

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6319904号
(P6319904)

(45) 発行日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日(2018.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	
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 P 7/10 (2006.01)	C 1 2 P	7/10
C 1 2 P 19/02 (2006.01)	C 1 2 P	19/02
C 1 2 P 19/14 (2006.01)	C 1 2 P	19/14 A

請求項の数 4 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-184909 (P2014-184909)	(73) 特許権者	000005326
(22) 出願日	平成26年9月11日(2014.9.11)		本田技研工業株式会社
(65) 公開番号	特開2016-54699 (P2016-54699A)		東京都港区南青山二丁目1番1号
(43) 公開日	平成28年4月21日(2016.4.21)	(74) 代理人	100064908
審査請求日	平成28年11月29日(2016.11.29)		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、
からなる - 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 - グルコシダーゼ。

【請求項2】

(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
からなる - 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3】

請求項1に記載の耐熱性 - 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。

【請求項4】

セルロースを含む材料を、請求項1に記載の耐熱性 - グルコシダーゼ、又は請求項3に記載のグリコシド加水分解酵素混合物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 - グルコシダーゼ、当該耐熱性 - 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 - 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 - 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。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。

10

【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-D-グルカナーゼ、EC 3.2.1.4)、エキソ型のセロビオヒドロラーゼ(1,4-セロビオシダーゼ又はセロビオヒドロラーゼ、EC 3.2.1.91)、-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-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。

20

【0004】

セロビオヒ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。-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。

【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。

30

【0006】

多くの耐熱性グリコシド加水分解酵素は、高温環境に生息する好熱性微生物を分離、同定し、これら培養分離された微生物から遺伝子をクローニングし、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 - グルコシダーゼ(至適温度70、至適pH 3.5~4.0)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 - グルコシダーゼ(至適温度55、至適pH 4.5~5.1)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 - グルコシダーゼ(至適温度80、至適pH 5~6)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 - グルコシダーゼ(至適温度80、至適pH 4.6)が、非特許文献2には、フェルピドバクテリウム・イスランジカム(*Fervidobacterium islandicum*)由来の耐熱性 - グルコシダーゼ(至適温度90、至適pH 6~7)が、それぞれ開示されている。

40

【先行技術文献】

50

【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

【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.

10

【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75、pH7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】

20

【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、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]~[4]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、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。

30

[2] (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、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。

[3] 前記[1]の耐熱性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。

[4] セルロースを含む材料を、前記[1]の耐熱性β-グルコシダーゼ、又は前記[3]のグリコシド加水分解酵素混合物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】

40

本発明に係る耐熱性β-グルコシダーゼは、少なくとも75、pH7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】オープンリーディングフレームOJ1G-364(OJ1G-364-1遺伝子と完全一致)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)とフェルビド

50

バクテリウム・スピーシーズ YNPの - グルコシダーゼ (配列番号6) 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、OJ1G-364-1遺伝子が大腸菌に発現させて得られたOJ1G-364-1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OJ1G-364-1タンパク質の各pHにおけるPNPG加水分解活性(50又は80)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OJ1G-364-1タンパク質の各温度におけるPNPG加水分解活性を計測した結果を示した図である。

【図5】実施例1において、大腸菌発現させたOJ1G-364-1タンパク質の各基質に対する - グルコシダーゼ活性の測定結果を示した図である。

10

【図6】実施例1において、大腸菌発現させたOJ1G-364-1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 - 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。

20

【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 - 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)291個を得た。これらのORFのうち、 - グルコシダーゼ触媒領域(触媒ドメイン)が確認できた111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 - グルコシダーゼ(以下、「OJ1G-364-1」)を得た。OJ1G-364-1のアミノ酸配列を配列番号1に、塩基配列を配列番号2に、それぞれ表す。

30

40

【0017】

後記実施例1に示すように、OJ1G-364-1は、PNPGに対し高い加水分解活性を示し、PNPX(p-ニトロフェニル - D-キシロピラノシド)、キシラン(Xylan)、及びリン酸膨潤アビセル(phosphoric acid swollen Avicel、PSA)に対しても分解活性を示すが、CMC(カルボキシメチルセルロース)に対しては、ほとんど分解活性は示さない。この基質特異性から、OJ1G-364-1は - 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 - グルコシダーゼ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、 - グルコシダーゼ活性とは、 - グルコシド

50

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、OJ1G-364-1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、フェルビドバクテリウム・スピーシーズ（*Fervidobacterium sp.*） YNPの -グルコシダーゼ（Genbank 登録ID: AAN60220.1）（配列番号6）であり、その配列同一性（相同性）は88%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、OJ1G-364-1は、 -グルコシダーゼ活性を有する新規な -グルコシダーゼであることが明らかとなった。

10

【0020】

OJ1G-364-1は、少なくとも75%、pH7の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性（ -グルコシダーゼ活性）を有する。実際に、後記実施例1<8>に示すように、OJ1G-364-1は、50~85%の温度範囲内で -グルコシダーゼ活性を示す。より詳細には、OJ1G-364-1の -グルコシダーゼ活性は、50~80%の範囲内では温度が高くなるにつれて高くなり、80%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、OJ1G-364-1に対しても、 -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。

20

【0022】

すなわち、本発明に係る耐熱性 -グルコシダーゼは、下記(A)~(C)のいずれかからなる -グルコシダーゼ触媒領域を有する、耐熱性 -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、OJ1G-364-1）、

30

(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75%、pH7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75%、pH7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。

【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。

40

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。

【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、90%以上100%未満であれば特に限定されないが、95%以上100%未満で

50

あることが好ましく、98%以上100%未満であることがより好ましい。

【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、OJ1G-364-1等のホモログ又はその部分タンパク質であってもよい。

【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、少なくとも少なくとも75%、pH7の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性（ α -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 α -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 α -グルコシダーゼが得られる。

【0030】

本発明に係る耐熱性 α -グルコシダーゼは、PNPGを基質とする。当該耐熱性 α -グルコシダーゼは、PNPG以外のその他の α -グルカン等を基質としてもよい。本発明に係る耐熱性 α -グルコシダーゼが基質とし得るものとしては、例えば、PNPX；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 cellulose、BMCC）、濾紙などの結晶性セルロース、PSA、CMC、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 α -グルコシダーゼとしては、PNPGに加えて、PNPX、PSA、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 α -グルコシダーゼは、少なくともpH7の条件で、PNPGを基質とする加水分解活性（ α -グルコシダーゼ活性）を、60～80℃の温度範囲内で示すことが好ましく、50～85℃の温度範囲内で示すことがより好ましい。本発明に係る耐熱性 α -グルコシダーゼの至適温度は、60～83℃の範囲内にあることが好ましく、70～83℃の範囲内にあることがより好ましく、75～80℃範囲内にあることがさらに好ましい。

【0032】

本発明に係る耐熱性 α -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、pH6.0～7.5の範囲内にある。本発明に係る耐熱性 α -グルコシダーゼとしては、少なくともpH5.0～8.0の範囲内において α -グルコシダーゼ活性を示すものが好ましく、pH4.0～8.0の範囲内において α -グルコシダーゼ活性を示すものがより好ましい。

【0033】

本発明に係る耐熱性 α -グルコシダーゼは、 α -グルコシダーゼ活性以外のセルロース

10

20

30

40

50

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ロ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 - 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 - 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 - グルコシダーゼが有する、 - 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 - グルコシダーゼには、公知の - グルコシダーゼに対し、 - 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。

10

【0035】

本発明に係る耐熱性 - グルコシダーゼが - 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、 - 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 - 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 - グルコシダーゼとしては、 - 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、 - 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。

20

【0036】

本発明に係る耐熱性 - 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、PSA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 - グルコシダーゼが - 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。

【0037】

本発明に係る耐熱性 - 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 - 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 - 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。

30

【0038】

また、本発明に係る耐熱性 - 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 - 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。

40

【0039】

[耐熱性 - 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 - グルコシダーゼをコードする。当該耐熱性 - 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。

50

【 0 0 4 0 】

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 - 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。

【 0 0 4 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 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 7 5 % 、 p H 7 の条件下で P N P G 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 9 0 % 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 7 5 % 、 p H 7 の条件下で P N P G 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 で表される塩基配列と 8 0 % 以上の配列同一性を有し、かつ少なくとも 7 5 % 、 p H 7 の条件下で P N P G 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 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 7 5 % 、 p H 7 の条件下で P N P G 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。

【 0 0 4 2 】

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。

【 0 0 4 3 】

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、M o l e c u l a r C l o n i n g - A L A B O R A T O R Y M A N U A L T H I R D E D I T I O N (S a m b r o o k ら、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s) に記載の方法が挙げられる。例えば、6 × S S C (2 0 × S S C の組成：3 M 塩化ナトリウム、0 . 3 M クエン酸溶液、p H 7 . 0)、5 × デンハルト溶液 (1 0 0 × 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 S D S、0 . 1 m g / m L サケ精子 D N A、及び 5 0 % 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、4 2 ~ 7 0 ° 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% S D S 含有 1 × S S C 溶液、より好ましくは 0 . 1 質量% S D S 含有 0 . 1 × S S C 溶液である。

【 0 0 4 4 】

前記 (a) ~ (e) の塩基配列においては、縮重コドンは、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 2 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。

【 0 0 4 5 】

配列番号 2 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、O J 1 G - 3 6 4 - 1 をコードする遺伝子 (「O J 1 G - 3 6

10

20

30

40

50

4 - 1 遺伝子」ということがある。)の全長若しくは - 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。O J 1 G - 3 6 4 - 1 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。

【0046】

前記(d)の塩基配列において、配列番号2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。

【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、O J 1 G - 3 6 4 - 1 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。O J 1 G - 3 6 4 - 1 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、 - 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75%、pH7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 - 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。

【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。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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み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。

10

【 0 0 5 4 】

〔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 - 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 - 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 - グルコシダーゼを生産し得る。

20

【 0 0 5 5 】

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。

【 0 0 5 6 】

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。

30

【 0 0 5 7 】

〔耐熱性 - グルコシダーゼの製造方法〕

本発明に係る耐熱性 - 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 - 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み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 - 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 - グルコシダーゼを発現させる。

40

【 0 0 5 8 】

形質転換体によって生産された耐熱性 - 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。

【 0 0 5 9 】

形質転換体から耐熱性 - グルコシダーゼを抽出又は精製する方法は、耐熱性 - 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 - 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

50

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碎しておいてもよい。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 - 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。

【0060】

本発明に係る耐熱性 - 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 - 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 - 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ー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 - グルコシダーゼを簡便に精製することができる。

10

【0061】

すなわち、本発明に係る耐熱性 - 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 - 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 - 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 - グルコシダーゼ、又は前記本発明に係る耐熱性 - グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性 - 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 - グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性 - 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 - 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。

20

【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 - 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 - 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 - キシロシダーゼ等のヘミセルラーゼ、セロピオハイドロラーゼ、 - 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、 - キシロシダーゼ、セロピオハイドロラーゼ、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、 - キシロシダーゼ、セロピオハイドロラーゼ、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。

30

【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70 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 ~ 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

40

50

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70～85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。

【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 - 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 - 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 - グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性 - 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。

10

【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 - 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 - 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 - グルコシダーゼが - グルコシダーゼ活性を示す条件であればよい。例えば、50～85、pH5.0～8.0で反応を行うことが好ましく、60～83、pH5.0～7.0で反応を行うことがより好ましく、60～80、pH5.0～7.0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。

20

【0068】

セルロースの加水分解反応には、本発明に係る耐熱性 - 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。その他の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70で、好ましくは少なくとも70～85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 - 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 - グルコシダーゼの製造方法によって製造された耐熱性 - 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。

30

【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。

40

【0070】

[実施例1] 温泉土壌からの新規耐熱性 - 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 - 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

50

サンプルは、採取時の温度 58 ~ 78、pH 7.2 ~ 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 5 µg に対して、ロシュダイアグノスティ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、 α -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 OJ1 について、メタゲノム DNA の配列解読を行い、平均リード長 390 bp、総リード数 6,301,450 個、総ゲノム解読量 2,456,206,434 bp の全ゲノムシーケンス (WGS) データセットを得た。

10

【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 2.5.3 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。

20

Quality フィルター処理したリードと 100 bp 以上のアセンブルコンティグは、合計 1.9 Gbp であり、このデータセットを α -グルコシダーゼ酵素遺伝子解析に用いた。リード総数 6,301,450 個のうち 3,908,909 個のリードがコンティグにアセンブルされ (計 188,991 コンティグ)、このうち最大コンティグ長は 278,185 bp であった。

【0073】

<3> α -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 (α -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 MetaGene (Noguchi et al., DNA Research, 2008, 15(6)) 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ーされた Glyco_hydro_3_C、Exo-1,4-beta glucosidase、Beta-glucosidase、Beta-d-glucosidase、B-glucosidase、Xylosidase、Glycoside hydrolase family 1、Glycoside hydrolase family 3、Glycoside hydrolase family 1、Glycoside hydr

30

40

50

olase family 3、Beta-D-glucoside glucosyl hydrolase、及び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_fs (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 291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14個得られた。一方、GH3ファミリーに属するORF配列は71個、GH31ファミリー、GH43ファミリーに属するORFがそれぞれ、17個と9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111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MetaGene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。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】

OJ1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						合計
	GH1	GH3	GH31	GH43	その他 GHs	GH不明	
完全長ORF	13	35	11	6	0	49	114
不完全長ORF	1	36	6	3	0	131	177
ORF合計数	14	71	17	9	0	180	291

【0077】

<5> オープンリーディングフレームOJ1G-364

オープンリーディングフレームOJ1G-364は、438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OJ1G-364は、7位のフェニルアラニン(F)から最後の438位のセリン(S)までの432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。

【0078】

図1に、オープンリーディングフレームOJ1G-364(OJ1G-364-1遺伝子と完全一致)のβ-グルコシダーゼ触媒領域のアミノ酸配列とフェルビドバクテリウム・スピーシーズ YNPのβ-グルコシダーゼ(Genbank 登録ID: AAN60220.1)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)を示す。439アミノ酸残基の中、388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OJ1G-364のβ-グルコシダーゼ触媒領域は、フェルビドバクテリウム・スピーシーズ YNPのβ-グルコシダーゼと88%の配列同一性を示していた。

10

【0079】

<6> 遺伝子クローニング

配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマー(5'-CACCATGATAAGAGATCCGATTTTC-3';配列番号3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4で表される塩基配列からなるリバースプライマー(5'-TTACGATATGAGGAAATCTTTC AAC C-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3で表される塩基配列は、配列番号2で表される塩基配列の1~22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4で表される塩基配列は、配列番号2で表される塩基配列の1292~1317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によりポジティブクローンを選別し、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。

20

30

【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OJ1G-364から2個の遺伝子クローンOJ1G-364-1とOJ1G-364-7を得た。β-グルコシダーゼ候補遺伝子OJ1G-364-1の塩基配列は、オープンリーディングフレームOJ1G-364(配列番号2)と同様に1,317bpを含み、OJ1G-364と全く同じアミノ酸配列であった。これに対して、β-グルコシダーゼ候補遺伝子OJ1G-364-7は、OJ1G-364の1アミノ酸変異体であり、OJ1G-364のアミノ酸配列(配列番号2)のうち、124位のロイシン(L)がセリン(S)であった。

40

【0081】

β-グルコシダーゼ候補遺伝子OJ1G-364-1(以下「OJ1G-364-1遺伝子」という)がコードするポリペプチド(OJ1G-364-1)は、438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。OJ1G-364-1は、3位のリジンから435位のロイシンまでの433アミノ酸(K3-L435)がGH1ファミリーに属するβ-グルコシダーゼ触媒領域の部分的な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

50

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、 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.8$ 程度まで培養した後、IPTG（Isopropyl-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（pH 8.0）を加えて懸濁した。その後、超音波破碎装置astrason 3000（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 = 0.45 μm 、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。

10

【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（pH 8.0）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（pH 8.0）にて0~50%の濃度勾配でタンパク質を分画した。 - 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（pH 8.0）へ溶液交換した。溶液交換後の - 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（pH 8.0）にて0~100%の濃度勾配でタンパク質を分画した。 - 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VIVASPIN 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（pH 8.0）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。 - 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（pH 8.0）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。

20

30

【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 ME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2.5 μL 、精製酵素は10 μL 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。

40

【0085】

図2に、OJ1G-364-1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50.6kDa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）。

50

【 0 0 8 6 】

< 8 > P N P G を基質とした - グルコシダーゼ活性の pH 及び温度依存性
 - グルコシダーゼ活性測定には、P N P G を基質として用いた。P N P G (S i g m a 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 P N P G 基質溶液は、全て当該方法により調製した P N P G 水溶液を用いた。

【 0 0 8 7 】

O J 1 G - 3 6 4 - 1 遺伝子がコードする酵素タンパク質 (O J 1 G - 3 6 4 - 1) の P N P G 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 1 m g / m L に調整し、さらにそれを 2 0 0 倍に水で希釈し 0 . 0 0 5 m g / m L とした精製酵素溶液を用いた。

10

【 0 0 8 8 】

精製酵素の P N P G 加水分解活性の測定は、4 0 m M の P N P G 水溶液を 5 0 μ L と、マッキルベインバッファー (p H 3 . 0、4 . 0、5 . 0、6 . 0、6 . 5、7 . 0、又は 8 . 0) を 5 0 μ L と、精製水を 8 0 μ L と、精製酵素溶液を 2 0 μ L と、からなる混合液を、温度 5 0 又は 8 0 で 1 5 分間反応させた (酵素終濃度 : 0 . 0 0 0 5 m g / m L、基質終濃度 : 1 0 m M)。全ての計測において、精製酵素溶液の代わりに 5 0 m M T r i s - H C l バッファー (p H 8 . 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。反応中に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 . 2 M N a ₂ C O ₃ 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 4 2 0 n m 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 4 2 0 n m 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による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 1 μ m o l の p - ニトロフ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 / m g) 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。

20

【 0 0 8 9 】

次に、精製した O J 1 G - 3 6 4 - 1 の P N P G 加水分解活性の温度依存性を調べた。

30

精製酵素の P N P G 加水分解活性の測定は、マッキルベインバッファーに代えて p H 7 . 0 のリン酸バッファーを用い、反応温度を 5 0、6 0、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、又は 9 9 で行った以外は、O J 1 G - 3 6 4 - 1 の P N P G 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 4 2 0 n m 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。

【 0 0 9 0 】

計測結果を図 3 及び 4 に示す。図 3 は、横軸を pH とし、精製酵素 O J 1 G - 3 6 4 - 1 の 5 0 又は 8 0 における各 pH における P N P G 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 P N P G 加水分解活性 (p H 7 . 0) を計測した結果を示した図である。p H 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。

40

【 0 0 9 1 】

精製酵素 O J 1 G - 3 6 4 - 1 は、温度範囲 6 0 ~ 8 0 において高い P N P G 加水分解活性を示した (図 4)。最も高い活性を示した最適温度 (T_{opt}) は、p H 7 . 0 において 8 0 であった。酵素反応温度を 8 5 以上にした時、精製酵素 O J 1 G - 3 6 4 - 1 の P N P G 加水分解活性は急激に減少した。

【 0 0 9 2 】

精製酵素 O J 1 G - 3 6 4 - 1 は、反応温度 5 0 ~ 8 0、p H 5 ~ 8 の範囲において高い P N P G 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、5 0 で p H 7 . 0 5 (実測値)、8 0 で p H 7 . 1 (実測値) であった。精製酵素 O J

50

1 G - 3 6 4 - 1 では、反応温度 5 0 、 p H 3 . 2 5 、 及び反応温度 8 0 、 p H 3 . 3 ~ 4 . 2 の範囲内においては、低レベルの P N P G 加水分解活性が認められた。

【 0 0 9 3 】

< 9 > O J 1 G - 3 6 4 - 1 の基質特異性

O J 1 G - 3 6 4 - 1 遺伝子がコードする酵素タンパク質 (O J 1 G - 3 6 4 - 1) に対して、様々なセルロース基質と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 1 m g / m L に調整し、さらにそれを 2 0 0 倍に水で希釈し 0 . 0 0 5 m g / m L とした精製酵素溶液を用いた。また、基質として、P N P G (S i g m a 社製)、P N P X (S i g m a 社製)、C M C (S i g m a 社製)、P S A、X y l a n (ブナ材由来、S i g m a 社製) を用いた。

10

P S A はリン酸溶液でアビセル粉末 (微結晶性セルロース粉末、M e r c k 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、p H 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 P S A は全て当該方法により調製した。

【 0 0 9 4 】

具体的には、まず、反応液として、5 0 μ L の p H 7 . 0 のリン酸バッファーと、2 0 μ L 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、P N P G を基質とする場合には、4 0 m M の P N P G 水溶液を 5 0 μ L と精製水を 8 0 μ L とし、P N P X を基質とする場合には、4 0 m M の P N P X 水溶液を 5 0 μ L と精製水を 8 0 μ L とし、C M C を基質とする場合には、1 質量 % の C M C 水溶液を 1 0 0 μ L と精製水を 3 0 μ L とし、P S A を基質とする場合には、P S A を 1 0 0 μ L と精製水を 3 0 μ L とし、X y l a n を基質とする場合には、1 質量 % の X y l a n 水溶液を 1 0 0 μ L と精製水を 3 0 μ L とした。

20

次いで、各混合液を、5 0 又は 8 0 で 1 5 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に混合し、反応開始とした。また、C M C、P S A、及び X y l a n 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 1 4 0 0 r p m の振動を加えた。

【 0 0 9 5 】

P N P G 又は P N P X を基質とした反応においては、反応終了後は、前記 < 8 > の O J 1 G - 3 6 4 - 1 の P N P G 加水分解活性の p H 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 4 2 0 n m 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。C M C、P S A、又は X y l a n を基質とした反応においては、反応終了後は、等量の 3 , 5 - d i n i t r o s a l i c y l i c a c i d r e a g e n t (D N S 溶液) を加えて 1 0 0 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 5 4 0 n m の吸光度を計測し、グルコースで作成した検量線 (X y l a n 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による加水分解によって生成した還元糖量を求めた。1 分間に 1 μ m o l の還元糖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 / m g) とした。

30

【 0 0 9 6 】

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、O J 1 G - 3 6 4 - 1 は P N P G に対し高い加水分解活性を示し、P N P X、X y l a n、及び P S A (8 0 のみ) 対しても分解活性を示した。一方、O J 1 G - 3 6 4 - 1 は、C M C に対してはほとんど分解活性を示さなかった。これらの結果から、O J 1 G - 3 6 4 - 1 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。

40

【 0 0 9 7 】

< 1 0 > D i f f e r e n t i a l s c a n n i n g f l u o r i m e t r y による β -グルコシダーゼの熱安定性測定

D i f f e r e n t i a l s c a n n i n g f l u o r i m e t r y (D S F)

50

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生し、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生する。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(pH7.0)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-Rad社製)を使い、データ解析を行った。

【0099】

図6には、DSF法により計測したOJ1G-364-1酵素タンパク質が示す、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す。図6の上段グラフは実測データであり、図6の下段グラフには、図6の上段グラフの蛍光強度変化曲線の1階微分「 $-d(\text{Fluorescence})/dt$ 」を示している。熱変性温度(melting temperature; T_m 値)は、温度関数である蛍光強度曲線の1階微分(図6の下段グラフのY軸に示した「 $-d(\text{Fluorescence})/dt$ 」)の極大値として定義した。

【0100】

OJ1G-364-1の蛍光強度曲線は、50付近と83付近の2か所に蛍光強度の微分値の極小点が見られた。OJ1G-364-1酵素タンパク質が、60から80の範囲内においても酵素活性を示すことから、50付近の極小点はタンパク質分子の何らかの構造変化があることを示唆しているが、熱崩壊を示すものではなく、実際の熱崩壊温度は83付近の極小点が生じていると考えられた。以上より、OJ1G-364-1の熱崩壊温度(T_m)は83.20であると推定された。

【産業上の利用可能性】

【0101】

本発明に係る耐熱性-グルコシダーゼは、少なくとも75、pH7の条件下でPNPGを基質とした加水分解活性を有しており、高温条件下におけるセルロース含有バイオマスの糖化処理に好適である。このため、当該耐熱性-グルコシダーゼ及びその生産に用いられ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、例えば、セルロース含有バイオマスからのエネルギー生産の分野において利用が可能である。

10

20

30

40

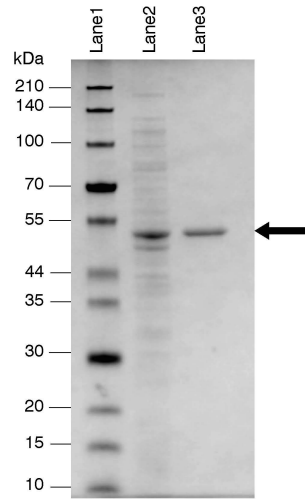
【 1 】

```

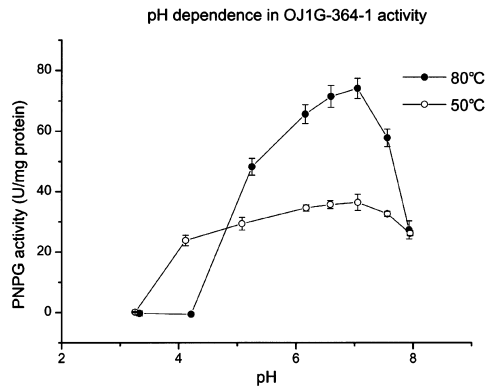
1 M I R S D F P K N V F G T A T A A Y Q T E G A A N E D G G P S I W D F S H T P G K I M T G E N G D V A 55
2 M I R R S D F P K N V F G T A T A A Y Q T E G A A N E D G G P S I W D F S H T P G K I M T G E N G D V A 55
55 C D H Y R K E D H Q L M K E I G L D A Y R E S I S I P R V P D G K N I G K G V D F N R L V D E L L E 110
55 C D H Y R K E D H Q L M K E I G L D A Y R E S I S I P R V P D G K N I G K G V D F N R L V D E L L E 110
111 H D I T P E T I L Y H D L P Y A L Y E K G G W L N S D I A M Y E R A Y A T E M E L G D R V K H W I L I 165
111 H D I T P E T I L Y H D L P Y A L Y E K G G W L N S D I A M Y E R A Y A T E M E L G D R V K H W I L I 165
166 E P M G S S F L G Y F T G E H A P G H K N L Q E A I W A A N L I R S H G H A V O S E R E V K D G I T 220
166 E P M G S S F L G Y F T G E H A P G H K N L Q E A I W A A N L I R S H G H A V O S E R E V K D G I T 220
221 N V M K V E P G D S R P E S F L A A S L V D K F V A W F H D P V W F G K Y P E E A V K Y V O E R G L O V M 275
221 N V M K V E P G D S R P E S F L A A S L V D K F V A W F H D P V W F G K Y P E E A V K Y V O E R G L O V M 275
276 E N D M D I I S T P I D F F G W N Y Y T R L Y V F D I T N P L G F S Y V G G D L P K T E M G W E I Y P Q G L 330
276 E N D M D I I S T P I D F F G W N Y Y T R L Y V F D I T N P L G F S Y V G G D L P K T E M G W E I Y P Q G L 330
331 F D M L V L K E R V R L P L Y T E N G M A G P D K T E N G K W N D I T R I E Y L E K H F E K A E A I N A 385
331 F D M L V L K E R V R L P L Y T E N G M A G P D K T E N G R W H D M V R I E Y L E K H F E K A E A I N A 385
386 G W L K G Y F I W S L M D N F E W A Y G Y S K R F G I T Y D Y N T Q R I L K D S A Y L K D P F L I S * 438
386 G W D L K G Y F I W S L M D N F E W A Y G Y S K R F G I T Y D Y N T Q R I L K D S A L M L K E F L K S 438

```

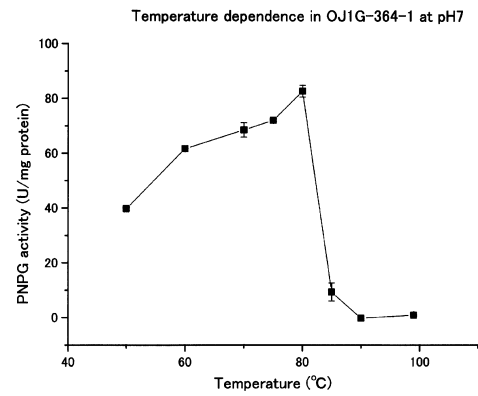
【 2 】



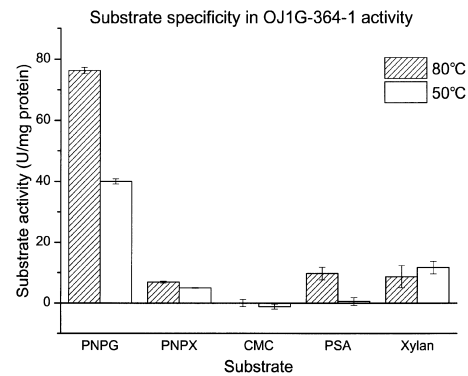
【 3 】



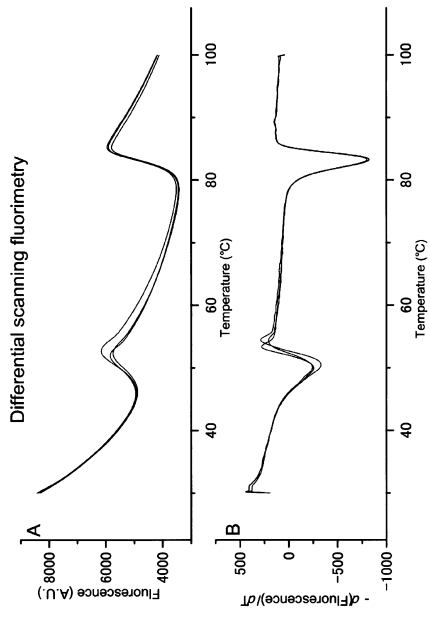
【 4 】



【 5 】



【 図 6 】



【 配列表 】

0006319904000001.app

フロントページの続き

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

- (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 野村 英雄

- (56)参考文献 国際公開第97/025417(WO, A1)
国際公開第2002/026979(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q