

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-169154  
(P2013-169154A)

(43) 公開日 平成25年9月2日(2013.9.2)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K</b>	<b>14/37</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K	14/37		4 B O 6 4
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	7/06		4 B O 6 5
<b>C 1 2 P</b>	<b>19/14</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	19/14	A	4 H O 4 5
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N	1/19		

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-33307 (P2012-33307)  
(22) 出願日 平成24年2月17日 (2012.2.17)

(71) 出願人 000003207  
トヨタ自動車株式会社  
愛知県豊田市トヨタ町1番地  
(71) 出願人 000003609  
株式会社豊田中央研究所  
愛知県長久手市横道41番地の1  
(71) 出願人 503359821  
独立行政法人理化学研究所  
埼玉県和光市広沢2番1号  
(74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔  
(74) 代理人 100118773  
弁理士 藤田 節

最終頁に続く

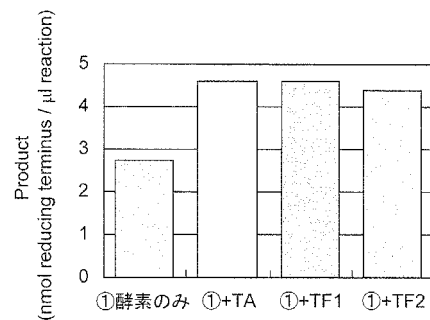
(54) 【発明の名称】 セルロース系バイオマス分解増強活性ポリペプチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】耐熱性酵母以外の通常の発酵微生物における反応温度領域において、セルラーゼによる糖化効率を増強するポリペプチドを提供する。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を含む、*Neurospora crassa*由来の、単離されたポリペプチドであって、結晶性セルロース結合能を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチド、前記ポリペプチドの存在下にて、セルロース系バイオマスをセルラーゼにて糖化する糖化処理方法、及び前記処理により得られた糖成分を原料として発酵を行う、アルコールの製造方法。

【選択図】 図4



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下 (a) ~ (c) いずれかに記載の単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列に対して 70% 以上の同一性を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチド

(c) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列に対して 1 又は複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチド

## 【請求項 2】

結晶性セルロース結合能を有することを特徴とする (1) 記載のポリペプチド。

## 【請求項 3】

*Neurospora crassa* 由来であることを特徴とする (1) 記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

## 【請求項 5】

請求項 4 記載の遺伝子を含む発現ベクター。

## 【請求項 6】

請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチドの存在下にて、セルロース系バイオマスをセルラーゼにて糖化する工程を含む、糖化処理方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチドの存在下にて、セルロース系バイオマスをセルラーゼにて糖化するとともに、糖成分を原料としてアルコール発酵を行う工程を含む、アルコールの製造方法。

## 【請求項 8】

請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチドをコードする遺伝子にて形質転換した組換え微生物により上記アルコール発酵を行うことを特徴とする請求項 7 記載のアルコールの製造方法。

## 【請求項 9】

上記組換え微生物は、組換え酵母であることを特徴とする請求項 8 記載のアルコールの製造方法。

## 【請求項 10】

請求項 1 乃至 3 いずれか一項記載のポリペプチドを含むセルラーゼ活性増強用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、セルロース系バイオマスを糖化する酵素の酵素活性を増強するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする核酸、当該ポリペプチドを用いたエタノールの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

セルロース系バイオマスは、エタノール等の有用なアルコールや有機酸の原料として有効に利用されている。セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンから主として構成されている。アルコールや有機酸の原料としてセルロース系バイオマスを利用する場合、セルロースやヘミセルロースを効率的に糖化する必要がある。セルロース系バイオマスの糖化には、濃硫酸や希硫酸を使用する方法、セルラーゼやヘミセルラーゼといった酵素を用いる方法が知られている。

## 【0003】

酵素を利用した糖化方法では、濃硫酸や希硫酸を使用する方法と比較して種々の利点があるものの、十分な糖化効率を達成するためには高価な酵素を大量に使用する必要がある

10

20

30

40

50

。すなわち、酵素を利用した糖化方法を適用して、セルロース系バイオマスからアルコールや有機酸を製造する場合、酵素使用量の増大に起因するコストの上昇が大きな問題となっていた。

【0004】

酵素使用量を削減する技術としては、例えば、特許文献1に記載されるように、特定のタンパク質を利用する技術が知られている。より詳細に述べると、特許文献1には、耐熱性を有する菌から分離したタンパク質であって、セルラーゼにおけるセルロース糖化活性を増強できるタンパク質が開示されている。なお、特許文献1が開示された耐熱性を有する菌とは、*Thermoascus aurantiacus*である。ところが、特許文献1が開示されたセルラーゼにおけるセルロース糖化活性を増強できるタンパク質は、耐熱性を有する菌に由来するため、比較的的高温領域に至適温度を有する。このため、いわゆる同時糖化発酵（セルラーゼによる糖化とアルコール発酵が同時に行われる系）の場合、耐熱性酵母を利用しなければならないといった制約があった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2007-523646号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上述のように、耐熱性酵母といった高温領域に至適温度領域を有する微生物以外の通常の発酵微生物の反応温度領域において、セルラーゼによる糖化効率を増強する機能を有する物質は知られていなかった。したがって、本発明は、耐熱性酵母以外の通常の発酵微生物における反応温度領域において、セルラーゼによる糖化効率を増強する機能を有するポリペプチド、当該ポリペプチドをコードする核酸及び当該ポリペプチドを用いたエタノールの製造方法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的を達成するため本発明者らが鋭意検討した結果、アカパンカビ（*Neurospora crassa*）由来の結晶性セルロース結合タンパク質の中から、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチドを同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

30

【0008】

本発明は以下を包含する。

(1) 以下(a)～(c)いずれかに記載の単離されたポリペプチド。

(a) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列に対して70%以上の同一性を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチド

(c) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列に対して1又は複数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加又は挿入されたアミノ酸配列を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチド

40

(2) 結晶性セルロース結合能を有することを特徴とする(1)記載のポリペプチド。

(3) *Neurospora crassa*由来であることを特徴とする(1)記載のポリペプチド。

(4) 上記(1)～(3)いずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

(5) 上記(4)記載の遺伝子を含む発現ベクター。

(6) 上記(1)～(3)いずれかに記載のポリペプチドの存在下にて、セルロース系バイオマスセルラーゼにて糖化する工程を含む、糖化処理方法。

(7) 上記(1)～(3)いずれかに記載のポリペプチドの存在下にて、セルロース系バイオマスセルラーゼにて糖化するとともに、糖成分を原料としてアルコール発酵を行う工程を含む、アルコールの製造方法。

50

(8) 上記(1)～(3)いずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子にて形質転換した組換え微生物により上記アルコール発酵を行うことを特徴とする(7)記載のアルコールの製造方法。

(9) 上記組換え微生物は、組換え酵母であることを特徴とする(8)記載のアルコールの製造方法。

(10) 上記アルコール発酵は、45℃以下に反応至適温度領域を有する微生物により行うことを特徴とする(7)記載のアルコールの製造方法。

(11) 上記(1)～(3)いずれかに記載のポリペプチドを含むセルラーゼ活性増強用組成物。

#### 【発明の効果】

10

#### 【0009】

本発明によれば、耐熱性酵母の至適温度領域よりも低い温度領域にて、セルラーゼの糖化活性を増強することができる。すなわち、本発明によれば、セルラーゼの糖化活性を増強することで、セルロース系バイオマスの糖化率を向上させることができる。また、本発明によれば、セルラーゼの糖化活性を増強することで、セルロース系バイオマスの糖化率を向上させることができ、当該セルロース系バイオマスからのエタノールの収率を向上させることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0010】

【図1】結晶性セルロース結合タンパク質のSDSポリアクリルアミド電気泳動の結果を示す写真である。

20

【図2】*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)のアミノ酸配列を示す図である。

【図3】*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)のアミノ酸配列を示す図である。

【図4】バイオマスとして蒸煮処理したネピアグラスを使用したときのバイオマス分解性評価試験の結果を示す特性図である。

【図5】バイオマスとしてスダジイ、スギ、ネピアグラスを使用したときのバイオマス分解性評価試験の結果を示す特性図である。

【図6】粗精製した各結晶性セルロース結合タンパク質を外部添加したバイオマス分解性評価試験の各反応温度における結果を示す特性図である。

【図7】粗精製した各結晶性セルロース結合タンパク質を外部添加していない発酵試験の結果を示す特性図である。

30

【図8】粗精製した各結晶性セルロース結合タンパク質を外部添加した発酵試験の結果を示す特性図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 本発明に係るポリペプチド

本発明に係るポリペプチドは、結晶性セルロース結合タンパク質であって、セルラーゼの糖化活性を増強する新規機能を見いだされたポリペプチドである。具体的に本発明に係るポリペプチドとしては、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)由来のポリペプチドを挙げることができる。本発明に係るポリペプチドのうち、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)由来のポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2及び4に示す。また、配列番号2及び4に示したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ配列番号1及び3に示す。ただし、本発明に係るポリペプチドは、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)由来のこれら配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドに限定されず、如何なる生物由来のポリペプチドでも良い。また、本発明に係るポリペプチドは、例えば、酵母等の真菌、細菌、動物、植物、昆虫、藻類由来のポリペプチドとしてもよい。

40

#### 【0012】

より具体的に、本発明に係るポリペプチドとしては、配列番号2又は4に示すアミノ酸

50

配列からなるポリペプチドに限定されず、アミノ酸配列は異なるがパラログの関係又は狭義のホモログの関係にある遺伝子であっても良い。

【0013】

また、本発明に係るポリペプチドとしては、これら配列番号2又は4に示すアミノ酸配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチドでも良い。配列同一性の値は、BLASTアルゴリズムを実装したBLASTNやBLASTXプログラムにより算出することができる(デフォルトの設定)。なお、配列同一性の値は、一对のアミノ酸配列をペアワイズ・アライメント分析した際に完全に一致するアミノ酸残基を算出し、比較した全アミノ酸残基中の上記アミノ酸残基数の割合として算出される。

10

【0014】

さらに、本発明に係るポリペプチドとしては、これら配列番号2又は4に示すアミノ酸配列に対して、1又は複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有し、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチドでも良い。ここで、複数個とは、例えば、2~30個、好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個、最も好ましくは2~5個である。

【0015】

さらにまた、本発明に係るポリペプチドとしては、配列番号1又は3の塩基配列からなる核酸の相補鎖の全部又は一部に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子によりコードされ、かつセルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するポリペプチドであっても良い。ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件を意味し、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual(Third Edition)を参照して適宜決定することができる。具体的には、サザンハイブリダイゼーションの際の温度や溶液に含まれる塩濃度、及びサザンハイブリダイゼーションの洗浄工程の際の温度や溶液に含まれる塩濃度によりストリンジェンシーを設定することができる。より詳細には、ストリンジェントな条件としては、例えば、ナトリウム濃度が25~500mM、好ましくは25~300mMであり、温度が42~68、好ましくは42~65である。より具体的には、5×SSC(83mM NaCl、83mMクエン酸ナトリウム)、温度42である。

20

30

【0016】

上述したように、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドが、セルラーゼの糖化活性を増強する機能を有するか否かは、以下のように検証することができる。まず、定法に従って当該ポリペプチドを単離する。次に、可溶性の糖を除去したセルロース系バイオマスと当該ポリペプチドと市販のセルラーゼとを含む反応液を調整し、例えば45で16時間程度の条件でセルラーゼによる糖化反応を行う。また、比較のために当該ポリペプチドを含有しない以外は同様な組成とした反応液を調整し、同条件にてセルラーゼによる糖化反応を行う。反応終了後、それぞれの反応液に含まれる可溶糖を検出し、可溶糖の含有量を比較する。そして、当該ポリペプチドを含む反応液における可溶糖の含有量が、当該ポリペプチドを含まない反応液における可溶糖の含有量と比較して有意に高い場合、当該ポリペプチドはセルラーゼの糖化活性を増強する機能を有すると判断できる。なお、反応液に含まれる可溶糖を測定する手法は特に限定されず、例えば、テトラゾリウムブルーを反応液に添加して10分程度煮沸し、その後、660nmの吸光度を測定することで、可溶糖の還元末端を定量する方法を挙げることができる。

40

【0017】

本発明に係るポリペプチドは、耐熱性酵母の生育温度領域といった高温領域及び耐熱性酵母の生育温度領域といった高温領域よりも低い温度領域においても、セルラーゼによる糖化効率を増強する機能を発揮する。

【0018】

50

## セルラーゼ

ここで、セルラーゼとは、セルロースのグリコシド結合を加水分解する活性を有する酵素の総称である。セルラーゼを構成する酵素としては、結晶セルロースの末端からセロピオースを遊離するエキソ型のセロピオヒドロラーゼ（CBH1及びCBH2）、結晶セルロースを分解できないが非結晶セルロース（アモルファスセルロース）鎖をランダムに切断するエンド型のエンドグルカナーゼ（EG）、 $\beta$ -グリコシド結合を加水分解する反応を触媒するグルコシダーゼを挙げることができる。

### 【0019】

なお、セルラーゼとしては、従来公知のものを適宜使用することができる。また、セルラーゼとしては、化学的に合成されたものでも良いし、微生物の生産物を精製したのも良い。また、セルラーゼとしては、市販のセルラーゼ製剤を使用することもできる。また、本発明に係るポリペプチドは、セルラーゼを発現する微生物、すなわちセルロース系バイオマスを加水分解する能力を有する微生物と共存することで、当該微生物の糖化活性を増強することもできる。セルラーゼの分泌生産能が高いものを微生物としては例えば、トリコデルマ・リーセイ（*Trichoderma reesei*）が挙げられる。すなわち、本発明に係るポリペプチドは、トリコデルマ・リーセイ（*Trichoderma reesei*）による糖化活性を増強することができる。そのようなセルラーゼ生成能を有する微生物としては、例えば *Aspergillus niger*、*A. foetidus*、*Alternaria alternata*、*Chaetomium thermophile*、*C. globosus*、*Fusarium solani*、*Irpex lacteus*、*Neurospora crassa*、*Cellulomonas fimi*、*C. uda*、*Erwinia chrysanthemii*、*Pseudomonas fluorescence*、*Streptomyces flavogriseus*等を挙げることができる。

### 【0020】

#### 糖化处理

糖化处理の対象となるセルロース系バイオマスとは、セルロース繊維の結晶構造とヘミセルロース及びリグニンとの複合体を含むバイオマスを意味する。特に、セルロース繊維の結晶構造及びヘミセルロースをセルロース系バイオマスに含まれる多糖類として扱う。セルロース系バイオマスには、間伐材、建築廃材、産業廃棄物、生活廃棄物、農産廃棄物、製材廃材及び林地残材及び古紙等の廃棄物が含まれる。また、セルロース系バイオマスとしては、段ボール、古紙、古新聞、雑誌、パルプ及びパルプスラッジ等も含む。さらに、セルロース系バイオマスとしては、おが屑や鉋屑等の製材廃材、林地残材又は古紙等を粉砕、圧縮し、成型したペレットをも含む。

### 【0021】

セルロース系バイオマスは、いかなる形状で使用しても良いが、いわゆるソフトバイオマスについては圧搾処理しておくことが好ましく、いわゆるハードバイオマスについては粉砕処理しておくことが好ましい。ソフトバイオマスの圧搾処理とは、ソフトバイオマスに対して所定の圧力を加えることで、バイオマスの組織を緩和・破壊する処理を意味する。圧搾処理には、食品分野、農業分野で通常使用されている圧搾装置を利用することができる。また、ハードバイオマスの粉砕処理とは、例えばカッターミルなどの装置によってバイオマスを粉砕する処理を意味する。粉砕処理では、ハードバイオマスを例えば0.1~2mm（平均径）程度に粗粉砕することが好ましい。

### 【0022】

糖化处理とは、以上のようなセルロース系バイオマスに対して、セルラーゼ及び/又はセルラーゼ分泌生産能を有する微生物を作用させる処理である。糖化处理によりセルロース系バイオマスに含まれるセルロース及びヘミセルロースが、グルコース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース等の単糖（可溶性糖）まで糖化される。

### 【0023】

上述した本発明に係るポリペプチドは、この糖化处理においてセルラーゼの糖化活性を増強できるため、セルロース系バイオマスの仕込量に対する可溶性糖の生成量を向上させることができる。言い換えると、上述した本発明に係るポリペプチドを糖化处理の反応系に存在させることで、セルロース系バイオマスを効率良く糖化することができ、目的とする

可溶糖の生産量を向上することができる。

【0024】

#### アルコール発酵

本発明に係るポリペプチドを利用したアルコール発酵とは、セルロース系バイオマスセルラーゼにより糖化して得られる糖からアルコールを生合成することを意味する。特に本発明に係るポリペプチドを利用することで、上述のようにセルロース系バイオマスを効率良く糖化でき、セルロース系バイオマス由来の糖の生産量を向上することができる。したがって、本発明に係るポリペプチドを利用することによって、アルコール発酵におけるアルコール収量も向上することができる。

【0025】

特に、本発明に係るポリペプチドを利用したアルコール発酵は、いわゆる同時糖化発酵であることが好ましい。同時糖化発酵とは、セルロース系バイオマスをセルラーゼにより糖化する工程と、糖化により生成されたグルコースを糖源とするエタノール発酵の工程とが同時に進行することを意味する。ここで、アルコール発酵は、従来公知のアルコール発酵能を有する酵母を利用することができる。

【0026】

このような酵母としては、特に限定されないが、*Candida shehatae*、*Pichia stipitis*、*Pachysolen tannophilus*、*Saccharomyces cerevisiae*及び*Schizosaccharomyces pombe*などの酵母が挙げられ、特に*Saccharomyces cerevisiae*が好ましい。また、酵母としては、実験面での利便性のために使われる実験株でも良いし、実用面での有用性のために使われている工業株（実用株）でも良い。工業株としては、例えば、ワイン、清酒や焼酎作りに用いられる酵母株を挙げることができる。また、アルコール発酵能を有する酵母は、野生型の酵母でも良いし、野生型の酵母に突然変異が導入された変異型の酵母でも良いし、また所定の遺伝子を導入又は欠損するように改変された組換え酵母であっても良い。

【0027】

特に、上述した本発明に係るポリペプチドをコードする遺伝子を発現可能に導入した組換え酵母を利用することが好ましい。すなわち、例えば配列番号1又は3に示す塩基配列からなる遺伝子を上記酵母内で発現するように導入することで、組換え酵母を作製することができる。導入する遺伝子のプロモーターとしては、特に限定されないが、例えばグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（TDH3）のプロモーター、3-ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子（PGK1）のプロモーター、高浸透圧応答7遺伝子（HOR7）のプロモーターなどが利用可能である。なかでもピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（PDC1）のプロモーターが下流の目的遺伝子を高発現させる能力が高いために好ましい。その他にも、TEF1遺伝子プロモーター、ADH1遺伝子プロモーター、TPI1遺伝子プロモーター、HXT7遺伝子プロモーター及びPYK1遺伝子プロモーターを使用することができる。

【0028】

すなわち、上述した遺伝子は、発現を制御するプロモーターやその他の発現制御領域とともに酵母のゲノムに導入してもよい。

【0029】

また、上述した遺伝子を導入する方法としては、酵母の形質転換方法として知られている従来公知のいかなる手法をも適用することができる。具体的には、例えば、エレクトロポレーション法“*Meth. Enzym.*, 194, p182 (1990)”、スフェロプラスト法“*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 p1929(1978)”、酢酸リチウム法“*J. Bacteriology*, 153, p163(1983)”、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 p1929 (1978)、*Methods in yeast genetics*, 2000 Edition : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manualなどに記載の方法で実施可能であるが、これに限定されない。

【0030】

本発明に係るポリペプチドを利用したアルコール発酵を同時糖化発酵で行う場合、セルロース系バイオマス（前処理後であってもよい）を含む培地に、上述したセルラーゼと本発明に係るポリペプチドと上述した酵母（組換え酵母であってもよい）とを加え、所定の

10

20

30

40

50

温度範囲で当該組換え酵母を培養する。培養温度としては特に限定されないが、エタノール発酵の効率を考慮して25~45 とすることができ、30~40 とすることが好ましい。特に、本発明に係るポリペプチドは、上記温度範囲においてセルラーゼの糖化活性を増強させることができる。換言すれば、本発明に係るポリペプチドがセルラーゼの糖化活性を増強する至適温度範囲は、上述した通常の酵母がアルコール発酵しうる温度範囲とほぼ一致する。よって、本発明に係るポリペプチドを利用してセルラーゼの糖化活性を増強しながらアルコール発酵を行う場合、耐熱性酵母を利用する必要はなく、アルコール発酵能を有する酵母を広く利用することができる。

【0031】

また、アルコール発酵に際して、培養液のpHは特に限定されないが、例えば培養液のpHを4~6とすることが好ましい。また、アルコール発酵に際して、反応液を攪拌や振とうしてもよい。

【0032】

本発明を利用したアルコールの製造方法では、アルコール発酵の後、培地からアルコールを回収する。アルコールの回収方法は、特に限定されず、従来公知のいかなる方法も適用することができる。例えば、上述したアルコール発酵が終了した後、固液分離操作によってアルコールを含む液層と、酵母や固形成分を含有する固層とを分離する。その後、液層に含まれるアルコールを蒸留法によって分離・精製することで、純度の高いアルコールを回収することができる。なお、アルコールの精製度は、アルコールの使用目的にあわせて適宜調整することができる。

【実施例】

【0033】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

【0034】

〔実施例1〕結晶性セルロース結合タンパク質の精製

糸状菌アカパンカビ (*Neurospora crassa* NBRC 6067) の培養上清溶液から、結晶性セルロースに結合するタンパク質の取得を試みた。

【0035】

まず、糸状菌アカパンカビ (*Neurospora crassa* NBRC 6067) を、以下の方法で培養した。炭素源としてCarboxy Methyl Cellulose (CMC, SIGMA-ALDRICH) を添加したDPY培地 (CMC 1g, Glucose 1g, Polypeptone 1g, Yeast extract 0.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05gを蒸留水で100 mlに溶解) (以下DPY+CMC培地) 100 mlに植菌し、30、120 rpm、4日間、振とう培養を行った。

【0036】

培養上清溶液から、結晶性セルロース結合タンパク質の調製を実施した。上述にて得られた培養上清溶液50 mlに対し、結晶性セルロース(アビセル PH-101, Sigma-Aldrich) 4 gを添加し、スターラーで5分間攪拌した。アビセルの沈降後に、ピペットにて上清を除去した。これに、Wash Buffer: 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1M Tris-HCl (pH7.0) 20 ml で2回洗浄した後、結晶性セルロースをシリンジに充填させた。溶出には、30mlの滅菌水、または50mM Tris NaOH (pH 12.5) 20 mlを用いた。

【0037】

採取した溶液は、限外ろ過膜(NANOSEP 10K OMEGA, PALL)を用いて濃縮した後、14% SDSポリアクリルアミドゲル (TEFCO) を用いて、SDS-PAGEを実施した。SDS-PAGEの詳細な実験手順は、Molecular Cloning -A Laboratory Manual- (Cold Spring Harbor Laboratory) に従った。

【0038】

SDSポリアクリルアミド電気泳動の結果を図1に示す。図1に示すように、約70kDa及び約30 kDaに相当する2本の断片が確認された。この結果から、糸状菌アカパンカビの培養上清溶液中に結晶性セルロースに結合するタンパク質が存在することが確認された。デー

10

20

30

40

50



データベースでの調査から、約70kDaの断片はセルロース結合ドメインを保有するセロピオヒドラーゼと推測された。また、約30kDaの断片については不明であった。よって、以下の実施例に示すように、本断片の同定を試みた。

【0039】

〔実施例2〕 結晶性セルロース結合タンパク質の同定

実施例1にて確認された糸状菌アカパンカビ (*Neurospora crassa* NBRC 6067) 由来の結晶性セルロース結合タンパク質について、LC-MS/MS解析によるペプチド配列同定と、既存データベースとの比較によるタンパク質の同定を試みた。

【0040】

実施例1のSDS-PAGEにおいて確認された約30kDaの断片(図1)を、ゲルから切り出し、エッペンチューブに採取した。本断片を溶解させた後、トリプシン(Promega)にて処理させることで得られた調整試料について、LC-MS/MS解析を実施した。

10

【0041】

調製試料を逆相クロマトグラフィーにて分離・濃縮しながら質量分析計で計測し、得られた結果を既存のデータベースと比較した。続いて、アルゴンガスを用い、ペプチド断片をペプチド結合の位置でランダムに崩壊させた分解物の質量を既存のデータベースと比較することによって、トリプシン処理によって得られたペプチド断片の配列同定を行った。

【0042】

LC-MS/MS解析の結果、5種類のペプチド配列の同定に成功した。同定されたペプチド配列は、以下の通りであった。

20

【0043】

“Leu-His-Ala-Ser-Ala-Ala-Ala-Gly-Ser-Thr-Val-Thr-Leu-Arg” (配列番号5)

“Thr-Pro-Ser-Ser-Gly-Leu-Val-Ser-Phe-Pro-Gly-Ala-Tyr-Lys” (配列番号6)

“Gly-Pro-Thr-Ile-Ala-Tyr-Lys” (配列番号7)

“Ile-Gln-Gln-Asp-Gly-Met-Asp-Ser-Ser-Gly-Val-Trp-Gly-Thr-Glu-Arg” (配列番号8)

“Thr-Pro-Ser-Thr-Val-Ser-Phe-Pro-Gly-Ala-Tyr-Ser-Gly-Ser-Asp-Pro-Gly-Val-Lys” (配列番号9)

【0044】

同定されたペプチド配列を、既存のデータベースにて調査し、本配列を保有するタンパク質が存在しないかを調べた。その結果、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) のNCU07898及びNCU01050のタンパク質中に、本配列と同じペプチドが存在することが確認された。同定された2種類のタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ図2及び3に示した。図2及び3において、LC-MS/MS解析によって同定された上記5つのアミノ酸配列を下線にて示した。

30

【0045】

アカパンカビ (*Neurospora crassa*) のNCU07898を*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)或いは単にTF1と呼称し、同様にNCU01050を*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)或いは単にTF2と呼称する。

【0046】

〔実施例3〕 結晶性セルロース結合タンパク質をコードする遺伝子の合成と、酵母での発現

40

*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)及び(TF2) (それぞれGeneBank accession No. EAA33178.1及びEAA32426.1)、*Thermoascus aurantiacus*由来GH61 (GeneBank accession No. ABW56451.1)のアミノ酸配列から*Saccharomyces cerevisiae*の発現に最適化した人工合成遺伝子を設計し、合成した(Operon)。*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)の人工合成遺伝子を配列番号1に示した。*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)の人工合成遺伝子を配列番号3に示した、*Thermoascus aurantiacus*由来GH61の人工合成遺伝子を配列番号10に示した。なお、以下、*Thermoascus aurantiacus*由来GH61を単にTAと称する場合もある。

【0047】

50

設計した塩基配列情報に基づいて、SignalP(Jannick Dyrlov Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne and Soren Brunak. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J. Mol. Biol., 340:783-795, 2004)にてシグナル配列をコードする領域を予測した。そして、予測されるシグナル配列を除いた成熟体をコードする領域を増幅するための一対のプライマーを以下のように設計した。

【0048】

TF1におけるシグナル配列除去用の一対のプライマー

TF1-F : 5'-AAGCGCGGCGGTGGCTTTGTGGACAATGCG (配列番号11)

TF1-R : 5'-CAAGAAAGCTGGGTATTAACAGGTAATAAC (配列番号12)

TF2におけるシグナル配列除去用の一対のプライマー

TF2-F : 5'-AAGCGCGGCGGTGGCCATACTATCTTTTCT (配列番号13)

TF2-R : 5'-CAAGAAAGCTGGGTATTAACACGTAAACAC (配列番号14)

TAにおけるシグナル配列除去用の一対のプライマー

TA-F : 5'-AAGCGCGGCGGTGGCTTTGTTCAGAACATC (配列番号15)

TA-R : 5'-CAAGAAAGCTGGGTATTATCCGGTATACAG (配列番号16)

【0049】

また、上記成熟体のN末端にプロテアーゼ切断配列(KRGGG)を付加するとともに、ベクターに導入するためのattBサイト及びattPサイトを付加する一対のプライマーを設計した。

【0050】

Stan-GW-F : 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAAGCGGCGGTGGC (配列番号17)

Stan-GW-R : 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA (配列番号18)

【0051】

これらプライマーを使用して合成した人工合成遺伝子を鋳型としてPCRによってベクターに導入するattBサイトおよびattPサイトを有するインサート断片を取得した。取得したインサート断片をpDONR207ベクター(Invitrogen)にGateway BPクロナーゼ(Invitrogen)を用いて組み込みエントリークローンを作製した(pTF1-ENT, pTF2-ENT, pTA-ENT)。

【0052】

*S. cerevisiae*-*E. coli* shuttle vectorであるpESC-HIS-MO2ベクター(豊田中央研究所)を基にGatewayベクターコンバージョンシステム(Invitrogen)を用いてディスティネーションベクターを作製した(pESC-HIS-MO2-GWベクター)。エントリークローンとディスティネーションベクターをGateway LRクロナーゼ(Invitrogen)により反応させ発現ベクターを作製した(pESC-TF1-HIS, pESC-TF2-HIS, pESC-TA-HIS)。

【0053】

*S. cerevisiae* YPH499株(Stratagene, MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1 63, his3 200, leu2 1)の形質転換はAmbergらの方法(Amberg DC, Burke DJ, Strathern J N. Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005)に従った。組換え酵母によるタンパク質の発現は、YPD (Yeast extract 10g/L, Pepton 20g/L, D-Glucose 20g/L)培地40mlに植菌し、30℃で4日間振盪培養した。得られた培養上清をポアサイズ30kDa及び10kDaの限外濾過膜を用いて濃縮し、続けて50mM 酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0にて3回洗浄することで溶媒を交換した。

【0054】

〔実施例4〕 結晶性セルロース結合タンパク質のバイオマス分解性評価

上記で得られたタンパク標品を0.2mg/mlとなるように濃度調整したうえで、バイオマス(スダジイ、スギ、ネピアグラス)を基質として、市販セルラーゼ製剤でのセルロース分解における、アカパンカビ由来の新規タンパク質TF1及びTF2の添加効果確認試験を試みた。

【0055】

反応液は200µlとし、うち5µlを本タンパク標品となるように調製した。セルラーゼに

10

20

30

40

50

対する糖化促進効果を見るために、発現タンパクの他に、*Trichoderma reesei*のセルラーゼとNOVO188を各5：1の割合で混合し、タンパク濃度を0.2mg/mlとしたものを5 $\mu$ l含むように反応系を調製した。これにより、タンパク質標品は200 $\mu$ lの反応系中に1 $\mu$ g溶解していることになる。基質としては、終濃度5% (w/v)となるようにスダジイ・スギ・ネピアグラス或いは蒸煮処理したネピアグラスを加えた。バイオマスは可溶性の糖を除去するために60 $^{\circ}$ Cの加温下にて上清に着色が無くなるまで洗浄したバイオマスを用いた。

【0056】

反応は45 $^{\circ}$ Cにて16時間行い、反応液の上清を適量テトラゾリウムブルー発色液(0.2%テトラゾリウムブルー-0.1M NaOH溶液と1M Sodium potassium tartrate溶液を1：1で混合したもの)に加えて10分間煮沸することで発色を行い、660nmの吸光度を測定することで可溶性の糖還元末端の量を定量した。

10

【0057】

バイオマスとして蒸煮処理したネピアグラスを使用したときの試験結果を図4に示した。また、バイオマスとしてスダジイ、スギ、ネピアグラスを使用したときの試験結果を図5に示した。図4及び5に示すように、セルラーゼのみを加えた区と、セルラーゼと発現タンパク質を同時に加えた区を比較すると、いずれの場合も発現タンパク質が共存する場合に、セルラーゼによる可溶性糖の生成量が約2倍増加することが確認された。なお、図4及び5には示していないが、発現タンパク質のみをバイオマスに加えた場合は、いずれも可溶性の糖は検出されなかった。

【0058】

これらの結果から、*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)及び*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)は、それぞれ従来公知のTAと同様にセルラーゼの糖化活性を増強する機能を有することが明らかとなった。

20

【0059】

また、本実施例では、反応温度を35~60 $^{\circ}$ Cとした以外は同様の方法によってバイオマス分解性評価試験を行った。各反応温度における分解産物量をプロットした結果を図6に示す。図6に示すように、*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)及び*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)は、それぞれ従来公知のTAと異なり、比較的到低温度領域にてセルラーゼの糖化活性を増強する機能を有することが明らかとなった。具体的には、*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)は、TAと比較すると特に、45 $^{\circ}$ C以下の温度領域においてセルラーゼの糖化活性を増強する顕著な効果が見られた。また、*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)は、TAと比較すると特に、40 $^{\circ}$ C以下の温度領域においてセルラーゼの糖化活性を増強する顕著な効果が見られた。

30

【0060】

〔実施例5〕結晶性セルロース結合タンパク質を発現する酵母を利用したアルコール発酵  
上記実施例3で得られたタンパク質を発現する遺伝子組換え酵母を利用し、前処理バイオマス(ネピアグラス)を基質としたSSCF(同時糖化並行複発酵)を実施し、バイオマス糖化・発酵における、アカパンカビ由来の新規タンパク質の効果確認試験を試みた。

【0061】

前処理ネピアグラス1.0g(水分含有率71.5%)に、50mMクエン酸緩衝液、糖化酵素混合液30FPU/g biomass(*Trichoderma reesei*のセルラーゼとNovo188を5：1の割合で混合)、1% Yeast extract、2% Peptone溶液、上述した結晶性セルロース結合タンパク質(TF1、TF2、TA)を分泌発現する遺伝子組換え酵母培養液(OD<sub>600nm</sub>=60)を添加し、全量30mlになるよう調整した。またコントロールとして組換え酵母の宿主株である*S. cerevisiae* YPH499株を同様の条件で調整した。なお酵母培養液は、前培養として、30 $^{\circ}$ C 120rpmにて3日間振とう培養した試料を用いた。本調整溶液を、30 $^{\circ}$ C、100rpmにて同時糖化発酵させ、適時サンプルを採取した。各採取試料をカラムにて精製後、バイオセンサ(王子計測機器)にて、溶液中のエタノール濃度を測定した。

40

【0062】

なお上述の発酵試験のコントロールとして、上述の調整溶液に、粗精製した各結晶性セ

50

ルコース結合タンパク質 (TF1、TF2、TA) 28.5mgを外部添加した試料についても調整し、30、100rpmにて同時糖化発酵させ、適時サンプルを採取した。各採取試料をカラムにて精製後、バイオセンサ (王子計測機器) にて、溶液中のエタノール濃度を測定した。

【 0 0 6 3 】

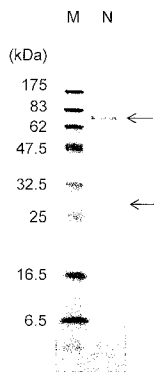
粗精製した各結晶性セルロース結合タンパク質を外部添加していない発酵試験結果を図7に示し、粗精製した各結晶性セルロース結合タンパク質を外部添加した発酵試験結果を図8に示した。結晶性セルロース結合タンパク質を分泌発現、または添加していないYPH499株でのエタノール生産量と比較すると、TF1、TF2、TAを分泌発現、または添加した試料では高いエタノール生産が確認されていた。また特に粗精製タンパク質を外部添加した試験においては、TAよりもTF1、TF2にて高いエタノール生産が確認された。

10

【 0 0 6 4 】

本実施例により、*Neurospora crassa*由来GH61(TF1)及び*Neurospora crassa*由来GH61(TF2)は、それぞれ同時糖化発酵の反応系に存在することで、エタノール生産性を向上できることが明らかとなった。

【 図 1 】



M: 分子量マーカー  
N: アカバネカビ由来タンパク質

【 図 2 】

**MW (Da) 26.147, GH61**  
(hypothetical protein NCU07898 [*Neurospora crassa* OR74A])

```

10      20      30      40      50
MKTFALLAS IGLVAAHGFV DNATIGGOFY QFYQPYQDPY MGSPPDRISR
60      70      80      90      100
KIPGNGPVED VTSLAIQQNA DSAPAKLHAS AAAGSTVTLR WTIWPDSHVG
110     120     130     140     150
PVITYMARCP DTGGDWTPS ASDRVFKIK EGGREGTSNV WAATPLMTAP
160     170     180     190     200
ANYEYAIFSC LKPGYLVRH EIALHSAYS YPGAGFYPGC HQLQVTSGT
210     220     230     240
KTPSSGLYSF PGAYKSTDPG VTYDAYOAAT YTIPGPAVFT C

```

【 図 3 】

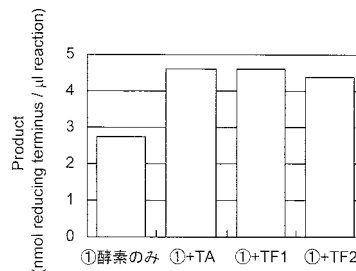
**MW (Da) 24.917, GH61**  
(hypothetical protein NCU01050 [*Neurospora crassa* OR74A])

```

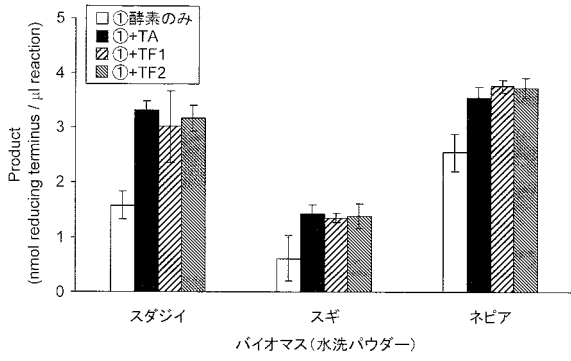
10      20      30      40      50
MKVLAPLVLA SAASAHTIFS SLEWNGVNGG LBEGVRVPTY NGPIEDVTSA
60      70      80      90      100
SIACNGSPNT VASTSKVITV QAGTNVTAIW RYMLSTTBGS PADVMDSSHK
110     120     130     140     150
GPTIAYLKKV DNAATASGVG NEWFKIQQDG MDSSGVWGTE RVINGKGRHS
160     170     180     190     200
IKIPECIAPG QYLLRAEMIA LHAASNYPGA OFYMECAQLN VVGGTGAKTP
210     220     230     240
STVSFPGAYS GSDPGYKISI YWPPVTSYTV PGPSVFTC

```

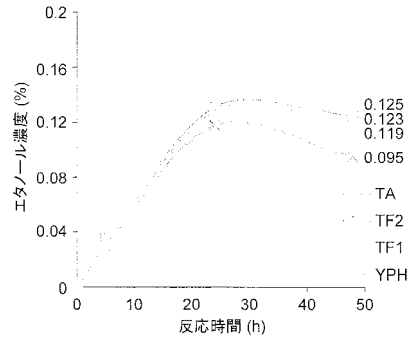
【 図 4 】



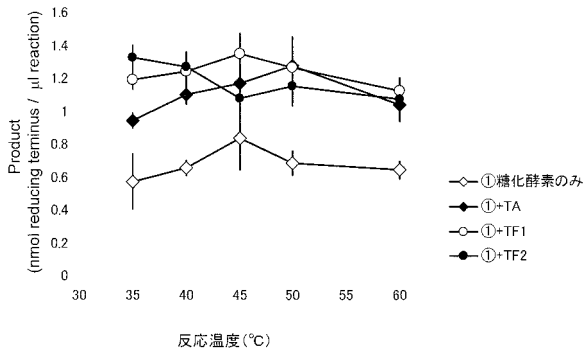
【 図 5 】



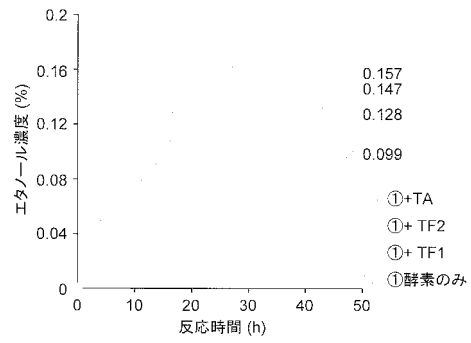
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



【 配列表 】

201316915400001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 R 1/865 (2006.01)	C 1 2 P 7/06	
	C 1 2 R 1:865	

(72)発明者 志佐 倫子

愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内

(72)発明者 石田 亘広

愛知県長久手市横道4番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 今村 千絵

愛知県長久手市横道4番地の1 株式会社豊田中央研究所内

(72)発明者 守屋 繁春

埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内

(72)発明者 菊地 淳

神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番2号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA17 BA80 CA02 DA12 EA04

4B064 AC03 AF03 AF04 CA06 CA19 CA21 CB07 CC24 CD20 CD22

CD24 DA16 DA20

4B065 AA58Y AA80X AB01 AC14 BA02 BB26 CA55 CA60

4H045 AA10 AA30 BA10 CA15 EA61 FA74