号2、10、9、45のN末端に分泌シグナルペプチド領域(配列番号46)が付加されたタンパク質をコードするDNAを含むプラスミドが得られた。

[0076] ピキア・パストリスPPS-9010株(DNA2.0社)のコンピテントセルの調製を行った。ピキア・パストリスPPS-9010株のシングルコロニーを20mlのYPD液体培地(酵母エキス1%(w/vol)、ペプトン2%(w/vol)、グルコース2%(w/vol))が入った100mlフラスコへ植菌し、30℃、120rpmで16時間振とう培養を行った(前培養)。前記前培養液を、50mlのYPD液体培地が入った200mlバツフル付フラスコへ $OD_{600}=0.15\sim 0.2$ になるように植菌し、30℃、120rpmで振とう培養し $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ まで増殖させた。培養液を50mlファルコンチューブへ移し、 $500\times g$ にて15分間遠心分離を行うことで集菌した。集菌した菌体に対し氷冷したBEDS溶液(10mMピシンー水酸化ナトリウム緩衝液(pH8.3)、エチレングリコール3%(vol/vol)、ジメチルスルホキシド(DMSO))

5% (v/v)、1Mソルビトール)を9ml添加して静かに懸濁し、さらに更に1Mジチオトレイトール(DTT)1mlを添加し、静かに懸濁して30℃、100rpmで5分間振とうした。500xgにて15分間遠心分離を行い、得られた沈殿に氷冷したBEDS溶液を1ml添加し静かに懸濁したものを、コンピテントセルとした。コンピテントセルはそのまま形質転換に使用するか、200μlずつに分注して-80℃で保存した。

[0077] 前記プラスミド各20μgをAvrII部位で切断し、線状断片とした。前記線状断片をエタノール沈殿にて精製し、前記ピキア・パストリスのコンピテントセル50μlと混合後、氷冷したエレクトロポレーションキュベット(0.2cm)(Bio-Rad社)に移して氷上に2分間置いた。Gene Pulser Xcell(Bio-Rad社)を用いて電圧1.5kV、抵抗200Ω、静電容量25μFでエレクトロポレーションを行った後、直ちに氷冷1Mソルビトール0.5mlを加え、YPD液体培地0.5mlを取り分けた14mlファルコンチューブへ移した。前記ファルコンチューブを30℃、120rpmで1.5時間振とう培養し、培養液100μLを、ゼオシン入りYPDSプレート培地(1mg/mlゼオシン、酵母エキス1%(w/v)、ペプトン2%(w/v)、グルコース2%(w/v)、1Mソルビトール、寒天2%(w/v))にコンラージ棒を用いて塗布し、30℃で2~3日間培養した。プレート上に生じたコロニーのうち直径の大きいものを選抜し、YPD液体培地0.5mlを取り分けた深さ2mlの96穴プレートに滅菌爪楊枝で各コロニーをつつき植菌し、28℃、1000rpmで4日間培養した。培養液の上清をSDS-PAGE結果を図1に示す。いずれのタンパク質も分泌発現されることを確認した。また、配列番号2、9、45を含むタンパク質については一次構造からの推定分子量よりも大きい分子量にバンドが検出されたことから、ピキアによる発現において糖鎖修飾が起きていることが確認された。

[0078]

[表9]

実施例 8 で調製した野生型エンドキシラナーゼおよびキシラナーゼ変異体

		アミノ酸配列	塩基配列
1	野生型	配列番号 2	配列番号 47
2	S35C/T62C	配列番号 9	配列番号 48
3	S35C/N44H/T62C/ Y61M/D65P/N63L/N66G	配列番号 45	配列番号 49
4	S35C/N44H/T62C/T101P/ S102N/Y61M/D65P/N63L/N66G	配列番号 10	配列番号 50

## [0079] (実施例 9) エンドキシラナーゼ変異体の活性比較

実施例 8 で得られた各種培養液の上清のエンドキシラナーゼの活性測定を行った。活性測定は、各種培養液の上清を 0.25 mg/mL となるよう添加し、50°C、60°C、70°C の各温度で反応を行う以外は、実施例 4 と同様に行った。算出した各ユニット値を元に、特に野生型における 50°C の活性値を基準 (100%) として相対的な活性値を表 11 にまとめた。キシラナーゼ変異体を含む上清は高温条件下においても高い活性を保持していた。また、酵母にて発現させた酵素は、実施例 4 にて大腸菌より発現された場合と比較して、高い耐熱性が認められた。

## [0080] [表10]

各反応温度におけるバーチウッドキシラン分解活性相対値

		50°C	60°C	70°C
1	野生型	100	114	25
2	S35C/T62C	101	155	183
3	S35C/N44H/T62C/ Y61M/D65P/N63L/N66G	114	181	204
4	S35C/N44H/T62C/T101P/ S102N/Y61M/D65P/N63L/N66G	115	171	240

## 産業上の利用可能性

[0081] 本発明におけるエンドキシラナーゼ変異体は、高温条件下での高いキシラン分解活性を示すため、バイオマスの加水分解および糖液の製造、オリゴ糖の製造に使用できる。

[0082] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 糸状菌由来のエンドキシラナーゼのアミノ酸配列において、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置62、位置63、位置101、及び位置102に相当する位置から選択される一以上のアミノ酸残基が置換されているアミノ酸配列を含み、かつ、エンドキシラナーゼ活性を有する、エンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項2] 配列番号1のアミノ酸配列の位置35、及び／又は位置62に相当する位置のアミノ酸残基が、システインに置換されている、請求項1に記載のエンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項3] 配列番号1のアミノ酸配列の位置44、及び／又は位置63に相当する位置のアミノ酸残基が、ヒスチジン、グリシン、トリプトファン、メチオニン、プロリン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンから、それぞれ独立して選択されるいずれかのアミノ酸に置換されている、請求項1又は2に記載のエンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項4] 配列番号1のアミノ酸配列の位置101、及び／又は位置102に相当する位置のアミノ酸残基が、プロリン、及びアスパラギンから、それぞれ独立して選択されるいずれかのアミノ酸に置換されている、請求項1～3のいずれか1項に記載のエンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項5] さらに、配列番号1のアミノ酸配列の位置61、位置65、及び位置66に相当する位置から選択される一以上のアミノ酸残基が置換されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のエンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項6] 配列番号1のアミノ酸配列の位置35、位置44、位置61、位置62、位置63、位置65、位置66、位置101、及び位置102に相当する位置のアミノ酸残基が全て置換されている、請求項1～5のいずれか1項に記載のエンドキシラナーゼ変異体。
- [請求項7] 糸状菌由来のエンドキシラナーゼが、アクレモニウム・セルロリチ

カス (*Acremonium cellulolyticus*) に由来する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のエンドキシラナーゼ変異体。

[請求項8] 以下の (a) から (c) のいずれかのアミノ酸配列からなり、かつエンドキシラナーゼ活性を有する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のエンドキシラナーゼ変異体：

(a) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列において、位置 35、位置 44、位置 61、位置 62、位置 63、位置 65、位置 66、位置 101、及び位置 102 における置換されたアミノ酸は変異せず、1 から数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列；あるいは

(c) 配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列において、位置 35、位置 44、位置 61、位置 62、位置 63、位置 65、位置 66、位置 101、及び位置 102 における置換されたアミノ酸は変異せず、該アミノ酸を除いて、配列番号 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 又は 45 で示されるアミノ酸配列と 90% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列。

[請求項9] 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のエンドキシラナーゼ変異体をコードする DNA。

[請求項10] 請求項 9 に記載の DNA を含む、発現ベクター。

[請求項11] 請求項 10 に記載の発現ベクターを用いた形質転換により作製された、形質転換細胞。

[請求項12] 請求項 11 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞により生産されたエンドキシラナーゼ変異体を得る工程を含む、エンドキシラナーゼ変異体の製造方法。

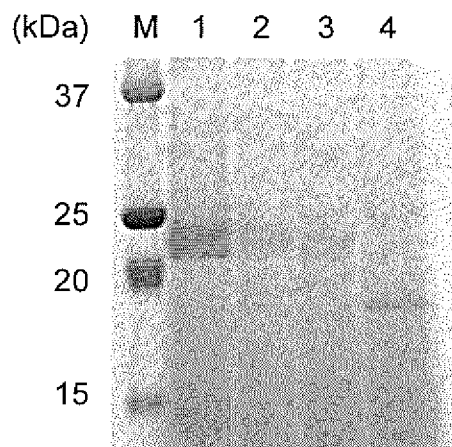
[請求項13] 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のエンドキシラナーゼ変異体を

含むバイオマス分解用酵素組成物。

[請求項14] 前記酵素組成物が、セロビオヒドロラーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼ、マンナーゼ、マンノシダーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、エステラーゼ、リパーゼからなる群から選択される1または2種以上の酵素をさらに含む、請求項13に記載のバイオマス分解用酵素組成物。

[請求項15] 請求項13又は請求項14に記載のバイオマス分解用酵素組成物を、バイオマスに添加することを含む、該バイオマスより糖液を製造する方法。

[図1]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2015/081151

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
*C12N9/42(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i*

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C12N9/42, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N15/09, C12P19/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2002-513595 A (Rhone-Poulenc Animal Nutrition SA et al.), 14 May 2002 (14.05.2002), fig. 1; paragraphs [0132] to [0134] & WO 1999/057325 A2 fig. 1; page 29, 2nd to 11th lines from the bottom & AR 19272 A & AT 446389 T & BR 9906426 A & CA 2295570 A & CN 1273601 A & DE 69941559 D & EP 0976838 A1 & KR 10-2007-0105387 A & MY 131016 A & NZ 502519 A & RU 2261910 C & TW 230736 B & US 2003/0108642 A1 & ZA 200000075 A	1-15 1-7, 9-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 December 2015 (09.12.15)	Date of mailing of the international search report 22 December 2015 (22.12.15)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/081151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WATANABE, M. et al., Xylanase (GH11) from <i>Acremonium cellulolyticus</i> : homologous expression and characterization, <i>AMB Express</i> [online], 4:27, 2014.04 [retrieval date 2015.12.03], Internet: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052667/pdf/s13568-014-0027-x.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052667/pdf/s13568-014-0027-x.pdf</a> >, page 2, left column, 8th to 10th lines from the bottom, page 2, right column, 6th line from the bottom to page 3, left column, line 7, Figure 1, 3	1-15 1-7, 9-15
Y	JP 2003-511066 A (Carbozyme Oy), 25 March 2003 (25.03.2003), paragraphs [0014], [0018], [0027], [0029]; fig. 2, 4 & US 2008/0171374 A1 paragraphs [0024], [0029], [0043], [0045]; fig. 2, 4 & WO 2001/027252 A1 & AT 295879 T & AU 7925000 A & BR 14833 A & CA 2385937 A & CN 1379813 A & DE 60020255 D & DK 1222256 T & EP 1222256 A & ES 2239046 T & FI 20001586 A0 & IL 149061 D & NO 20021723 A & ZA 200202894 A	1-7, 9-15
A	WO 2009/154247 A1 (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 23 December 2009 (23.12.2009), & JP 5622321 B & US 2012/0094320 A1 & EP 2305803 A1	1-15
A	JP 2006-271379 A (Toyama-Ken et al.), 12 October 2006 (12.10.2006), (Family: none)	1-15
A	JP 2002-199890 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 16 July 2002 (16.07.2002), (Family: none)	1-15
A	JP 2014-064563 A (Toray Industries, Inc.), 17 April 2014 (17.04.2014), (Family: none)	1-15
A	JP 2013-243954 A (Kao Corp.), 09 December 2013 (09.12.2013), & WO 2013/176205 A1	1-15
A	WO 2013/103127 A1 (Honda Motor Co., Ltd.), 11 July 2013 (11.07.2013), & US 2015/0044728 A1 & DE 112012005586 T & CN 104093832 A	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2015/081151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRUBER, K. et al., Thermophilic xylanase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> : high-resolution X-ray structure and modeling studies, <i>Biochemistry</i> , 1998.09.29, Vol.37, No.39, pp.13475-13485	1-7, 9-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12N9/42(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12N9/42, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N15/09, C12P19/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2015年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2015年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2015年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), UniProt/GeneSeq, Cplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2002-513595 A (ローヌーポーラン・アニマル・ニュトリシオン・エス・アーほか) 2002.05.14, 図1, 段落[0132]-[0134] & WO 1999/057325 A2, 図1, 第29頁下から第2-11行 & AR 19272 A & AT 446389 T & BR 9906426 A & CA 2295570 A & CN 1273601 A & DE 69941559 D & EP 0976838 A1 & KR 10-2007-0105387 A & MY 131016 A & NZ 502519 A & RU 2261910 C & TW 230736 B & US 2003/0108642 A1 & ZA 200000075 A	1-15 1-7, 9-15

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

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

国際調査を完了した日 09.12.2015	国際調査報告の発送日 22.12.2015
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	6220
---	--	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WATANABE, M. et al., Xylanase (GH11) from <i>Acremonium cellulolyticus</i> : homologous expression and characterization, <i>AMB Express</i> [online], 4:27, 2014.04 [検索日 2015.12.03], インターネット: <URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052667/pdf/s13568-014-0027-x.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052667/pdf/s13568-014-0027-x.pdf</a> >, 第2頁左欄下から第8-10行, 第2頁右欄下から第6行-第3頁左欄第7行, Figure 1, 3	1-15 1-7, 9-15
Y	JP 2003-511066 A (カーボザイム・オサケユキテュア) 2003.03.25, 段落[0014], [0018], [0027], [0029], 図2, 4 & US 2008/0171374 A1, 段落[0024], [0029], [0043], [0045], 図2, 4 & WO 2001/027252 A1 & AT 295879 T & AU 7925000 A & BR 14833 A & CA 2385937 A & CN 1379813 A & DE 60020255 D & DK 1222256 T & EP 1222256 A & ES 2239046 T & FI 20001586 A0 & IL 149061 D & NO 20021723 A & ZA 200202894 A	1-7, 9-15
A	WO 2009/154247 A1 (日本化薬株式会社) 2009.12.23 & JP 5622321 B & US 2012/0094320 A1 & EP 2305803 A1	1-15
A	JP 2006-271379 A (富山県ほか) 2006.10.12 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2002-199890 A (理化学研究所) 2002.07.16 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2014-064563 A (東レ株式会社) 2014.04.17 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2013-243954 A (花王株式会社) 2013.12.09 & WO 2013/176205 A1	1-15
A	WO 2013/103127 A1 (本田技研工業株式会社) 2013.07.11 & US 2015/0044728 A1 & DE 112012005586 T & CN 104093832 A	1-15
A	GRUBER, K. et al., Thermophilic xylanase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> : high-resolution X-ray structure and modeling studies, <i>Biochemistry</i> , 1998.09.29, Vol.37, No.39, pp.13475-13485	1-7, 9-15