

(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
2014年10月2日(02.10.2014)



(10) 国際公開番号

WO 2014/157141 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058189
- (22) 国際出願日: 2014年3月25日(25.03.2014)
- (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 2013-062795 2013年3月25日(25.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 近藤 昭彦(KONDO, Akihiko); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 蓮沼 誠久(HASUNUMA, Tomohisa); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 猪熊 健太郎(INOKUMA, Kentaro); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 進藤 卓也, 外(SHINDO, Takuya et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

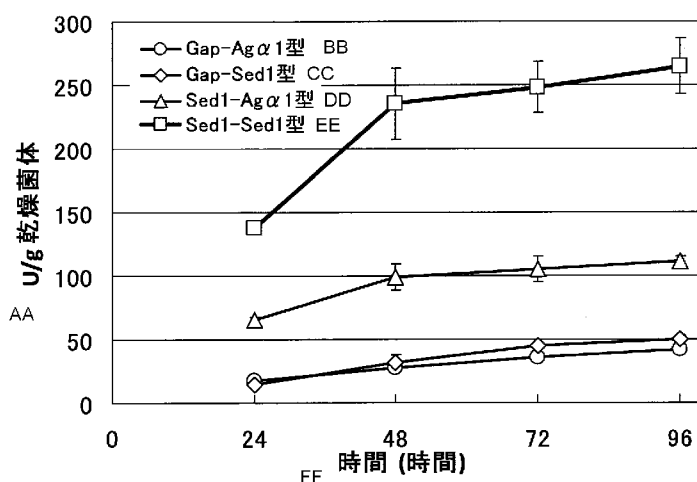
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE FOR CELL SURFACE LAYER EXPRESSION

(54) 発明の名称: 細胞表層発現用ポリヌクレオチド

[図1]



AA U/g dry bacterial cell
BB Gap-Agα1 type
CC Gap-Sed1 type

DD Sed1-Agα1 type
EE Sed1-Sed1 type
FF Time (hours)

(57) Abstract: The present invention discloses a polynucleotide for cell surface layer expression. This polynucleotide comprises a promoter, a secretion signal sequence, a sequence for encoding a target protein, and a sequence for encoding the protein localized to the cell surface layer or the cell membrane binding region thereof, and the promoter is a promoter of a gene encoding the protein localized to the cell surface layer. Provided is a polynucleotide for cell surface layer expression that enables production of yeast containing a highly active enzyme that is present in the cell surface layer.

(57) 要約: 細胞表層発現用ポリヌクレオチドが開示される。本発明のポリヌクレオチドは、プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、および細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列を含み、該プロモーターが、該細胞表層局在タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターである。高い活性で細胞表層に提示される酵素を有する酵母の作製を可能とする細胞表層発現用ポリヌクレオチドが提供される。



-
- 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))

明 細 書

発明の名称：細胞表層発現用ポリヌクレオチド

技術分野

[0001] 本発明は、細胞表層発現用ポリヌクレオチドに関し、より詳細には、高い活性で細胞表層に提示される酵素を有する酵母の作製を可能とする細胞表層発現用ポリヌクレオチドに関する。

背景技術

[0002] 近年、化石燃料の枯渇が危惧される中、その代替燃料の開発が進められている。中でもバイオマスに由来するバイオエタノールが注目されている。バイオマスは、再生可能な資源であり、地球上に大量に存在し、そして使用しても大気中の二酸化炭素が増えず（カーボンニュートラル）、地球温暖化防止に寄与できるからである。

[0003] ソフトバイオマスの主成分であるセルロース、ヘミセルロースなどを本来資化することができない発酵微生物を、生物工学的手法を用いて改変することにより、非食用炭素源から直接エタノールを発酵させる試みがなされている。

[0004] このような生物工学的手法として細胞表層提示技術が好適に利用されている。細胞表層提示としては、細胞表層局在タンパク質のGPIアンカータンパク質を利用する方法が挙げられる。このようなGPIアンカータンパク質として、種々のタンパク質が知られている（例えば、特許文献1～4および非特許文献1～5）。他方、細胞表層提示技術におけるタンパク質発現には、プロモーターも関与し得る。酵母細胞において高いプロモーター活性を示すプロモーターとしては、酵母SED1プロモーター、GAPDHプロモーター、PGK1プロモーター、およびADH1プロモーターなどが知られている（例えば、特許文献2～4）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2011-160727号公報

特許文献2：特開2008-86310号公報

特許文献3：特開2007-189909号公報

特許文献4：特開2005-245335号公報

特許文献5：特開2011-30563号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Biotechnol. Lett., 2010年, 第32巻, 第1131-1136頁

非特許文献2：Mol. Microbiol., 2004年, 第52巻, 第1413-1425頁

非特許文献3：Appl. Environmen. Microbiol., 1997年, 第63巻, 第615-620頁

非特許文献4：Biotechnol. Lett., 2010年, 第32巻, 第255-260頁

非特許文献5：J. Bacteriol., 1997年, 第179巻, 第1513-1520頁

非特許文献6：Nature Methods, 2009年, 第6巻, 第343-345頁

非特許文献7：Yeast, 1998年, 第14巻, 115-132頁

非特許文献8：Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006年, 第72巻, 第1136-1143頁

非特許文献9：Appl. Microbiol. Biotechnol., 2010年, 第85巻, 第1491-1498頁

非特許文献10：Enzyme Microb. Technol., 2012年, 第50巻, 第343-347頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、高い活性で細胞表層に提示される酵素を有する酵母の作製を可能とする細胞表層発現用ポリヌクレオチドを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、細胞表層発現用ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、および細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配

列を含み、該プロモーターが、該細胞表層局在タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターである、ポリヌクレオチドを提供する。

[0009] 1つの実施形態では、上記細胞表層局在タンパク質はS E D 1またはC W P 2である。

[0010] 本発明はまた、細胞表層発現用ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、および細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列を含み、該プロモーターおよび該細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列が、S e d 1およびC w p 2のいずれかの遺伝子に由来する、ポリヌクレオチドを提供する。

[0011] 1つの実施形態では、上記プロモーターおよび上記細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列がともに、S e d 1遺伝子に由来する；または上記プロモーターおよび上記細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列がともに、C w p 2遺伝子に由来する。

[0012] 本発明はさらに、上記細胞表層発現用ポリヌクレオチドを含む、発現ベクターを提供する。

[0013] 本発明はさらに、上記細胞表層発現用ポリヌクレオチドまたは上記発現ベクターが導入された、形質転換酵母を提供する。

[0014] 1つの実施形態では、上記形質転換酵母は、S E D 1およびS S D 1からなる群より選択される少なくとも1つを欠損している宿主酵母から得られる。

[0015] さらに実施形態では、上記形質転換酵母は、S E D 1およびS S D 1を欠損している宿主酵母から得られる。

[0016] 1つの実施形態では、上記形質転換酵母は、セルロース分解酵素およびデンプン分解酵素からなる群から選択される少なくとも1つの酵素を細胞表層提示する。

[0017] 本発明はまた、エタノールを製造する方法であって、

上記形質転換酵母を発酵培養する工程を含む、方法を提供する。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、高活性にて酵素などのタンパク質が細胞表層に提示される酵母の作製を可能とする細胞表層発現用ポリヌクレオチドが提供される。このようなポリヌクレオチドが導入された酵母は、その細胞表層に高活性のタンパク質を発現することができる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1] B G L 1 遺伝子の G a p - A g α 1 形質転換株、G a p - S e d 1 形質転換株、S e d 1 - A g α 1 形質転換株、および S e d 1 - S e d 1 形質転換株の培養の際の β - グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図2] E G I I 遺伝子の G a p - A g α 1 形質転換株、G a p - S e d 1 形質転換株、S e d 1 - A g α 1 形質転換株、および S e d 1 - S e d 1 形質転換株の培養 48 時間後のエンドグルカナナーゼ活性を示すグラフである。

[図3] B G L 1 遺伝子の G a p - A g α 1 形質転換株、S e d 1 - S e d 1 形質転換株、および C w p 2 - C w p 2 形質転換株の培養の際の β - グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図4] B G L 1 遺伝子の S e d 1 - S e d 1 形質転換株、C w p 2 - C w p 2 形質転換株、および S e d 1 - C w p 2 形質転換株の培養の際の β - グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図5] B G L 1 遺伝子の S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 S E D 1 Δ 株および S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 株の培養の際の β - グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図6] B G L 1 遺伝子の S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 S S D 1 Δ 株および S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 株の培養の際の β - グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図7] B G L 1 遺伝子の S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 株、S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 S E D 1 Δ 株、S e d 1 - S e d 1 形質転換 B Y 4 7 4 1 S S D 1 Δ 株、および S e d 1 - S e d 1 形質転換 B

Y 4 7 4 1 S E D 1 Δ S S D 1 Δの培養の際の β -グルコシダーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図8] E G I I 遺伝子のS e d 1 - S e d 1 形質転換株、G a p - A g α 1 形質転換株および空ベクター導入株（表層提示なし）の発酵培養の際のエタノール生産量の経時変化を示すグラフである。

[図9] α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型S e d 1 - S e d 1 形質転換株の培養の際の α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性の経時変化を示すグラフである。

[図10] α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型S e d 1 - S e d 1 形質転換株の生デンプンからのエタノール生産量の経時変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明について、以下、詳細に説明する。

[0021] 細胞表層発現用ポリヌクレオチドは、プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、および細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列を含むポリヌクレオチドである。

[0022] （細胞表層局在タンパク質およびその細胞膜結合領域）

「細胞表層局在タンパク質」は、細胞表層に固定化または付着もしくは接着し、そこに局在するタンパク質をいう。細胞表層局在タンパク質としては、脂質で修飾されたタンパク質が知られており、この脂質が膜成分と共有結合することにより細胞膜に固定される。本明細書中では、それらの役割から、「細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域」をまとめて、単に「アンカー」とも称する。

[0023] 細胞表層局在タンパク質の代表例として、G P I (glycosyl phosphatidyl inositol: エタノールアミンリン酸-6 マンノース α -1, 2 マンノース α -1, 6 マンノース α -1, 4 グルコサミン α -1, 6 イノシトールリン脂質を基本構造とする糖脂質) アンカータンパク質を挙げることができる。G P I アンカータンパク質は、そのC末端に糖脂質であるG P I を有しており

、このG P Iが細胞膜中のP I（phosphatidyl inositol）と共有結合することによって細胞膜表面に結合する。

[0024] G P Iアンカータンパク質のC末端へのG P Iの結合は、以下のようにして行われる。G P Iアンカータンパク質は、転写および翻訳の後、N末端側に存在する分泌シグナルの作用により小胞体内腔に分泌される。G P Iアンカータンパク質のC末端またはその近傍の領域に、G P IアンカーがG P Iアンカータンパク質と結合する際に認識されるG P Iアンカー付着シグナルと呼ばれる領域が存在する。小胞体内腔およびゴルジ体において、このG P Iアンカー付着シグナル領域が切断され、新たに生じるC末端にG P Iが結合する。

[0025] G P Iが結合したタンパク質は、分泌小胞により細胞膜まで運ばれ、G P Iが細胞膜のP Iに共有結合することにより、細胞膜に固定される。さらに、ホスファチジルイノシトール依存性ホスホリパーゼC（P I-P L C）によりG P Iアンカーが切断され、細胞壁に組み込まれることにより細胞壁に固定された状態で、細胞表面に提示される。

[0026] 本発明では、細胞表層局在タンパク質であるG P Iアンカータンパク質の全体、またはその細胞膜結合領域であるG P Iアンカー付着シグナル領域を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用いることができる。細胞膜結合領域（G P Iアンカー付着シグナル領域）は、通常、細胞表層局在タンパク質のC末端側の領域である。細胞膜結合領域は、G P Iアンカー付着シグナル領域を含んでいればよく、融合タンパク質の酵素活性を阻害しない限り、G P Iアンカータンパク質のその他の任意の部分を含んでいてもよい。

[0027] G P Iアンカータンパク質は、酵母細胞で機能するタンパク質であればよい。このようなG P Iアンカータンパク質としては、例えば、 α -または α -アグルチニン（A G α 1、A G A 1）、T I P 1、F L O 1、S E D 1、C W P 1およびC W P 2が挙げられ、S E D 1およびC W P 2が好ましい。

[0028] S E D 1は、酵母サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の定常期における主要な細胞表層局在タンパク質である。本タンパク質

は、ストレスによって誘導され、細胞壁の完全性（integrity）の維持に寄与すると考えられている。S E D 1 の遺伝子（S e d 1）は、例えば、GenBank に登録された配列情報に基づき、当業者が通常用いる方法を用いて入手することができる（GenBank accession number NM_001180385；NCBI Gene ID：851649）。S e d 1 のタンパク質コーディング領域の塩基配列を配列番号 1 に示し、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。S E D 1 の細胞膜結合領域（G P I アンカー付着シグナル領域）は、例えば、配列番号 2 の 1 1 0 位から 3 3 8 位を含む領域である。S E D 1 をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列の全長をコードするポリヌクレオチドであっても、またはアンカー機能を損なわない限り、一部の配列（例えば、配列番号 2 の 1 1 0 位から 3 3 8 位のアミノ酸配列を含む配列）をコードするポリヌクレオチドであってもよい。

[0029] C W P 2 とは、酵母サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の細胞表層局在タンパク質である。C W P 2 の遺伝子（C w p 2）は、例えば、GenBank に登録された配列情報に基づき、当業者が通常用いる方法を用いて入手することができる（GenBank accession number NM_001180025；NCBI Gene ID：853765）。C w p 2 のタンパク質コーディング領域の塩基配列を配列番号 3 に示し、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。C W P 2 の細胞膜結合領域（G P I アンカー付着シグナル領域）は、例えば、配列番号 4 の 2 6 位から 9 2 位を含む領域である。C W P 2 をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列の全長をコードするポリヌクレオチドであっても、またはアンカー機能を損なわない限り、一部（例えば、配列番号 4 の 2 6 位から 9 2 位のアミノ酸配列を含む配列）をコードするポリヌクレオチドであってもよい。

[0030] 本明細書において、ポリヌクレオチドは、開示されたアミノ酸配列において 1 または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、本発明において所望の機能または効果を実質的に有するタンパク質をコードするものであってもよい。開示されるアミノ酸配列に対するアミノ

酸の変異（例えば、欠失、置換もしくは付加）は、いずれか１種類であってもよいし、２種類以上が組み合わされていてもよい。また、これらの変異の総数は、特に限定されないが、例えば、１個以上１０個以下、または１個以上５個以下である。アミノ酸置換の例としては、各機能または効果を実質的に保持する限りにおいていずれの置換であってもよいが、例えば、保存的置換が挙げられ、保存的置換としては、具体的には以下のグループ内（すなわち、括弧内に示すアミノ酸間）での置換が挙げられる：（グリシン、アラニン）、（バリン、イソロイシン、ロイシン）、（アスパラギン酸、グルタミン酸）、（アスパラギン、グルタミン）、（セリン、トレオニン）、（リジン、アルギニン）、（フェニルアラニン、チロシン）。

[0031] 他の実施形態としては、ポリヌクレオチドは、開示されるアミノ酸配列に対して、例えば、７０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ本発明において所望の機能または効果を実質的に有するタンパク質をコードするものであってもよい。アミノ酸配列における配列同一性はまた、７４％以上、７８％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９２％以上、９５％以上、９８％以上、または９９％以上であり得る。

[0032] 本明細書において配列の同一性または類似性とは、当該技術分野で知られているとおり、配列を比較することにより決定される、２以上のタンパク質あるいは２以上のポリヌクレオチドの間の関係である。配列の「同一性」とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きの部分的な配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の配列不変性の程度を意味する。また、「類似性」とは、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間のアラインメントによって、あるいは場合によっては、一続きの部分的な配列間のアラインメントによって決定されるような、タンパク質またはポリヌクレオチド配列の間の相関性の程度を意味する。より具体的には、配列の同一性と保存性（配列中の特定アミノ酸または配列における物理化学特性を維持する置換）によって決定される。なお、類似性は、後

述するBLASTの配列相同性検索結果においてSimilarityと称される。同一性および類似性を決定する方法は、対比する配列間で最も長くアラインメントするように設計される方法であることが好ましい。同一性および類似性を決定するための方法は、公衆に利用可能なプログラムとして提供されている。例えば、AltschulらによるBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) プログラム (例えば、Altschulら, J. Mol. Biol., 1990, 215:403-410 ; Altschulら, Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402) を利用し決定することができる。BLASTのようなソフトウェアを用いる場合の条件は、特に限定するものではないが、デフォルト値を用いるのが好ましい。

[0033] さらに他の実施形態として、ポリヌクレオチドは、開示される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするものが挙げられる。ストリンジェントな条件とは、例えば、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、塩基配列の同一性が高い核酸、すなわち開示される塩基配列と例えば、65%以上、70%以上、75%以上、78%以上、80%以上、85%以上、90%以上、92%以上、95%以上、98%以上、または99%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAの相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム塩濃度が例えば、15 mM~750 mM、50 mM~750 mM、または300 mM~750 mM、温度が例えば、25℃~70℃、50℃~70℃、または55℃~65℃、そしてホルムアミド濃度が例えば、0%~50%、20%~50%、または35%~45%での条件をいう。さらに、ストリンジェントな条件では、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄条件が、ナトリウム塩濃度が例えば、15 mM~600 mM、50 mM~600 mM、または300 mM~600 mM、そして温度が例えば50℃~70℃、55℃~70℃、または60℃~65℃である。ハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring

ng Harbor Laboratory (2001) に記載されている方法などの周知の方法で行うことができる。温度が高いほど、または塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり、より相同性の高いポリヌクレオチドを単離できる。

[0034] さらに他の実施形態として、ポリヌクレオチドは、開示される塩基配列と例えば、65%以上、70%以上、75%以上、78%以上、80%以上、85%以上、90%以上、92%以上、95%以上、98%以上、または99%以上の同一性を有する塩基配列を有し、かつその所望の機能または効果を実質的に有するポリヌクレオチドが挙げられる。

[0035] 例えば、分泌シグナル配列ー細胞表層局在タンパク質をコードする構造遺伝子ーGPIアンカー付着認識シグナルをコードする配列を有する配列において、この細胞表層局在タンパク質をコードする構造遺伝子の全部または一部の配列を、目的タンパク質をコードする配列に置換することができる。

[0036] 細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードするポリヌクレオチド（遺伝子）は、これらを有する微生物から、既知の配列情報に基づいてプライマーまたはプローブを設計してPCRまたはハイブリダイゼーション法などによって取得し得る。また、上記ポリヌクレオチドを含む既存のベクターから、切り出して利用することもできる。あるいはポリヌクレオチドは、化学合成法等の当技術分野で公知の各種の核酸配列合成法によって、核酸断片として合成してもよい。

[0037] （分泌シグナル配列）

「分泌シグナル配列」は、分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列である。

[0038] 分泌シグナルペプチドは、ペリプラズムを含む細胞外に分泌される分泌性タンパク質のN末端に通常結合しているペプチドである。このペプチドは、生物間で類似した構造を有しており、例えば20個程度のアミノ酸からなり、N末端付近に塩基性アミノ酸配列を有し、その後に疎水性アミノ酸を多く含んでいる。分泌シグナルは、通常、分泌性タンパク質が細胞内から細胞膜を通過して細胞外へ分泌される際にシグナルペプチダーゼにより分解される

ことにより除去される。

[0039] 本発明においては、目的タンパク質を酵母の細胞外に分泌させることができる分泌シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列であれば、どのようなものでも用いることができ、その起源は問わない。例えば、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) などのグルコアミラーゼの分泌シグナルペプチド、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) のグルコアミラーゼの分泌シグナルペプチド、酵母サッカロマイセス・セレビシエの α -または α -アグルチニンの分泌シグナルペプチド、酵母サッカロマイセス・セレビシエの α 因子の分泌シグナルペプチドなどをコードする配列を好適に用いることができる。特に、分泌効率の点で、リゾプス・オリゼ由来グルコアミラーゼの分泌シグナルペプチド配列が好ましい。また、アスペルギルス・オリゼ由来グルコアミラーゼの分泌シグナルペプチド配列も好ましいものとして挙げられる。目的タンパク質が本来有する分泌シグナルペプチドをコードする配列を利用することもできる。

[0040] (プロモーター)

プロモーターは、プロモーター活性を有していればよく、「プロモーター活性」とは、プロモーター領域に転写因子が結合し、転写を惹起する活性をいう。プロモーターは、所望のプロモーター領域を保有する菌体、ファージなどから、制限酵素を用いて切り出し得る。必要に応じて制限酵素認識部位またはクローニングベクターとの重複部位を設けたプライマーを用い、PCRで所望のプロモーター領域を増幅することによりプロモーター領域のDNA断片を得ることができる。また、既に判明しているプロモーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のプロモーターを化学合成してもよい。

[0041] 細胞表層発現用ポリヌクレオチドに含まれるプロモーターは、好ましくは、アンカーとして用いられる細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域の細胞表層局在タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターである、あるいは、該遺伝子が本来（ネイティブに）有するプロモーターである。すなわち、プロモーターとアンカー（細胞表層局在タンパク質またはその細胞

膜結合領域）とが同種の遺伝子に由来することが好ましい。

[0042] 本発明において用いられるプロモーターとしては、S e d 1 および C w p 2 のプロモーターが好ましい。S e d 1 および C w p 2 のプロモーターの塩基配列はそれぞれ、例えば、GenBankのSaccharomyces cerevisiae S288c chromosome IV, complete sequence (GenBank accession number NC_001136) およびSaccharomyces cerevisiae S288c chromosome XI, complete sequence (GenBank accession number NC_001143) に記載されている。S e d 1 および C w p 2 のプロモーターの塩基配列をそれぞれ配列番号5および6に示す。

[0043] 例えば、細胞表層局在タンパク質がS E D 1である場合、細胞表層局在タンパク質をコードする配列としてその遺伝子S e d 1のコーディング領域を用い、かつプロモーターとしてその遺伝子S e d 1のプロモーターを用いること、そして細胞表層局在タンパク質がC W P 2である場合、細胞表層局在タンパク質をコードする配列としてその遺伝子C w p 2のコーディング領域を用い、かつプロモーターとしてその遺伝子C w p 2のプロモーターを用いることが好ましい（これらの場合、プロモーターとアンカーとが同種の遺伝子に由来する）。他方、S e d 1のプロモーターについて、遺伝子C w p 2のコーディング領域を用いてもよく、C w p 2のプロモーターについて、遺伝子S e d 1のコーディング領域を用いてもよい。上記コーディング領域およびプロモーターについて、目的の機能を果たすものであれば、上記のように、それらの塩基配列において、1または2以上（例えば数個）のヌクレオチドが欠失、付加または置換などの変異された塩基配列であってもよい。

[0044] （目的タンパク質をコードする配列）

目的タンパク質の種類、もしくはその起源は特に限定されない。目的タンパク質の種類として、例えば、酵素、抗体、リガンド、蛍光タンパク質などが挙げられる。酵素としては、例えば、セルロース分解酵素、デンプン分解酵素、グリコーゲン分解酵素、キシラン分解酵素、キチン分解酵素、脂質分解酵素などが挙げられ、より具体的には、例えば、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼ、アミラーゼ（例えば、グ

ルコアミラーゼおよび α -アミラーゼ)、リパーゼなどが挙げられる。

[0045] 目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、イントロンを除いたcDNA配列が好ましい。

[0046] 目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、その全長をコードする配列であってもよく、目的タンパク質の活性を示すものであれば目的タンパク質の一部領域をコードする配列であってもよい。また、上記のように、目的タンパク質の活性を示す限り、天然型タンパク質をコードする塩基配列において、1または2以上（例えば数個）のヌクレオチドが欠失、付加または置換などの変異を含む塩基配列であってもよく、あるいは1または2以上（例えば数個）アミノ酸が欠失、付加または置換などの変異を含むアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列であってもよい。

[0047] 目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド（遺伝子）は、酵素を産生する微生物から、既知の配列情報に基づいてプライマーまたはプローブを設計してPCRまたはハイブリダイゼーション法などによって取得し得る。また、目的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む既存のベクターから、好ましくはその発現カセットの形態で切り出して利用することもできる。

[0048] 目的タンパク質の一例として、以下、セルロース分解酵素およびデンプン分解酵素を例に挙げて説明する。

[0049] セルロース分解酵素は、 β 1,4-グリコシド結合を切断し得る任意の酵素をいう。任意のセルロース加水分解酵素生産菌に由来し得る。セルロース加水分解酵素生産菌としては、代表的には、アスペルギルス属（例えば、アスペルギルス・アクレアタス(*Aspergillus aculeatus*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、およびアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*))、トリコデルマ属（例えば、トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesei*))、クロストリディウム属（例えば、クロストリディウム・テルモセラム(*Clostridium thermocellum*)、セルロモナス属（例えば、セルロモナス・フィミ(*Cellulomonas fimi*)およびセルロモナス・ウダ(*Cellulomonas uda*))

、シュードモナス属（例えば、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescence*)）などに属する微生物が挙げられる。

[0050] 以下、代表的なセルロース分解酵素として、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼについて説明するが、セルロース分解酵素はこれらに限定されない。

[0051] エンドグルカナーゼは、通常、セルラーゼと称される酵素であり、セルロースを分子内部から切断し、グルコース、セロビオース、およびセロオリゴ糖を生じる（「セルロース分子内切断」）。エンドグルカナーゼには5種類あり、それぞれエンドグルカナーゼⅠ、エンドグルカナーゼⅡ、エンドグルカナーゼⅢ、エンドグルカナーゼⅣ、およびエンドグルカナーゼⅤと称される。これらの区別は、アミノ酸配列の差異であるが、セルロース分子内切断作用を有する点では共通する。例えば、トリコデルマ・リーセイ由来エンドグルカナーゼ（特に、エンドグルカナーゼⅡ：EGⅡ（例えば、特許文献5））が用いられ得るが、これに限定されない。

[0052] セロビオヒドロラーゼは、セルロースの還元末端または非還元末端のいずれかから分解してセロビオースを遊離する（「セルロース分子末端切断」）。セロビオヒドロラーゼには2種類あり、それぞれセロビオヒドロラーゼⅠおよびセロビオヒドロラーゼⅡと称される。これらの区別は、アミノ酸配列の差異であるが、セルロース分子末端切断作用を有する点では共通する。例えば、トリコデルマ・リーセイ由来セロビオヒドロラーゼ（特に、セロビオヒドロラーゼⅡ：CBHⅡ（例えば、特許文献5））が用いられ得るが、これに限定されない。

[0053] β -グルコシダーゼは、セルロースの非還元末端からグルコース単位を切り離していくエキソ型の加水分解酵素である（「グルコース単位切断」）。 β -グルコシダーゼは、アグリコンまたは糖鎖と β -D-グルコースとの β 1,4-グリコシド結合を切断し得、セロビオースまたはセロオリゴ糖を加水分解してグルコースを生成し得る。 β -グルコシダーゼは、セロビオースまたはセロオリゴ糖を加水分解し得る酵素の代表例である。 β -グルコシダ

ーゼは現在、1種類知られており、 β -グルコシダーゼ1と称される。例えば、アスペルギルス・アクレアタス由来 β -グルコシダーゼ（特に、 β -グルコシダーゼ1：BGL1（例えば、非特許文献8））が用いられ得るが、これに限定されない。

[0054] セルロースの良好な加水分解のために、セルロース加水分解様式の異なる酵素を組み合わせることが好ましい。セルロース分子内切断、セルロース分子末端切断、およびグルコース単位切断などの種々の異なるセルロース加水分解様式で作用する酵素が適宜、組み合わせられ得る。それぞれの加水分解様式を有する酵素の例として、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼが挙げられるがこれらに限定されない。セルロース加水分解様式の異なる酵素の組合せは、例えば、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼからなる群から選択され得る。セルロースの構成糖であるグルコースを最終的に生産できることが望ましいので、グルコースを生成し得る酵素を少なくとも1つ含むことが好ましい。グルコースを生成し得る酵素としては、グルコース単位切断酵素（例えば、 β -グルコシダーゼ）に加え、エンドグルカナーゼもグルコースを生成し得る。例えば、酵母において、 β -グルコシダーゼ、エンドグルカナーゼ、およびセロビオヒドロラーゼを表層提示させ得る。

[0055] 以下、代表的なデンプン分解酵素として、グルコアミラーゼおよび α -アミラーゼについて説明するが、デンプン分解酵素はこれらに限定されない。

[0056] グルコアミラーゼは、正式名称がグルカン1, 4- α -グルコシダーゼといい、1, 4- α -D-グルカングルコヒドロラーゼ、エキソ1, 4- α -グルコシダーゼ、 γ -アミラーゼ、リゾソーマル α -グルコシダーゼあるいはアミログルコシダーゼを別名とする。糖鎖の非還元末端の α -1, 4-結合をエキソ型に加水分解してブドウ糖1分子を産生する。 α -1, 6-結合も切断するものも知られている。グルコアミラーゼは、リゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) 由来グルコアミラーゼ（例えば、非特許文献9）が挙げられるが、これに限定されない。

[0057] α -アミラーゼは、別名を 1, 4- α -D-グルカングルカノヒドロラーゼ、グリコゲナーゼといい、デンプンやグリコーゲンの α -1, 4-結合を不規則に切断し、多糖ないしマルトース、オリゴ糖を生み出す酵素である。動物、植物、微生物に広く分布する普遍的な酵素である。 α -アミラーゼとしては、例えば、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*) 由来 α -アミラーゼ (例えば、非特許文献 10) が挙げられるが、これに限定されない。

[0058] デンプンの良好な加水分解のために、デンプン加水分解様式の異なる酵素を組み合わせることが好ましい。1つの実施形態では、酵母は、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを共に表層提示し得る。

[0059] (ターミネーター)

細胞表層発現用ポリヌクレオチドは、さらにターミネーターを含むことができる。

[0060] ターミネーターは、ターミネーター活性を有していればよく、「ターミネーター活性」とは、ターミネーター領域において転写を終結させる活性をいう。ターミネーターは、ターミネーター活性を有しさえすればよく、所望のターミネーター領域を保有する菌体、ファージなどから、制限酵素を用いて切り出し得る。必要に応じて制限酵素認識部位またはクローニングベクターの挿入部位を設けたプライマーを用い、PCRで所望のターミネーター領域を増幅することによりターミネーター領域のDNA断片を得ることができる。また、既に判明しているターミネーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のターミネーターを化学合成してもよい。

[0061] ターミネーターとしては、 α -アグルチニンターミネーター、ADH1 (アルデヒドデヒドロゲナーゼ) ターミネーター、GAPDH (グリセルアルデヒド-3'-リン酸デヒドロゲナーゼ) ターミネーターなどが挙げられる。

[0062] (細胞表層発現用ポリヌクレオチドの構築)

アンカー (細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域) をコード

する配列を、分泌シグナル配列と共に所望の配置で、目的タンパク質をコードする配列（構造遺伝子）と連結し、この連結物をプロモーターの下流に配置する。細胞表層発現用ポリヌクレオチドは、例えば、目的タンパク質が発現されたときに、アンカー（細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域）のN末端に連結されるように、上記配列を配置させる。すなわち、目的タンパク質をコードする配列は、アンカーをコードする配列の5'側に位置する。さらに、目的タンパク質をコードする配列は分泌シグナル配列の下流に配置される。

[0063] 上述の因子（プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、およびアンカーをコードする配列）の連結物の下流にターミネーターを配置することができる。

[0064] 各種配列を含むDNAの合成および結合は、当業者が通常用い得る技術で行われ得る。例えば、分泌シグナル配列と目的タンパク質の構造遺伝子との結合は、部位特異的突然変異法、もしくはOne-step isothermal assembly（非特許文献6）を用いて行うことができる。これらの方法を用いることにより、正確な分泌シグナル配列の切断および活性な酵素の発現が可能である。

[0065] 細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列と共に目的タンパク質（例えば、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、または β -グルコシダーゼ）をコードする領域（構造遺伝子）、分泌シグナル、およびプロモーターおよびターミネーターなどの発現調節配列を含む公知のプラスミドから、適宜、ベクターの調製に適した形態で切り出して、インサートを調製することによって利用することもできる。

[0066] （発現ベクター）

発現ベクターは、プラスミドベクターであってもよく、あるいは人工染色体であってもよい。酵母を宿主とする場合、ベクターの調製が容易であり、また酵母細胞の形質転換が容易である点で、プラスミドの形態が好ましい。DNAの取得の簡易化の点からは、酵母と大腸菌とのシャトルベクターであることが好ましい。必要に応じて、ベクターは、調節配列（オペレーター、

エンハンサーなど)を含み得る。このようなベクターは、例えば、酵母の2 μ mプラスミドの複製開始点(Ori)とColE1の複製開始点とを有しており、酵母選択マーカー(以下に説明)および大腸菌の選択マーカー(薬剤耐性遺伝子など)を有する。

[0067] 酵母選択マーカーとしては、公知の任意のマーカーが利用され得る。例えば、薬剤耐性遺伝子、栄養要求性マーカー遺伝子(例えば、イミダゾールグリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ(HIS3)をコードする遺伝子、リンゴ酸ベーターイソプロピルデヒドロゲナーゼ(LEU2)をコードする遺伝子、トリプトファンシンターゼ(TRP5)をコードする遺伝子、アルギニノコハク酸リアーゼ(ARG4)をコードする遺伝子、N-(5'-ホスホリボシル)アントラニル酸イソメラーゼ(TRP1)をコードする遺伝子、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ(HIS4)をコードする遺伝子、オロチジーン5-リン酸デカルボキシラーゼ(URA3)をコードする遺伝子、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ(URA1)をコードする遺伝子、ガラクトキナーゼ(GAL1)をコードする遺伝子、およびアルファアミノアジピン酸レダクターゼ(LYS2)をコードする遺伝子など)が挙げられる。例えば、栄養要求性マーカー遺伝子(例えば、HIS3、LEU2、URA1、TRP1欠損マーカーなど)が好ましく用いられ得る。

[0068] (酵母)

宿主として用いる酵母は、子のう菌酵母(Ascomycetous yeast)に属するものであればよく、特に限定されない。その中でもサッカロマイセス科(Saccharomycetaceae)に属するものが好ましく、サッカロマイセス属(Saccharomyces)であるものがより好ましい。

[0069] 本発明の酵母は、本発明のポリヌクレオチドまたは発現ベクターを宿主となる酵母に導入することにより得られる。「導入」とは、ポリヌクレオチドまたは発現ベクター中の発現を目的とする遺伝子が宿主細胞に導入されるだけでなく、宿主細胞で発現されることも含む。導入方法は特に限定されず、公知の方法を採用できる。代表的には、上記説明した本発明の発現ベクター

を用いて酵母を形質転換する方法が挙げられる。形質転換方法は、特に限定されず、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、酢酸リチウム法、プロトプラスト法などのトランスフェクション法やマイクロインジェクション法のような公知の方法を制限なく使用できる。導入された遺伝子は、プラスミドの形態で存在してもよく、または酵母の染色体に挿入された形態あるいは酵母の染色体に相同組換えにより組み込まれた形態で存在してもよい。

[0070] 本発明のポリヌクレオチドが導入された酵母は、常法に従い、酵母選択マーカによる形質または目的タンパク質の活性などを指標として選択することができる。

[0071] また、得られた酵母の細胞表層に目的タンパク質が固定（細胞表層提示）されていることは、常法により確認することができる。例えば、被験酵母に、このタンパク質に対する抗体と、FITCのような蛍光標識2次抗体またはアルカリフォスファターゼのような酵素標識2次抗体などとを作用させる方法、このタンパク質に対する抗体とビオチン標識2次抗体とを反応させた後さらに蛍光標識ストレプトアビジンを作用させる方法などが挙げられる。

[0072] 複数種のタンパク質を細胞表層発現するように、酵母を形質転換することもできる。この場合、複数種のタンパク質のそれぞれをコードする配列の遺伝子発現カセットを含むそれぞれの発現ベクターを構築してもよく、複数の遺伝子発現カセットを1つの発現ベクターに入れることもできる。例えば、 δ インテグレーションを利用することができる（特許文献5）。

[0073] 1つの実施形態では、形質転換のための宿主として、例えば、SED1およびSSD1からなる群より選択される少なくとも1つを欠損している酵母が用いられる。好ましくはSED1欠損酵母、より好ましくはSED1およびSSD1二重欠損酵母が宿主として用いられる。SED1については、上述のとおりである。SSD1は、SED1などの酵母のストレス応答遺伝子に対する負の制御因子である。SSD1遺伝子について、NCBI遺伝子登録番号はNCBI Gene ID: 851887である（Genbank accessi

on number NM_001180601.1)。サッカロマイセス・セレビスエに由来する S S D 1 遺伝子の塩基配列およびそのコードアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 38 および 39 に示す。

[0074] 上記の S E D 1 および S S D 1 からなる群より選択される少なくとも 1 つを欠損している欠損酵母は、例えば、宿主酵母におけるこれらのタンパク質をコードする遺伝子の破壊または発現を抑制することによって行われ得る。このような「欠損」の実施形態としては、正常タンパク質の生産量の抑制、および機能しない変異体タンパク質の生産もしくは促進が挙げられる。そのための遺伝子操作としては、トランスジェニック、遺伝子ノックアウト、ノックインなどが挙げられる。1 つの実施形態では、例えば、S E D 1 および S S D 1 二重欠損酵母は、S E D 1 遺伝子および S S D 1 遺伝子の両遺伝子を破壊した二重破壊株である。

[0075] このような欠損酵母は、公知の遺伝子配列情報に基づいて適宜プライマー等を作製し、上記遺伝子操作を行うことによって作製してもよく、市販の欠損株を用いてもよい。市販の欠損株としては、例えば、酵母サッカロマイセス・セレビスエ B Y 4 7 4 1 株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3 株) の Yeast K knockout Collection (Open Biosystems 社より入手) などが挙げられる。

[0076] (エタノールの製造方法)

本発明によるセルロース分解酵素およびデンプン分解酵素からなる群から選択される少なくとも 1 つの酵素を細胞表面提示する酵母は、エタノールの製造に用いられ得る。1 つの実施形態では、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼからなる群から選択される少なくとも 1 つの酵素を細胞表面提示する酵母 (本明細書中、「セルラーゼ細胞表面提示酵母」ともいう) である。このような酵母は、エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼからなる群から選択される 2 種の酵素; またはエンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼを細胞表面提示する酵母であってもよい。別の実施形態では、 α -アミラーゼおよび/またはグルコアミラーゼを細胞表面提示する

酵母（本明細書中、「アミラーゼ細胞表層提示酵母」ともいう）である。酵母は、セルロース分解酵素およびデンプン分解酵素を共に表層提示するものであってよい。好ましくは、細胞表層発現用カセットとして、遺伝子 *S e d 1* のコーディング領域およびその遺伝子 *S e d 1* のプロモーターを含むカセットが用いられる。

[0077] セルラーゼ細胞表層提示酵母は、セルロースおよびその糖化物を発酵基質として利用し得る。アミラーゼ細胞表層提示酵母は、デンプンおよびその糖化物を発酵基質として利用し得る。セルロースおよびその糖化物を含む発酵基質、ならびにデンプンおよびその糖化物を含む発酵基質について、それらの入手源または材料として、例えば、バイオマスが挙げられる。バイオマスとは、枯渇性資源ではない、現生生物体構成物質起源の産業資源をいう。すなわち、バイオマスとは、再生可能な、生物由来の有機性資源から化石資源を除いたものをいう。バイオマスは、セルロースおよび／またはデンプンを含み得る。バイオマスとしては、特に限定されず、例えば、資源作物またはその廃棄物が挙げられる。資源作物としては、特に限定されず、例えば、トウモロコシ、サトウキビが挙げられ、さらに資源作物の廃棄物の例としては、これらの処理工程で発生する廃棄物が挙げられる。リグノセルロース系バイオマスは、食糧と競合しない点で好ましい材料である。リグノセルロース系バイオマスとしては、特に限定されず、例えば、イネ、ムギ、ススキ、ヨシなどのイネ科植物の食糧となる部位を除く部位（例えば、籾殻、根、茎、葉）、およびこれらの部位でなる製品から生じた廃棄物が挙げられる。

[0078] 必要に応じて、発酵基質材料（例えば、バイオマス）を、発酵に供する前に前処理してもよい。このような前処理は、「糖化」により、バイオマス中の多糖類（例えば、セルロースおよび／またはデンプン）をオリゴ糖または単糖に分解し得る。前処理方法としては、特に限定されないが、例えば、酵素法、希硫酸法、水熱分解法が挙げられる。コストの点で、希硫酸法、水熱分解法が好ましい。希硫酸法では、例えば、1% (v/v) ~ 5% (v/v) の希硫酸で材料を 180℃ ~ 200℃ にて 5分 ~ 1時間程度処理する。水熱分解

法では、例えば、 $130^{\circ}\text{C} \sim 300^{\circ}\text{C}$ にて 10 MPa 程度の水で材料を処理する。

[0079] 表層提示酵母は、発酵に供する前に好氣的条件下で培養することにより、その菌体量を増加させ得る。形質転換酵母の培養は、当業者に周知の方法により適宜実施できる。培地の pH は、例えば $4 \sim 6$ 、好ましくは 5 である。好氣的培養時の培地中の溶存酸素濃度は、例えば $0.5\text{ ppm} \sim 6\text{ ppm}$ 、好ましくは $1\text{ ppm} \sim 4\text{ ppm}$ 、より好ましくは 2 ppm である。培養温度は、例えば $20^{\circ}\text{C} \sim 45^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $25^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは 30°C である。酵母菌体量が例えば 10 g （湿潤量）／ L 以上、好ましくは 12.5 g （湿潤量）／ L 、より好ましくは 15 g （湿潤量）／ L 以上になるまで培養することが好ましく、培養時間は例えば $24\text{ 時間} \sim 96\text{ 時間}$ 程度である。

[0080] 発酵培養では、酵母に一般的に適用される培養条件を適宜選択して用いることができる。典型的には、発酵のための培養のために、静置培養、振とう培養または通気攪拌培養等を用いることができる。通気条件は、嫌気条件下、微好気条件下、および好気条件などから適宜選択することができる。培養温度は、例えば $25^{\circ}\text{C} \sim 45^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $30^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは 35°C である。培養時間は、必要に応じて任意の時間が設定され得、例えば $24\text{ 時間} \sim 120\text{ 時間}$ などの範囲内の培養時間に設定することができる。 pH の調整は、無機あるいは有機酸、アルカリ溶液などを用いて行うことができる。発酵培地には、発酵基質に加えて、酵母の培養のために添加され得る培地成分を必要に応じてさらに含めることもできる。

[0081] エタノール発酵終了後、培養液（発酵液）からエタノール含有画分を回収する工程、さらにこれを精製または濃縮する工程を実施することもできる。これらの工程およびそれらに要する手段は、当業者によって適宜選択される。

実施例

[0082] 以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例によ

って限定されるものではない。

[0083] 本実施例で用いた酵母サッカロマイセス・セレビスエのBY4741株（非特許文献7）は、Invitrogen社より入手した。

[0084] 本実施例に示す全てのPCR法には、KOD-Plus-Neo-DNAポリメラーゼ（東洋紡績株式会社製）を用いて実施した。

[0085] 本実施例に示す全ての酵母への遺伝子導入は、酢酸リチウム法によって実施した。

[0086] （実施例1：細胞表層提示用発現カセットを含有するベクターおよびセルラーゼ表層提示用ベクターの調製）

サッカロマイセス・セレビスエ由来の細胞表層局在タンパク質遺伝子*Seed1*（以下、便宜上「*SED1*」ともいう）について、PCR法により、サッカロマイセス・セレビスエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー対（*SED1a*-XhoI-F（配列番号7）および*SED1a*-BsrGI-R（配列番号8））を用いて増幅し、コーディング領域を含むDNA断片を調製した。この断片をXhoIおよびBsrGIで処理し、同様に処理したベクタープラスミドpIBG13（栄養要求性マーカー遺伝子*HIS3*、および*BGL1*発現カセット（すなわち、*GAPDH*（グリセルアルデヒド-3'-リン酸デヒドロゲナーゼ）プロモーター、リゾプス・オリゼ由来グルコアミラーゼの分泌シグナルペプチド配列、*BGL1*のコーディング領域、 α -アグルチニン遺伝子の3'側の半分の領域（ α -アグルチニン遺伝子のコーディング領域の991位から1953位までのヌクレオチドからなる領域）、およびコーディング領域下流445bpのターミネーター領域がこの順に配置されているカセット）を有する表層発現用ベクター：非特許文献8）に連結した。得られたプラスミドをpIBG13Sと命名した。

[0087] サッカロマイセス・セレビスエ由来の細胞表層局在タンパク質遺伝子*Seed1*について、PCR法により、サッカロマイセス・セレビスエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー対*SED1p*-CBA-F（配列番号9）および*SED1p*-CBA-R（配列番号10）を用いて増幅し、プロモーター領域を含むDNA断

片を調製した。この断片を、ベクタープラスミドpIBG13を鋳型とし、プライマー対pIBGvsp-CBA-F（配列番号11）およびpIBGvsp-CBA-R（配列番号12）を用いて増幅した断片と、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpISpBG13と命名した。

[0088] アスペルギルス・アクレアタス由来 β -グルコシダーゼ1（BGL1）遺伝子、トリコデルマ・リーセイ由来エンドグルカナーゼII（EGII）遺伝子、およびトリコデルマ・リーセイ由来セロビオヒドロラーゼII（CBHII）遺伝子の調製は、以下のように行った。

[0089] BGL1、EGII、およびCBHII遺伝子の各遺伝子断片を、PCR法により、それぞれpIBG13、p δ U-PGAGEGII（ α -アグルチニン遺伝子の3'側の半分の領域を有するEGIIの表層発現用ベクター：特許文献5）、およびp δ U-PGAGCGHII（ α -アグルチニン遺伝子の3'側の半分の領域を有するセロビオヒドロラーゼIIの表層発現用ベクター：特許文献5）を鋳型として、BGL1用プライマー対（BGL1-NcoI-F（配列番号13）およびBGL1-PG-R（配列番号14））、EGII用プライマー対（EGII-NcoI-F（配列番号15）およびEGII-XhoI-R（配列番号16））、およびCBHII用プライマー対（CBHII-CBA-F（配列番号17）およびCBHIIaa-CBA-R（配列番号18）（Ag α 1連結用）、またはCBHII-CBA-F（配列番号17）およびCBHIIsa-CBA-R（配列番号19）（SED1連結用））を用いて増幅することにより調製した。

[0090] Ag α 1遺伝子のコーディング領域の3'側の半分の領域を含むDNA断片、およびSED1遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を、PCR法により、それぞれpIBG13、およびサッカロマイセス・セレビシエBY4741株ゲノムを鋳型とし、Ag α 1用プライマー対（AG α 1a-PG-F（配列番号20）およびAG α 1a-BsrGI-R（配列番号21））、およびSED1用プライマー対（SED1a-PG-F（配列番号22）およびSED1a-BsrGI-R（配列番号8））を用いて増幅することにより調製した。

[0091] BGL1遺伝子断片の下流に、Ag α 1遺伝子のコーディング領域の3'

側の半分の領域を含むDNA断片、またはSED1遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片がインフレームになるように連結したDNA断片（それぞれBGL1-Ag α 1、およびBGL1-SED1）を、PCR法により、それぞれBGL1遺伝子断片と、Ag α 1遺伝子のコーディング領域の3'側の半分の領域を含むDNA断片、またはSED1遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を混合したものを鋳型として、BGL1-Ag α 1用プライマー対（BGL1-NcoI-F（配列番号13）およびAG α 1a-BsrGI-R（配列番号21））、およびBGL1-SED1用プライマー対（BGL1-NcoI-F（配列番号13）およびSED1a-BsrGI-R（配列番号8））を用いて増幅することにより調製した。

[0092] BGL1-Ag α 1およびBGL1-SED1断片をそれぞれNcoIおよびBsrGIで処理し、同様に処理したプラスミドpIBG13に、分泌シグナルの下流にインフレームになるように連結した。得られたそれぞれのプラスミドをpIBG-PG-Ag α 1およびpIBG-PG-Sed1と命名した。

[0093] EGII遺伝子断片をNcoIおよびXhoIで処理し、同様に処理したプラスミドpIBG13またはpIBG13Sに、分泌シグナルの下流にインフレームになるように連結した。得られたそれぞれのプラスミドをpIEG-Ag α 1およびpIEG-Sed1と命名した。

[0094] Ag α 1連結用CBHII、またはSED1連結用CBHII遺伝子断片を、それぞれベクタープラスミドpIBG13またはpIBG13Sを鋳型とし、プライマー対AG α 1acb-CBA-F（配列番号23）およびpIBGscb-CBA-R（配列番号24）、またはSED1acb-CBA-F（配列番号25）およびpIBGscb-CBA-R（配列番号24）を用いて増幅した断片と、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpICB-Ag α 1およびpICB-Sed1と命名した。

[0095] BGL1-Ag α 1、BGL1-SED1、EGII-Ag α 1、およびEGII-Sed1断片を、それぞれpIBG-PG-Ag α 1、pIBG-PG-Sed1、pIEG-Ag α 1、およびpIEG-Sed1をNcoIおよびBsrGIで処理することにより調製し、同様に処理したプラスミドpISpBG13に、分泌シグナルの下流にインフレームになるように連結した。得られたそれぞれのプラスミドをpISpBG-PG-Ag α 1、pISpBG-PG-Sed1、pISpEG-Ag α 1、およびpI

SpEG-Sed1と命名した。

- [0096] PCR法により、pISpBG13を鋳型とし、プライマー対SED1p-CBA-F（配列番号9）およびSED1p-CBA-R（配列番号10）を用いて増幅し、SED1遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片を調製した。この断片を、プラスミドpICB-Sed1を鋳型とし、プライマー対pIBGvsp-CBA-F（配列番号11）およびpIBGvsp-CBA-R（配列番号12）を用いて増幅した断片と、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpISpCB-Sed1と命名した。
- [0097] PCR法により、サッカロマイセス・セレビスエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー対NCRv-CBA-F（配列番号26）およびNCRleu2-CBA-R（配列番号27）を用いて増幅し、サッカロマイセス・セレビスエゲノム上の非コーディング領域を含むDNA断片を調製した。
- [0098] PCR法により、サッカロマイセス・セレビスエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー対LEU2nc-CBA-F（配列番号28）およびLEU2v-CBA-R（配列番号29）を用いて増幅し、サッカロマイセス・セレビスエ由来Leu2遺伝子を含むDNA断片を調製した。
- [0099] プラスミドpICB-Ag α 1を鋳型とし、プライマー対pIBGvleu2-CBA-F（配列番号30）およびpIBGvncr-CBA-R（配列番号31）を用いて増幅した断片に、非コーディング領域を含むDNA断片、およびLeu2遺伝子を含むDNA断片を、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpINCCB-Ag α 1と命名した。
- [0100] プラスミドpISpCB-Sed1を鋳型とし、プライマー対pIBGvleu2-CBA-F（配列番号30）およびpIBGvncr-CBA-R（配列番号31）を用いて増幅した断片に、非コーディング領域を含むDNA断片、およびLeu2遺伝子を含むDNA断片を、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpINCCB-Sed1と命名した。
- [0101] サッカロマイセス・セレビスエ由来の細胞表層局在タンパク質遺伝子Cwp2（以下、便宜上「CWP2」ともいう）について、PCR法により、サッカロマイセス・セレビスエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー

対CWP2pv-CBA-F（配列番号32）およびCWP2ps-CBA-R（配列番号33）を用いて増幅し、プロモーター領域を含むDNA断片を調製した。この断片を、プラスミドpISpBG-PG-Sed1を鋳型とし、プライマー対pIBGsc2p-CBA-F（配列番号34）およびpIBGvc2p-CBA-R（配列番号35）を用いて増幅した断片と、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpIC2BG-PG-Sed1と命名した。

[0102] サッカロマイセス・セレビシエ由来の細胞表層局在タンパク質遺伝子CWP2について、PCR法により、サッカロマイセス・セレビシエBY4741株ゲノムを鋳型とし、プライマー対CWP2a-PG-F（配列番号36）およびCWP2a-BsrGI-R（配列番号37）を用いて増幅し、コーディング領域を含むDNA断片を調製した。

[0103] BGL1遺伝子断片の下流に、CWP2遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片がインフレームになるように連結したDNA断片（BGL1-CWP2）を、PCR法により、それぞれBGL1遺伝子断片と、CWP2遺伝子のコーディング領域を含むDNA断片を混合したものを鋳型として、プライマー対BGL1-NcoI-F（配列番号13）およびCWP2a-BsrGI-R（配列番号37）を用いて増幅することにより調製した。

[0104] BGL1-CWP2断片をNcoIおよびBsrGIで処理し、同様に処理したプラスミドpISpBG-PG-Sed1、およびpIC2BG-PG-Sed1に、分泌シグナルの下流にインフレームになるように連結した。得られたそれぞれのプラスミドをpISpBG-PG-Cwp2、およびpIC2BG-PG-Cwp2と命名した。

[0105] （実施例2：セルラーゼ表層提示酵母の調製）

BGL1、およびEGII遺伝子の各プラスミド（pIBG-PG-Ag α 1、またはpIEG-Ag α 1）をNdeIで処理し、それぞれ酵母サッカロマイセス・セレビシエBY4741株（MAT α his3 leu2 met15 ura3株）に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。これらの形質転換株を各遺伝子のGap-Ag α 1形質転換株と称する。

[0106] BGL1、およびEGII遺伝子の各プラスミド（pIBG-PG-Sed1、またはp

IEG-Sed1) をNdeIで処理し、それぞれ酵母サッカロマイセス・セレビスエB Y 4 7 4 1 株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。これらの形質転換株を各遺伝子のG a p - S e d 1 形質転換株と称する。

[0107] B G L 1、およびE G I I 遺伝子の各プラスミド (pISpBG-PG-Ag α 1、またはpISpEG-Ag α 1) をNdeIで処理し、それぞれ酵母サッカロマイセス・セレビスエB Y 4 7 4 1 株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。これらの形質転換株を各遺伝子のS e d 1 - A g α 1 形質転換株と称する。

[0108] B G L 1、およびE G I I 遺伝子の各プラスミド (pISpBG-PG-Sed1、またはpISpEG-Sed1) をNdeIで処理し、それぞれ酵母サッカロマイセス・セレビスエB Y 4 7 4 1 株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。これらの形質転換株を各遺伝子のS e d 1 - S e d 1 形質転換株と称する。

[0109] B G L 1 遺伝子の各プラスミド (pISpBG-PG-Cwp2、またはpIC2BG-PG-Cwp2) をNdeIで処理し、それぞれ酵母サッカロマイセス・セレビスエB Y 4 7 4 1 株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。これらの形質転換株をB G L 1 遺伝子のS e d 1 - C w p 2、およびC w p 2 - C w p 2 形質転換株と称する。

[0110] C B H I I 遺伝子のプラスミド (pINCCB-Ag α 1) をNdeIで処理し、E G I I 遺伝子のG a p - A g α 1 形質転換株 (MAT α leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株をE G I I - C B H I I 遺伝子共発現型G a p - A g α 1 形質転換株と称する。

[0111] C B H I I 遺伝子のプラスミド (pINCCB-Sed1) をNdeIで処理し、E G I I 遺伝子のS e d 1 - S e d 1 形質転換株 (MAT α leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株をE G I I - C B H I I 遺伝子共発現型S e d 1 - S e d 1 形質転換株と称する。

[0112] 細胞表層発現用ポリヌクレオチドを含まないベクタープラスミドpRS403 (H

IS3酵母発現ベクター：Agilent Technologies社）をNdeIで処理し、酵母サッカロマイセス・セレビスエBY4741株（MAT α his3 leu2 met15 ura3株）に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を空ベクター導入株と称する。

[0113] （実施例3： β -グルコシダーゼ活性の検討1）

BGL1遺伝子のGap-Ag α 1形質転換株、Gap-Sed1形質転換株、Sed1-Ag α 1形質転換株、およびSed1-Sed1形質転換株について、 β -グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0114] 菌体をSD培地（ロイシン、メチオニン、およびウラシルを補充）5 mLに移植し、30℃、180 rpmにて18時間培養し（前培養）、次いで1×YPD培地50 mLに移植し（初発OD₆₀₀=0.05）、30℃、150 rpmにて培養した（本培養）。本培養開始からの24時間経過ごとに培養液をそれぞれ回収し、菌体の β -グルコシダーゼ活性の測定は、以下のように行った：

（1）菌体を蒸留水で2回洗浄；

（2）反応液500 μ L（組成：10 mM pNPG（p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド）100 μ L（最終濃度2 mM）；500 mM クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）50 μ L（最終濃度50 mM）；蒸留水250 μ L；および酵母100 μ L）（最終菌体濃度1～10 g 湿潤菌体/L））を調製し、500 rpm、30℃にて10分間反応；

（3）反応終了後、3M Na₂CO₃ 500 μ Lを加え反応を停止；そして

（4）10,000 gで5分間遠心後、上清の400 nmにおける吸光度ABS₄₀₀を測定。1分間で1 μ molのpNP（p-ニトロフェノール）を遊離する酵素量を1 Uとする。

[0115] この結果を図1に示す。図1中の記号は以下の通りである：白丸、Gap-Ag α 1形質転換株（Gap-Ag α 1型）；白菱形、Gap-Sed1形質転換株（Gap-Sed1型）；白三角、Sed1-Ag α 1形質転換

株 (S e d 1 - A g α 1 型) ; および白四角、S e d 1 - S e d 1 形質転換株 (S e d 1 - S e d 1 型) 。図 1 に示されるように、S e d 1 - S e d 1 形質転換株は、G a p - A g α 1 形質転換株、G a p - S e d 1 形質転換株、および S e d 1 - A g α 1 形質転換株と比較して顕著に高い B G L 活性を示すことが観察された。このように、S e d 1 (S E D 1) のプロモーターとアンカーとをセットで用いると相乗効果が生じ、個別に用いた場合に比べて B G L 活性が大きく向上することが示される。

[0116] (実施例 4 : エンドグルカナーゼ活性の検討)

E G I I 遺伝子の G a p - A g α 1 形質転換株、G a p - S e d 1 形質転換株、S e d 1 - A g α 1 形質転換株、および S e d 1 - S e d 1 形質転換株について、エンドグルカナーゼ (E G) 活性を検討した。

[0117] 菌体を S D 培地 (ロイシン、メチオニン、およびウラシルを補充) 5 m L に移植し、3 0 ° C、1 8 0 r p m にて 1 8 時間培養し (前培養)、次いで 1 × Y P D 培地 5 0 m L に移植し (初発 O D₆₀₀ = 0. 0 5)、3 0 ° C、1 5 0 r p m にて培養した (本培養)。本培養開始からの 4 8 時間後に培養液をそれぞれ回収し、菌体のエンドグルカナーゼ活性の測定は、以下のように行った :

(1) 菌体を蒸留水で 2 回洗浄 ;

(2) 反応液 2 5 0 0 μ L (組成 : セラザイム C タブレット (M e g a z y m e 社製) 1 錠 ; 5 0 0 m M クエン酸ナトリウム緩衝液 (p H 5. 0) 2 5 0 μ L (最終濃度 5 0 m M) ; 蒸留水 2 0 0 0 μ L ; および酵母 2 5 0 μ L (最終菌体濃度 1 0 g 湿潤菌体 / L)) を調製し、静置、3 8 ° C にて 4 時間反応 ;

(3) 反応終了後、1 0, 0 0 0 g で 5 分間遠心後、上清の 5 9 0 n m の吸光度 A B S₅₉₀ を測定。

[0118] この結果を図 2 に示す。図 2 中、横軸は左から順に G a p - A g α 1 形質転換株 (G a p - A g α 1)、G a p - S e d 1 形質転換株 (G a p - S e d 1)、S e d 1 - A g α 1 形質転換株 (S e d 1 - A g α 1)、および S

ed1-Sed1形質転換株(Sed1-Sed1)の結果を示し、縦軸は590nmでの吸光度を示す。図2に示されるように、Sed1-Sed1形質転換株は、Gap-Agα1形質転換株、Gap-Sed1形質転換株、およびSed1-Agα1形質転換株と比較して顕著に高いEG活性を示すことが観察された。このように、EGにおいても、Sed1(SED1)のプロモーターとアンカーとをセットで用いると相乗効果が生じ、個別に用いた場合に比べて活性が大きく向上することが示される。

[0119] (実施例5:β-グルコシダーゼ活性の検討2)

BGL1遺伝子のSed1-Sed1形質転換株、Gap-Agα1形質転換株、およびCwp2-Cwp2形質転換株について、実施例3と同様に、β-グルコシダーゼ(BGL)活性を検討した。

[0120] この結果を図3に示す。図3中の記号は以下の通りである：白丸、Gap-Agα1形質転換株(Gap-Agα1型)；白四角、Sed1-Sed1形質転換株(Sed1-Sed1型)；および白三角、Cwp2-Cwp2形質転換株(Cwp2-Cwp2型)。図3に示されるように、Sed1-Sed1形質転換株においてGap-Agα1形質転換株と比較して顕著に高いBGL活性が見られただけでなく、Cwp2-Cwp2形質転換株においてもこのようなBGL活性の顕著な増大が観察された。このように、同種の遺伝子に由来するアンカーとプロモーターとをセットで用いることによる活性向上効果は、Sed1のセットを用いた場合に限定されず、Cwp2(CWP2)など他の細胞表層局在タンパクのセットを用いた場合にも見られた。

[0121] (実施例6:水熱処理稲ワラ加水分解の検討)

EGII-CBIII遺伝子共発現型Sed1-Sed1形質転換株、EGII-CBIII遺伝子共発現型Gap-Agα1形質転換株、および空ベクター導入株について、水熱処理稲ワラ加水分解に対する効果を検討した。

[0122] 菌体をSD培地(メチオニン、およびウラシルを補充)10mLに移植し

、30℃、180rpmにて18時間培養し（前培養）、次いで1×YPD培地500mLに移植し（初発OD₆₀₀=0.05）、30℃にて静置培養した（本培養）。本培養開始からの48時間後に培養液をそれぞれ回収し、菌体を蒸留水で2回洗浄し、加水分解処理に用いた。

[0123] 稲ワラを130～300℃、10MPa程度の水にて処理し、固形分を回収したものを水熱処理稲ワラとして用いた。

[0124] 加水分解処理は、以下の条件下で行った：

水熱処理稲ワラ	100g乾燥重/L
酵母エキス	10g/L
ペプトン	20g/L
クエン酸ナトリウム緩衝液	50mM（pH5.0）
酵母菌体	100g湿潤菌体重量/L
合計	10mL

上記を回転式発酵装置に入れ、市販酵素剤を添加せずに、38℃、35rpm、96時間反応させた。

[0125] 空ベクター導入株（表層提示なし）では96時間後も水熱処理稲ワラに変化は見られなかった。EGII-CBHII遺伝子共発現型Gap-Agα1形質転換株では48時間以降に徐々に加水分解にともなう流動性の上昇が見られた。EGII-CBHII遺伝子共発現型Sed1-Sed1形質転換株では15時間で大幅な流動性の上昇が見られた。このようなSed1-Sed1形質転換株によれば、水熱処理稲ワラを加水分解し、流動性を大きく上昇させることができた。

[0126] （実施例7：β-グルコシダーゼ活性の検討3）

BGL1遺伝子のSed1-Sed1形質転換株、Cwp2-Cwp2形質転換株、およびSed1-Cwp2形質転換株について、実施例3と同様にして、β-グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0127] この結果を図4に示す。図4中の記号は以下の通りである：白四角、Sed1-Sed1形質転換株（Sed1-Sed1型）；白三角、Cwp2-

Cwp2形質転換株（Cwp2-Cwp2型）；および黒三角、Sed1-Cwp2形質転換株（Sed1-Cwp2型）。図4に示されるように、Sed1-Cwp2形質転換株では、Sed1-Sed1形質転換株およびCwp2-Cwp2形質転換株ほどの活性増大は見られなかったが、Gap-Agα1形質転換株と比較して活性の増大が観察された。

[0128] （実施例8：SED1遺伝子破壊株における表層提示β-グルコシダーゼ活性の検討）

本実施例では、BY4741株およびそのSED1遺伝子破壊株（BY4741 SED1Δ株）のそれぞれについて、遺伝子Sed1のコーディング領域およびプロモーターを用いて調製したβ-グルコシダーゼ細胞表層提示酵母のβ-グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0129] BY4741株およびBY4741 SED1Δ株のそれぞれについて、上記実施例2に記載のように、BGL1遺伝子のプラスミドpISpBG-PG-Sed1を用いて形質転換した。なお、BY4741 SED1Δ株は、Yeast Knock out Collection Parental Strain - BY4741（Open Biosystems社）から入手した。得られたそれぞれの形質転換株、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1Δ株およびSed1-Sed1形質転換BY4741株について、実施例3と同様に、β-グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0130] この結果を図5に示す。図5中の記号は以下の通りである：黒丸、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1Δ株（SED1Δ株）；および黒四角、Sed1-Sed1形質転換BY4741株（BY4741株）。図5に示されるように、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1Δ株では、Sed1-Sed1形質転換BY4741株と比較して表層BGL活性の最大値が上昇し、特に培養72時間以降のBGL活性が顕著に増大していた。

[0131] （実施例9：SSD1遺伝子破壊株における表層提示β-グルコシダーゼ活性の検討）

本実施例では、BY4741株およびそのSSD1遺伝子破壊株（BY4741 SSD1Δ株）のそれぞれについて、遺伝子Sed1のコーディング領域およびプロモーターを用いて調製したβ-グルコシダーゼ細胞表面提示酵母のβ-グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0132] BY4741株およびBY4741 SSD1Δ株のそれぞれについて、実施例2に記載のように、BGL1遺伝子のプラスミドpISpBG-PG-Sed1を用いて形質転換した。なお、BY4741 SSD1Δ株は、Yeast Knockout Collection Parental Strain - BY4741（Open Biosystems社）から入手した。得られたそれぞれの形質転換株、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1Δ株およびSed1-Sed1形質転換BY4741について、実施例3と同様にして、β-グルコシダーゼ（BGL）活性を検討した。

[0133] この結果を図6に示す。図6中の記号は以下の通りである：黒三角、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1Δ株（SSD1Δ株）；および黒四角、Sed1-Sed1形質転換BY4741株（BY4741株）。図6に示されるように、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1Δ株では、Sed1-Sed1形質転換BY4741株と比較して、表面BGL活性の最大値に大きな上昇は見られなかったものの、培養48時間後のBGL活性がやや向上していた。さらに、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1Δ株では、Sed1-Sed1形質転換BY4741株と比較して、培養48時間後では1.16倍、96時間後では1.26倍に増大しており、培養によって得られた菌体が持つBGL活性の総量が大きく増大した。

[0134] （実施例10：二重破壊株における表面提示β-グルコシダーゼ活性の検討）

本実施例では、BY4741株についてSED1遺伝子およびSSD1遺伝子の両遺伝子を破壊した株（二重破壊株）を、BY4741株、BY4741 SED1Δ株およびBY4741 SSD1Δ株とともに、遺伝子Sed1のコーディング領域およびプロモーターを用いて調製したβ-グルコ

シダーゼ細胞表層提示酵母の β -グルコシダーゼ (BGL) 活性について検討した。

[0135] Sed1-Sed1形質転換BY4741株の二重破壊株を、以下のように調製した。PCR法により、プラスミドpTEF1/Zeo (Invitrogen社より入手) を鋳型とし、プライマー対SED1d-zeo-F1 (配列番号40) およびSED1d-zeo-R1 (配列番号41) を用いて、ゼオシン耐性遺伝子を含み、かつ両端にそれぞれSED1遺伝子の上流および下流の領域と相同性を持つ30bの配列を付与された約1.1kbのDNA断片を調製した。さらに、この断片を鋳型とし、プライマー対SED1d-zeo-F2 (配列番号42) およびSED1d-zeo-R2 (配列番号43) を用いて再度PCR法による増幅を行い、ゼオシン耐性遺伝子を含み、かつ両端にそれぞれSED1遺伝子の上流および下流の領域と相同性を持つ80bの配列を付与された約1.2kbのDNA断片を調製した。このDNA断片を、上記実施例9で得られたSed1-Sed1形質転換SSD1 Δ 株に供し、酢酸リチウム法により形質転換し、ゼオシン耐性の株を選抜して、SED1およびSSD1についての二重破壊株を獲得した。この獲得した形質転換株をSed1-Sed1形質転換BY4741 SED1 Δ SSD1 Δ 株と称する。

[0136] Sed1-Sed1形質転換BY4741株、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1 Δ 株、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1 Δ 株、およびSed1-Sed1形質転換BY4741 SED1 Δ SSD1 Δ 株について、実施例3と同様にして、 β -グルコシダーゼ (BGL) 活性を検討した。

[0137] この結果を図7に示す。図7中の記号は以下の通りである：白菱形、Sed1-Sed1形質転換BY4741株 (BY4741)；黒四角、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1 Δ 株 (BY4741 SED1 Δ)；黒三角、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SSD1 Δ 株 (BY4741 SSD1 Δ)；および黒丸、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1 Δ SSD1 Δ 株 (BY4741 SED1 Δ SSD1 Δ)。

1 Δ)。図7に示されるように、二重破壊株を宿主としてSED1型表層提示カセットを発現させた場合 (Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1ΔSSD1Δ株)、SED1の単独破壊株が宿主の場合 (Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1Δ株)を上回る表層BGL活性の最大値および上昇速度が見られた。さらに得られる菌体量についても、Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1ΔSSD1Δ株では、Sed1-Sed1形質転換BY4741株と比較して48時間後では1.10倍、96時間後では1.20倍に増大し、SSD1の単独破壊株が宿主の場合 (Sed1-Sed1形質転換BY4741 SED1Δ株)と実質的に同様の効果が見られた。

[0138] (実施例11：エタノール生産能の検討)

EGII遺伝子のSed1-Sed1形質転換株およびGap-Agα1形質転換株について、エタノール生産能を検討した。

[0139] 本実施例では、EGII遺伝子を細胞表層発現させた2種のEGII表層提示株、すなわちEGII表層提示Sed1-Sed1形質転換株およびEGII表層提示Gap-Agα1形質転換株、ならびに空ベクター導入株 (表層提示なし)を用いた。本検討は、発酵培養のために以下の組成の培養液を用いた以外は、実施例6の手順に従い、実施した：

水熱処理稲ワラ	100g乾燥重/L
酵母エキス	10g/L
ペプトン	20g/L
クエン酸ナトリウム緩衝液	50mM (pH5.0)
酵母菌体	100g湿潤菌体重量/L
酵素剤 (Ctec2:Novozymes社製)	1FPU/10mL
合計	10mL

[0140] この結果を図8に示す。図8中の記号は以下の通りである：黒丸、EGII表層提示Sed1-Sed1形質転換株 (Sed1-Sed1型)；黒三角、EGII表層提示Gap-Agα1形質転換株 (Gap-Agα1型)

；および黒四角、空ベクター導入株（表層提示なし）。図8に示されるように、EGII表層提示Gap-Ag α 1形質転換株では、表層提示なしの空ベクター導入株と比較して水熱処理稲ワラの同時糖化発酵におけるエタノール生産速度および収率に大きな差が見られなかったのに対し、Seed1-Seed1形質転換株では、これらが顕著に増大した。

[0141] （実施例12：アミラーゼ表層提示用ベクターの調製）

リゾプス・オリゼ由来グルコアミラーゼ遺伝子、およびストレプトコッカス・ボビス由来 α -アミラーゼ遺伝子の調製は、以下のように行った。

[0142] グルコアミラーゼ遺伝子断片を、PCR法により、p δ U-PGGluRAG（ α -アグルチニン遺伝子の3'側の半分の領域を有するグルコアミラーゼの表層発現用ベクター：非特許文献9）を鋳型として、プライマー対pIBGvsp-CBA-F（配列番号11）およびGA-CBA-R（配列番号44）を用いて増幅することにより調製した。

[0143] 酵母サッカロマイセス・セレビシエの α 因子の分泌シグナルペプチドをコードする断片およびストレプトコッカス・ボビス由来 α -アミラーゼ遺伝子を含む遺伝子断片を、PCR法により、pUPGSBAAG（ α -アグルチニン遺伝子の3'側の半分の領域を有する α -アミラーゼの表層発現用ベクター：非特許文献10）を鋳型として、 α -アミラーゼ用プライマー対AA-CBA-F（配列番号45）およびAA-CBA-R（配列番号46）を用いて増幅することにより調製した。

[0144] グルコアミラーゼ遺伝子、または α 因子分泌シグナルペプチドコード断片および α -アミラーゼ遺伝子を含む遺伝子断片を、それぞれベクタープラスミドpINCCB-Sed1またはpISpBG-PG-Sed1を鋳型とし、プライマー対SED1aga-CBA-F（配列番号47）およびSED1p-CBA-R（配列番号10）、またはSED1aaa-CBA-F（配列番号48）およびSED1p-CBA-R2（配列番号49）を用いて増幅した断片と、One-step isothermal assemblyにより連結した。得られたプラスミドをpINCGA-Sed1およびpISpAA-Sed1と命名した。

[0145] （実施例13：アミラーゼ表層提示酵母の調製）

α -アミラーゼ遺伝子のプラスミド (pISpAA-Sed1) をNdeIで処理し、酵母サッカロマイセス・セレビシエBY4741株 (MAT α his3 leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を α -アミラーゼ遺伝子のSed1-Sed1形質転換株と称する。

[0146] グルコアミラーゼ遺伝子のプラスミド (pINCGA-Sed1) をNdeIで処理し、 α -アミラーゼ遺伝子のSed1-Sed1形質転換株 (MAT α leu2 met15 ura3株) に供し、酢酸リチウム法により形質転換した。この形質転換株を α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型Sed1-Sed1形質転換株と称する。

[0147] (実施例14: α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性の検討)

α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型Sed1-Sed1形質転換株について、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性を検討した。

[0148] 菌体をSD培地 (メチオニン、およびウラシルを補充) 5 mL に移植し、30°C、180 rpmにて18時間培養し (前培養)、次いで1×YPD培地50 mL に移植し (初発OD₆₀₀=0.05)、30°C、150 rpmにて培養した (本培養)。本培養開始からの24時間経過ごとに培養液をそれぞれ回収し、菌体を蒸留水で2回洗浄した。菌体の α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性の測定は、それぞれ α -アミラーゼ測定キット (キッコーマン株式会社製) および糖化力測定キット (キッコーマン株式会社製) を用いて、pH 5.0、37°Cにて行った。

[0149] この結果を図9に示す。図9中、白菱形は α -アミラーゼ活性測定の結果を示し、白四角はグルコアミラーゼ活性測定の結果を示す。図9に示されるように、 α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型Sed1-Sed1形質転換株は、高い α -アミラーゼ活性とグルコアミラーゼ活性を同時に示すことが観察された。このように、デンプン分解酵素 (α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ) においても、セルロース分解酵素 (エンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、および β -グルコシダーゼ) と同様の細胞

表層提示が可能であることが示された。

[0150] (実施例 15 : デンプン同時糖化発酵の検討)

α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型 S e d 1 - S e d 1 形質転換株について、生デンプンからのエタノール生産能を検討した。

[0151] 菌体を S D 培地 (メチオニン、およびウラシルを補充) 10 mL に移植し、30℃、180 rpm にて 18 時間培養し (前培養)、次いで 1 × Y P D 培地 500 mL に移植し (初発 OD₆₀₀ = 0.05)、30℃、150 rpm にて培養した (本培養)。本培養開始からの 72 時間後に培養液を回収し、菌体を蒸留水で 2 回洗浄し、同時糖化発酵に用いた。

[0152] とうもろこし由来デンプン (和光純薬工業株式会社製) を生デンプンとして用いた。

[0153] 加水分解処理は、以下の条件下で行った :

生デンプン	200 g 乾燥重 / L
酵母エキス	10 g / L
ペプトン	20 g / L
酵母菌体	50 g 湿潤菌体重量 / L
合計	5 mL

上記を回転式発酵装置に入れ、市販酵素剤を添加せずに、30℃、35 rpm、120 時間反応させた。

[0154] この結果を図 10 に示す。 α -アミラーゼ-グルコアミラーゼ遺伝子共発現型 S e d 1 - S e d 1 形質転換株によれば、市販酵素剤を添加することなく酵母菌体のみで生デンプンを加水分解し、直接エタノールに変換することができた。

産業上の利用可能性

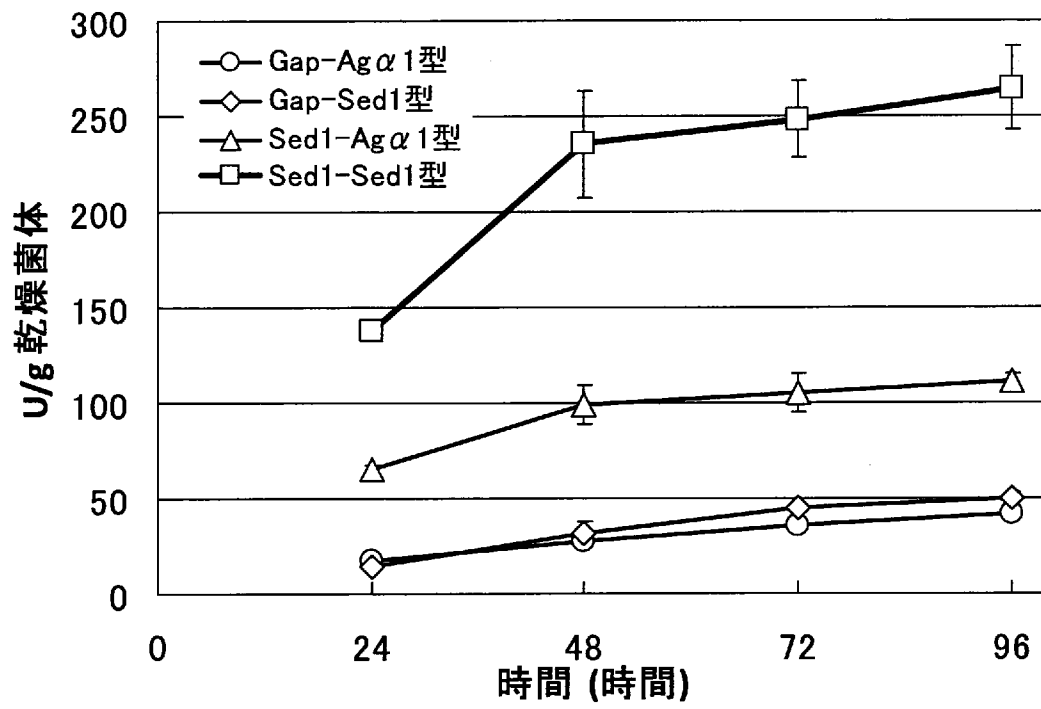
[0155] 高活性にて酵素などのタンパク質が細胞表層に提示される酵母の作製を可能とする細胞表層発現用ポリヌクレオチドが提供される。このようなポリヌクレオチドが導入された酵母は、その細胞表層に高活性のタンパク質を発現することができる。例えば、タンパク質がセルロース分解酵素の場合、セル

ロース系バイオマスからのバイオ燃料（エタノール、ブタノール、イソプレノイドなど）や化学品ポリマー原料（イソプロパノール、アミノ酸、有機酸、キノン類など）の生産に応用することができる。バイオマスの有効利用は、環境への負荷を低減するだけでなく、化石資源の利用によるCO₂排出を抑制することが期待できる。

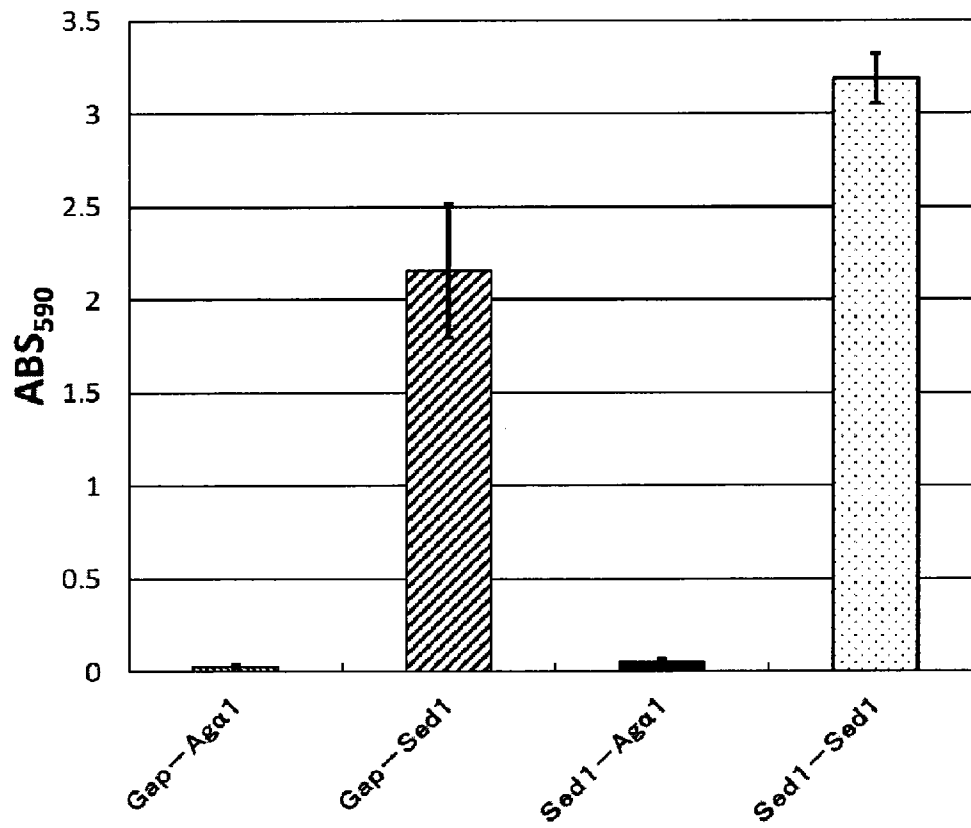
請求の範囲

- [請求項1] 細胞表層発現用ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、プロモーター、分泌シグナル配列、目的タンパク質をコードする配列、および細胞表層局在タンパク質またはその細胞膜結合領域をコードする配列を含み、該プロモーターが、該細胞表層局在タンパク質をコードする遺伝子のプロモーターである、ポリヌクレオチド。
- [請求項2] 前記細胞表層局在タンパク質がS E D 1 またはC W P 2 である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 請求項 1 または 2 に記載の細胞表層発現用ポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。
- [請求項4] 請求項 1 または 2 に記載の細胞表層発現用ポリヌクレオチドまたは請求項 3 に記載の発現ベクターが導入された、形質転換酵母。
- [請求項5] S E D 1 およびS S D 1 からなる群より選択される少なくとも 1 つを欠損している宿主酵母から得られる、請求項 4 に記載の形質転換酵母。
- [請求項6] S E D 1 およびS S D 1 を欠損している宿主酵母から得られる、請求項 5 に記載の形質転換酵母。
- [請求項7] セルロース分解酵素およびデンプン分解酵素からなる群から選択される少なくとも 1 つの酵素を細胞表層提示する、請求項 4 から 6 のいずれかに記載の形質転換酵母。
- [請求項8] エタノールを製造する方法であって、
請求項 7 に記載の形質転換酵母を発酵培養する工程を含む、方法。

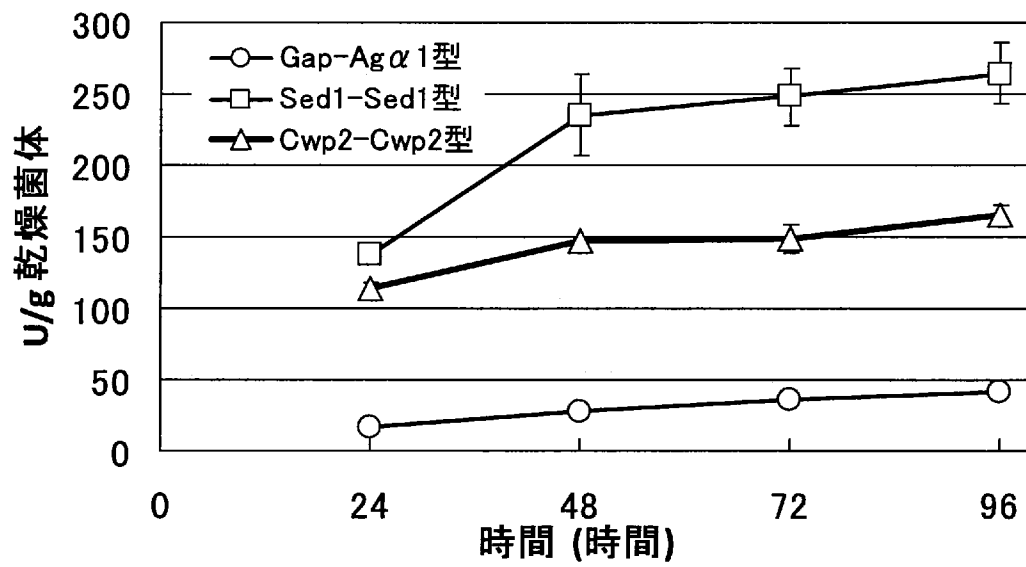
[図1]



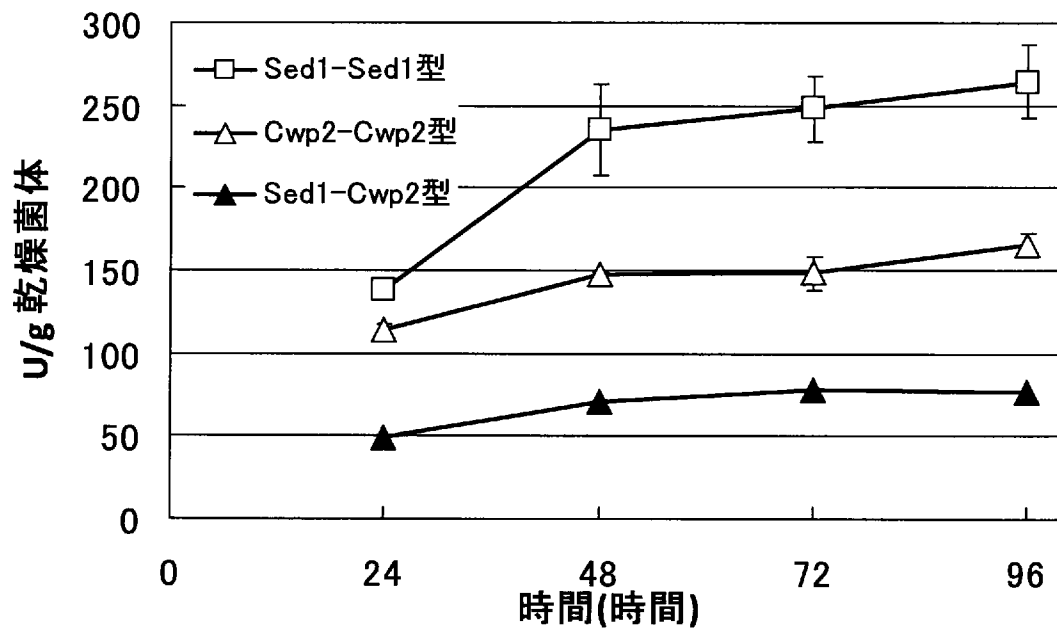
[図2]



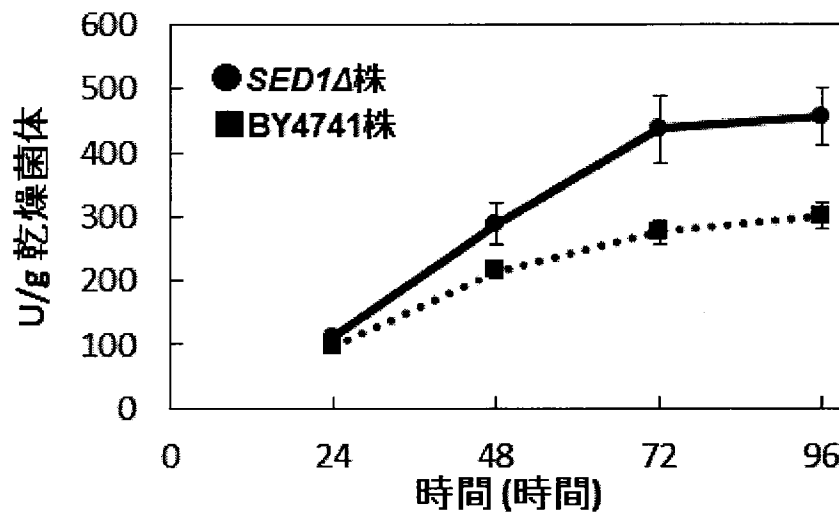
[図3]



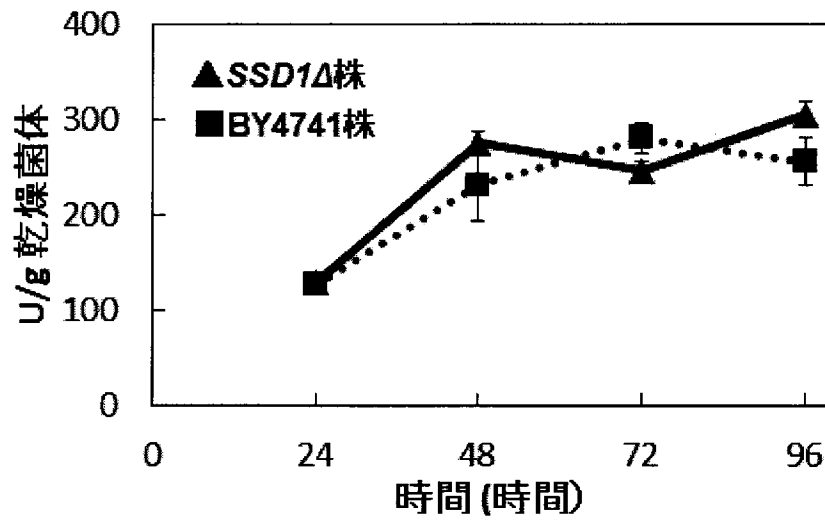
[図4]



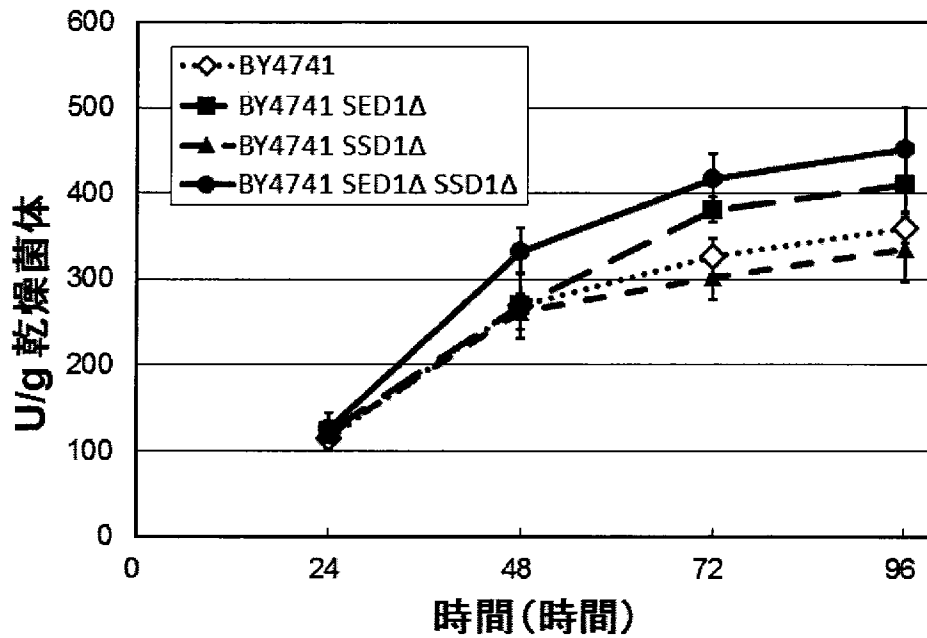
[図5]



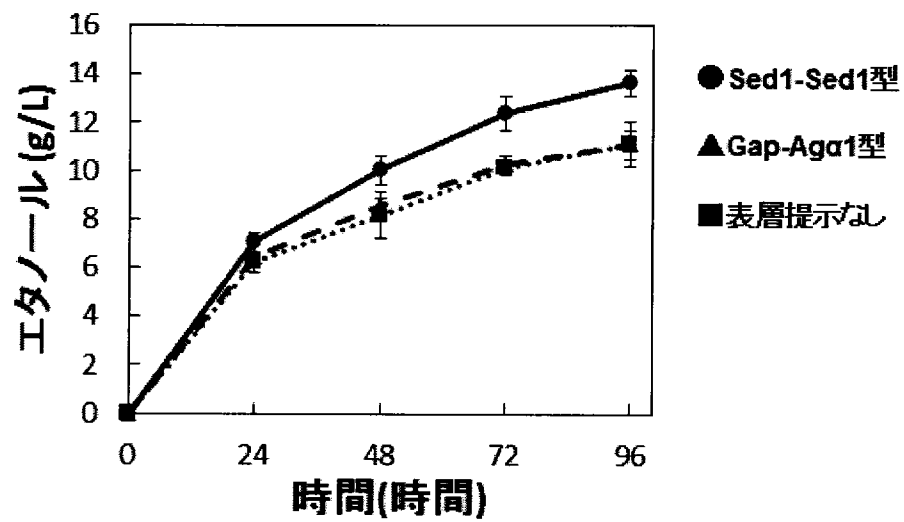
[図6]



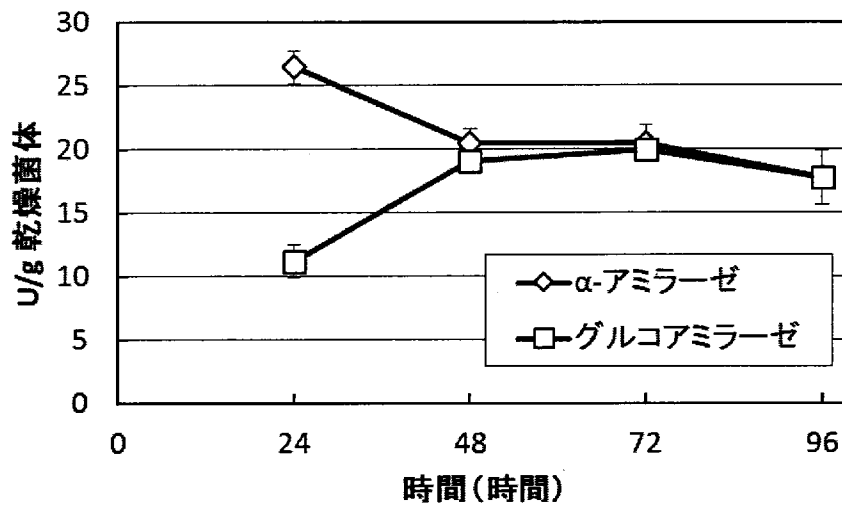
[図7]



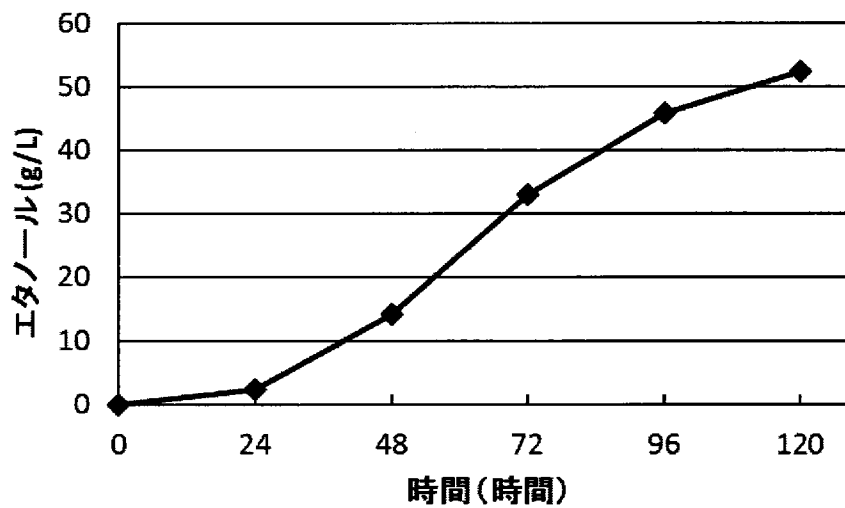
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058189

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P7/06(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/19, C12P7/06

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAM, A. F. J. et al., Green fluorescent	1-4
Y	protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , FEMS Microbiology Letters, 1998, Vol.162, p.249-255, particularly, page 252, left column, lines 4 to 12, page 250, right column, 3rd paragraph, pages 252 to 254, 3.2.	1-8
Y	KOTAKA, A. et al., Enhancement of β -glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of SED1, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, Vol.109, No.5, p.442-446, particularly, page 442, abstract, page 442, left column, 1st to 2nd paragraphs, right column, 2nd paragraph, page 446, left column, the last paragraph	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 June, 2014 (17.06.14)

Date of mailing of the international search report
01 July, 2014 (01.07.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058189

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-086310 A (Gekkeikan Sake, Co., Ltd.), 17 April 2008 (17.04.2008), particularly, claims 1, 13; paragraph [0059] (Family: none)	1-8
Y	JP 2005-245335 A (Gekkeikan Sake, Co., Ltd.), 15 September 2005 (15.09.2005), particularly, claim 1; example 5; paragraph [0035] (Family: none)	1-8
Y	WHEELER, R. T. et al., A <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> mutant with increased virulence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, Vol.100, No.5, p.2766-2770, particularly, page 2766, abstract	1-8
Y	SU, G.-D. et al., Surface display of active lipase in <i>Pichia pastoris</i> using Sed1 as an anchor protein, Biotechnology Letters, 2010, Vol.32, p.1131-1136, particularly, page 1131, abstract	1-8
P,X	INOKUMA, K. et al., Efficient yeast cell- surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter, Biotechnology for Biofuels [online], 2014.01.14, Vol.7, 8 (doi:10.1186/ 1754-6834-7-8), [retrieved on 2014-06-12], URL: http://www.biotechnologyforbiofuels.com/ content/pdf/1754-6834-7-8.pdf , entire text	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12P7/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/19, C12P7/06

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	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014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）

CAplus /MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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	RAM, A. F. J. et al., Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , FEMS Microbiology Letters, 1998, Vol.162, p.249-255, 特に、252 頁左欄 4-12 行、250 頁右欄 3 段落、252-254 頁の 3.2.	1-4 1-8

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.06.2014

国際調査報告の発送日

01.07.2014

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）

吉田 知美

4 B

3335

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
Y	KOTAKA, A. et al., Enhancement of β -glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of SED1, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, Vol.109, No. 5, p.442-446, 特に、442 頁要約、442 頁左欄 1-2 段落、右欄 2 段落、446 頁左欄最終段落	1 - 8
Y	JP 2008-086310 A (月桂冠株式会社) 2008.04.17, 特に、請求項 1、13、[0059] (ファミリーなし)	1 - 8
Y	JP 2005-245335 A (月桂冠株式会社) 2005.09.15, 特に、請求項 1、実施例 5、[0035] (ファミリーなし)	1 - 8
Y	WHEELER, R. T. et al., A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutant with increased virulence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, Vol.100, No.5, p.2766-2770, 特に、2766 頁要約	1 - 8
Y	SU, G.-D. et al., Surface display of active lipase in <i>Pichia pastoris</i> using Sed1 as an anchor protein, Biotechnology Letters, 2010, Vol.32, p.1131-1136, 特に、1131 頁要約	1 - 8
P X	INOKUMA, K. et al., Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter, Biotechnology for Biofuels [online], 2014.01.14, Vol.7, 8 (doi:10.1186/1754-6834-7-8), [retrieved on 2014-06-12], URL: http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-7-8.pdf 全文	1 - 8