

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6286745号
(P6286745)

(45) 発行日 平成30年3月7日 (2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日 (2018.2.16)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 9/42 (2006.01)

C 1 2 N 9/42 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 10 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-184910 (P2014-184910)
 (22) 出願日 平成26年9月11日 (2014.9.11)
 (65) 公開番号 特開2016-54700 (P2016-54700A)
 (43) 公開日 平成28年4月21日 (2016.4.21)
 審査請求日 平成28年11月29日 (2016.11.29)

(73) 特許権者 000005326
 本田技研工業株式会社
 東京都港区南青山二丁目1番1号
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100146835
 弁理士 佐伯 義文
 (74) 代理人 100175802
 弁理士 寺本 光生
 (74) 代理人 100094400
 弁理士 鈴木 三義
 (74) 代理人 100126664
 弁理士 鈴木 慎吾

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性β-グルコシダーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド、又は

(C) 配列番号1で表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からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド、
 からなるβ-グルコシダーゼ触媒領域を有することを特徴とする、耐熱性β-グルコシダーゼ。

【請求項2】

キシラナーゼ活性を有する、請求項1に記載の耐熱性β-グルコシダーゼ。

【請求項3】

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有する

10

20

ポリペプチドをコードする塩基配列、

(c) 配列番号1で表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からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、又は

(d) 配列番号2又は3で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有し、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル-β-D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、からなるβ-グルコシダーゼ触媒領域をコードする領域を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記ポリペプチドが、キシラナーゼ活性も有する、請求項3に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

請求項3又は4に記載のポリヌクレオチドが組込まれており、宿主細胞において、β-グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを発現し得る、発現ベクター。

【請求項6】

請求項5に記載の発現ベクターが導入されている、形質転換体。

【請求項7】

真核微生物である、請求項6に記載の形質転換体。

【請求項8】

請求項6又は7に記載の形質転換体内で、耐熱性β-グルコシダーゼを生産することを含む、耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法。

【請求項9】

請求項1若しくは2に記載の耐熱性β-グルコシダーゼ、又は請求項3若しくは4に記載のポリヌクレオチドがコードする耐熱性β-グルコシダーゼと、少なくとも1種のその他のグリコシド加水分解酵素とを含む、グリコシド加水分解酵素混合物。

【請求項10】

セルロースを含む材料を、請求項1若しくは2に記載の耐熱性β-グルコシダーゼ、請求項3若しくは4に記載のポリヌクレオチドがコードする耐熱性β-グルコシダーゼ、又は請求項6若しくは7に記載の形質転換体に接触させることにより、セルロース分解物を生産することを含む、セルロース分解物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐熱性β-グルコシダーゼ、当該耐熱性β-グルコシダーゼをコードするポリヌクレオチド、当該耐熱性β-グルコシダーゼを発現するための発現ベクター、当該発現ベクターが組込まれた形質転換体及び当該耐熱性β-グルコシダーゼを用いたセルロース分解物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

植物バイオマス、若しくはリグノセルロースは、地球上に最も豊富にある再生可能エネルギー源である。地球環境保全や化石燃料枯渇の観点から、植物バイオマスをエタノールなどのバイオ燃料や化成品の原料として用いるバイオリファイナリーが注目を浴びている。植物バイオマス乾燥重量の主要構成要素は、セルロースやヘミセルロース等の多糖類とリグニンから成るリグノセルロースである。例えば、多糖類はグリコシド加水分解酵素によってグルコースやキシロースなどの単糖に加水分解された後、バイオ燃料や化成品の原料として利用される。

【0003】

リグノセルロースは複雑な構造を持ち、難分解性であり、単一のグリコシド加水分解酵

10

20

30

40

50

素では分解、糖化が難しい。リグノセルロースの全分解には、一般的に、エンドグルカナーゼ（セルラーゼ又はエンド－1，4－ β －D－グルカナーゼ、EC 3.2.1.4）、エキソ型のセロビオハイドロラーゼ（1，4－ β －セロビオシダーゼ又はセロビオハイドロラーゼ、EC 3.2.1.91）、 β －グルコシダーゼ（EC 3.2.1.21）の3種の酵素が必要とされ、その他にも、ヘミセルラーゼであるキシラナーゼ（エンド－1，4－ β －キシラナーゼ、EC 3.2.1.8）や他の植物細胞壁分解酵素も含めた複数酵素の適切な配合が必要であると考えられている。

【0004】

セロビオハイドロラーゼによってセルロースが加水分解を受けると、主に、二糖のセロビオースが生成する。 β －グルコシダーゼは、このセロビオースを単糖のグルコースに加水分解することから、リグノセルロースを最終的に単糖にまで分解するために必要不可欠な酵素の一つである。

10

【0005】

従来のリグノセルロースを資源とするバイオエタノール製造では、エタノールの高エネルギー効率変換を目的として、高固体負荷（30～60% solid loading）による糖化处理が試みられている。このような高固体負荷によるリグノセルロースの酵素糖化は、バイオマス糖化液の粘性が高く、リグノセルロースの加水分解反応が進み難い。そこで、耐熱性酵素を用いて、例えば80℃以上の高温で酵素糖化处理を行うことにより、加水分解反応速度が上昇することに加えて、バイオマス糖化液の粘性が低下することから、糖化反応時間の短縮及び酵素量の削減が達成できると期待される。このため、各種グリコシド加水分解酵素について、より耐熱性に優れた酵素の開発が望まれている。

20

【0006】

多くの耐熱性酵素は、高温環境に生息する好熱性微生物から遺伝子をクローニングしてDNA配列を決定した後、大腸菌や糸状菌などにより発現させることにより得られてきた。例えば、特許文献1には、糸状菌アクレモニウム・セルロリティカス（*Acremonium cellulolyticus*）由来の耐熱性 β －グルコシダーゼ（至適温度70℃、至適pH3.5～4.0）が、特許文献2には、アクレモニウム・セルロリティカス由来の3種の耐熱性 β －グルコシダーゼ（至適温度55℃、至適pH4.5～5.1）が、特許文献3には、サーモアナエロバクター（*Thermoanaerobacter*）由来の耐熱性 β －グルコシダーゼ（至適温度80℃、至適pH5～6）が、非特許文献1には、サーモアスカス・オーランティアカス（*Thermoascus auranticus*）由来の耐熱性 β －グルコシダーゼ（至適温度80℃、至適pH4.6）が、非特許文献2には、フェルビドバクテリウム・イスランジカム（*Fervidobacterium islandicum*）由来の耐熱性 β －グルコシダーゼ（至適温度90℃、至適pH6～7）が、それぞれ開示されている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第4801872号公報

【特許文献2】特許第4689807号公報

【特許文献3】特開平10-52274号公報

40

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Neil et al., Biochemical Journal, 2001, vol.353, p.117-127.

【非特許文献2】Jabbour et al., Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, vol.93, p.1947-1956.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp－ニトロフェニル－ β －D－グルコピラノシド（PNPG）を基質とした加水分解活性を示す新規な耐熱性 β －グルコシ

50

ダーゼ、当該耐熱性 β -グルコシダーゼをコードするポリヌクレオチド、当該耐熱性 β -グルコシダーゼを発現するための発現ベクター、当該発現ベクターが組込まれた形質転換体、及び当該耐熱性 β -グルコシダーゼを用いたセルロース分解物の製造方法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】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、温泉高温土壌から直接DNAを抽出し、難培養性微生物叢の大規模メタゲノムシーケンスを行うことにより、新規アミノ酸配列を持つ耐熱性 β -グルコシダーゼの取得に成功し、本発明を完成させた。

【0011】

すなわち、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼ、ポリヌクレオチド、発現ベクター、形質転換体、耐熱性 β -グルコシダーゼの製造方法、グリコシド加水分解酵素混合物及びセルロース分解物の製造方法は、下記〔1〕～〔10〕である。

〔1〕 (A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(B) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド、又は

(C) 配列番号1で表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からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド、
からなる β -グルコシダーゼ触媒領域を有することを特徴とする、耐熱性 β -グルコシダーゼ。

〔2〕 キシラナーゼ活性を有する、前記〔1〕の耐熱性 β -グルコシダーゼ。

〔3〕 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、

(c) 配列番号1で表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からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、又は

(d) 配列番号2又は3で表される塩基配列と90%以上の配列同一性を有し、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でp-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、
からなる β -グルコシダーゼ触媒領域をコードする領域を有する、ポリヌクレオチド。

〔4〕 前記ポリペプチドが、キシラナーゼ活性も有する、前記〔3〕のポリヌクレオチド。

〔5〕 前記〔3〕又は〔4〕のポリヌクレオチドが組込まれており、宿主細胞において、 β -グルコシダーゼ活性を有するポリペプチドを発現し得る、発現ベクター。

〔6〕 前記〔5〕の発現ベクターが導入されている、形質転換体。

〔7〕 真核微生物である、前記〔6〕の形質転換体。

〔8〕 前記〔6〕又は〔7〕の形質転換体内で、耐熱性 β -グルコシダーゼを生産することを含む、耐熱性 β -グルコシダーゼの製造方法。

〔9〕 前記〔1〕若しくは〔2〕の耐熱性 β -グルコシダーゼ、又は前記〔3〕若しくは〔4〕のポリヌクレオチドがコードする耐熱性 β -グルコシダーゼと、少なくとも1種のその他のグリコシド加水分解酵素とを含む、グリコシド加水分解酵素混合物。

10

20

30

40

50

〔１０〕 セルロースを含む材料を、前記〔１〕若しくは〔２〕の耐熱性β-グルコシダーゼ、前記〔３〕若しくは〔４〕のポリヌクレオチドがコードする耐熱性β-グルコシダーゼ、又は前記〔６〕しくは前記〔７〕に記載の形質転換体に接触させることにより、セルロース分解物を生産することを含む、セルロース分解物の製造方法。

【発明の効果】

【００１２】

本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼは、少なくとも８５℃、pH 7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有する。このため、当該耐熱性β-グルコシダーゼは、高温条件下におけるセルロースの糖化处理に好適である。

また、本発明に係るポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドが組込まれた発現ベクター、当該発現ベクターが導入されている形質転換体は、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造に好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】 遺伝子クローンAR19G-225-3のβ-グルコシダーゼ触媒領域のアミノ酸配列（配列番号１）とサーモトガ・ネポリタナ DSM 4359のβ-グルコシダーゼ（配列番号７）のアミノ酸配列のペアワイズアライメント図である。

【図２】 実施例１において、AR19G-225-3遺伝子が大腸菌に発現させて得られたAR19G-225-3タンパク質のSDS-PAGE解析結果を示した図である。

【図３】 実施例１において、大腸菌発現させたAR19G-225-3タンパク質の各pHにおけるPNPG加水分解活性（７０℃又は８５℃）を計測した結果を示した図である。

【図４】 実施例１において、大腸菌発現させたAR19G-225-3タンパク質の各温度におけるPNPG加水分解活性（pH 7.5又はpH 8.0）を計測した結果を示した図である。

【図５】 実施例１において、大腸菌発現させたAR19G-225-3タンパク質の各基質に対するβ-グルコシダーゼ活性の測定結果を示した図である。

【図６】 実施例１において、大腸菌発現させたAR19G-225-3タンパク質が示す、熱変性に伴って引き起こされるSYPRO Orangeの蛍光強度変化を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

〔耐熱性β-グルコシダーゼ〕

糸状菌、細菌、アーキアを含む多くの微生物は難培養性であり、土壌など微生物環境に生息する菌の９９％が未知の菌であるといわれている。特に、高温環境に生息する微生物の培養は極めて困難であり、現在の微生物培養技術では土壌中に生息する微生物の０.１％以下を単離・培養しているにすぎないと考えられている。この高温土壌微生物の難培養性が、耐熱性酵素の開発が進まない一因である。

【００１５】

近年、ギガ塩基対の大量配列解読を可能にした次世代ギガシーケンサーが開発されたことにより、土壌等に含まれる微生物叢のゲノムを丸ごと解読することが可能となった。この解析技術を利用して、土壌などの環境サンプルから微生物集団のゲノムDNAを調製し、ゲノム構成が不均一、雑多な集団について直接ゲノムを網羅的に解読し、並列コンピュータにより解読データをアセンブルすることで微生物叢ゲノム配列を再構成するメタゲノム解析法が提案され、難培養性微生物のゲノム解読が急速に進展した。

【００１６】

本発明者らは、後記実施例１に示すように、採取した高温温泉土壌から微生物集団のゲノムDNA（メタゲノムDNA）を調製し、メタゲノムDNAのショットガンシーケンス及びアノテーションを行い、既知β-グルコシダーゼ酵素と類似したアミノ酸配列を持つオープンリーディングフレーム（ORF）１０４個を得た。これらのORFのうち、β-

10

20

30

40

50

グルコシダーゼ触媒領域（触媒ドメイン）が確認できた34個について、ORFの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計し、PCR法により、高温温泉土壌メタゲノムDNAから遺伝子候補をクローニングした。PCRクローニングされたDNAを大腸菌に組み込み、当該塩基配列がコードするタンパク質を発現させ、PNPG分解活性アッセイによる機能スクリーニングを行った。最終的に、これらのORFの中からPNPG分解活性を持つ耐熱性β-グルコシダーゼ（以下、「AR19G-225-3」）を得た。AR19G-225-3のアミノ酸配列を配列番号1に、塩基配列を配列番号3に、それぞれ表す。

【0017】

後記実施例1に示すように、AR19G-225-3は、PNPGに対し高い加水分解活性を示し、キシラン（Xylan）及びリン酸膨潤アビセル（phosphoric acid swollen Avicel、PSA）に対しても若干の分解活性を示す。この基質特異性から、AR19G-225-3はβ-グルコシダーゼ活性を有しており、若干のキシラナーゼ活性をも有するグリコシド加水分解酵素であることが示唆される。

【0018】

なお、本発明及び本願明細書において、β-グルコシダーゼ活性とは、β-グルコシド結合を含むグルカンを基質とし、前記基質を加水分解することにより単糖を生成する活性を意味する。

また、本発明及び本願明細書において、キシラナーゼ活性とは、キシランを基質とし、キシランを加水分解する活性（キシラン加水分解活性）を意味する。

【0019】

また、AR19G-225-3のアミノ酸配列を公知のアミノ酸配列データベースに対して検索したところ、最も配列同一性が高かったアミノ酸配列は、サーモトガ・ネポリタナ（*Thermotoga neapolitana*）DSM 4359のβ-グルコシダーゼA（Genbank 登録ID：ACM22958.1）（配列番号7）であり、その配列同一性（相同性）はわずか55%であった。基質特異性及び既知のタンパク質とのアミノ酸配列の配列同一性から、AR19G-225-3は、新規なβ-グルコシダーゼであることが明らかとなった。

【0020】

AR19G-225-3は、少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有する。実際に、後記実施例1<8>に示すように、AR19G-225-3は、50～100℃の温度範囲内でβ-グルコシダーゼ活性を示し、70～90℃の温度範囲内においても強いβ-グルコシダーゼ活性を示す。より詳細には、AR19G-225-3のβ-グルコシダーゼ活性は、50～85℃の範囲内では温度が高くなるにつれて高くなり、90℃超では急激に低下する傾向にあった。

【0021】

一般的に何らかの生理活性を有するタンパク質は、その生理活性を損なうことなく、1個又は2個以上のアミノ酸を欠失、置換又は付加させることができる。つまり、AR19G-225-3に対しても、β-グルコシダーゼ活性をはじめとするグリコシド加水分解活性を失わせることなく、1個又は2個以上のアミノ酸を欠失、置換又は付加させることができる。

【0022】

すなわち、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼは、下記（A）～（C）のいずれかからなるβ-グルコシダーゼ触媒領域を有する、耐熱性β-グルコシダーゼである。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（すなわち、AR19G-225-3）、

（B）配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド、

（C）配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解

10

20

30

40

50

解活性を有するポリペプチド。

【0023】

本発明及び本願明細書において、「ポリペプチドにおいてアミノ酸が欠失する」とは、ポリペプチドを構成しているアミノ酸の一部が失われる（除去される）ことを意味する。

本発明及び本願明細書において、「ポリペプチドにおいてアミノ酸が置換する」とは、ポリペプチドを構成しているアミノ酸が別のアミノ酸に変わることを意味する。

本発明及び本願明細書において、「ポリペプチドにおいてアミノ酸が付加される」とは、ポリペプチド中に新たなアミノ酸が挿入されることを意味する。

【0024】

前記（B）のポリペプチドにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列に対して欠失、置換若しくは付加されるアミノ酸の数は、1～20個が好ましく、1～10個がより好ましく、1～5個がさらに好ましい。

10

【0025】

前記（C）のポリペプチドにおいて、配列番号1で表されるアミノ酸配列との配列同一性は、60%以上100%未満であれば特に限定されないが、70%以上100%未満であることが好ましく、75%以上100%未満であることがより好ましく、80%以上100%未満であることがさらに好ましい。中でも、前記（C）のポリペプチドにおける配列番号1で表されるアミノ酸配列との配列同一性は、85%以上100%未満であることが好ましく、90%以上100%未満であることがより好ましく、95%以上100%未満であることがさらに好ましく、98%以上100%未満であることがよりさらに好ましい。

20

【0026】

なお、アミノ酸配列同士の配列同一性（相同性）は、2つのアミノ酸配列を、対応するアミノ酸が最も多く一致するように、挿入及び欠失に当たる部分にギャップを入れながら並置し、得られたアラインメント中のギャップを除くアミノ酸配列全体に対する一致したアミノ酸の割合として求められる。アミノ酸配列同士の配列同一性は、当該技術分野で公知の各種相同性検索ソフトウェアを用いて求めることができる。本発明におけるアミノ酸配列の配列同一性の値は、公知の相同性検索ソフトウェアBLASTPにより得られたアラインメントを元にした計算によって得られる。

【0027】

前記（B）及び（C）のポリペプチドとしては、人工的に設計されたものであってもよく、AR19G-225-3等のホモログ又はその部分タンパク質であってもよい。

30

【0028】

前記（A）～（C）のポリペプチドは、それぞれ、アミノ酸配列に基づいて化学的に合成してもよく、後記の本発明に係るポリヌクレオチドを用いて、タンパク質発現系によって生産してもよい。また、前記（B）及び（C）のポリペプチドは、それぞれ、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに基づいて、アミノ酸変異を導入する遺伝子組換え技術を用いて人工的に合成することもできる。

【0029】

前記（A）～（C）のポリペプチドは、少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性（ β -グルコシダーゼ活性）を有する。このため、前記（A）～（C）のいずれかのポリペプチドを β -グルコシダーゼ触媒領域として有することにより、耐熱性 β -グルコシダーゼが得られる。

40

【0030】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼは、PNPGを基質とする。当該耐熱性 β -グルコシダーゼは、PNPG以外のその他の β -グルカン等を基質としてもよい。本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼが基質とし得るものとしては、例えば、PNPX（p-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシド）；リケナン（Lichenan）等の β -1,3結合と β -1,4結合からなるグルカン；キシラン；アビセル（Avicel）、結晶性バクテリアセルロース（Bacterial microcrystalline c

50

e l l u l o s e、B M C C)、濾紙などの結晶性セルロース、P S A、C M C、セロビオース等の β -1, 4結合からなるグルカン; ラミナリン等の β -1, 3結合と β -1, 6結合からなるグルカン; β -1, 3結合からなるグルカン; ゲンチオビオース等の β -1, 6結合からなるグルカン等が挙げられる。本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼとしては、P N P Gに加えて、P N P X、P S A、及びキシランからなる群より選択される1種以上を基質とするものが好ましい。

【0031】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼは、少なくともpH 7. 5の条件で、P N P Gを基質とする加水分解活性(β -グルコシダーゼ活性)を、70~90℃の温度範囲内で示すことが好ましく、60~90℃の温度範囲内で示すことがより好ましく、50~100℃の温度範囲内で示すことがさらに好ましい。本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼの至適温度は、70~90℃の範囲内にあることが好ましく、80~90℃の範囲内にあることがより好ましく、80~87℃範囲内にあることがさらに好ましい。

10

【0032】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼの至適pHは、反応温度に依存して変化するものの、pH 6. 0~8. 5の範囲内にある。本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼとしては、少なくともpH 5. 0~9. 0の範囲内において β -グルコシダーゼ活性を示すものが好ましく、pH 4. 0~9. 5の範囲内において β -グルコシダーゼ活性を示すものがより好ましい。

20

【0033】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼは、 β -グルコシダーゼ活性以外のセルロース加水分解活性を有していてもよい。その他のセルロース加水分解活性としては、エンドグルカナーゼ活性、キシラナーゼ活性、キシロシダーゼ活性、又はセロビオハイドrolラーゼ活性等が挙げられ、キシラナーゼ活性が好ましい。

【0034】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼは、前記(A)~(C)のポリペプチドのいずれかからなる β -グルコシダーゼ触媒領域のみからなる酵素であってもよく、その他の領域を含んでいてもよい。その他の領域としては、公知の β -グルコシダーゼが有する、 β -グルコシダーゼ触媒領域以外の領域が挙げられる。例えば、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼには、公知の β -グルコシダーゼに対し、 β -グルコシダーゼ触媒領域を前記(A)~(C)のポリペプチドに置換することによって得られる酵素も含まれる。

30

【0035】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼが β -グルコシダーゼ触媒領域以外の領域を含む場合、セルロース結合モジュールを含むことが好ましい。セルロース結合モジュールは、 β -グルコシダーゼ触媒領域の上流(N末端側)にあってもよく、下流(C末端側)にあってもよい。また、セルロース結合モジュールと β -グルコシダーゼ触媒領域は、直接結合していてもよく、適当な長さのリンカー領域を介して結合していてもよい。本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼとしては、 β -グルコシダーゼ触媒領域の上流又は下流に、リンカー領域を介してセルロース結合モジュールが存在しているものが好ましく、 β -グルコシダーゼ触媒領域の上流にリンカー領域を介してセルロース結合モジュールが存在しているものがより好ましい。

40

【0036】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼが含むセルロース結合モジュールは、セルロースとの結合能、例えば、P S Aや結晶性アビセルとの結合能を有する領域であればよく、そのアミノ酸配列は特に限定されるものではない。当該セルロース結合モジュールとしては、例えば、既知のタンパク質が有するセルロース結合モジュール又はそれを適宜改変したものをを用いてもよい。また、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼが β -グルコシダーゼ触媒領域とセルロース結合モジュールを有する場合、これらはリンカー配列を介して結合していることが好ましい。当該リンカー配列のアミノ酸配列やその長さ等は特に限定されるものではない。

50

【0037】

本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼは、その他にも、そのN末端又はC末端に、細胞内の特定の領域に移行させて局在させ得るシグナルペプチドや、細胞外へ分泌するシグナルペプチドを有していてもよい。このようなシグナルペプチドとして、例えば、アポプララスト移行シグナルペプチド、小胞体保留シグナルペプチド、核移行シグナルペプチド、又は分泌型シグナルペプチド等がある。小胞体保留シグナルペプチドとして、例えば、HDELのアミノ酸配列からなるシグナルペプチド等がある。本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼが、そのN末端又はC末端にシグナルペプチドを有している場合には、形質転換体中で発現させた耐熱性β-グルコシダーゼを、細胞外へ分泌させたり、細胞中の小胞体等に局在させることができる。

10

【0038】

また、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼは、その他にも、発現系を用いて生産した場合に簡便に精製可能とするため、例えば当該耐熱性β-グルコシダーゼのN末端やC末端に、各種タグが付加されていてもよい。当該タグとしては、例えば、Hisタグ、HA(hemagglutinin)タグ、Mycタグ、及びFlagタグ等の組換えタンパク質の発現又は精製において汎用されているタグを用いることができる。

【0039】

[耐熱性β-グルコシダーゼをコードするポリヌクレオチド]

本発明に係るポリヌクレオチドは、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼをコードする。当該耐熱性β-グルコシダーゼは、当該ポリヌクレオチドが組込まれた発現ベクターを宿主に導入することにより、当該宿主の発現系を利用して生産することができる。

20

【0040】

具体的には、本発明に係るポリヌクレオチドは、下記(a)～(e)のいずれかの塩基配列からなるβ-グルコシダーゼ触媒領域をコードする領域を有する、ポリヌクレオチドである。

【0041】

- (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列、
- (b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列のうちの1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、
- (c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、
- (d) 配列番号2又は3で表される塩基配列と80%以上の配列同一性を有し、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列、
- (e) 配列番号2又は3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列であり、かつ少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列。

30

40

【0042】

なお、本願及び本願明細書において、「ポリヌクレオチドにおいて塩基が欠失する」とは、ポリヌクレオチドを構成しているヌクレオチドの一部が失われる(除去される)ことを意味する。

本発明及び本願明細書において、「ポリヌクレオチドにおいて塩基が置換する」とは、ポリヌクレオチドを構成している塩基が別の塩基に変わることを意味する。

本発明及び本願明細書において、「ポリヌクレオチドにおいて塩基が付加される」とは、ポリヌクレオチド中に新たな塩基が挿入されることを意味する。

【0043】

本発明及び本願明細書において、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、Mole

50

cular Cloning—A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方法が挙げられる。例えば、 $6\times\text{SSC}$ ($20\times\text{SSC}$ の組成：3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸溶液、pH7.0)、 $5\times$ デンハルト溶液 ($100\times$ デンハルト溶液の組成：2質量%ウシ血清アルブミン、2質量%フィコール、2質量%ポリビニルピロリドン)、0.5質量%のSDS、0.1mg/mLサケ精子DNA、及び50%フォルムアミドからなるハイブリダイゼーションバッファー中で、 $42\sim 70^{\circ}\text{C}$ で数時間から一晩インキュベーションを行うことによりハイブリダイズさせる条件を挙げることができる。なお、インキュベーション後の洗浄の際に用いる洗浄バッファーとしては、好ましくは0.1質量% SDS含有 $1\times\text{SSC}$ 溶液、より好ましくは0.1質量% SDS含有 $0.1\times\text{SSC}$ 溶液である。

10

【0044】

前記(a)～(e)の塩基配列においては、縮重コドン、宿主のコドン使用頻度の高いものを選択することが好ましい。例えば、前記(a)の塩基配列としては、配列番号2で表される塩基配列であってもよく、配列番号3で表される塩基配列であってもよく、配列番号2又は3で表される塩基配列を、コードするアミノ酸配列は変更せずに、宿主において使用頻度の高いコドンへ改変した塩基配列であってもよい。コドンの改変は、公知の遺伝子配列変異技術又は人工遺伝子合成によって行うことができる。

【0045】

配列番号2又は3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドは、塩基配列情報に基づいて化学的に合成してもよく、AR19G-225-3をコードする遺伝子(「AR19G-225-3遺伝子」ということがある。)の全長若しくは β -グルコシダーゼ触媒領域を含む部分領域を遺伝子組換え技術によって自然界から取得したものであってもよい。AR19G-225-3遺伝子の全長又はその部分領域は、例えば、自然界から微生物を含むサンプルを取得し、当該サンプルから回収されたゲノムDNAを鋳型として、配列番号2又は3で表される塩基配列に基づいて常法により設計したフォワードプライマーとリバースプライマーを用いてPCRを行うことによって得ることができる。当該サンプルから回収したmRNAを鋳型として逆転写反応により合成されたcDNAを鋳型としてもよい。なお、鋳型となる核酸を回収するサンプルは、温泉土壌等の高温環境下から採取されたサンプルであることが好ましい。

20

30

【0046】

前記(d)の塩基配列において、配列番号2又は3で表される塩基配列との配列同一性は、80%以上100%未満であれば特に限定されないが、85%以上100%未満であることが好ましく、90%以上100%未満であることがより好ましく、95%以上100%未満であることがさらに好ましい。

【0047】

なお、塩基配列同士の配列同一性(相同性)は、2つの塩基配列を、対応する塩基が最も多く一致するように、挿入及び欠失に当たる部分にギャップを入れながら並置し、得られたアラインメント中のギャップを除く塩基配列全体に対する一致した塩基の割合として求められる。塩基配列同士の配列同一性は、当該技術分野で公知の各種相同性検索ソフトウェアを用いて求めることができる。本発明における塩基配列の配列同一性の値は、公知の相同性検索ソフトウェアBLASTNにより得られたアライメントを元にした計算によって得られる。

40

【0048】

例えば、前記(b)、(c)、又は(d)の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、それぞれ、配列番号2又は3で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドに対して、1又は2以上の塩基を欠失、置換若しくは付加することによって人工的に合成することができる。また、前記(b)、(c)、又は(d)の塩基配列としては、AR19G-225-3遺伝子のホモログ遺伝子の全長配列又はその部分配列であってもよい。AR19G-225-3遺伝子のホモログ遺伝子は、塩基配列が既知の遺伝子のホモログ遺伝子を取得す

50

る際に用いられる遺伝子組換え技術によって取得することができる。

【0049】

本発明に係るポリヌクレオチドは、 β -グルコシダーゼ触媒領域をコードする領域のみを有するものであってもよく、当該領域に加えて、セルロース結合モジュール、リンカー配列、各種シグナルペプチド、各種タグ等をコードする領域を有していてもよい。

【0050】

[発現ベクター]

本発明に係る発現ベクターは、前記本発明に係るポリヌクレオチドが組込まれており、宿主細胞において、少なくとも85℃、pH7.5の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有するポリペプチド(β -グルコシダーゼ)を発現し得る。すなわち、前記本発明に係るポリヌクレオチドが、前記本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼを発現し得る状態で組込まれた発現ベクターである。具体的には、上流から、プロモーター配列を有するDNA、前記本発明に係るポリヌクレオチド、及びターミネーター配列を有するDNAからなる発現カセットが、発現ベクターに組込まれていることが必要である。なお、周知の遺伝子組み換え技術を用いることにより、ポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことができる。ポリヌクレオチドの発現ベクターへの組み込みでは、市販の発現ベクター作製キットを用いてもよい。

10

【0051】

本発明及び本願明細書において、発現ベクターとは、上流から、プロモーター配列を有するDNA、外来DNAを組込むための配列を有するDNA、及びターミネーター配列を有するDNAを含むベクターである。

20

【0052】

当該発現ベクターとしては、大腸菌等の原核細胞へ導入されるものであってもよく、酵母、糸状菌、昆虫培養細胞、哺乳培養細胞、又は植物細胞等の真核細胞へ導入されるものであってもよい。これらの発現ベクターとしては、それぞれの宿主に応じて通常用いられる任意の発現ベクターを用いることができる。

【0053】

本発明に係る発現ベクターは、前記本発明に係るポリヌクレオチドのみならず、薬剤耐性遺伝子等も組込まれた発現ベクターであることが好ましい。発現ベクターにより形質転換された細胞と形質転換されていない細胞の選抜を容易に行うことができるためである。当該薬剤耐性遺伝子として、例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、及びピアラホス耐性遺伝子等がある。

30

【0054】

[形質転換体]

本発明に係る形質転換体は、本発明に係る発現ベクターが導入されている。当該形質転換体中では、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼを発現させ得る。発現ベクターを導入する宿主としては、大腸菌等の原核細胞であってもよく、酵母、糸状菌、昆虫培養細胞、哺乳培養細胞、又は植物細胞等の真核細胞であってもよい。大腸菌の形質転換体を培養することにより、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼを、より簡便かつ大量に生産することができる。一方で、真核細胞内ではタンパク質に糖鎖修飾が施されるため、真核細胞の形質転換体を用いることにより、原核細胞の形質転換体を用いた場合よりも、より耐熱性に優れた耐熱性 β -グルコシダーゼを生産し得る。

40

【0055】

発現ベクターを用いて形質転換体を作製する方法は、特に限定されるものではなく、形質転換体を作製する場合に通常用いられている方法により行うことができる。当該方法として、例えば、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポレーション法、及びPEG(ポリエチレングリコール)法等がある。このうち、宿主が植物細胞である場合には、パーティクルガン法又はアグロバクテリウム法で行うことが好ましい。

【0056】

宿主として、原核細胞、酵母、糸状菌、昆虫培養細胞、又は哺乳培養細胞等を用いた場

50

合には、得られた形質転換体は、一般的には、形質転換前の宿主と同様にして、常法により培養することができる。

【0057】

[耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法]

本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法は、前記本発明に係る形質転換体内で、耐熱性β-グルコシダーゼを生産する方法である。前記本発明に係るポリヌクレオチドが、発現の時期等の制御能を有していないプロモーターの下流に組込まれている発現ベクターを用いて製造された形質転換体内では、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼが恒常的に発現している。一方で、特定の化合物や温度条件等によって発現を誘導するいわゆる発現誘導型プロモーターを用いて製造された形質転換体に対しては、それぞれの発現誘導条件に適した誘導処理を行うことにより、当該形質転換体内に耐熱性β-グルコシダーゼを発現させる。

10

【0058】

形質転換体によって生産された耐熱性β-グルコシダーゼは、当該形質転換体内に留めた状態で使用してもよく、当該形質転換体から抽出・精製してもよい。

【0059】

形質転換体から耐熱性β-グルコシダーゼを抽出又は精製する方法は、耐熱性β-グルコシダーゼの活性を損なわない方法であれば、特に限定されるものではなく、細胞や生体組織からポリペプチドを抽出する場合に通常用いられている方法によって抽出することができる。当該方法として、例えば、形質転換体を適当な抽出バッファーに浸し、耐熱性β-グルコシダーゼを抽出した後、抽出液と固形残渣に分離する方法が挙げられる。当該抽出バッファーとしては、界面活性剤等の可溶化剤を含有するものが好ましい。形質転換体が植物である場合には、抽出バッファーに浸す前に、予め当該形質転換体を細断又は粉砕しておいてもよい。また、抽出液と固形残渣を分離する方法としては、例えば、濾過方法、圧縮濾過方法、又は遠心分離処理方法等の公知の固液分離処理を用いることができ、抽出バッファーに浸した状態の形質転換体を搾ってもよい。抽出液中の耐熱性β-グルコシダーゼは、塩析法、限外濾過法、又はクロマトグラフィー法等の公知の精製方法を用いて精製することができる。

20

【0060】

本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼを、形質転換体内で分泌型シグナルペプチドを有する状態で発現させた場合には、当該形質転換体を培養した後、得られた培養物から形質転換体を除いた培養液上清を回収することにより、簡便に耐熱性β-グルコシダーゼを含む溶液を得ることができる。また、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼが、Hisタグ等のタグを有している場合、当該タグを利用したアフィニティクロマトグラフィー法により、抽出液や培養上清中の耐熱性β-グルコシダーゼを簡便に精製することができる。

30

【0061】

すなわち、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法は、前記本発明に係る形質転換体内で、耐熱性β-グルコシダーゼを生産すること、及び所望により前記形質転換体から前記耐熱性β-グルコシダーゼを抽出し精製することを含む。

【0062】

[グリコシド加水分解酵素混合物]

前記本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼ、又は前記本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性β-グルコシダーゼと、少なくとも1種のその他のグリコシド加水分解酵素を含むグリコシド加水分解酵素混合物として使用することもできる。前記本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性β-グルコシダーゼは、形質転換体内に含まれた状態のものであってもよく、形質転換体から抽出又は精製されたものであってもよい。本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼを、その他のグリコシド加水分解酵素との混合物としてセルロースの分解反応に用いることにより、難分解性であるリグノセルロースをより効率よく分解させることができる。

40

50

【0063】

当該グリコシド加水分解酵素混合物に含まれる前記耐熱性 β -グルコシダーゼ以外のその他のグリコシド加水分解酵素としては、セルロースの加水分解活性を有するものであれば特に限定されるものではない。当該グリコシド加水分解酵素混合物に含まれる前記 β -グルコシダーゼ以外のその他のグリコシド加水分解酵素としては、例えば、キシラナーゼ、若しくは β -キシロシダーゼ等のヘミセルラーゼ、セロビオハイドロラーゼ、 β -グルコシダーゼ、又はエンドグルカナーゼ等が挙げられる。本発明に係るグリコシド加水分解酵素混合物としては、ヘミセルラーゼとエンドグルカナーゼの少なくとも一方を含むものが好ましく、ヘミセルラーゼとエンドグルカナーゼを両方含むものがより好ましい。中でも、キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、セロビオハイドロラーゼ、及びエンドグルカナーゼからなる群より選択される1種以上のグリコシド加水分解酵素を含むものが好ましく、キシラナーゼ、 β -キシロシダーゼ、セロビオハイドロラーゼ、及びエンドグルカナーゼを全て含むものがより好ましい。

10

【0064】

当該グリコシド加水分解酵素混合物に含まれるその他のグリコシド加水分解酵素は、少なくとも85℃でグリコシド加水分解活性を有する耐熱性グリコシド加水分解酵素であることが好ましく、70～90℃でグリコシド加水分解活性を有する耐熱性グリコシド加水分解酵素であることがより好ましい。当該グリコシド加水分解酵素混合物に含まれる全ての酵素が耐熱性であることにより、当該グリコシド加水分解酵素混合物によるセルロースの分解反応を高温条件下で効率よく行うことができる。すなわち、当該グリコシド加水分解酵素混合物が耐熱性グリコシド加水分解酵素のみを含む場合、当該グリコシド加水分解酵素混合物をリグノセルロース糖化处理に用いることにより、糖化温度70～90℃の高温環境下でリグノセルロース加水分解反応を行うことが可能になる。この高温糖化により、酵素量と糖化時間を著しく減らすことができ、糖化コストが大幅に削減される。

20

【0065】

[セルロース分解物の製造方法]

本発明に係るセルロース分解物の製造方法は、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼにより、セルロースを分解して分解物を得る方法である。具体的には、セルロースを含む材料を、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼ、本発明に係る形質転換体、又は本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性 β -グルコシダーゼに接触させることにより、セルロース分解物を生産する。

30

【0066】

セルロースを含む材料としては、セルロースが含まれていれば特に限定されるものではない。当該材料としては、例えば、雑草や農業系廃棄物等のセルロース系バイオマス、又は古紙等が挙げられる。当該セルロースを含む材料は、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼと接触させる前に、破碎若しくは細断等の物理的処理、酸若しくはアルカリ等による化学処理、又は適当なバッファーへの浸漬又は溶解処理等を行っておくことが好ましい。

【0067】

本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼによるセルロースの加水分解反応の反応条件は、当該耐熱性 β -グルコシダーゼが β -グルコシダーゼ活性を示す条件であればよい。例えば、60～90℃、pH5.0～9.0で反応を行うことが好ましく、70～90℃、pH5.0～9.0で反応を行うことがより好ましく、70～90℃、pH6.0～8.5で反応を行うことがさらに好ましい。前記加水分解反応の反応時間は、加水分解に供されるセルロースを含む材料の種類、前処理の方法、又は量等を考慮して適宜調整される。例えば、10分間～100時間、セルロース系バイオマスを分解する場合には、1～100時間の反応時間で前記加水分解反応を行うことができる。

40

【0068】

セルロースの加水分解反応には、本発明に係る耐熱性 β -グルコシダーゼに加えて、少なくとも1種のその他のグリコシド加水分解酵素を用いることも好ましい。当該その他の

50

グリコシド加水分解酵素としては、前記グリコシド加水分解酵素混合物に含められるグリコシド加水分解酵素と同様のものを用いることができ、少なくとも85℃で、好ましくは少なくとも70～90℃でグリコシド加水分解活性を有する耐熱性グリコシド加水分解酵素であることが好ましい。また、当該セルロース分解物の製造方法には、本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼ、本発明に係る形質転換体、又は本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性β-グルコシダーゼに代えて、前記グリコシド加水分解酵素混合物を用いてもよい。

【実施例】

【0069】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0070】

[実施例1] 温泉土壌からの新規耐熱性β-グルコシダーゼのクローニング

<1> 温泉土壌からのDNA抽出と全ゲノムシーケンス (Whole Genome Sequence、WGS)

70～90℃で活性を示す新規耐熱性β-グルコシダーゼの遺伝子探索を目的として、中性～弱アルカリ性温泉から土壌DNAを採取し、これらの土壌を構成する微生物叢メタゲノムDNAの塩基配列解読を行った。

中性～弱アルカリ性温泉土壌サンプルとして、野外にて高温の温泉が噴き出している日本国内の3ヶ所、5地点(メタゲノムDNAサンプルN2、AR19、AR15、OJ1、及びH1)から、土壌、泥、バイオマットを含む温泉水を採取した。これらの温泉土壌サンプルは、採取時の温度58～78℃、pH7.2～8のレンジにあった。

【0071】

採取した温泉土壌サンプル各10gから、DNA抽出キット (ISOIL Large for Beads ver. 2、NIPPON GENE社製) を使い、DNAを抽出した。抽出されたDNAのうち5μgに対して、ロシュダイアグノスティックス社製のシーケンサーGS FLX Titanium 454を用いて、メタゲノムDNAのショットガンシーケンスを行った。残りのDNAは、β-グルコシダーゼ遺伝子のPCRクローニングに用いた。

温泉土壌サンプルAR19について、メタゲノムDNAの配列解読を行い、平均リード長396bp、総リード数2,766,332個、総ゲノム解読量1,106,243,280bpの全ゲノムシーケンス (WGS) データセットを得た。

【0072】

<2> 温泉メタゲノムデータのアセンブルと統計量

Roche 454の出力 (sffファイル) を、PyroBayes (Quinlan et al., Nature Methods, 2008, vol.5, p.179-81.) にて再ベースコールし、FASTA形式の配列ファイル及びQuality値ファイルを取得した。得られたシーケンスリードは、端を切り落とし品質を上げ、454 Life SciencesのアセンブルソフトウェアNewbler version 2.3を使ってアセンブルした。アセンブルは、「minimum acceptable overlap match (mi) = 0.9」、「option: -large (for large or complex genomes, speeds up assembly, but reduces accuracy.)」に設定して行った。

Qualityフィルター処理したリードと100bp以上のアセンブルコンティグは、合計104,096,316bpあり、このデータセットをグリコシド加水分解酵素遺伝子解析に用いた。リード総数2,766,332個のうち2,308,679個のリードが、平均で1,027bpのコンティグにアセンブルされ(計101,372コンティグ)、このうち最大コンティグ長は187,970bpであった。

【0073】

<3> β-グルコシダーゼのオープンリーディングフレーム (ORF) 予測

UniProt データベース (<http://www.uniprot.org/>) から EC 番号が 3. 2. 1. 4 (セルラーゼ)、3. 2. 1. 21 (β -グルコシダーゼ)、3. 2. 1. 37 (β -キシロシダーゼ)、3. 2. 1. 91 (セルロース 1, 4- β -セロビオシダーゼ)、3. 2. 1. 8 (エンド 1, 4- β -キシラナーゼ) の配列をダウンロードし (アクセス日: 2009/4/13)、これらグリコシド加水分解酵素遺伝子のプロテオームローカルデータベースを構築した。アノテーションソフトウェア Orphelia (Hoff et al., Nucleic Acids Research, 2009, 37(Web Server issue: W101-W105)) を使用して、前記<2>で得たコンティグ配列から、遺伝子領域 (= オープンリーディングフレーム) を推定した。推定された ORF からグリコシド加水分解酵素遺伝子を抽出するために、BLASTP (blastall ver. 2. 2. 18) を使い、前記ローカルデータベースに参照した。BLASTP の option 条件は、「Filter query sequence = false」、「Expectation value (E) < $1e^{-20}$ 」[以下、デフォルト値: Cost to open a gap = -1、Cost to extended gap = -1、X dropoff value for gapped alignment = 0、Threshold for extending hits = 0、Word size = default] とし、前記ローカルデータベース中にエントリされた Glyco_hydro_3_C、Exo-1, 4- β -glucosidase、Beta-glucosidase、Beta-d-glucosidase、B-glucosidase、Xylosidase、Glycoside hydrolase family 1、Glycoside hydrolase family 3、Glycoside hydrolase family 1、Glycoside hydrolase family 3、Beta-D-glucoside glucosylhydrolase、Beta-galactosidase のいずれかにヒットした ORF 配列を β -グルコシダーゼの候補配列として収集した。

【0074】

<4> 遺伝子のグリコシド加水分解酵素 (GH) ファミリー分類

前記<3>で収集された β -グルコシダーゼの候補配列について、タンパク質の機能領域配列データベース pfam HMMs (Pfam version 23.0 and HMMER v2.3; Finn et al., Nucleic Acids Research Database, 2010, Issue 38, p.D211-222) を基準に、機能分類を行った。具体的には、隠れマルコフモデルを応用した配列相同性検索アルゴリズム HMMER (Durbin et al., 'The theory behind profile HMMs. Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids', 1998, Cambridge University Press.; hmmpfam (Ver. 2.3.2)、E-value cutoff < $1e^{-5}$; Database = Pfam_families (models that can be used to find fragments of the represented domains in a sequence.)) を用いて、Pfam 領域データベースとの相同性からグリコシド加水分解酵素 (GH) ファミリーを決定した。

【0075】

β -グルコシダーゼの候補配列と推定された ORF 104 個の GH ファミリー分類結果を表 1 に示す。GH 触媒ドメインの配列を 70% 以上カバーしているものをカウントした。GH 触媒ドメイン領域のカバー率が 70% 未満の配列及び Pfam との相同性が確認できなかった配列は、GH 不明に分類した。表 1 に示すように、GH1 ファミリーに属する β -グルコシダーゼ ORF が 10 個得られた。一方、GH3 ファミリーに属する ORF 配列は 19 個、GH31 ファミリー、GH43 ファミリーに属する ORF がそれぞれ、4 個と 1 個得られた。これら β -グルコシダーゼ触媒ドメイン配列の存在が確認できた 34 個の ORF については、不完全長配列を含むすべての ORF について、プライマーを設計し、温泉土壌メタゲノム DNA から PCR により遺伝子をクローニングした。ソフトウェア Orphelia による ORF 予測では、メチオニン (M) 以外の開始コドン (L, V) を

予測することがあり、表1の完全長ORF数にはこれらも含まれる。表1中、括弧内はメチオニンを開始コドンとする完全長ORF数を表している。メチオニン以外の開始コドンを持つ遺伝子も存在することが報告されているが、表1の結果からはその比率が多いことから、誤判定を多く含むと考えられた。開始コドンがメチオニンでないORFについては、配列の3'末端にメチオニンのコドン配列(ATG)を付加するようにプライマーを設計した。

【0076】

【表1】

AR19 メタゲノム	β-グルコシダーゼ遺伝子のGHファミリー分類						
	GH1	GH3	GH31	GH43	その他 GHs	GH 不明	合計
完全長 ORF	8(6)	12(9)	3(3)	1(1)	0	31(22)	55(41)
不完全長 ORF	2	7	1	0	0	39	49
ORF 合計数	10	19	4	1	0	70	104

10

【0077】

<5> オープンリーディングフレームAR19G-225

オープンリーディングフレームAR19G-225は、442アミノ酸残基からなるポリペプチド(配列番号1)をコードし、1位のアミノ酸残基がメチオニンから開始し、3'末端が終始コドンで終わる完全長配列(配列番号2)であった。モチーフの配列相同性から、オープンリーディングフレームAR19G-225は、2位のグルタミン(Q)から最後の442位のセリン(S)までの441アミノ酸がGlycoside hydrolase family 1の触媒領域をコードしていると推測された。

20

【0078】

図1に、遺伝子クローンAR19G-225-3のβ-グルコシダーゼ触媒領域のアミノ酸配列とサーモトガ・ネポリタナ DSM 4359のβ-グルコシダーゼA(Genbank 登録ID:ACM22958.1)のアミノ酸配列のペアワイズアライメントを示す。図1中、黒白反転のアミノ酸は、これらの全アミノ酸配列において同一アミノ酸残基(identical)を示し、網掛けのアミノ酸は、これらのアミノ酸配列において類似アミノ酸残基(similar)を示し、「-」は欠失(ギャップ)を示す。ギャップを含む450アミノ酸残基の中、251アミノ酸残基が同一であり、オープンリーディングフレームAR19G-225のβ-グルコシダーゼ触媒領域は、サーモトガ・ネポリタナ DSM 4359のβ-グルコシダーゼAと55%の配列同一性を示していた。

30

【0079】

<6> 遺伝子クローニング

配列番号6で表される塩基配列からなるフォワードプライマー(5'-CACCATGCAGTTTCCACGAGGTTT-3';配列番号4で表される塩基配列の5'末端側に4塩基(CACC)付加したもの。5'側に付加したCACCは、ベクターに挿入するための配列である。)と配列番号5で表される塩基配列からなるリバースプライマー(5'-TCAACTCCGCTGCCCAGCAAT-3')を用い、ゲノムDNA増幅キット(GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit、GEヘルスケア社製)で増幅した温泉土壌DNAをテンプレートにして、PCRを行った。なお、配列番号4で表される塩基配列は、配列番号2又は3で表される塩基配列の1~21位の塩基からなる部分配列と相同的な(同一の)塩基配列である。また、配列番号5で表される塩基配列は、配列番号2又は3で表される塩基配列の1309~1329位の塩基からなる部分配列と相補的な塩基配列である。増幅したPCR産物は、Champion pET Directional TOPO(登録商標) Expression Kits(ライフテクノロジーズ社製)のpET101/D-TOPOベクターに挿入し、One Shot TOP10株に形質転換した。コロニーPCRによりポジティブ

40

50

クローンを選抜し、100mg/Lアンピシリンを含むLB液体培地を用いて37℃、200rpmで17～20時間培養した後、ミニプレップキット（Wizard（登録商標）plus SV Minipreps DNA Purification System、Promega社製）を用いてプラスミドの調製を行った。調製したプラスミドは、ライフテクノロジーズ社の3730 DNA Analyzerシーケンサーを用いて配列確認を行った。

【0080】

PCRクローニングにより、オープンリーディングフレームAR19G-225から1個の遺伝子クローンAR19G-225-3を得た。β-グルコシダーゼ候補遺伝子AR19G-225-3の塩基配列は、オープンリーディングフレームAR19G-225（配列番号2）と同様に1,329bpを含み、予測されたORFとは1塩基異なっていた。すなわち、729位の塩基が、予測されたORF（配列番号2）ではチミン（T）であったのに対して、クローニングされた遺伝子（配列番号3）ではシトシン（C）であった。ただし、コードするアミノ酸配列（配列番号1）は、両者に違いが見られなかった。

【0081】

β-グルコシダーゼ候補遺伝子AR19G-225-3（以下「AR19G-225-3遺伝子」という）がコードするポリペプチド（AR19G-225-3）は、442アミノ酸からなり、シグナルペプチドは検出されなかった。AR19G-225-3は、2位のグルタミンから442位のセリンまでの441アミノ酸（Q2-S442）がGH1ファミリーに属するβ-グルコシダーゼ触媒領域のアミノ酸配列を示すポリペプチドであった。

【0082】

<7> 遺伝子発現及びβ-グルコシダーゼ酵素タンパクの精製

シーケンス確認後、目的遺伝子をもつプラスミドを、ヒートショック法によりタンパク質発現用大腸菌へ導入した。形質転換用コンピテントセルは、Champion（登録商標）pET Directional TOPO（登録商標）Expression Kits（ライフテクノロジーズ社製）に付属するBL21 Star（DE3）株を用いた。目的の遺伝子をもつ大腸菌を100mg/Lアンピシリンを含むLB培地に植菌し、OD₆₀₀=0.2～0.8程度まで培養した後、IPTG（Isopropyl-β-D（-）-thiogalactopyranoside）を添加し、さらに5～20時間培養することによって、目的タンパク質の発現誘導を行った。培養後、遠心分離を行って大腸菌を回収し、培養液の1/10容量の50mM Tris-HCl Buffer（pH8.0）を加えて懸濁した。その後、超音波破碎装置astrason3000（MISONIX社製）を用いて、5分間破碎-5分間休止工程を7～8回繰り返し、目的タンパク質を含む遺伝子組換え大腸菌の粗抽出物を得た。当該遺伝子組換え大腸菌粗抽出物をフィルター（孔径φ=0.45μm、ミリポア社製）で濾過し、得られた濾液を遺伝子組換え大腸菌破碎上清とした。

【0083】

当該遺伝子組換え大腸菌破碎上清を、50mM Tris-HClバッファー（pH8.0）で平衡化したイオン交換カラムHiTrap Q HP（GEヘルスケア社製）に充填し、中高圧液体クロマトグラフィーシステムAKTA design（GEヘルスケア社製）を用いて、1MのNaClを含む50mM Tris-HClバッファー（pH8.0）にて0～50%の濃度勾配でタンパク質を分画した。β-グルコシダーゼ活性のあった分画は、まとめて混合した後、遠心式の限外濾過膜VIVASPIN 20（Sartorius stedim社製）によって750mMの硫酸アンモニウムを含む50mM Tris-HClバッファー（pH8.0）へ溶液交換した。溶液交換後のβ-グルコシダーゼ活性分画を、同液で平衡化した疎水性相互作用分離カラムHiTrap Phenyl HP（GEヘルスケア社製）に充填し、50mM Tris-HClバッファー（pH8.0）にて0～100%の濃度勾配でタンパク質を分画した。β-グルコシダーゼ活性のあった分画は、まとめて混合した後に、液量が8mL程度になるまでVI

VASPIN 20を用いて濃縮した。濃縮したサンプルは、150mMのNaClを含む50mM Tris-HClバッファー (pH8.0) で平衡化したゲル濾過カラムHiLoad 26/60 superdex 200 pg (GEヘルスケア社製) に添加し、カラム体積の1~1.5倍容の同バッファーを流速2~3mL/minで流すことによって分画した。β-グルコシダーゼ活性のあった分画は、まとめて混合した後、50mM Tris-HClバッファー (pH8.0) への溶液交換と濃縮を行い、終濃度約1mg/mLの精製酵素を得た。

【0084】

遺伝子組換え大腸菌破碎上清と精製酵素を、SDS-PAGE解析により確認した。遺伝子組換え大腸菌破碎上清と精製酵素のSDS電気泳動は、それぞれAnykD Criterion TGX Strain-Free プレキャストゲル (Bio-Rad社製) を用いて行った。前記上清又は0.13mg/mLに希釈した精製酵素を、それぞれTris-SDS βME処理液 (コスモバイオ社製) と1:1で混合した泳動用サンプルを、98℃で10分間処理した後、1サンプルあたり、遺伝子組換え大腸菌破碎上清は10μL、精製酵素は10μLをそれぞれ泳動させた。泳動終了後、画像撮影システムChemidoc (Bio-Rad社製) により、タンパク質のバンドを可視化した。

【0085】

図2に、AR19G-225-3遺伝子を導入した形質転換大腸菌から調製された遺伝子組換え大腸菌破碎上清及び当該遺伝子組換え大腸菌破碎上清から精製された精製酵素のSDS-PAGE解析の結果を示す。レーン1はタンパク質量指標、レーン2は遺伝子組換え大腸菌破碎上清、レーン3は精製酵素の電気泳動パターンである。この結果、前記遺伝子組換え大腸菌破碎上清 (レーン2) において、アミノ酸配列 (配列番号1) から予想される質量50.3kDa近傍に強いバンドが認められ、精製酵素 (レーン3) では、当該バンドに対応する単一バンドが認められた (図中、矢印)。

【0086】

<8> PNPGを基質としたβ-グルコシダーゼ活性のpH及び温度依存性

β-グルコシダーゼ活性測定には、PNPGを基質として用いた。PNPG (Sigma社製) を水で溶かし、所定の終濃度となるように調整したものを、基質溶液として用いた。なお、以降の実験に用いたPNPG基質溶液は、全て当該方法により調製したPNPG水溶液を用いた。

【0087】

AR19G-225-3遺伝子がコードする酵素タンパク質 (AR19G-225-3) のPNPG加水分解活性のpH依存性を調べた。計測には、前記<7>で得られた精製酵素を1mg/mLに調整し、さらにそれを12.5倍に水で希釈し0.08mg/mLとした精製酵素溶液を用いた。

【0088】

精製酵素のPNPG加水分解活性の測定は、13.6mMのPNPG水溶液を147μLと、0.2M Britton-Robinson buffer (pH4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、又は10.0) を50μLと、精製水を1μLと、精製酵素溶液を2μLと、からなる混合液を、温度70℃又は85℃で15分間反応させた (基質終濃度: 10mM)。全ての計測において、精製酵素溶液の代わりに50mM Tris-HClバッファー (pH8.0) を入れて同条件で反応させた混合液をコントロール区とした。また、基質溶液と精製酵素溶液は、反応温度で5分間それぞれ別々に保温した後に混合し、反応開始とした。反応中はいずれの混合液もサーモミキサー (エッペンドルフ社) を用いて所定の温度とした。反応終了後は、各混合液に対して等量の0.2M Na₂CO₃ 溶液を加えて攪拌することにより反応を停止させた後、それを遠心し、上清を得た。上清中のp-ニトロフェノール量は、分光光度計を用いて420nmの吸光度を計測し、予め作成していたp-ニトロフェノール量と420nmの吸光度の検量線を用いて算出し、コントロール区との差分から酵素の加水分解によって生成したp-ニトロフェノール量を求めた。1分間に1μmolのp-ニトロフ

10

20

30

40

50

ェノールを生成する酵素活性を1 Uとし、タンパク質量で除した値を比活性 (U/mg) とした。また各計測は、3回の独立した試行により行い、平均値を求めた。

【0089】

次に、精製したAR19G-225-3のPNPG加水分解活性の温度依存性を調べた。

精製酵素のPNPG加水分解活性の測定は、Britton-Robinson bufferに代えてpH7.5又はpH8.0の0.2Mリン酸バッファーを用い、反応温度を50、60、70、75、80、85、90、95、又は99℃で行った以外は、AR19G-225-3のPNPG加水分解活性のpH依存性を調べた場合と同様にして、酵素反応を行った後、反応後の混合液の上清の420nmの吸光度を測定し、加水分解によって生成したp-ニトロフェノール量を求めた。

10

【0090】

計測結果を図3及び4に示す。図3は、横軸をpHとして、精製酵素AR19G-225-3の70℃又は85℃における各pHにおけるPNPG加水分解活性を計測した結果を示した図であり、図4は、横軸を温度として、各温度におけるPNPG加水分解活性 (pH7.5又はpH8.0) を計測した結果を示した図である。pHは、基質とバッファーと酵素の混合液の実測値をプロットした。

【0091】

精製酵素AR19G-225-3は、温度範囲75～90℃において高いPNPG加水分解活性を示した (図4)。最も高い活性を示した至適温度 (T_{opt}) は、pH7.5及び8.0において85℃であった。酵素反応温度を95℃以上にした時、精製酵素AR19G-225-3のPNPG加水分解活性は急激に減少した。

20

【0092】

精製酵素AR19G-225-3は、反応温度70～85℃、pH5～9の範囲において高いPNPG加水分解活性を示した (図3)。最適pHは反応温度に依存して変化し、70℃でpH7.81 (実測値)、85℃でpH7.77 (実測値) であった。精製酵素AR19G-225-3では、反応温度85℃、pH9.13～9.50の範囲内においては、低レベルのPNPG加水分解活性が認められた。

【0093】

<9> AR19G-225-3の基質特異性

30

AR19G-225-3遺伝子がコードする酵素タンパク質 (AR19G-225-3) に対して、様々なセルロース基質及びヘミセルロース基質に対する加水分解活性を調べた。計測には、前記<7>で得られた精製酵素を1mg/mLに調整し、さらにそれを12.5倍に水で希釈し0.08mg/mLとした精製酵素溶液を用いた。また、基質として、PNPG (Sigma社製)、PNPX (Sigma社製)、CMC (Sigma社製)、PSA、Xylan (ブナ材由来、Sigma社製) を用いた。

PSAはリン酸溶液でアビセル粉末 (微結晶性セルロース粉末、Merck社製) を一旦溶解させた後に滅菌蒸留水を加えて析出させた後、pHが5以上になるまで洗浄することによって調製した。なお、以降の実験に用いたPSAは全て当該方法により調製した。

【0094】

40

具体的には、まず、反応液として、50μLのpH8.0のリン酸バッファーと、2μLの精製酵素溶液と、基質水溶液と、精製水と、からなる混合液を調製した。混合液に添加する基質溶液の濃度と量及び精製水の量は、PNPGを基質とする場合には、13.6mMのPNPG水溶液を147μLと精製水を1μLとし、PNPXを基質とする場合には、13.6mMのPNPX水溶液を147μLと精製水を1μLとし、CMCを基質とする場合には、1質量%のCMC水溶液を100μLと精製水を48μLとし、PSAを基質とする場合には、PSAを100μLと精製水を48μLとし、Xylanを基質とする場合には、1質量%のXylan水溶液を100μLと精製水を48μLとした。

次いで、各混合液を、70℃又は85℃で15分間インキュベートすることにより酵素反応を行った。基質溶液と精製酵素溶液は、反応温度で5分間それぞれ別々に保温した後

50

に混合し、反応開始とした。また、CMC、PSA、及びXylanを基質とした場合には、反応中、基質の沈殿を防ぐため、サーモミキサー（エッペンドルフ社）により混合液に1400rpmの振動を加えた。

【0095】

PNPG又はPNPXを基質とした反応においては、反応終了後は、前記<8>のAR19G-225-3のPNPG加水分解活性のpH依存性を調べた場合と同様にして、反応後の混合液の上清の420nmの吸光度を測定し、加水分解によって生成したp-ニトロフェノール量を求めた。CMC、PSA、又はXylanを基質とした反応においては、反応終了後は、等量の3, 5-dinitrosalicylic acid reagent（DNS溶液）を加えて100℃で5分間加熱処理し、5分間の冷却後に遠心し、上清を得た。上清中の還元糖量を、分光光度計を用いて540nmの吸光度を計測し、グルコースで作成した検量線（Xylanを基質とした場合は、キシロースで作成した検量線）を用いて算出し、コントロール区との差分から酵素の加水分解によって生成した還元糖量を求めた。1分間に1μmolの還元糖を生成する酵素活性を1Uとし、タンパク質量で除した値を比活性（U/mg）とした。

【0096】

各計測は、3回の独立した試行により行い、平均値を求めた。測定結果を図5に示す。この結果、AR19G-225-3はPNPGに対し高い加水分解活性を示し、PSA及びXylan（特に、85℃）対しても若干の分解活性を示した。これらの結果から、AR19G-225-3はβ-グルコシダーゼであり、若干のキシラナーゼ活性も持つことが示された。

【0097】

<10> Differential scanning fluorimetryによるβ-グルコシダーゼの熱安定性測定

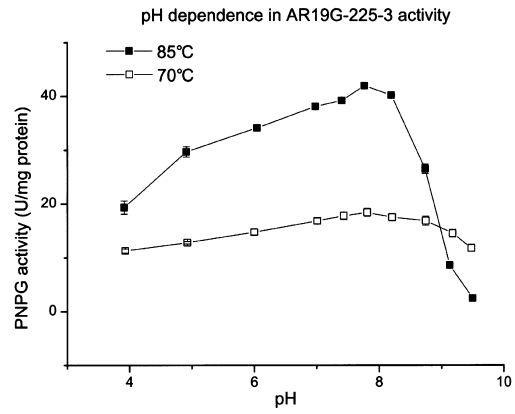
Differential scanning fluorimetry（DSF）は、蛍光色素とリアルタイムPCR装置を用いて、タンパク質の熱変性を計測する方法の一つであり、様々なタンパク質に応用可能である。SYPRO Orange等、DSFに使われる蛍光色素は、疎水性部位と結合する無極性条件下で蛍光を発し、一方、水に溶けた極性条件下では発光が抑えられる。通常、タンパク質はその熱変性温度において折り畳み構造が解け、内部にある疎水性部位がタンパク質表面に露出する。この露出した疎水性部位にSYPRO Orangeが結合すると、波長470～480nmの励起光により、波長595nm付近にピークを持つ強い蛍光を発する。タンパク質溶液の温度を一定間隔で段階的に上昇させ、蛍光強度を計測することにより、熱崩壊温度（＝蛍光強度の変化点）が算出される。

【0098】

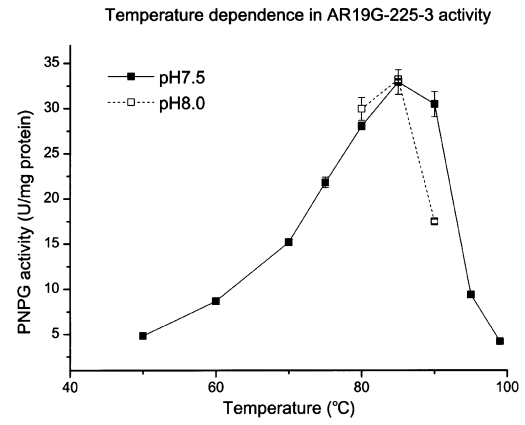
計測には、前記<7>で得られた精製酵素を1mg/mLに調整した精製酵素溶液を用いた。

具体的には、96穴PCRプレート（Multiplate 96 Well PCR Plate MLL-9651、Bio-Rad社製）のウェルに100倍希釈したSYPRO Orange（ライフテクノロジーズ社製）を2μL、濃度1mg/mLの精製酵素溶液を1μL、200mMリン酸バッファー（pH8.0）を5μL、精製水を12μL加え、各ウェルの容積を20μLとした。PCRプレートはOptical 8連フラットキャップ（Bio-Rad社製）でシールし、リアルタイムPCR装置（CFX96 Touch Real-Time PCR System、Bio-Rad社製）で0.2℃ずつ、30℃から100℃までウェルの温度を上昇させ、ターゲット温度が達成されてから10秒間経過した後、各ウェルの蛍光強度を同時計測した。波長帯域450～490nmの光発光ダイオード（LED）によりSYPRO Orangeを励起し、SYPRO Orange放射光は560～580nmレンジの帯域通過フィルターを通し、CCDカメラで蛍光強度の計測を行い、蛍光強度変化を温度の関数としてプロットした。リアルタイムPCRに付属の解析ソフトウェアCFX Manager（Bio-

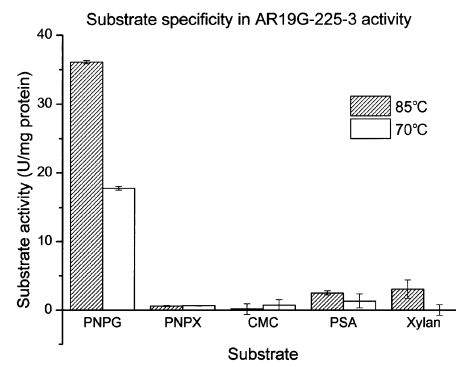
【図 3】



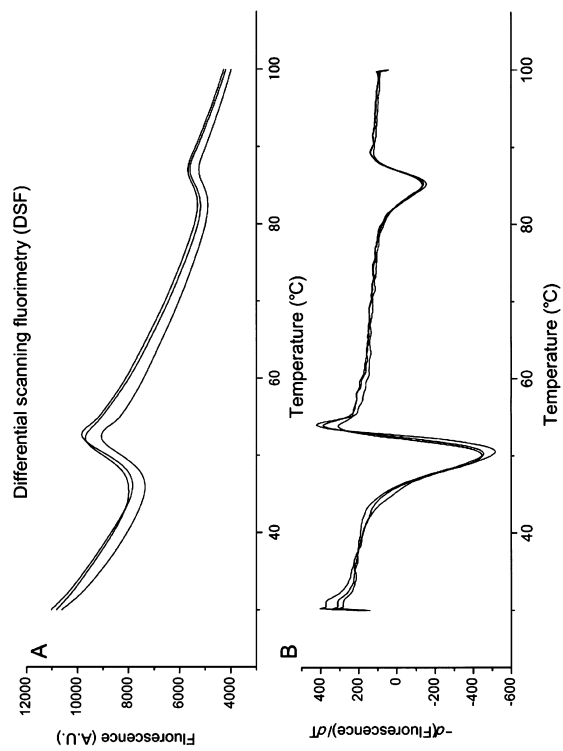
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0006286745000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 7/10 (2006.01) C 1 2 P 7/10

(72)発明者 広瀬 佳嗣
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 郡司 貴浩
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 山口 明日香
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 須田 みぎわ
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 大熊 二郎
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 近藤 康弘
 埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内
 (72)発明者 加藤 友彦
 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 公益財団法人かずさDNA研究所内
 (72)発明者 柴田 大輔
 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7 公益財団法人かずさDNA研究所内

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第2010/006152 (WO, A1)
 国際公開第2009/146464 (WO, A1)
 Enzyme and Microbial Technology, 2014年 2月, vol.57, pp.48-54
 Appl Microbiol Biotechnol, 2012年, vol.93, pp.1947-1956
 Letters in Applied Microbiology, 2011年, vol.54, pp.79-87
 Bioresource Technology, 2012年, vol.112, pp.345-349
 Bioresource Technology, 2013年, vol.147, pp.658-661
 Journal of Bacteriology, 2000年, vol.182 no.18, pp.5172-5179

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 15/00-15/90
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
 PubMed
 Cini