

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6207609号
(P6207609)

(45) 発行日 平成29年10月4日 (2017. 10. 4)

(24) 登録日 平成29年9月15日 (2017. 9. 15)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 9/42 (2006. 01)

C 1 2 N 9/42 Z N A

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 19/14 (2006. 01)

C 1 2 P 19/14 A

請求項の数 17 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-530476 (P2015-530476)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月4日 (2013. 9. 4)
 (65) 公表番号 特表2015-533486 (P2015-533486A)
 (43) 公表日 平成27年11月26日 (2015. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2013/052036
 (87) 国際公開番号 WO2014/037667
 (87) 国際公開日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)
 審査請求日 平成28年9月1日 (2016. 9. 1)
 (31) 優先権主張番号 1258260
 (32) 優先日 平成24年9月5日 (2012. 9. 5)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 515060517
 イエフベ・エネルジェ・ヌーヴェル
 フランス・F-92500・リュエイ・マ
 ルメゾン・アヴニユ・ボワ・プレオ・1・
 アンド・4
 (73) 特許権者 515059810
 プロテウス
 フランス・F-91160・ロンジュモー
 ・リュ・ボシュエ・23・ゼドゥイ・ドゥ
 ・ラ・ヴィニユ・オ・ルー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低温において強化されたベータ-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1のアミノ酸配列の、ベータ-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号3の配列の野生型BGL1タンパク質のベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、約30 から約35 の間に含まれる温度で、増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有することを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号5のアミノ酸配列の100B11ポリペプチドのベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、30 から35 の間に含まれる温度で、増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有することを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号5のアミノ酸配列の100B11ポリペプチドのベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、約30 から約35 の間に含まれる温度で、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、なおさらに好ましくは少なくとも40%増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有することを特徴とする、請求項3に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードすることを特徴とする、精製または単離された核酸。

【請求項 6】

10

20

配列番号2の核酸配列を含むことを特徴とする、請求項5に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項5または6に記載の核酸を含むことを特徴とするベクター。

【請求項 8】

請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項5に記載の核酸、または請求項7に記載のベクターを含むことを特徴とする、単離された宿主細胞。

【請求項 9】

トリコデルマ属、アスペルギルス属、ニューロスボラ属、フミコラ属、ペニシリウム属、フサリウム属、サーモモノスポラ属、マイセリオフトーラ属、クリソスポリウム属、バチルス属、シュードモナス属、エシェリキア属、クロストリジウム属、セルロモナス属、ストレプトマイセス属、ヤロウイア属、ピキア属およびサッカロマイセス属から選択されることを特徴とする、請求項8に記載の単離された宿主細胞。

10

【請求項 10】

トリコデルマ・リーゼイ、トリコデルマ・ヴィリダエ、トリコデルマ・コニング、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランス、アスペルギルス・ウェンティ、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・フォエニシス、ニューロスボラ・クラッサ、フミコラ・グリセア、マイセリオフトーラ・サーモフィラ、クリソスポリウム・ラクノウェンス、ペニシリウム・ピノフィラム、ペニシリウム・オキサリウム、エシェリキア・コリ、クロストリジウム・アセトブチリカム、クロストリジウム・サッカロリティカム、クロストリジウム・ベイジェリンキ、クロストリジウム・ブチリカム、ピキア・パストリス、ヤロウイア・リポリティカ、サッカロマイセス・セレピシエおよびそれらの混合物から選択されることを特徴とする、請求項8または9に記載の単離された宿主細胞。

20

【請求項 11】

種トリコデルマ・リーゼイのものであることを特徴とする、請求項9に記載の単離された宿主細胞。

【請求項 12】

種サッカロマイセス・セレピシエのものであることを特徴とする、請求項9に記載の単離された宿主細胞。

【請求項 13】

ベータ-オリゴ糖の加水分解のための、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチドの、または請求項8から12のいずれか一項に記載の細胞の使用。

30

【請求項 14】

グルコースへのセロピオースの加水分解のための、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチドの、または請求項8から12のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項 15】

バイオ燃料の生成のための、請求項1から4のいずれか一項に記載のポリペプチドの、または請求項8から12のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項 16】

リグノセルロース系バイオマスに対して作用する酵素組成物であって、糸状菌によって生成され、請求項1から4のいずれか一項に記載の少なくとも1つのポリペプチドを含む、酵素組成物。

40

【請求項 17】

バイオマスからバイオ燃料を生成するための方法であって、以下の工程：

- 加水分解しようとする材料を水相に懸濁させる工程；
- 請求項16に記載の酵素組成物または請求項8から12のいずれか一項に記載の細胞の存在下で、リグノセルロース系バイオマスを加水分解して、グルコースを含有する加水分解物を生成する工程；
- 前記加水分解物の前記グルコースを発酵させて、発酵マストを生成する工程；
- 前記発酵マストからバイオ燃料を分離する工程

を含み、前記加水分解工程および発酵工程が同時に実施される、方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

セルロースからエタノールを生成する可能性は、大量の原材料の入手可能性に起因し、燃料としてのエタノールにおける関心にも起因して、かなりの注目を集めてきた。かかるプロセスのためのセルロースベースの天然原材料は、「バイオマス」と称される。多数の型のバイオマス、例えば、木材、農業残渣、草本作物および都市固形廃棄物は、バイオ燃料を生成するための潜在的な原材料とみなされてきた。これらの材料は、主に、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンからなる。

【背景技術】

10

【0002】

セルロースは、ベータ-1,4結合によって連結されたグルコース分子からなるポリマーであり、分解または脱重合に対して非常に抵抗性である。一旦セルロースがグルコースに変換されると、後者は、酵母を使用して、エタノールなどのバイオ燃料へと容易に発酵される。

【0003】

セルロースをグルコースに変換するための、研究された最も古い方法は、酸加水分解に基づく。このプロセスは、濃酸または希酸の存在下で実施できる。しかし、濃酸が使用される場合の酸の不十分な回収および希酸の使用の場合におけるグルコースの低生成などのいくつかの欠点は、酸加水分解プロセスの経済に対して有害である。

20

【0004】

酸加水分解プロセスの欠点を克服するために、セルラーゼ型の酵素を使用するセルロース変換プロセスが、より最近、酵素的加水分解に関連付けられた。しかし、リグノセルロース系バイオマス(例えば、セルロース)のこの酵素的加水分解は、高価な産業プロセスであるという欠点を有する。結果として、ますます有効なセルラーゼ分泌微生物株を使用する必要がある。これに関して、真菌トリコデルマ属(*Trichoderma*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、フミコラ属(*Humicola*)またはフサリウム属(*Fusarium*)、ならびにまたサーモモノスポラ属(*Thermomonospora*)、バチルス属(*Bacillus*)、セルロモナス属(*Cellulomonas*)およびストレプトマイセス属(*Streptomyces*)などの細菌などの多くの微生物が、セルロースを加水分解する酵素を含む。これらの微生物によって分泌される酵素は、グルコースへのセルロースの変換において使用される3つの型の活性を有し、3つの群に分割される：セルロース線維を内部からランダムに攻撃するエンドグルカナーゼ、線維の末端を攻撃してセロビオースを放出するエキソグルカナーゼ、およびこのセロビオースをグルコースに加水分解するベータ-グルコシダーゼ。後者は、セルロース変換プロセスの限定的工程を構成する。実際、このプロセスの最後に加水分解されない任意のセロビオースは、バイオ燃料の生成の間の収量の喪失を示すので、グルコースへのセロビオースの変換に、このプロセスの第1の困難が存在する。

30

【0005】

トリコデルマ属を含むいくつかのセルラーゼ生成微生物がベータ-グルコシダーゼをほとんど生成しないことを考慮すると、セロビオースのこの蓄積は、酵素的加水分解における主要な問題である。実際、産業的トリコデルマ属株によって分泌される総タンパク質の1%未満がベータ-グルコシダーゼ型のものである。したがって、ベータ-グルコシダーゼのこの低い量は、セロビオースをグルコースに加水分解する低い能力、したがって、この系におけるセロビオースの蓄積を生じる。これが起きると、高濃度のセロビオースは、他のセルラーゼおよび特にセロビオースが反応の最終生成物であるエキソグルカナーゼの活性を阻害する。これらの欠点を克服するために、本発明者らは、その特許出願W02010/029259において、増加した比活性を有する酵素を取得することができるようにし、それによってリグノセルロース系バイオマスをバイオ燃料に変換するためのプロセスを実質的に改善する、ベータ-グルコシダーゼ遺伝子を開発した。

40

【0006】

50

加水分解および発酵は、種々のスキームに従って実施され得る。最も一般的なものは、加水分解発酵分離法(SHF)からなる。この方法は、最適な反応条件を維持することによって、各工程を最適化することを可能にする。この発酵は、約28 から約30 の間の温度で即座に実施されるが、加水分解は一般に、少なくとも45 の温度で実施される。しかし、SHFでは、この反応の最後に放出される糖は、非常に高い濃度であり、酵素の阻害をもたらす、このプロセスの効率を減速させる。

【0007】

これらの欠点を回避するために、別の型のプロセス(SSF、同時糖化発酵)が想定され得る。SSFでは、2つの工程(ヘキソースの加水分解および発酵)が同時に起こり、酵素に対して阻害的な濃度での糖の蓄積を防止する。投資コストもまた、単一リアクタの使用に続いて低減される。放出される糖は、エタノールへの発酵に直ぐに使用されるので、加水分解の程度は、阻害の非存在に続いてより高い。

【0008】

この方法では、リアクタの温度は、典型的には約30 から約35 の間の、加水分解の最適温度と発酵の最適温度との間で妥協を必然的に図ることになる。しかし、かかる温度では、ベータ-グルコシダーゼを含むセルロース分解性酵素の活性は、約30%低減される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO2010/029259

【特許文献2】欧州特許第1104457号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Durandら、Enzyme Microb. Technol., 1988;10:341~346

【非特許文献2】Boder ETおよびWittrup KD、Biotechnol Prog、1998、14:55~62

【非特許文献3】Bradford MM., Anal Biochem、1976、72:248~54

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、SSFプロセスの最適な加水分解および発酵の温度において、特に約30 から約35 の間の温度において、効率的なベータ-グルコシダーゼ活性を維持することが可能な酵素が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、特に配列番号3の配列の野生型BGL1タンパク質のベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、約30 から約35 の間の温度で、増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを開発した。BGL1は、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)由来のベータ-グルコシダーゼに対応する。

【0013】

本発明者らは、野生型BGL1タンパク質のベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、増強されたベータ-グルコシダーゼ比活性を有するいくつかのクローンを以前に同定している。かかる結果は、その特許出願WO2010/029259に示されている。より具体的には、本発明者らは、配列番号5のポリペプチドをコードする特定のクローン(100B11と呼ばれる)を実証しており、強いプロモーターの制御下でのトリコデルマ・リーゼイにおけるその発現は、この酵素を発現しない株によって生成されるベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、生成された酵素カクテルのベータ-グルコシダーゼ活性において26.2倍の増加をもたらす(特許出願WO2010/029259の表6)。

【0014】

本発明者らはここで、以前に同定されたクローン100B11と比較して増強された活性を有する酵素をコードする新たなクローンを、驚くべきことに、予測外に実証し、これは、約

10

20

30

40

50

30 から約35 の間の温度においてである。

【0015】

したがって、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列の、ベータ-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドに関する。

【0016】

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、以下の通りである：

MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAKLNLQDKVGI VSGVGWNGGPCVGNTPA
SKIGYPQLCLQDGLGIRFGGSVTAFTPGIQAASTWDTELMRQRGEYLGAEAKGCGIHVLLGPVAGPLGKTPQGGRNWEG
FGVDPYLTGIA MAETIEGLQSAGVQACAKHYIVNEQELNRETISNPDDRTLHELWLPFADAVHANVASVMCSYNKING
SWACEDQYTLQTVLKDQLGFPGYVMTDWNQAQHTTVQSANGLDMSMPGTD FNGNNRLWGPALTNVNSNQVPTSRVDDMV
TRILAAWYLTGQDQAGYPSFNI SRNVQGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANI LPLKKPASIAVVGSAIIGNHARNSPSCN
DKGCDDGALGMGWGSGAVNYPYFVAPYDAINTRASSQGTQVTLSTNDNTSSGASAARGKDVAIVFITADSGEGYITVEGN
AGDRNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNVI VVVHVSVAIILEQILALPQVKAVVWAGLPSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLV
YTIKSPNDYNTRIVSGGSDSFSEGLFIDYKHFDANI TPRYEFYGLSYTKFNYSRLSVLSTAKSGPATGAVVPGGPSD
LFQNVATVTVDIANSGQVTGA EVAQLYITYPSSAPRTPPKQLRGFAKLNLTPGQSGTATFNI RRRDLSYWD TASQKWVVP
SGSFGISVGASSRDIRLTSTLSVA.

10

【0017】

このポリペプチドは、配列番号2の核酸配列によってコードされる。

【0018】

優先的に、配列番号1のアミノ酸配列のポリペプチドは、約30 から約35 の間の温度で、特にこれらの同じ温度における配列番号3の配列の野生型BGL1タンパク質のベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有する。このBGL1タンパク質は、配列番号4の核酸配列によってコードされる。

20

【0019】

より好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列のポリペプチドは、約30 から約35 の間の温度で、これらの同じ温度における配列番号5のアミノ酸配列の100B11ポリペプチドのベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有する。この100B11ポリペプチドは、配列番号6の核酸配列によってコードされる。

【0020】

さらに、本発明によるポリペプチドは、グルコースによる阻害に対してあまり感受性でないという利点を有し、結果として、高いグルコース濃度の存在下でより良好なベータ-グルコシダーゼ活性を保持する。

30

【0021】

一実施形態では、以前に記載されたポリペプチドは、グルコースの非存在下で決定された野生型タンパク質BGL1(配列番号3)のベータ-グルコシダーゼ活性と比較して増強された、グルコースの存在下で決定されたベータ-グルコシダーゼ活性を有する。

【0022】

好ましい一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列の100B11ポリペプチドのベータ-グルコシダーゼ活性と比較して、約30 から約35 の間の温度で、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、なおさらに好ましくは少なくとも40%増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有する。

40

【0023】

当業者は、例えば、基質パラ-ニトロフェニルベータ-D-グルコピラノシド(pNPG)を使用する酵素活性試験によって、本発明によるポリペプチドの酵素活性の増加または言い換えれば改善を決定することができる。ベータ-グルコシダーゼの作用後に得られるパラ-ニトロフェノールの量は、例えば、414nmにおける光学密度を読み取ることによって決定される。

【0024】

本発明によるポリペプチドが野生型BGL1タンパク質の酵素活性と比較して増強された酵素活性を有するかどうかを決定するために当業者が使用し得るプロトコルの一例は、以下

50

の通りである：

- 本発明によるポリペプチドを発現するエシェリキア・コリ(E. coli)のストック培養物を37℃で一晩、調製する；
- 1%のストック培養物にLB培養培地を接種して20℃で24時間置く；
- 13000rpmで2分間、遠心分離する；
- 細胞ペレットをpH5の100mMコハク酸塩緩衝液で再懸濁させる(最終OD₆₀₀=100)；
- 50μlの細胞を、15mMのパラ-ニトロフェニルペー タ-D-グルコピラノシド(pNPG)を含むpH5の100mMコハク酸塩緩衝液100μlと共に50℃で1時間30分間、インキュベートした後、氷上で5分間置く；
- 150μlの0.2M Na₂CO₃を添加する；
- 13000rpmで2分間、遠心分離する；
- 150μlの上清に対して414nmにおける光学密度を読み取る。

10

【0025】

さらに、当業者は、本発明によるポリペプチドが野生型BGL1タンパク質よりもグルコース阻害に対して感受性が低いかどうかを決定するために、50℃で1時間30分間にわたり、15mMのpNPGおよび60g/lのグルコースを含むpH5の100mMコハク酸塩緩衝液100μlと共に50μlの細胞をインキュベートすることによって、上記プロトコルを使用することができる。

【0026】

これらのプロトコルは、特に配列番号5のアミノ酸配列の100B11ポリペプチドと比較した、約30℃から約35℃の間の温度条件下でのペー タ-グルコシダーゼ活性の増強を測定するために、容易に適応可能である。

20

【0027】

本発明は、配列番号1のアミノ酸配列のポリペプチドをコードする核酸にも関する。優先的に、この核酸は、配列番号2の核酸配列を含む。

【0028】

本発明は、以前に記載した核酸を含むベクターにも関する。

【0029】

本発明によれば、用語「ベクター」は、外来核酸断片を挿入することが可能な任意のDNA配列を意味する意図であり、このベクターは、外来DNAを宿主細胞中に導入するのを可能にする。ベクターの例は、プラスミド、コスミド、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)およびP1バクテリオファージ由来人工染色体(PAC)、ならびにウイルス由来ベクターである。

30

【0030】

本発明によれば、以前に記載した核酸はまた、プロモーター、ターミネーターまたは宿主細胞におけるその発現に必要な任意の他の配列に機能的に連結され得る。

【0031】

本発明によるベクターは、選択マーカーもまた保有し得る。用語「選択マーカー」は、この選択マーカーを含む細胞に、かかる細胞を選択することを可能にする特徴をその発現が付与する遺伝子を意味する意図である。例えば、これは、抗生物質に対する耐性の遺伝子である。

40

【0032】

本発明の主題は、以前に記載された本発明のポリペプチドを生成することができる、または本発明の前記ポリペプチドをコードする核酸を含むことができる、単離された宿主細胞でもある。

【0033】

当業者は、周知の従来の方法によって、少なくとも以前に記載されたポリペプチド、核酸またはベクターを宿主細胞中に導入することができる。例えば、塩化カルシウム処理、エレクトロポレーション、またはパーティクルガンの使用に言及がなされ得る。

【0034】

一実施形態によれば、当業者は、本発明による増強されたペー タ-グルコシダーゼ活性

50

を有するポリペプチドをコードする数コピーの核酸を宿主細胞中に従来の方法によって導入することができる。

【0035】

一実施形態によれば、以前に記載された単離された宿主細胞は、トリコデルマ属、アスペルギルス属、ニューロスポラ属(*Neurospora*)、フミコラ属、マイセリオフトーラ属(*Myceliophthora*)、クリソスポリウム属(*Chrysosporium*)、ペニシリウム属(*Penicillium*)、フサリウム属、サーモモノスポラ属、バチルス属、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、クロストリジウム属(*Clostridium*)、セルロモナス属、ストレプトマイセス属、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)およびサッカロマイセス属(*Saccharomyces*)から選択される。

10

【0036】

好ましい一実施形態によれば、以前に記載された単離された宿主細胞は、トリコデルマ・リーゼイ、トリコデルマ・ヴィリダエ(*Trichoderma viridae*)、トリコデルマ・コニング(*Trichoderma koningii*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*)、マイセリオフトーラ・サーモフィラ(*Myceliophthora thermopila*)、クリソスポリウム・ラクノウェンス(*Chrysosporium lucknowense*)、アスペルギルス・ウェンティ(*Aspergillus wentii*)、アスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・フォエニシス(*Aspergillus phoenicis*)、ニューロスポラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)、フミコラ・グリセア(*Humicola grisea*)、ペニシリウム・ピノフィラム(*Penicillium pinophilum*)、ペニシリウム・オキサリカム(*Penicillium oxalicum*)、エシェリキア・コリ、クロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・サッカロリティカム(*Clostridium saccharolyticum*)、クロストリジウム・ベイジェリンキ(*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・ブチリカム(*Clostridium butylicum*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、サッカロマイセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)およびそれらの混合物から選択される。

20

【0037】

好ましい一実施形態によれば、以前に記載された単離された宿主細胞は、トリコデルマ・リーゼイおよびサッカロマイセス・セレビスエから選択される。

【0038】

本発明は、ベータ-オリゴ糖の加水分解のための、以前に記載されたポリペプチドの、または以前に記載された細胞の任意の1つの使用にも関する。

30

【0039】

本発明は、グルコースへのセロビオースの加水分解のための、以前に記載されたポリペプチドの、または以前に記載された細胞の任意の1つの使用にも関する。

【0040】

本発明の主題は、バイオ燃料の生成のための、以前に記載されたポリペプチドの、または以前に記載された細胞の任意の1つの使用にも関する。

【0041】

本発明によれば、用語「バイオ燃料」は、バイオマスの変換から生じ、エネルギー目的のために使用され得る、任意の生成物として規定され得る。第1に、限定を望まないが、例として、バイオガス、燃料中に(任意選択で引き続く変換後に)取り込まれ得る生成物、またはそれ自体燃料であり得る生成物、例えば、アルコール(使用される発酵性生物の型に依存して、エタノール、ブタノールおよび/またはイソプロパノール)、溶媒(アセトン)、酸(酪酸)、脂質およびその誘導体(短鎖または長鎖脂肪酸、脂肪酸エステル)、ならびにまた水素に対して、言及がなされ得る。

40

【0042】

好ましくは、本発明によるバイオ燃料は、アルコール、例えば、エタノール、ブタノールおよび/またはイソプロパノールである。より好ましくは、本発明によるバイオ燃料は、エタノールである。

50

【 0 0 4 3 】

別の一実施形態では、このバイオ燃料はバイオガスである。

【 0 0 4 4 】

別の一実施形態では、この生成物は、化学産業において有利な分子、例えば、他のアルコール、例えば1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、1,4-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、有機酸、例えば酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、酪酸、コハク酸、リンゴ酸、フマル酸、クエン酸もしくはイタコン酸、またはヒドロキシ酸、例えばグリコール酸、ヒドロキシプロピオン酸もしくは乳酸である。

【 0 0 4 5 】

バイオ燃料の生成に加えて、30 から35 の間の温度で増強されたベータ-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドは、種々の基質の加水分解を触媒することによって、他の型の適用においても使用され得、したがって、種々の芳香/風味の放出を可能にする。例として、これは、果実内に存在するいくつかのグルコシドを加水分解することによってこれらの果実の風味を放出するために使用され得、あるいはブドウのモノターフェニルベータ-グルコシドを加水分解し、したがって、ワインの風味の重要な供給源を提示することができる。結果として、以前に記載されたポリペプチドは、いくつかの分野、特に、香水製造、食品産業、ワイン醸造学などにおいて、使用され得る。

10

【 0 0 4 6 】

本発明によるポリペプチドを発現することが可能な糸状菌、好ましくはトリコデルマ属、より好ましくはトリコデルマ・リーゼイの株は、この微生物の増殖のために選択された、ラクトースまたはグルコースなどの炭素ベースの基質の存在下で、発酵槽において培養される。一実施形態では、この炭素ベースの基質は、その性質に依存して、20~35g/lの開始濃度を得るために、滅菌前に発酵槽中に導入されるか、または別々に滅菌されて後者の滅菌後に発酵槽中に導入される。

20

【 0 0 4 7 】

次いで、酵素の生成のために選択された基質を含む水溶液が添加される。真菌によって生成される、リグノセルロース系バイオマスに対して作用する酵素組成物が、培養培地の濾過によって最終的に回収される。この組成物は、特に、エンドグルカナーゼ、エキソグルカナーゼおよび本発明によるベータ-グルコシダーゼを含む。一実施形態では、酵素の生成のために選択された基質を含む水溶液は、200~250g/lの濃度で調製され、この溶液は、ラクトースなどのインデューサー基質を含まなければならない。この水溶液は、35mg/gから45mg/gの間の細胞の最適化された量を提供するために、最初の炭素ベースの基質の枯渇後に注入される(流加)。この流加期の間、培養培地中の糖の残留濃度は、1g/l未満であり、リグノセルロース系バイオマスに対して作用する酵素は、真菌によって分泌される。この酵素は、培養培地の濾過によって回収され得る。

30

【 0 0 4 8 】

本発明の主題は、リグノセルロース系バイオマスに対して作用する酵素組成物であり、この酵素組成物は、糸状菌または酵母によって生成され、以前に記載されたポリペプチドを含む。

【 0 0 4 9 】

最後に、本発明の主題は、バイオマスからバイオ燃料を生成するための方法であって、以下の工程：

40

- 加水分解しようとする材料を水相に懸濁させる工程；
- 酵素組成物の存在下で、以前に記載されたリグノセルロース系バイオマスを加水分解して、グルコースを含有する加水分解物を生成する工程；
- 加水分解物のグルコースを発酵させる工程；
- 発酵マストからバイオ燃料を分離する工程

を含み、加水分解工程および発酵工程が同時に実施されることを特徴とする方法である。

【 0 0 5 0 】

本発明の別の主題は、バイオマスからバイオ燃料を生成するための方法であって、以下

50

の工程：

- 加水分解しようとするバイオマスを水相に懸濁させる工程；
- 以前に規定されたリグノセルロース系バイオマスに対して作用する酵素組成物および発酵性生物を同時に添加し、インキュベートする工程；
- 発酵マストからバイオ燃料を分離する工程

を含むことを特徴とする方法である。

【0051】

本発明の別の主題は、バイオマスからバイオ燃料を生成するための方法であって、以下の連続工程：

- 加水分解しようとするバイオマスを水相に懸濁させる工程；
- 30 から35 の間の温度で、以前に規定された1または複数のセルロース分解性生物および/または発酵性生物を添加して、発酵マストを生成する工程；
- 発酵マストからバイオ燃料を分離する工程

を含むことを特徴とする方法である。

【0052】

この実施形態によれば、バイオマス中に存在するセルロースはグルコースに変換され、同時に、同じリアクタ中で、発酵性生物(例えば酵母)は、当業者に公知のSSF(同時糖化および発酵)プロセスに従って、グルコースを最終生成物に変換する。発酵性生物の代謝能力および加水分解能力に依存して、操作の正確な実施は、より多いまたはより少ない量の外因性セルロース分解性混合物の添加を必要とし得る。

【0053】

別の一実施形態では、この発酵性生物は、任意選択でリグノセルロース系バイオマスに対して作用する他の酵素と一緒に、分泌によってまたはその細胞の表面上に、本発明の主題であるポリペプチドを生成し、したがって、糸状菌によって生成される酵素の必要性を限定するまたは排除する。

【0054】

したがって、本発明による、約30 から約35 の間の温度でより良好なベータ-グルコシダーゼ活性を示すポリペプチドの使用は、より良いグルコース生成収量を得るという利点を有する。したがって、本発明は、以前よりも少ない酵素を使用することを可能にし、経済的利点を有し、例えばバイオ燃料の生成コストはより少ない。

【0055】

本発明の他の態様、主題、利点および特徴は、以下の、例として示される本発明の好ましい実施形態を説明する非制限的な記載を読めば、示されている。

【実施例】

【0056】

(実施例1)

第1ラウンドのシャッフリング

トリコデルマ・リーゼイベータ-グルコシダーゼ遺伝子の配列(親遺伝子BGL1、配列番号4)を、BGL1親遺伝子と70%の同一性を有するケトミウム・グロボサム(*Chaetomium globosum*)の推定グルコシダーゼ遺伝子(遺伝子A)(配列番号7、核酸配列配列番号8によってコードされる)との、欧州特許第1104457号に記載される特許されたプロセスに従う第1ラウンドのシャッフリングに供した。

【0057】

1-ハイスループットスクリーニング

ハイスループットスクリーニング試験により、これら2つの配列のシャッフリングから生じる最良のクローン、即ち、トリコデルマ・リーゼイ由来のBGL1親遺伝子と比較した場合にベータ-グルコシダーゼ活性レベルにおいて2よりも大きい増強係数を有するクローンを選択することが可能になる。

【0058】

第1ラウンドのシャッフリングのライブラリースクリーニング試験を、以下の工程に従

10

20

30

40

50

って実施した：

- 本発明による組換え酵素のシャッフリングバリエーションを発現するエシェリキア・コリの種々のコロニーを寒天上で単離し、前記コロニーをLB培地中で37℃で一晩、前培養する；
- 3%のLB培地にこの前培養物を接種し、次いで37℃で4時間インキュベートする；
- 100 μ M イソプロピル- β -D-ガラクトシド (IPTG) を添加することによりバリエーションの発現を誘導し、次いで20℃で一晩インキュベートする；
- 13000rpmで2分間、遠心分離する；
- 細胞ペレットを2.2mMのpara-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (pNPG) を含有する0.1Mコハク酸塩緩衝液100 μ lに再懸濁させる；
- 室温で3時間インキュベートする；
- アルカリ化後、414nmにおける光学密度を読み取る。

10

【0059】

これらのスクリーニング条件下で、BGL1参照酵素と比較して β -グルコシダーゼ活性の増強を示すいくつかのクローンを同定した。

【0060】

2- β -グルコシダーゼ活性の増強の決定

2-1/pNPG基質に対して

第1ラウンドのシャッフリングにおいて選択されたバリエーションの相対的kcatを決定するために、以下の手順を実施した：

20

- 本発明による組換え酵素を発現するエシェリキア・コリのストック培養物を37℃で一晩、形成させる；
- LB培養培地に1%ストック培養物を接種してIPTG (250 μ M) によって誘導しながら20℃で24時間置く；
- 13000rpmで2分間、遠心分離する；
- 細胞ペレットをpH5の100mMコハク酸塩緩衝液で再懸濁させる (最終OD₆₀₀=100)；
- 50 μ lの細胞を、15mMのpara-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (pNPG) を含むpH5の100mMコハク酸塩緩衝液100 μ lと共に50℃で1時間30分間インキュベートし、その後氷上で5分間置く；
- 150 μ lの0.2M Na₂CO₃を添加する；
- 13000rpmで2分間、遠心分離する；
- 150 μ lの上清に対して、414nmにおける光学密度を読み取る。

30

【0061】

Table 2(表1)は、これらの実験条件下で、以前に同定された3つのクローン (10H7、59B8および164A2と呼ぶ) について得られたkcat値およびまた増強係数を示す。

【0062】

【表1】

TABLE 2: β -グルコシダーゼ活性の増強

(誘導された培養物の結果)

40

	クローン	K _{cat} (分 ⁻¹)	増強係数
第1ラウンドのクローン	10H7	590.0	8
	59B8	518.6	7
	164A2	1437.3	20
参照タンパク質	BGL1	71.0	1

【0063】

これらの結果は、3つのクローン10H7、59B8および164A2について、野生型酵素 (BGL1) と比較した酵素活性の非常に顕著な増強を示す。

【0064】

50

2-2/セロピオースに対して

次いで、10H7、59B8および164A2クローンの活性の増強を、第2の基質:セロピオースに対して確認した。

【0065】

この試験を、本発明による組換え酵素を発現するエシェリキア・コリの培養物に対して実施した。この試験の工程は以下の通りである:

- LB培養培地に、IPTGで誘導した1%のストック培養物を接種し、次いで、37℃で一晩インキュベートする;
- 前記細胞を、600nmにおける0.4の光学密度が得られるまで、37℃で培養する;
- 前記細胞を250 μ M IPTGによって20℃で20時間、誘導する;
- 培養培地のグルコースを除去するために、100mMコハク酸塩緩衝液、pH5中で細胞ペレットを3回洗浄する;
- マイクロプレート中で50℃で12時間、10 μ lの前記細胞および190 μ lの263.2mMセロピオース(最終濃度250mM)からなる反応ミックス(RM1)を調製する;
- マイクロプレート中で50℃で12時間インキュベートする。

10

【0066】

顕色:

- 以下からなる反応ミックス(RM2)を調製する:
 - 10 μ lのRM1、
 - 90 μ lの100mMコハク酸塩緩衝液、pH5、
 - 5 μ lのグルコースオキシダーゼ、44U/ml。

20

【0067】

- 室温で1時間インキュベートする。

【0068】

- 以下を混合し、室温で30分間インキュベートする:
 - 10 μ lのRM2、
 - 2 μ lの西洋ワサビペルオキシダーゼ、10U/ml、
 - 5 μ lの100mM ABTS、
 - 83 μ lの50mMリン酸塩緩衝液、pH7.4。

【0069】

- 420nmにおける光学密度を読み取る。

30

【0070】

【表2】

TABLE 3:ベータ-グルコシダーゼ活性の増強

(誘導された培養物の結果)

	クローン	$K_{cat}(\text{分}^{-1})$	増強係数
第1ラウンドのクローン	10H7	69.1	13
	59B8	37.7	7
	164A2	213.2	41
参照タンパク質	BGL1	5.2	1

40

【0071】

同様に、これらの結果は、セロピオースを基質として使用した場合の、10H7、59B8および164A2クローンについて、野生型酵素(BGL1)と比較した酵素活性の非常に顕著な増強を示す。

【0072】

(実施例2)

第2ラウンドのシャッフリング

50

第1ラウンドのシャッフリングにおいて得られた増強された遺伝子の配列を、引き続いて、第2ラウンドのシャッフリング(これも欧州特許第1104457号に記載される特許されたプロセスに従う)に供した。遺伝的多様性を増加させるために、野生型BGL1酵素に対して70%の同一性を有するベータ-グルコシダーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を追加した。

【0073】

より具体的には、ニューロスボラ・クラッサの推定グルコシダーゼ遺伝子(遺伝子C)(配列番号10の核酸配列によってコードされる配列番号9)を使用した。

【0074】

1-ハイスループットスクリーニング

10

最良のクローン、即ち、164A2クローンと比較した場合にベータ-グルコシダーゼ活性レベルにおいて2よりも大きい増強係数を有するクローンを選択するために、以前に記載されたハイスループットスクリーニング試験(IPTG誘導工程を例外とするが、これは、第1ラウンドのシャッフリングにおいて提供された増強が、プロモーター漏出のみに基づいたベータ-グルコシダーゼ活性の検出を可能にするからである)を、この第2ラウンドのシャッフリング後に得られたクローンに対して実施した。

【0075】

これらのスクリーニング条件下で、参照酵素(164A2)と比較したベータ-グルコシダーゼ活性の増強が、特に100B11(配列番号6の核酸配列によってコードされる配列番号5)クローンおよび115E1(配列番号12の核酸配列によってコードされる配列番号11)クローンを含むいくつかのクローンにおいて見出された。

20

【0076】

2-ベータ-グルコシダーゼ活性の増強の決定

2-1/pNPGに対して

相対的 k_{cat} を決定するために、100B11クローンおよび115E1クローンの活性を、以前に記載された活性試験によって測定した。

【0077】

Table 4(表3)は、これらの実験条件下で、100B11クローンおよび115E1クローンについて得られた k_{cat} 値およびまた増強係数を示す。

【0078】

30

【表3】

TABLE 4:ベータ-グルコシダーゼ活性の増強

(誘導された培養物の結果)

	クローン	$K_{cat}(\text{分}^{-1})$	増強係数
第2ラウンドのクローン	100B11	4342.8	3.0
	115E1	3989.2	2.8
参照タンパク質	164A2	1437.3	1

【0079】

40

これらの結果は、100B11クローンおよび115E1クローンについて、参照酵素(164A2)およびBGL1(X60)と比較した酵素活性の非常に顕著な増強を示す。

【0080】

2-2/セロピオースに対して

次いで、100B11クローンおよび115E1クローンの活性の増強を、第2の基質:セロピオースに対して確認した。

【0081】

相対的 k_{cat} を決定するために、100B11クローンおよび115E1クローンの活性を、実施例1の項目2-2に記載したように基質としてセロピオースを使用して、以前に記載されたように50での活性試験によって測定した。

50

【 0 0 8 2 】

【表 4】

TABLE 5:ベータ-グルコシダーゼ活性の増強

(誘導された培養物の結果)

	クローン	$K_{cat}(\text{分}^{-1})$	増強係数
第2ラウンドのクローン	100B11	387.2	1.8
	115E1	406.4	1.9
参照タンパク質	164A2	213.2	1

10

【 0 0 8 3 】

同様に、これらの結果は、セロピオースを基質として使用した場合の、100B11クローンおよび115E1クローンについて、参照酵素(164A2)と比較した酵素活性の非常に顕著な増強を示す。

【 0 0 8 4 】

(実施例3)

第3ラウンドのシャッフリング

第2ラウンドのシャッフリングにおいて得られた14の増強された遺伝子(138E12、134G2、100B11、115E1、99G11、127B12、91F6、135F9、116D9、212D11、210A6、124F5、129D2および141F7)の配列を、引き続いて、第3ラウンドのシャッフリング(これも欧州特許第11 04457号に記載される特許されたプロセスに従う)に供した。遺伝的多様性を増加させるために、これらの遺伝子に対して70%の同一性を有するベータ-グルコシダーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を追加した。この正確な実施例において、ニューロスボラ・クラッサの推定ベータ-グルコシダーゼ遺伝子(遺伝子C)(配列番号10の核酸配列によってコードされる配列番号9)およびケトミウム・グロボサムの推定ベータ-グルコシダーゼ遺伝子(遺伝子A)(配列番号8の核酸配列によってコードされる配列番号7)を使用した。

20

【 0 0 8 5 】

1-ハイスループットスクリーニング

以前に記載されたハイスループットスクリーニング試験(IPTG誘導工程を例外とするが、これは、第1ラウンドのシャッフリングにおいて提供された増強が、プロモーター漏出のみに基づいたベータ-グルコシダーゼ活性の検出を可能にするからである)を、この第3ラウンドのシャッフリング後に得られたクローンに対して実施した。これらのクローンの活性を、30 および50 において測定した。

30

【 0 0 8 6 】

これらのスクリーニング条件下で、有利な30 /50 活性比を有するので、17E5クローン(配列番号2の核酸配列によってコードされる配列番号1のアミノ酸配列のもの)を選択した。

【 0 0 8 7 】

Table 6 (表5)は、17E5クローンおよび100B11クローン(第2ラウンドのシャッフリングから得られた参照クローン)についての、50 および30 において得られた相対的活性を示す。

40

【 0 0 8 8 】

【表 5】

TABLE 6:30℃での相対的活性

	50℃	30℃
17E5	100%	80%
100B11	100%	53%

50

【 0 0 8 9 】

これらの結果は、17E5クローンが、100B11クローンについての53%に対して、50 におけるその活性と比較して30 における80%の活性を保持することを示す。

【 0 0 9 0 】

さらに、その比活性は、100B11酵素の比活性よりも、2倍大きい。

【 0 0 9 1 】

2-ベータ-グルコシダーゼ活性の決定

相対的kcatを決定するために、17E5クローンの活性を、以前に記載された活性試験によって、30 および50 において測定した。

【 0 0 9 2 】

Table 7(表6)は、これらの実験条件下での、17E5クローンについて得られたkcat値およびまた増強係数を示す。

【 0 0 9 3 】

【表 6】

TABLE 7:30℃におけるベータ-グルコシダーゼ活性の増強
(非誘導培養物の結果)

	kcat(分 ⁻¹)		増強係数	
	30℃	50℃	30℃	50℃
17E5	4.2	10.94	2.32	2.17
100B11	1.81	5.03		

【 0 0 9 4 】

これらの結果は、参照クローンと比較して2倍の、17E5クローンの酵素活性の増強を示し、これは、両方の温度においてである。

【 0 0 9 5 】

(実施例4)

トリコデルマ・リーゼイにおけるベータ-グルコシダーゼの増強されたバリエーションの発現

17E5遺伝子を、ハイグロマイシン(ストレプトマイセス・ハイグロスコピカス(*Streptomyces hygroscopicus*)Hph遺伝子)を使用した選択を用いて、RUT C30(ATCC 56765)から誘導したトリコデルマ・リーゼイ株CL847(Durandら、Enzyme Microb. Technol., 1988;10:341~346)における発現を可能にするベクター中にクローニングした。この17E5遺伝子を、他のトリコデルマ・リーゼイセルラーゼと同時に誘導可能な強いcbh1プロモーターの制御下に置いた。

【 0 0 9 6 】

トリコデルマ・リーゼイの形質転換を、当業者に公知の従来の方法に従って実施した(カルシウムショックによるプロトプラストの形質転換および50 μg/mlハイグロマイシンによる選択)。形質転換体を、胞子形成によって精製し、次いで、不安定なクローンを排除するために、選択培地中で2回継代培養した。

【 0 0 9 7 】

次いで、30個のクローンを、24ウェルプレートにおいてセルラーゼ生成に関して評価した。各クローンの数個の胞子を使用して、以下の組成を有する培地2mlを接種した:20g/l ラクトース、20g/l Solka flocセルロース、5g/lペプトン、15g/l KH₂PO₄、5g/l (NH₄)₂SO₄、0.6g/l CaCl₂、0.6g MgSO₄、0.005g/l FeSO₄、0.0014g/l MnSO₄、0.0014g/l ZnSO₄、0.0037g/l CoCl₂、11.6g/lのマレイン酸、12.1g/lのtrisおよび2.08g/lのNaOH。フラスコを、150rpmで振盪しながら30 でインキュベートした。

【 0 0 9 8 】

5日後、培養物を遠心分離し、上清のタンパク質濃度を、Folin法を使用して測定した。上清のベータ-グルコシダーゼ活性を、以下の条件下で、パラ-ニトロフェニルベータ-D-グルコピラノシド (pNPG) 発色団基質の加水分解によって測定した:

- 50mMのクエン酸塩緩衝液、pH4.8
- 5mMのpNPG
- 10 μ lのサンプル
- 30 分で30分間のインキュベーション。

【 0 0 9 9 】

この反応を、100 μ lの2%炭酸ナトリウムを添加することによって停止させた。pNPGの加水分解によって放出されたパラ-ニトロフェノールの量を、410nmにおける吸光度を測定することによって測定し、パラ-ニトロフェノール範囲と比較した。この反応は、25 μ Mから400 μ Mまでのパラ-ニトロフェノールで線形であった。これらのサンプルを、測定された吸光度がその範囲の線形性を維持するように、任意選択で希釈した。ベータ-グルコシダーゼ活性を、比較のために、上記と同じ条件下で50 においても測定した。最も高いベータ-グルコシダーゼ活性(元の株と比較して、少なくとも5倍大きい)を示すクローンを選択した。

10

【 0 1 0 0 】

Table 8(表7)は、それぞれ、上記方法に従って得られた、野生型CL847株由来の、バリエーション100B11を発現する株由来の、およびバリエーション17E5を発現するクローンのうち1つ由来の上清についての、酵素の μ mol/min/mgで測定された30 /50 のpNPaseベータ-グル

20

【 0 1 0 1 】

【表 7】

Table 8:100B11 ポリペプチドおよび 17E5 ポリペプチドの、野生型 CL847 のベータ-グルコシダーゼ活性

	30°C/50°C	30°Cにおける比活性	50°Cにおける比活性
	活性比		
CL847	0.2	0.06	0.3
100B11	0.3	3.7	12.5
17E5	0.5	4.7	9.5

30

【 0 1 0 2 】

30 /50 比における増加は、17E5クローンにおいて顕著であり、30 の温度で、100B11バリエーションの比活性よりも高い比活性である。

【 0 1 0 3 】

(実施例5)

サッカロマイセス・セレビシエにおける、野生型ベータ-グルコシダーゼ(BGL1)ならびに増強されたバリエーション100B11および17E5の組換え発現

40

1-酵母細胞質におけるBGL1、100B11および17E5タンパク質の生成:

トリコデルマ・リーゼイの野生型ベータ-グルコシダーゼ遺伝子(BGL1)ならびにまた100B11バリエーションおよび17E5バリエーションのベータ-グルコシダーゼ遺伝子を、pESC-Leuベクター(Agilent Technologies社)中に、シグナルペプチドなしでクローニングした。この構築物は、ロイシンおよびトリプトファンに関して栄養要求性のサッカロマイセス・セレビシエBY100株の細胞質におけるタンパク質の発現を可能にする(Boder ETおよびWittrup KD、Biotechnol Prog、1998、14:55~62)。このプラスミドは、ガラクトース誘導性GAL1プロモーターの制御下の遺伝子発現を生じさせることを可能にし、形質転換体の選択を可能にする選択可能な栄養要求性マーカー遺伝子(Leu2)を有する。生成されたタンパク質は、

50

最後に、N末端のc-mycタグに融合され、アフィニティークロマトグラフィーによる、生成された酵素の検出および精製を可能にする。

【 0 1 0 4 】

サッカロマイセス・セレビシエEBY100の形質転換を、当業者に公知の従来の方法に従って実施した(ヒートショックおよび酢酸リチウムによる酵母の形質転換)。形質転換体を、0.67%のYeast Nitrogen Base(YNB)、2%のグルコースおよび0.01%のトリプトファンを含むYNB-Glc-Trp培地上で選択した。

【 0 1 0 5 】

各遺伝子について1つの形質転換体(Sc-BGL1、Sc-100B11およびSc-17E5)を使用して、0.67%のYNB、0.5%のカザミノ酸(CAA)、0.01%のトリプトファンおよび2%のグルコースを含む15mlのYNB-Glc-CAA-Trp最少培地を接種した。220rpmで振盪しながら30 での24時間の前培養後、3つのSc-BGL1、Sc-100B11およびSc-17E5株を使用して、0.67%のYNB、0.5%のCAA、0.01%のトリプトファンおよび2%のガラクトースを含む150mlのYNB-Gal-CAA-Trp培地を、(0.5のOD₆₀₀で)接種した。この培養物を、220rpmで振盪しながら25 でインキュベートした。

10

【 0 1 0 6 】

4日間のインキュベーション後、20mlの培養物を、3000g、4 で5分間遠心分離した。酵母ペレットを、3mlの50mMクエン酸塩緩衝液、pH5中に取り、2.5kbarの圧力で機械的に溶解させた。50000g、4 で30分間、遠心分離した後に、細胞質抽出物を得た。

【 0 1 0 7 】

2-ベータ-グルコシダーゼ活性の決定

細胞質抽出物中の総タンパク質濃度は、Bradfordアッセイ(Bradford MM., Anal Biochem, 1976, 72:248~54)によって、平均して1.7mg/mlであると概算された。

【 0 1 0 8 】

細胞質抽出物のベータ-グルコシダーゼ活性を、以下の条件下で、600 μ lの容量において、パラ-ニトロフェニルベータ-D-グルコピラノシド(pNPG)基質の加水分解によって測定した：

- 50mMのクエン酸塩緩衝液、pH5
- 5mMのpNPG
- 6.1 μ gの総タンパク質を含む3.6 μ lの細胞質抽出物
- 30 または50 における30分間のインキュベーション。

30

【 0 1 0 9 】

この反応を、100 μ lの加水分解反応に100 μ lの1M炭酸ナトリウムを添加することによって停止させた。pNPGの加水分解によって放出されたパラ-ニトロフェノール(pNP)の濃度を、415nmにおける吸光度を測定することによって決定し、標準範囲のパラ-ニトロフェノール(0.36 μ Mから360 μ Mまで線形)と比較した。これらの細胞質抽出物を、最初の反応速度条件下になるように、任意選択で希釈した。

【 0 1 1 0 】

Table 9(表8)は、それぞれ、野生型酵素を発現する株(Sc-BGL1)由来の、100B11を発現する株(Sc-100B11)由来の、および17E5を発現する株(Sc-17E5)由来の細胞質抽出物について、 μ mol.min⁻¹.mg⁻¹の総タンパク質で測定された、30 /50 ベータ-グルコシダーゼ活性比を示す。

40

【 0 1 1 1 】

【表 8】

Table 9: Sc-BGL1、Sc-100B11 および Sc-17E5 のベータ-グルコシダーゼ活性

	30℃における比活 性	50℃における比活 性	30℃/50℃ 活 性比	野生型 BGL1 と比較し た、30℃における比活 性の増強
Sc-BGL1	0.15	0.41	0.4	-
Sc-100B11	0.18	0.64	0.3	1.2
Sc-17E5	0.46	1.12	0.4	3.1

10

【0112】

これらの結果は、30℃におけるSc-17E5株の比活性が、Sc-BGL1株と比較して3倍、およびSc-100B11と比較して2.5倍大きいことを示す。

【0113】

(実施例6)

サッカロマイセス・セレビシエにおいて生成された野生型ベータ-グルコシダーゼ(BGL1)ならびに増強されたバリエーション100B11および17E5の精製ならびに特徴付け

1-ベータ-グルコシダーゼ精製:

20

実施例5のSc-BGL1ならびにSc-100B11およびSc-17E5バリエーションの細胞質抽出物を使用して、以下のプロトコルに従って、対応する酵素BGL1、100B11および17E5を精製した:

500 μ lの細胞質抽出物を、軸振盪しながら4℃で1時間、20 μ lの「Anti-c-Myc tag Gel」樹脂(MBL社)と共にインキュベートした。13000rpmで10秒間の遠心分離後、樹脂を1 \times PBSで3回洗浄した。1mg.mL⁻¹のc-mycペプチド(EQKLISEEDL)から構成される溶出溶液中で4℃で5分間の樹脂のインキュベーション後、タンパク質の溶出を、13000rpmで10秒間の遠心分離によって実施した。

【0114】

2-ベータ-グルコシダーゼ活性の決定

精製された酵素の濃度を、ネイティブBGL1について120 125M⁻¹.cm⁻¹ならびに100B11および17E5について120 250M⁻¹.cm⁻¹と等しいモル吸光係数を使用して、ナノドロップ(nano drop)を用いて280nmで吸光度を測定することによって得た。この濃度は、平均して0.19mg/mlと等しい。

30

【0115】

各酵素の純度を、クマシーブルーを使用するタンパク質染色を用いて、SDSの存在下で、10%ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動によって検証した。

【0116】

BGL1ならびに精製された100B11および17E5バリエーションの活性を、以前に記載したように、30℃および50℃において測定した。

【0117】

40

Table 10(表9)は、30℃および50℃でのpNPGの加水分解の間に決定された各酵素の比活性(μ mol.min⁻¹.mg⁻¹の酵素)を示す。

【0118】

【表 9】

Table 10: 精製された BGL1、100B11 および 17E5 のベータ-グルコシダーゼ活性

	30℃における比活性	50℃における比活性	30℃/50℃ 活性比	野生型 BGL1 と比較した、30℃における比活性の増強
	性	性	性比	
BGL1	5.1	8.9	0.57	-
100B11	7.1	17.2	0.41	1.4
17E5	10.2	23.6	0.43	2.0

10

【 0 1 1 9 】

これらの結果は、野生型BGL1と比較して2倍の、および100B11バリエーションと比較して1.4倍の、17E5バリエーションの比活性の、30℃における増強を示す。

【配列表】

0006207609000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 0 L	1/02	(2006.01)	C 1 0 L 1/02
C 1 0 L	3/00	(2006.01)	C 1 0 L 3/00 Z

(73)特許権者 500174661

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・レシエルシュ・サイエンティフィック・セ・エン・エール・エ
ス -

フランス・F - 7 5 7 9 4・パリ・セデックス・1 6・リュ・ミシェル・アンジュ・3

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(74)代理人 100133400

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 アントワーン・マルジョー

フランス・F - 7 5 0 1 8・パリ・リュ・マルカデ・2 1 2

(72)発明者 ユーグ・マチス

フランス・F - 7 7 6 0 0・ブシー・サン・ジョルジュ・ブラス・フルジョンス・ビヤングニ
ユ・3 0

(72)発明者 セリーヌ・エーリナック

フランス・F - 3 0 3 5 0・ドムサルグ・ロティスモン・ル・コトー・7

(72)発明者 クリストフ・ウルマン

フランス・F - 3 0 0 0 0・ニーム・リュ・ドゥパルシュー・5

(72)発明者 セシール・ペルシロン

フランス・F - 3 0 0 0 0・ニーム・リュ・ドゥ・ラ・コンテス・3

(72)発明者 セバスチャン・フォル

フランス・F - 3 8 4 1 0・ユリアージュ・シュマン・デュ・パルク・5 5

(72)発明者 シルヴィエ・アルマン

フランス・F - 3 8 1 0 0・グルノーブル・リュ・マルキアン・2 3

(72)発明者 モード・プチ

フランス・F - 3 8 7 0 0・ラ・トロンシュ・リュ・マリー・ヴォレ・4

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0171674(US, A1)

米国特許出願公開第2010/0304438(US, A1)

国際公開第2010/148148(WO, A2)

特開平02-219584(JP, A)

特開平08-214897(JP, A)

特表2005-512545(JP, A)

International Journal of Biological Sciences, 2009, 5(6), pp.578-595

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
UniProt/GenSeq