

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2018年2月8日(08.02.2018)



(10) 国際公開番号

**WO 2018/025929 A1**

(51) 国際特許分類:

*C12N 15/09* (2006.01) *C12P 21/02* (2006.01)  
*C12N 1/15* (2006.01) *C12R 1/645* (2006.01)  
*C12P 19/14* (2006.01) *C12R 1/885* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/028122

(22) 国際出願日: 2017年8月2日(02.08.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2016-152134 2016年8月2日(02.08.2016) JP

(71) 出願人: 花王株式会社(KAO CORPORATION)  
[JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町  
一丁目1番10号 Tokyo (JP). 国立大学法  
人長岡技術科学大学(NATIONAL UNIVERSITY  
CORPORATION NAGAOKA UNIVERSITY OF  
TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒9402188 新潟県長  
岡市上富岡町1603-1 Niigata (JP).

(72) 発明者: 柴田 望(SHIBATA, Nozomu); 〒6408580  
和歌山県和歌山市湊1334番地 花王株  
式会社研究所内 Wakayama (JP). 小笠原 渉  
(OGASAWARA, Wataru); 〒9402188 新潟県長  
岡市上富岡町1603-1 国立大学法人  
長岡技術科学大学内 Niigata (JP). 志田 洋  
介(SHIDA, Yosuke); 〒9402188 新潟県長岡市  
上富岡町1603-1 国立大学法人長  
岡技術科学大学内 Niigata (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務  
所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA  
PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区  
日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴  
人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH,  
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,  
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則5.2(a))

(54) Title: MUTANT STRAIN OF FILAMENTOUS FUNGUS AND USE THEREFOR

(54) 発明の名称: 糸状菌変異株及びその利用

(57) Abstract: Provided are a mutant strain of a filamentous fungus having enhanced protein secretion production, and a protein production method using the filamentous fungus. Specifically provided is a protein production method that includes a step for cultivating a mutant strain of a filamentous fungus with a knockdown or knockout of tubulin, and extracting protein from the culture.

(57) 要約: タンパク質分泌生産が向上した糸状菌変異株、及び当該糸状菌を用いたタンパク質の製造方法の提供。チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株を培養し、培養物からタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の製造方法。



WO 2018/025929 A1

## 明 細 書

発明の名称：糸状菌変異株及びその利用

### 技術分野

[0001] 本発明は、糸状菌変異株及び該糸状菌を用いたタンパク質製造に関する。

### 背景技術

[0002] 糸状菌は、高いタンパク質生産能力を有し、セルラーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなど分泌性タンパク質を培養液中に産生する微生物である。一般に糸状菌の培養液には、こうした複数種のタンパク質が含まれており、その中から目的の性質を有するプロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼなどのタンパク質成分を回収し、工業的に利用されている。

[0003] また、近年、化石資源を除いた再生可能な生物由来の有機性資源であるバイオマスが注目され、その中でもセルロースを分解することで糖を製造し、得られた糖から化学変換や微生物を用いた発酵技術により石油資源の代替物やバイオ燃料などの有用資源を製造する技術の開発が、世界中で行われている。

[0004] セルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを主成分として構成されるが、当該バイオマスを活用するには、セルロースやヘミセルロースを高効率に分解可能な糖化酵素の開発が必要となる。この場合に、多種のセルラーゼ及びキシラナーゼを生産する植物性多糖の分解菌として、トリコデルマ (*Trichoderma*) 等の糸状菌が注目され（非特許文献1）。特に、トリコデルマは、セルラーゼおよびキシラナーゼを同時に生産することが可能であり、しかもその複合酵素を大量に生産することから、セルラーゼ生産の宿主として有用である（非特許文献2）。

[0005] チューブリンは、細胞骨格を形成する主要なタンパク線維である微小管や中心体を形成するタンパク質である。チューブリンには、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ チューブリンの3種類が知られている。 $\alpha$ チューブリン、 $\beta$ チューブリンは類似した構造を持ち、 $\alpha$ と $\beta$ はヘテロ二量体を形成し重合することでプロトフィラ

メントが形成される。このプロトフィラメントが並行に並ぶことで微小管が形成される。これに対し、 $\gamma$ チューブリンは中心体の形成を担うことが知られている。

[0006] チューブリンは全ての真核細胞に存在し、高度に保存されている。また、同じ細胞内にも複数のイソ型が存在することが知られており、細胞内での所在が異なることで機能が異なっている。例えば、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*) には、2 個の  $\alpha$  チューブリン様タンパク質、5 個の  $\beta$  チューブリン様タンパク質が存在することが知られている（非特許文献 3）。

菌類においても、チューブリンの機能は多岐に渡ることが報告されており、例えばアスペルギルス・ニデュランスにおいては、 $\beta$  チューブリンをコードする *ben A* に変異が生じると核分裂が正常に行われなくなることが報告されている（非特許文献 4）。また、アスペルギルス・ニデュランスの  $\alpha$  チューブリンをコードする *tub A* の遺伝子破壊は核分裂の阻害を引き起こすことが報告されており（非特許文献 5）、さらに、 $\alpha$  チューブリンをコードする *tub B* は欠損しても生育には影響がないものの、二倍体核の形成の阻害が引き起こされることが報告されている（非特許文献 6）。このように、菌類においてもチューブリンは細胞分裂や生殖に関与している。

[0007] しかしながら、チューブリンの機能低減や喪失が菌体外へのタンパク質分泌生産に関与することはこれまでに知られていない。

[0008] 〔非特許文献 1〕 近藤昭彦、天野良彦、田丸浩、「バイオマス分解酵素研究の最前線-セルラーゼ・ヘミセルラーゼを中心として-」、シーエムシー出版、10 頁～ 19 頁

〔非特許文献 2〕 小笠原渉、志田洋介、「化学と生物」 vol.50、公益社団法人 日本農芸化学会、50 巻、8 号、592 頁～ 599 頁、2012 年 08 月

〔非特許文献 3〕 Martinez, D., et al. (2008). *Nature Biotechnology* 26, 553-560.

〔非特許文献 4〕 Oakley, B.R., Morris, N.R. (1981). *Cell* 24, 837-845.

〔非特許文献5〕 Doshi, P. et al. (1991). Mol. Gen. Genet. 225, 129-141.

〔非特許文献6〕 Kirk, K.E., and Morris, N.R. (1991). Genes Dev. 5, 2014-2023.

## 発明の概要

[0009] 本発明は以下に係るものである。

〔1〕チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株を培養し、培養物からタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の製造方法。

〔2〕糸状菌においてチューブリンを機能低減又は機能喪失させることを含む、糸状菌のタンパク質分泌生産性の向上方法。

〔3〕チューブリンが機能低減又は機能喪失したトリコデルマ属糸状菌の変異株であって、親菌株と比較してタンパク質分泌生産性が向上した変異株。

〔4〕チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤として用いる、バイオマスからの糖の製造方法。

〔5〕チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤として用いる、バイオマスの糖化方法。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1] *Trichoderma reesei* PC-3-7株とPC-3-7 $\Delta$ tubB株とを結晶性セルロースを炭素源として培養した際のタンパク生産性を示す図。黒四角の実線がPC-3-7株、黒丸の破線がPC-3-7 $\Delta$ tubB株を示す。値はPC-3-7株の最大生産量を100%としたときの相対値を示す。

[図2] *Trichoderma reesei* PCD-10株とPCD-10 $\Delta$ tubB株とを結晶性セルロースを炭素源として培養した際のタンパク生産性を示す図。黒四角の実線がPCD-10株、黒丸の破線がPCD-10 $\Delta$ tubB株を示す。値はPCD-10株の最大生産量を100%としたときの相対値を示す。

[図3] *Trichoderma reesei* PC-3-7株とPC-3-7 $\Delta$ tubB株とを結晶性セルロース

とグルコースを炭素源として培養した際のタンパク生産性を示す図。黒四角の実線がPC-3-7株、黒丸の破線がPC-3-7 $\Delta$ tubB株を示す。値はPC-3-7株の最大生産量を100%としたときの相対値を示す。

[図4] *Trichoderma reesei* PC-3-7株とPC-3-7 $\Delta$ tubB株とを結晶性セルロースとキシランを炭素源として培養した際のタンパク生産性を示す図。黒四角の実線がPC-3-7株、黒丸の破線がPC-3-7 $\Delta$ tubB株を示す。値はPC-3-7株の最大生産量を100%としたときの相対値を示す。

### 発明の詳細な説明

[0011] 本発明は、タンパク質分泌生産が向上した糸状菌変異株、及び当該糸状菌を用いたタンパク質の製造方法を提供することに関する。

[0012] 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、チューブリンの機能が喪失した糸状菌変異株でタンパク質分泌生産が向上し、当該菌株を用いることにより、効率的なタンパク質生産が可能となることを見出した。

[0013] 本発明によれば、セルラーゼやキシラナーゼ等のタンパク質の生産において分泌生産性が向上された糸状菌が提供され、当該糸状菌を用いることで、より効率のよいタンパク質生産が可能となる。

[0014] 本明細書において、アミノ酸配列及びヌクレオチド配列の同一性はLipman-Pearson法 (Lipman, D.J., Pearson, W.R. : Science, 1985, 227: 1435-1441) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (k t u p) を2として解析を行うことにより算出される。

[0015] 本明細書において、別途定義されない限り、アミノ酸配列又は塩基配列におけるアミノ酸又は塩基の欠失、置換、付加又は挿入に関して使用される「1又は数個」とは、例えば、1～12個、好ましくは1～8個、より好ましくは1～4個であり得る。また本明細書において、アミノ酸又は塩基の「付加」には、配列の一末端及び両末端への1又は数個のアミノ酸又は塩基の付

加が含まれる。

[0016] 本明細書において、別途定義されない限り、ハイブリダイゼーションに関する「ストリンジেন্টな条件」とは、配列同一性が約80%以上若しくは約90%以上のヌクレオチド配列を有する遺伝子の確認を可能にする条件である。「ストリンジेंटな条件」としては、Molecular Cloning – A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) 記載の条件が挙げられる。ハイブリダイゼーションの当業者は、プローブのヌクレオチド配列や濃度、長さ等に応じて、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、温度等を調節することにより、ストリンジेंटな条件を適切に作り出すことができる。一例を示せば、上記「ストリンジेंटな条件」とは、ハイブリダイゼーション条件としては、5×SSC、70℃以上が好ましく、5×SSC、85℃以上がより好ましく、洗浄条件としては、1×SSC、60℃以上が好ましく、1×SSC、73℃以上がより好ましい。上記SSC及び温度条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素を適宜組み合わせることにより、適切なストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0017] 本明細書において、遺伝子の上流及び下流とは、それぞれ、対象として捉えている遺伝子又は領域の5'側及び3'側に続く領域を示す。別途定義されない限り、遺伝子の上流及び下流とは、遺伝子の翻訳開始点からの上流領域及び下流領域には限定されない。

[0018] <糸状菌変異株の構築>

本発明の糸状菌変異株は、チューブリンが機能低減又は機能喪失した糸状菌株である。

チューブリンは、細胞骨格を形成する主要なタンパク線維である微小管や中心体を形成するタンパク質であり、チューブリンの構成タンパクとして、 $\alpha$ チューブリン、 $\beta$ チューブリン及び $\gamma$ チューブリンの3種類が知られてい

る。 $\alpha$ チューブリンと $\beta$ チューブリンは類似した構造を持ち、両者はヘテロ二量体を形成し重合することでプロトフィラメントを形成する。また $\gamma$ チューブリンは中心体の形成を担うことが知られている。

本発明においては、特に指定する場合を除き、「チューブリン」には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ チューブリンが包含されるが、好適には $\alpha$ 又は $\beta$ チューブリンであり、より好適には $\alpha$ チューブリンである。

[0019] 例えば、トリコデルマ・リーセイにおける $\alpha$ チューブリンは、NCBIデータベースにて、Tubulin alpha chain 1 (TRIREDRAFT\_120830 : 配列番号2)、Tubulin alpha chain 2 (TRIREDRAFT\_120789 : 配列番号4)として登録され、 $\beta$ チューブリンは、Tubulin beta chain 1 (TRIREDRAFT\_21742 : 配列番号6)、Tubulin beta chain 2 (TRIREDRAFT\_122886 : 配列番号8)、また $\beta$ チューブリンドメインを有するものとしてHypothetical protein (TRIREDRAFT\_58421 : 配列番号10)、Hypothetical protein (TRIREDRAFT\_124181 : 配列番号12)、WD40 repeat-like protein (TRIREDRAFT\_65771 : 配列番号14)が登録されている。

また、トリコデルマ・リーセイ以外の糸状菌における $\alpha$ チューブリンとしては、アスペルギルス・ニデュランスにおけるTubulin alpha-1 chain (NCBI-ProteinID: XP\_657920)、Tubulin alpha-2 chain (NCBI-ProteinID: XP\_680839)、ニューロスボラ・クラッサにおけるtubulin alpha-2 (NCBI-ProteinID: XP\_963223)、alpha tubulin (NCBI-ProteinID: XP\_958904)、トリコデルマ・ハルジアナムのtubulin/FtsZ family protein (NCBI-ProteinID: KK097118)が挙げられ、これらとトリコデルマ・リーセイのTubulin alpha chain 1 (TRIREDRAFT\_120830)とのアミノ酸配列の同一性は68～89%であり、Tubulin alpha chain 2 (TRIREDRAFT\_120789)とのアミノ酸配列の同一性は68～93%である。

また、 $\beta$ チューブリンとしては、アスペルギルス・ニデュランスにおけるTUBULIN BETA-1 CHAIN (NCBI-ProteinID: XP\_658786)、TUBULIN BETA-2 CHAIN (NCBI-ProteinID: XP\_664442)、ニューロスボラ・クラッサにおけるtubul

in beta chain (NCBI-ProteinID: XP\_957669) が挙げられ、これらとトリコデルマ・リーセイのTubulin beta chain 1 (TRIREDRAFT\_21742) とのアミノ酸配列の同一性は 84 ~ 91 % であり、Tubulin beta chain 2 (TRIREDRAFT\_122886) とのアミノ酸配列の同一性は 82 ~ 91 % である。

[0020] したがって、本発明における  $\alpha$  チューブリンとしては、好適には以下が挙げられる。

- (A) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (B) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ  $\alpha$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質、
- (C) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列と 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ  $\alpha$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質。

[0021] また、 $\beta$  チューブリンとしては、具体的には以下が挙げられる。

- (D) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (E) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質、
- (F) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列と 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質。

[0022] 配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列と 80 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列としては、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上、より好ましくは 97 %、より好ましくは 98 % 又はより好ましくは 99 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0023] チューブリンは、微小管や中心体を形成するタンパク質であり、 $\alpha$  チューブリンと  $\beta$  チューブリンはヘテロ二量体を形成し、これが重合することで

ロトフィラメントを形成する。このプロトフィラメントが並行に並ぶことで微小管が形成される。本発明において、 $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質、 $\beta$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質とは、それぞれ $\alpha$ チューブリン又は $\beta$ チューブリンと同様に、ヘテロ二量体を形成し、重合してプロトフィラメントを形成する能力を有するタンパク質であることを意味する。

[0024] 本発明において、チューブリンが機能低減又は機能喪失したとは、チューブリンの発現が親株に比べて低下又は喪失すること、好適には $\alpha$ 及び $\beta$ チューブリンの何れか1以上の発現が親株に比べて低下又は喪失し、 $\alpha$ 及び $\beta$ チューブリンのヘテロ二量体形成が阻害されること、さらに好ましくは $\alpha$ チューブリンの発現が親株に比べて低下又は喪失し、 $\alpha$ 及び $\beta$ チューブリンのヘテロ二量体形成が阻害されることが挙げられる。

本発明において、チューブリンの「発現」とは、当該タンパク質をコードする遺伝子から、翻訳産物が産生され、且つ機能的な状態でその作用部位に局在することをいう。チューブリンの発現が低下又は喪失したとは、遺伝子レベル、転写レベル、転写後調節レベル、翻訳レベル、翻訳後修飾レベルでの改変により、結果として、糸状菌変異株の菌体内に存在するチューブリン量が、親株におけるそれに比べて有意に低下又は喪失した状態を意味する。

[0025] 「チューブリンの発現が親株に比べて低下した」とは、糸状菌が有するチューブリンの発現量が親株に比べて低下していること、より具体的には親株と比較して、菌体内のチューブリンの発現量が、通常50%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下に低下し、それによりその活性もまた同様に低下していることを意味する。最も好ましくは、チューブリンの発現量が0%、すなわちチューブリンの発現喪失である。

尚、チューブリンの発現量の比較は、チューブリンのタンパク質の発現量に基づき実施される。

チューブリンの発現量は、ウェスタンブロッティングや免疫組織染色等の周知の免疫学的手法により測定することができる。

[0026] チューブリンの発現が親株に比べて低下又は喪失した糸状菌変異株は、好適には、親株の糸状菌の染色体DNA上のチューブリン遺伝子を欠失又は不活性化することにより取得することができる。ここで、チューブリン遺伝子とは、ORFを含む転写領域及び当該遺伝子のプロモーター等の転写調節領域からなるDNAを意味する。

本発明において、 $\alpha$ チューブリン遺伝子としては、好適には以下が挙げられる：

- (a) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは96%以上、より好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ

$\alpha$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0027] また、 $\beta$  チューブリン遺伝子としては、好適には以下が挙げられる：

(g) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(h) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列と 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列と 80% 以上、好ましくは 85% 以上、より好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、より好ましくは 96% 以上、より好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、より好ましくは 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0028] チューブリン遺伝子の欠失又は不活性化は、当該遺伝子の塩基配列上の 1

つ以上の塩基に対する変異の導入、すなわち当該遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部の欠失、当該塩基配列に対する別の塩基配列の置換若しくは挿入（この場合、チューブリンのアミノ酸配列は、親株と同一であってもよいし、異なってもよい）等が挙げられる。

[0029] 塩基に対する変異を導入する領域としては、例えば、チュー布林遺伝子の転写領域、及び当該遺伝子のプロモーターやエンハンサー（転写活性化領域）などの転写調節領域を挙げることができ、好ましくは転写領域を挙げることができる。

[0030] チュー布林遺伝子の転写調節領域としては、例えば、染色体DNA上におけるチュー布林遺伝子の転写領域の5'末端より上流側30塩基までの領域を挙げることができる。チュー布林遺伝子の転写活性化領域としては、上流側-500塩基から-1000塩基に相当する領域を挙げることができる。

[0031] 転写領域への塩基の変異の導入は、チューブリンの発現を低下又は喪失させる塩基の変異であれば、塩基の種類及び数に制限はないが、塩基の欠失としては、好ましくは10塩基以上、より好ましくは20塩基以上、さらに好ましくは100塩基以上、特に好ましくは200塩基以上の転写領域の一部、最も好ましくは転写領域全部の欠失を挙げることができる。塩基の置換としては、転写領域の5'末端から150番目以内の塩基、好ましくは100番目以内の塩基、より好ましくは50番目以内の塩基、特に好ましくは30番目以内の塩基、最も好ましくは20番目以内の塩基を置換してナンセンスコドンを導入する置換を挙げることができる。塩基の挿入としては、転写領域の5'末端から150番目以内の塩基、好ましくは100番目以内の塩基、より好ましくは50番目以内の塩基、特に好ましくは30番目以内の塩基、最も好ましくは20番目以内の塩基の直後に、50塩基以上、好ましくは100塩基以上、より好ましくは200塩基以上、さらに好ましくは500塩基以上、特に好ましくは1kb以上のDNA断片を付加することを挙げることができる。塩基の付加の好ましい態様としては、ハイグロマイシン耐性

遺伝子、オーレオバシジン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子、又は当該糸状菌が有さないアセトアミダーゼ遺伝子等の栄養要求性遺伝子の導入を挙げることができる。

[0032] 糸状菌の染色体DNA上のチューブリン遺伝子に塩基の変異を導入する方法としては、例えば、相同組換えを利用した方法を挙げることができる。一般的な相同組換えを利用した方法としては、塩基が欠失、置換又は挿入された変異遺伝子を、チューブリン遺伝子の上流領域及び下流領域の間に挿入することにより、薬剤耐性遺伝子又は栄養要求性遺伝子を有したDNA断片を作成し、当該DNA断片を利用して、塩基の欠失等を導入したい宿主細胞内のチューブリン遺伝子の遺伝子配座にて相同組換えを起こす方法を挙げることができる。

[0033] 相同組換えを利用した具体的な方法としては、i) 当該相同組換え用DNA断片を常法により親株の糸状菌に導入した後、薬剤耐性又は栄養要求性を指標にして相同組換えによって染色体DNA上に当該相同組換え用プラスミドが組込まれた形質転換株を選択し、ii) 得られた形質転換株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行う。この際のプライマーは当該遺伝子の塩基が欠失、置換又は挿入された場所が増幅されるように設計されている。当該遺伝子の本来の長さが増幅されず、塩基の欠失、置換又は挿入を反映した長さが増幅された株を選択し、iii) 最終的にサザン解析にて染色体DNAの当該遺伝子座にのみ変異型遺伝子が導入されており、それ以外の場所には導入されていない株を取得することができる。

[0034] 親株の染色体DNA上のチューブリン遺伝子に塩基の変異を導入する方法としては、他にもバクテリオファージや接合を利用する方法を挙げられる。

[0035] また、本発明の糸状菌変異株は、親株の糸状菌を突然変異処理法に付した後、チューブリンの発現が親株と比較して低下又は喪失した菌株を選択することによっても得ることが出来る。突然変異処理法としては、具体的には、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG)、エチルニトロソウレア、紫外線による処理（新版 微生物実験法、1999年、126-134頁、講談社サイ

エンティフィック)、放射線の照射等が挙げられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も変異原として用いることができる。

[0036] また、チューブリン遺伝子に変異を導入せずにチューブリンの発現を低下させることもできる。このような方法としては、例えば、タンパク質をコードする遺伝子の転写産物を分解する活性を有する核酸、或いは当該転写産物からタンパク質への翻訳を抑制する核酸の導入が挙げられる。このような核酸としては、当該タンパク質をコードする mRNA の塩基配列と相補的又は実質的に相補的な塩基配列或いはその一部を含む核酸が挙げられる。

[0037] チューブリンをコードする mRNA の塩基配列と実質的に相補的な塩基配列とは、対象糸状菌体内の生理的条件下において、当該 mRNA の標的配列に結合してその翻訳を阻害し得る程度の相補性を有する塩基配列を意味し、具体的には、例えば、当該 mRNA の塩基配列と完全相補的な塩基配列（すなわち、mRNA の相補鎖の塩基配列）と、オーバーラップする領域に関して、約 80% 以上、好ましくは約 90% 以上、より好ましくは約 95% 以上、最も好ましくは約 97% 以上の同一性を有する塩基配列である。

[0038] より具体的には、チューブリンをコードする mRNA の塩基配列と相補的又は実質的に相補的な塩基配列としては、上述の (a) ~ (l) で示したポリヌクレオチドが挙げられる。

[0039] 好適なチューブリンをコードする mRNA としては、例えば、配列番号 1、3、5、7、9、11 又は 13 に示される塩基配列を含むトリコデルマ・リーセイの  $\alpha$  チューブリン又は  $\beta$  チューブリンをコードする mRNA を挙げることが出来る。

[0040] 「チューブリンをコードする mRNA の塩基配列と相補的又は実質的に相補的な塩基配列の一部」とは、チューブリンの mRNA に特異的に結合することができ、且つ当該 mRNA からのタンパク質の翻訳を阻害し得るものであれば、その長さや位置に特に制限はないが、配列特異性の面から、標的配列に相補的又は実質的に相補的な部分を少なくとも 10 塩基以上、好ましくは約 15 塩基以上、より好ましくは約 20 塩基以上含むものである。

[0041] 具体的には、チューブリンをコードするmRNAの塩基配列と相補的又は実質的に相補的な塩基配列又はその一部を含む核酸として、以下の(i)～(iii)のいずれかのものが好ましく例示される。

(i) チューブリンをコードするmRNAに対するアンチセンスRNA

(ii) チューブリンをコードするmRNAに対するsiRNA (small interfering RNA)

(iii) チューブリンをコードするmRNAに対するリボザイム

[0042] 本発明における親株としては、チューブリンを発現する糸状菌であれば、限定されず、真菌門 (Eumycota) 及び卵菌門 (Oomycota) に属する糸状菌が挙げられる。具体的には、上記糸状菌としては、トリコデルマ (Trichoderma) 属、アルペルギルス (Aspergillus) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、ニューロスポラ (Neurospora) 属、フサリウム (Fusarium) 属、クリソスポリウム (Chrysosporium) 属、フミコーラ (Humicola) 属、エメリセラ (Emericella) 属、ハイポクレア (Hypocrea) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、クリソスポリウム (Chrysosporium) 属、ミセリオフトラ (Myceliophthora) 属、ピロマイセス (Piomyces) 属、タラロマイセス (Talaromyces) 属、サーモアスカス (Thermoascus) 属、チエラビア (Thielavia) 属等の糸状菌が挙げられるが、好ましくはトリコデルマ属の糸状菌である。

[0043] 前記トリコデルマ属の糸状菌としては、トリコデルマ・リーセイ、トリコデルマ・ロンジブラキアタム (Trichoderma longibrachiatum) トリコデルマ・ハリジアウム (Trichoderma harzianum)、トリコデルマ・コニング (Trichoderma koningii) 及びトリコデルマ・ヴィリデ (Trichoderma viride) 等が挙げられるが、好ましくはトリコデルマ・リーセイであり、より好ましくはトリコデルマ・リーセイPCD-10株 (FERM P-8172) 及びトリコデルマ・リーセイPC-3-7株 (ATCC 66589) である。

[0044] 親株である糸状菌は、野生型株であってもよく、当該野生型株から人工的に育種された株でもよく、そのゲノム中の塩基配列が置換、付加、欠失又は修飾された変異型株 (変異体) 又は突然変異体であってもよい。

[0045] 本発明の糸状菌変異株の好適な例としては、トリコデルマ・リーセイPCD-10株又はトリコデルマ・リーセイPC-3-7株の $\alpha$ チューブリン遺伝子を相同的組換えにより欠失させ、 $\alpha$ チューブリンの発現を喪失させることにより得られる糸状菌が挙げられ、具体的には、後述する実施例に開示したPC-3-7 $\Delta$ tubB株とPCD-10 $\Delta$ tubB株を挙げることができる。

[0046] 斯くして構築された本発明の糸状菌変異株は、菌体内のチューブリンが機能低減又は喪失していることに起因して、タンパク質の分泌生産性が親株よりも向上する。また、セルラーゼの生産において親株よりもグルコースによる阻害が抑えられ、グルコースが培地中に高濃度で存在している場合においても、セルラーゼの生産性低下が抑えられる。

[0047] <タンパク質の製造>

本発明の糸状菌変異株を培養することにより、培養液中にタンパク質を生成、蓄積させることができ、当該培養物からタンパク質を採取することにより、タンパク質を製造することができる。糸状菌は培養液中において複数種のタンパク質を産生することから、本発明により製造されるタンパク質は、複数種のタンパク質の混合物であってもよい。

ここで、タンパク質としては、例えばセルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、エキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクターゼ、アミラーゼ等が挙げられる。

[0048] 例えば、セルラーゼ又はキシラナーゼを製造する場合は、本発明の糸状菌変異株を、セルロース、ソホロース、セロオリゴ糖（セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオース等）のセルラーゼ誘導物質の存在下で培養し、培養物からセルラーゼ又はキシラナーゼを採取することにより製造することができる。

[0049] また、本発明により製造されるタンパク質は、糸状菌が本来分泌生産しない異種のタンパク質であってもよい。この場合は、本発明の糸状菌変異株に

対して、異種タンパク質をコードする遺伝子を挿入することで組換え糸状菌を作製し、この組換え糸状菌を培養することで異種タンパク質を含むタンパク質を得ることができる。更に、分泌生産効率を向上させるために、所望のタンパク質をコードする遺伝子を修飾することも可能である。具体的に修飾とは、分泌シグナルペプチドが所望のタンパク質に機能的に付加されるように遺伝子を修飾することである。分泌シグナルペプチドは、所望のタンパク質のアミノ末端に付加されることが望ましい。分泌シグナルペプチドが付加されることにより、分泌生産能力を向上させることができる。

[0050] タンパク質の製造に使用される培地は、炭素源、窒素源、無機塩、ビタミンなど、本発明の糸状菌の増殖並びに各種タンパク質の生産に必要な栄養素を含む限り、合成培地、天然培地のいずれでもよい。

[0051] 炭素源としては、本発明の糸状菌変異株が資化できる炭素源であればいずれでもよく、具体的には、上記したセルラーゼ誘導物質の他、グルコース、フラクトースのような糖質、エタノール、グリセロールのようなアルコール類、酢酸のような有機酸類などを挙げることができる。これらは単独で、又は複数を組み合わせて使用することができる。

[0052] 窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩、アミン等の窒素化合物、ペプトン、大豆加水分解物のような天然窒素源などをあげることができる。

[0053] 無機塩としては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、炭酸カリウムなどをあげることができる。

[0054] ビタミンとしては、ビオチンやチアミンなどをあげることができる。さらに必要に応じて本発明の糸状菌が生育に要求する物質を添加することができる。

[0055] 培養は、好ましくは振とう培養や通気攪拌培養のような好気的条件下で行う。培養温度は好ましくは10℃以上、より好ましくは20℃以上、より好ましくは25℃以上であり、且つ好ましくは50℃以下、より好ましくは42℃以下、より好ましくは35℃以下である。また、好ましくは10～50℃

、より好ましくは20～42℃、より好ましくは25～35℃である。

培養時のpHは3～9、好ましくは4～5である。培養時間は、10時間～10日間、好ましくは2～7日間である。

[0056] 培養終了後、培養物を回収し、必要に応じて超音波や加圧等による菌体破碎処理を行い、ろ過や遠心分離等によって固液分離した後、限外ろ過、塩析、透析、クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより目的のタンパク質を取得できる。なお、分離精製の程度は特に限定されない。培養上清やその粗分離精製物自体をタンパク質として利用することもできる。

[0057] <バイオマスの糖化>

本発明の糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤とし、これとセルロース又はキシラン含有物質（バイオマス）を水性媒体中に共存させ、攪拌または振とうしながら加温することにより、バイオマスを分解または糖化し、単糖を製造することができる。

セルロース又はキシラン含有物質としては、前述のセルラーゼ誘導物質として挙げたものを利用することができる。

バイオマスの分解又は糖化において、反応液のpHおよび温度は、セルラーゼ又はキシラナーゼが失活しない範囲内であればよく、一般的に、常圧で反応を行う場合、温度は5～95℃、pHは1～11の範囲で行われる。

バイオマスの分解又は糖化の工程は、バッチ式で行っても、連続式で行ってもよい。

[0058] 上述した実施形態に関し、本発明においては更に以下の態様が開示される。

<1>チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株を培養し、培養物からタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の製造方法。

<2>糸状菌においてチューブリンを機能低減又は機能喪失させることを含む、糸状菌のタンパク質分泌生産性の向上方法。

<3>チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンの発現を親

株に比べて低下又は喪失させるものである、＜1＞又は＜2＞の方法。

＜4＞チューブリンが $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンである、＜1＞～＜3＞のいずれかの方法。

＜5＞チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンをコードする遺伝子を欠失又は不活性化することによりなされる、＜1＞～＜3＞のいずれかの方法。

＜6＞チューブリンをコードする遺伝子が $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子である＜5＞の方法。

＜7＞ $\alpha$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の（a）～（f）のいずれかで示される＜6＞の方法。

（a）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

（b）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（c）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（d）配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（e）配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

（f）配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

＜8＞ $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の（g）～（l）のい

ずれかで示される<6>の方法。

(g) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(h) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つβチューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つβチューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つβチューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つβチューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

<9>糸状菌が、アクレモニウム属、アスペルギルス属、クリソスポリウム属、フサリウム属、フミコーラ属、ミセリオフトラ属、ニューロスポラ属、ペニシリウム属、ピロマイセス属、タラロマイセス属、サーモアスカス属、チエラビア属、又はトリコデルマ属糸状菌である<1>～<8>のいずれかの方法。

<10>糸状菌がトリコデルマ属糸状菌である<9>の方法。

<11>糸状菌がトリコデルマ・リーセイである<10>の方法。

[0059] <12>チューブリンが機能低減又は機能喪失したトリコデルマ属糸状菌の変異株であって、親菌株と比較してタンパク質分泌生産性が向上した変異

株。

<13>チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンの発現が親株に比べて低下又は喪失したものである、<12>の変異株。

<14>チューブリンが $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンである、<12>又は<13>の変異株。

<15>チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンをコードする遺伝子を欠失又は不活性化することによりなされる、<12>又は<13>の変異株。

<16>チューブリンをコードする遺伝子が $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子である<15>の変異株。

<17> $\alpha$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の(a)～(f)のいずれかで示される<16>の変異株。

(a) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク

質をコードするポリヌクレオチド。

<18> $\beta$  チューブリンをコードする遺伝子が、以下の (g) ~ (l) のいずれかで示される<16>の変異株。

(g) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(h) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

<19>糸状菌がトリコデルマ・リーセイである<12>~<18>のいずれかの変異株。

<20>チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤として用いる、バイオマスからの糖の製造方法。

<21>チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤とし

て用いる、バイオマスの糖化方法。

[0060] <22>タンパク質が、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、エキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクターゼ及びアミラーゼから選ばれる1種以上である<1>~<11>のいずれかの方法。

<23>タンパク質が、セルラーゼ及び／又はキシラナーゼである<22>の方法。

<24>糸状菌変異株を、セルロース、ソホロース及びセロオリゴ糖（セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオース等）から選ばれるセルラーゼ誘導物質の存在下で培養し、培養物からセルラーゼ又はキシラナーゼを採取する<23>の方法。

## 実施例

[0061] 以下、実施例を示し、本発明をより具体的に説明する。

[0062] <実施例1>遺伝子破壊菌株の作製

### (1) 遺伝子破壊用プラスミドDNAの構築

pUC118（タカラバイオ）のHincII制限酵素切断点に*Trichoderma reesei*由来のtubB遺伝子(TRIREDRAFT\_120830)の上流から下流（配列番号20）を挿入したプラスミドpUC-tubBを鋳型とし、表1に示したフォワードプライマー1（配列番号15）とリバースプライマー1（配列番号16）にてPCRすることで約5.2kb断片（A）を増幅した。また*Aspergillus nidurans*由来のアセトアミダーゼamdSの（配列番号17）を鋳型として表1に示したフォワードプライマー2（配列番号18）とリバースプライマー2（配列番号19）を用いてPCRすることで約3.1 kbp断片（B）を増幅した。得られたDNA断片（A）及び（B）はIn-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ）のプロトコルに従って処理し、tubBの遺伝子中にamdS遺伝子が挿入されたプラスミドを構築した。このプラスミドをコンピテントセル*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells（タカラバイオ）へと形質転換し、アンピシリン耐性株として得られた形質転換体の中から、コロニーPCRにより目的の遺伝子が挿入されたプラスミドを保持する菌株を選別した。選別し

た形質転換体はアンピシリン添加LB培地を用いて培養後（37℃、1日間）、得られた菌体からプラスミドをHigh Pure Plasmid Isolation kit（ロシュ）を用いて回収、精製した。ここで得られたベクターをpUC- $\Delta$ tubB-*amdS*と名付けた。

[0063] (2) 形質転換体の作製

*Trichoderma reesei* PC-3-7株(ATCC66589)、及びPCD-10株(FERM P-8172)に対して上記(1)で構築したベクターの形質転換を行った。導入はプロトプラストPEG法(Biotechnol Bioeng. 2012 Jan;109(1):92-99.)で行った。形質転換体はアセトアミドを単一窒素源とした選択培地(2% グルコース、1.1M ソルビトール、2% アガー、0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH5.5)、0.06%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06%  $\text{CsCl}_2$ 、0.06%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.06% アセトアミド、0.1% Trace element 1; %はいずれもw/v%)にて選抜した。Trace element1の組成は以下のとおりである: 0.5g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g  $\text{CoCl}_2$ 、0.16g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.14g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を蒸留水にて100mLにメスアップした。得られた形質転換体の中から、相同組換えによりtubB遺伝子の位置に*amdS*が挿入され遺伝子破壊が起きているものをコロニーPCRにより選別した。遺伝子破壊が生じた形質転換体をそれぞれPC-3-7  $\Delta$ tubB、PCD-10  $\Delta$ tubBと名付けた。

[0064] [表1]

| プライマー       | 配列                                   | 配列番号 |
|-------------|--------------------------------------|------|
| フォワードプライマー1 | CGTTTCCAGTGC GCAAAGTACCGCGCGCTTGACAA | 1 5  |
| リバースプライマー1  | CCAATGATGTGCGCATCTGGGAAATGTTCTTTGGC  | 1 6  |
| フォワードプライマー2 | TGCGCACATCATTGGATAGG                 | 1 8  |
| リバースプライマー2  | TGCGCACTGGAAACGCAACC                 | 1 9  |

[0065] <実施例2>形質転換体の培養検討1

形質転換体のタンパク質生産性の評価は以下に示すように行った。前培養として500mLフラスコに培地を50mL仕込み、 $1 \times 10^5$ 個/mLとなるよう*Trichoderma reesei* PC-3-7、PCD-10と実施例1で作製した、PC-3-7  $\Delta$ tubB、PCD-10  $\Delta$ tubB

bBのそれぞれの胞子を植菌し、28℃、220rpmにて振とう培養した（プリス社製PRXYg-98R）。培地組成は以下の通りである。1% グルコース、0.14%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.03%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.03%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% Bacto Peptone(BD Difco)、0.05% Bacto Yeast extract(BD Difco)、0.1% Tween 80、0.1% Trace element2、50mM 酒石酸バッファー (pH4.0)。Trace element2の組成は以下の通りである。6mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、26mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、100mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、40mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、8mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、200mg  $\text{ZnCl}_2$ を蒸留水にて100mLにメスアップする。

2日間の前培養後、ジャーファーマンターとしてBTR-25NA1S-8M（バイオート）を用いて本培養を行った。上記前培養液を10%（v/v%）植菌し、5日間培養を行った。炭素源としては結晶性セルロースであるAvicel PH-101（Sigma-Aldrich）を10%の濃度で使用し、その他の培地成分は以下のものを使用した。0.42%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.03%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.03%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% Bacto Peptone、0.05%Bacto Yeast extract、0.1% Tween 80、0.1% Trace element2、0.2% Antifoam PE-L。ジャーファーマンターの設定は以下の通りである。温度：28℃、通気量：0.5 vvm、pH：4.5（5% アンモニア水で調整）、攪拌数はD0=3.0 ppmを一定に保つよう変動。培養は5日間行った。

#### [0066] <実施例3> 形質転換体の培養検討2

他の炭素源を用いた際の形質転換体のタンパク質生産性の評価は以下に示すように行った。本検討に関しては、PC-3-7、及びPC-3-7 $\Delta$ tubBに関して評価を行った。前培養は実施例2と同様に行った。本培養は、ジャーファーマンターとしてBMZ-01KP2（バイオート）を用いて行い、炭素源として10% Avicel PH-101+2.5% glucose、または10% Avicel PH-101+2% Xylan from Beechwood(東京化成工業)を用いた。それ以外は実施例2と同様の条件で行った。

#### [0067] <実施例4> タンパク質濃度測定

タンパク質の濃度はbradford法にて測定した。bradford法では、Quick Start プロテインアッセイ（BioRad）を使用し、ウシγグロブリンを標準タンパ

ク質とした検量線をもとにタンパク質濃度を計算した。

タンパク質濃度の測定結果は図 1 から図 4 に示した。どの条件においても tubB 遺伝子を破壊した形質転換体が親株よりも高いタンパク質生産性を示したことから、tubB 遺伝子破壊のタンパク質生産への有効性が示された。

## 請求の範囲

- [請求項1] チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株を培養し、培養物からタンパク質を採取する工程を含むタンパク質の製造方法。
- [請求項2] チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンの発現を親株に比べて低下又は喪失させるものである、請求項1記載の方法。
- [請求項3] チューブリンが $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンである、請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンをコードする遺伝子を欠失又は不活性化することによりなされる、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] チューブリンをコードする遺伝子が $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子である請求項4記載の方法。
- [請求項6]  $\alpha$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の（a）～（f）のいずれかで示される請求項5記載の方法。
- （a）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；
  - （b）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
  - （c）配列番号1又は3に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
  - （d）配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
  - （e）配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且

つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項7]  $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の(g)～(l)のいずれかで示される請求項5記載の方法。

(g) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(h) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列と80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\beta$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号5、7、9、11又は13に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\beta$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\beta$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(l) 配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\beta$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項8] 糸状菌が、アクレモニウム属、アスペルギルス属、クリソスポリウム属、フサリウム属、フミコーラ属、ミセリオフトラ属、ニューロス

ポラ属、ペニシリウム属、ピロマイセス属、タラロマイセス属、サーモアスカス属、チエラビア属、又はトリコデルマ属糸状菌である請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項9] 糸状菌がトリコデルマ属糸状菌である請求項 8 の記載の方法。

[請求項10] 糸状菌がトリコデルマ・リーセイである請求項 9 記載の方法。

[請求項11] タンパク質が、セルラーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、エキソグルカナーゼ、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、ガラクターゼ及びアミラーゼから選ばれる 1 種以上である請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項12] タンパク質が、セルラーゼ及び／又はキシラナーゼである請求項 11 記載の方法。

[請求項13] 糸状菌変異株を、セルロース、ソホロース及びセロオリゴ糖から選ばれるセルラーゼ誘導物質の存在下で培養し、培養物からセルラーゼ又はキシラナーゼを採取する請求項 12 記載の方法。

[請求項14] セロオリゴ糖が、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース及びセロヘキサオースから選ばれる請求項 13 記載の方法。

[請求項15] 糸状菌においてチューブリンを機能低減又は機能喪失させることを含む、糸状菌のタンパク質分泌生産性の向上方法。

[請求項16] チューブリンが機能低減又は機能喪失したトリコデルマ属糸状菌の変異株であって、親菌株と比較してタンパク質分泌生産性が向上した変異株。

[請求項17] チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンの発現が親株に比べて低下又は喪失したものである、請求項 16 記載の変異株。

[請求項18] チューブリンが $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンである、請求項 16 又は 17 記載の変異株。

[請求項19] チューブリンの機能低減又は機能喪失が、チューブリンをコードす

る遺伝子を欠失又は不活性化することによりなされる、請求項 16 又は 17 記載の変異株。

[請求項20] チューブリンをコードする遺伝子が $\alpha$ チューブリン及び／又は $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子である請求項 19 記載の変異株。

[請求項21]  $\alpha$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の (a) ~ (f) のいずれかで示される請求項 20 記載の変異株。

(a) 配列番号 1 又は 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1 又は 3 に示すヌクレオチド配列と 80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1 又は 3 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 又は 4 に示すアミノ酸配列と 80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ $\alpha$ チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項22]  $\beta$ チューブリンをコードする遺伝子が、以下の (g) ~ (l) のいずれかで示される請求項 20 記載の変異株。

(g) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(h) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列と 80%以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(i) 配列番号 5、7、9、11 又は 13 に示すヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドの相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(j) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(k) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

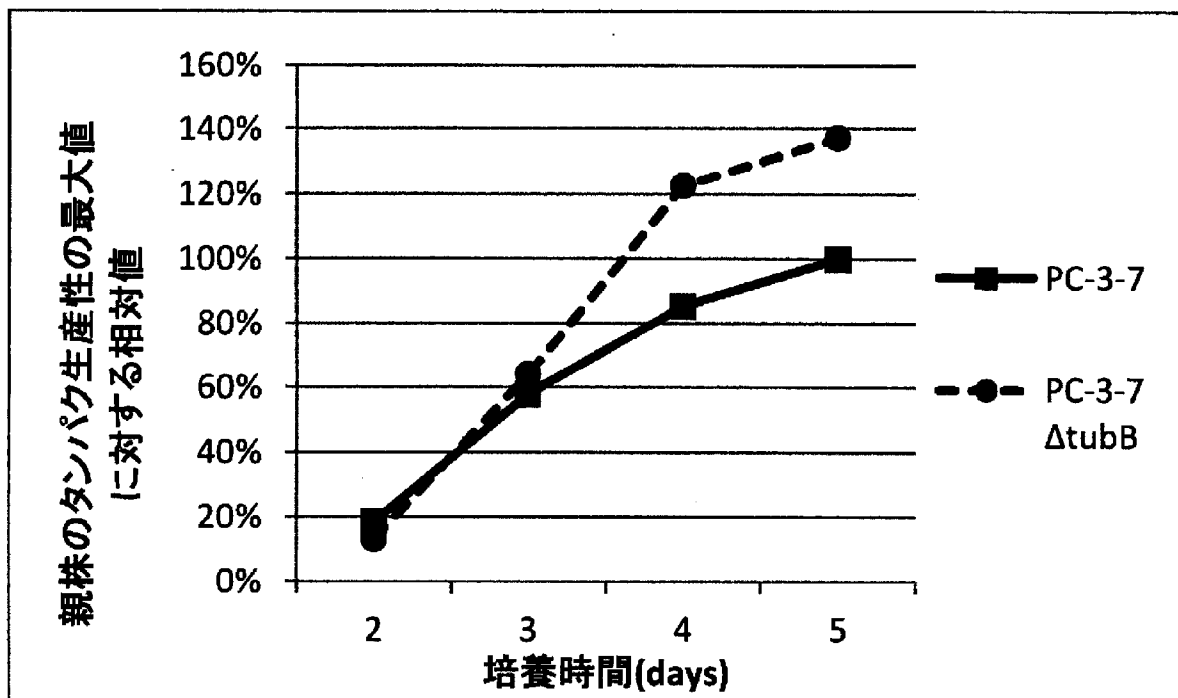
(l) 配列番号 6、8、10、12 又は 14 に示すアミノ酸配列と 80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ  $\beta$  チューブリンとしての機能を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[請求項23] 糸状菌がトリコデルマ・リーセイである請求項 16～22 のいずれか 1 項記載の変異株。

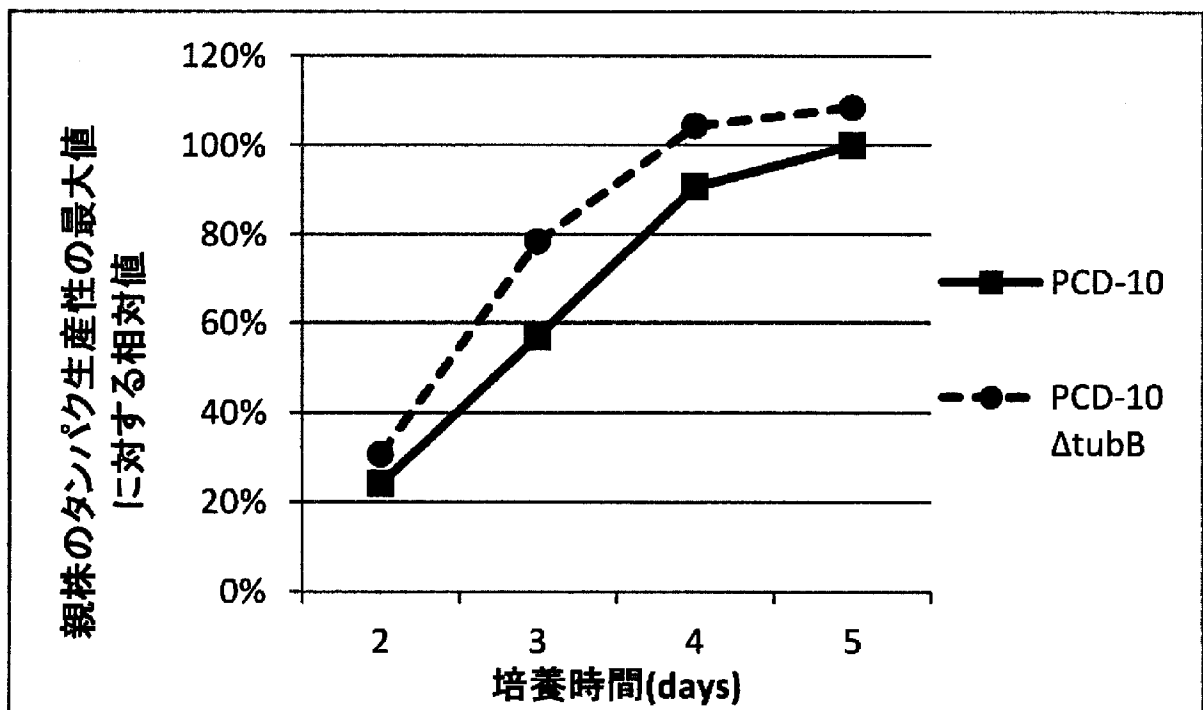
[請求項24] チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤として用いる、バイオマスからの糖の製造方法。

[請求項25] チューブリンを機能低減又は機能喪失させた糸状菌変異株をセルラーゼ誘導物質の存在下で培養して得られる培養物をバイオマス糖化剤として用いる、バイオマスの糖化方法。

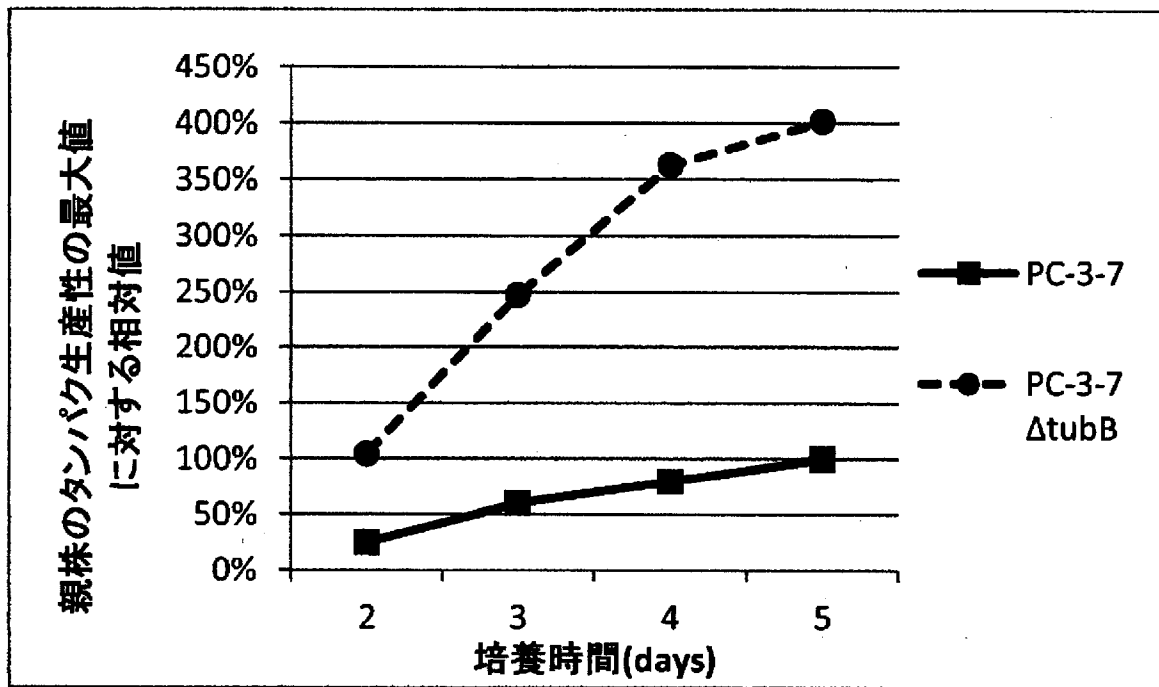
[図1]



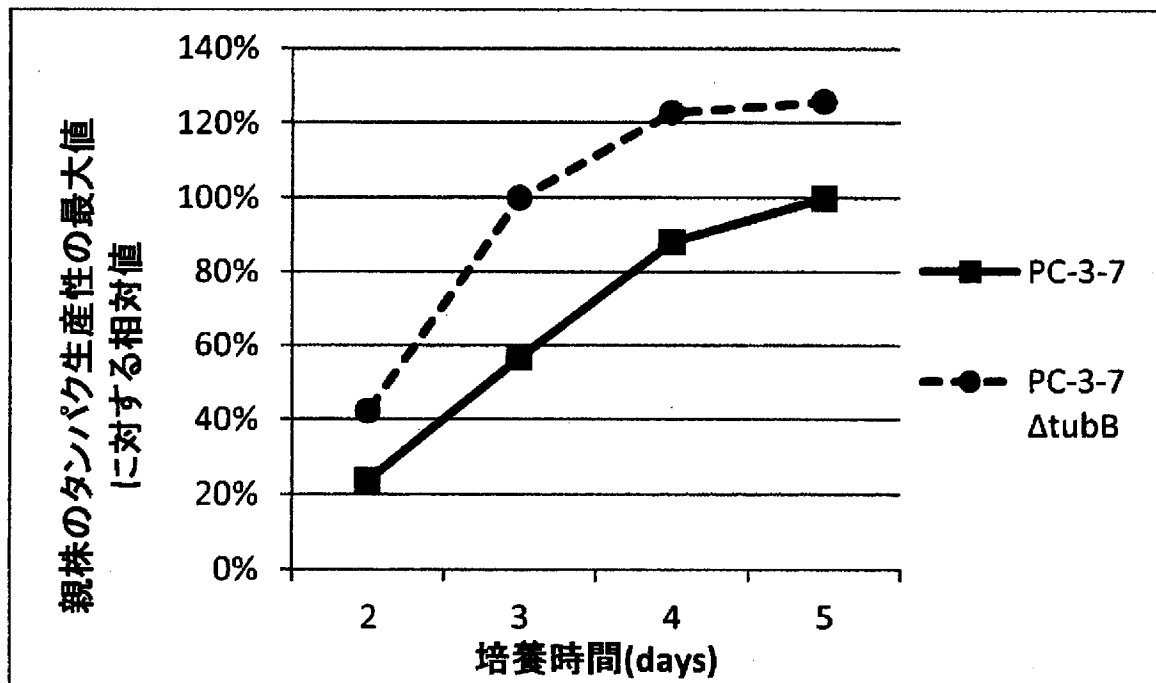
[図2]



[図3]



[図4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028122

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C12R1/645(2006.01)n, C12R1/885(2006.01)n

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N1/15, C12P19/14, C12P21/02, C12R1/645, C12R1/885

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, DWPI(Thomson Innovation), CiNii

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No.           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| X<br>A    | DOSHI, P. et al., Two alpha-tubulin genes of <i>Aspergillus nidulans</i> encode divergent proteins, Mol. Gen. Genet., 1991, Vol.225, pages 129-141, ISSN 1617-4615 (Print) 1617-4623 (Online), page 129, summary, page 130, left column, lines 7 to 26, page 134, right column, 18th line from the bottom to page 139, left column, line 21                                               | 16-21<br>1-15, 22-25            |
| X<br>A    | MAY, G. S., The highly divergent beta-tubulins of <i>Aspergillus nidulans</i> are functionally interchangeable, The Journal of Cell Biology, 1989, Vol.109, pages 2267-2274, Online ISSN 1540-8140 Print ISSN 0021-9525, page 2267, summary, page 2267, left column, 10th line from the bottom, right column, line 12, page 2268, right column, line 8 to page 2273, left column, line 12 | 16-20, 22<br>1-15, 21,<br>23-25 |

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

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 October 2017 (26.10.17)

Date of mailing of the international search report  
07 November 2017 (07.11.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028122

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No.                                  |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| X<br>A    | tubulin alpha chain 1 [Trichoderma reesei QM6a], database GenBank, EGR50979, [online], 2016.07.25, [retrieval date 2017.10.24], Internet:<URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520743">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520743</a> >, particularly, columns of ORGANISM, FEATURES, ORIGIN                              | 1-6, 8-10,<br>16-21, 23<br>7, 11-15, 22,<br>24, 25     |
| X<br>A    | tubulin alpha chain 2 [Trichoderma reesei QM6a], database GenBank, EGR50935, [online], 2016.07.25, [retrieval date 2017.10.24], Internet:<URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520699">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520699</a> >, particularly, columns of ORGANISM, FEATURES, ORIGIN                              | 1-6, 8-10,<br>16-21, 23<br>7, 11-15, 22,<br>24, 25     |
| X<br>A    | tubulin beta chain 1 [Trichoderma reesei QM6a], database GenBank, EGR50613, [online], 2016.07.25, [retrieval date 2017.10.24], Internet:<URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520377">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520377</a> >, particularly, columns of ORGANISM, FEATURES, ORIGIN                               | 1-5, 7-10,<br>16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21,<br>24, 25 |
| X<br>A    | beta-tubulin 2 [Trichoderma reesei RUT C-30], database GenBank, ETS00404, [online], 2015.03.23, [retrieval date 2017.10.24], Internet:<URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572277122">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572277122</a> >, particularly, columns of ORGANISM, FEATURES, ORIGIN                                 | 1-5, 7-10,<br>16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21,<br>24, 25 |
| X<br>A    | tubulin nucleotide-binding domain-like protein [Trichoderma reesei RUT C-30], database GenBank, ETR97034, [online], 2015.03.23, [retrieval date 2017.10.24], Internet:<URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572273390">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572273390</a> >, particularly, columns of ORGANISM, FEATURES, ORIGIN | 1-5, 7-10,<br>16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21,<br>24, 25 |
| A         | Wataru OGASAWARA, Yosuke SHIDA, "Comparative Genomic Analysis of the Japanese Phylogenetic Tree of Cellulolytic Microorganism Trichoderma reesei Mutants", Kagaku to Seibutsu, 2012, vol.50, no.8, pages 592 to 599, Print ISSN 0453-073X Online ISSN 1883-6852, particularly, page 592, summary                                               | 1-25                                                   |
| A         | WO 2014/192647 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 04 December 2014 (04.12.2014), particularly, claims; abstract (Family: none)                                                                                                                                                                             | 1-25                                                   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12P19/14(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i,  
C12R1/645(2006.01)n, C12R1/885(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N1/15, C12P19/14, C12P21/02, C12R1/645, C12R1/885

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2017年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、PubMed、DWPI (Thomson Innovation)、CiNii

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                   | 関連する<br>請求項の番号       |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| X<br>A          | DOSHI, P. et al., Two alpha-tubulin genes of <i>Aspergillus nidulans</i> encode divergent proteins, Mol. Gen. Genet., 1991, Vol.225, pages 129-141, ISSN 1617-4615 (Print) 1617-4623 (Online), 第129頁要旨, 第130頁左欄第7行~第26行, 第134頁右欄下から第18行~第139頁左欄第21行 | 16-21<br>1-15, 22-25 |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

26.10.2017

国際調査報告の発送日

07.11.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

白井 美香保

4N

4502

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                  |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 関連する<br>請求項の番号                                   |
| X<br>A                | MAY, G. S., The highly divergent beta-tubulins of <i>Aspergillus nidulans</i> are functionally interchangeable, The Journal of Cell Biology, 1989, Vol.109, pages 2267-2274, Online ISSN 1540-8140 Print ISSN 0021-9525, 第2267頁要旨, 第2267頁左欄下から第10行右欄第12行, 第2268頁右欄第8行～第2273頁左欄第12行                                          | 16-20, 22<br>1-15, 21, 23-25                     |
| X<br>A                | tubulin alpha chain 1 [ <i>Trichoderma reesei</i> QM6a], database GenBank, EGR50979, [オンライン], 2016.07.25, [検索日 2017.10.24],<br>インターネット:<URL:<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520743">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520743</a> >, 特にORGANISM欄, FEATURES欄, ORIGIN欄                              | 1-6, 8-10, 16-21, 23<br>7, 11-15, 22, 24, 25     |
| X<br>A                | tubulin alpha chain 2 [ <i>Trichoderma reesei</i> QM6a], database GenBank, EGR50935, [オンライン], 2016.07.25, [検索日 2017.10.24],<br>インターネット:<URL:<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520699">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520699</a> >, 特にORGANISM欄, FEATURES欄, ORIGIN欄                              | 1-6, 8-10, 16-21, 23<br>7, 11-15, 22, 24, 25     |
| X<br>A                | tubulin beta chain 1 [ <i>Trichoderma reesei</i> QM6a], database GenBank, EGR50613, [オンライン], 2016.07.25, [検索日 2017.10.24],<br>インターネット:<URL:<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520377">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/340520377</a> >, 特にORGANISM欄, FEATURES欄, ORIGIN欄                               | 1-5, 7-10, 16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21, 24, 25 |
| X<br>A                | beta-tubulin 2 [ <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30], database GenBank, ETS00404, [オンライン], 2015.03.23, [検索日 2017.10.24],<br>インターネット:<URL:<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572277122">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572277122</a> >, 特にORGANISM欄, FEATURES欄, ORIGIN欄                                 | 1-5, 7-10, 16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21, 24, 25 |
| X<br>A                | tubulin nucleotide-binding domain-like protein [ <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30], database GenBank, ETR97034, [オンライン], 2015.03.23, [検索日 2017.10.24],<br>インターネット:<URL:<br><a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572273390">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/572273390</a> >, 特にORGANISM欄, FEATURES欄, ORIGIN欄 | 1-5, 7-10, 16-20, 22, 23<br>6, 11-15, 21, 24, 25 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                            |                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                          | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | 小笠原 渉, 志田 洋介, 比較ゲノム解析によるセルロース分解微生物「トリコデルマ・リーセイ」日本型系統樹進化の謎の解明とさらなる進化, 化学と生物, 2012, Vol. 50, No. 8, pages 592-599, Print ISSN 0453-073X Online ISSN 1883-6852, 特に第 5 9 2 頁要旨 | 1-25           |
| A                     | WO 2014/192647 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所)<br>2014. 12. 04, 特に特許請求の範囲, 要約<br>(ファミリーなし)                                                                                            | 1-25           |