

明 細 書

発明の名称：

変異型キシラナーゼ、その製造方法及び用途、並びにリグノセルロースの糖化物製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、リグノセルロース原料からの効率的な糖化物製造方法に関する。また、本発明は、変異型キシラナーゼ、変異型キシラナーゼの製造方法及び変異型キシラナーゼの用途に関する。

背景技術

[0002] キシラナーゼは、植物細胞壁を構成するキシランの β -1, 4結合をランダムに加水分解する酵素である。該酵素は、a) リグノセルロース原料の糖化、b) パルプ漂白、c) 動物飼料添加剤、d) 洗剤補助剤及びe) 製パン改質剤といった幅広い用途への利用が期待されている。

[0003] a) リグノセルロース原料の糖化：リグノセルロース原料から、酵素を用いて醗酵基質となる単糖を産生するリグノセルロース原料の糖化方法が知られている。しかしながら、該糖化方法に用いるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ（キシラナーゼ等）の酵素の価格が高いことが該糖化方法の実用化の障害となっている。そこで、該糖化方法のコストを低減させるための有効な手段として、該糖化方法において用いる酵素を再利用することが提案されている（例えば特開2006-87319号公報（特許文献1）、国際公開第2011-065449号パンフレット（特許文献10）及び国際公開第2011-125056号パンフレット（特許文献11）を参照）。

[0004] キシラナーゼは、リグノセルロース原料の主成分の一つであるヘミセルロース（主成分 β -1, 4キシラン）を分断する酵素である。そのためリグノセルロース原料の糖化方法においては、重要な酵素の一つである。しかしながら、キシラナーゼは安定性が低いことが知られている。

一方、リグノセルロース原料の糖化には、酸性領域pH4.0～pH6.

0で、40℃～60℃という高温下、数日間に及ぶ処理を必要とする。そのため、キシラナーゼの安定性の低さが、酵素再利用の妨げとなっている。

[0005] *Trichoderma reesei*（以下、「*T. reesei*」と略す。）由来耐熱性キシラナーゼ変異体（例えば国際公開第2007/115391号パンフレット（特許文献2）及び国際公開第2007/115407号パンフレット（特許文献3）を参照。）は、50℃～70℃で30分の熱処理後も80%以上の残存活性を示している。

また、*Bacillus*属由来の耐熱性キシラナーゼ（例えば特開2004-121257号公報（特許文献4）を参照。）も、70℃、30分間の熱処理後90%以上の残存活性を示すことが知られている。

[0006] b) パルプ漂白：パルプの漂白工程にキシラナーゼを用いることにより、漂白薬剤の使用量を軽減することができている。

一般的に、製紙工業におけるパルプ漂白は、前段の酸素によるパルプからの脱リグニン（pH10～pH12、80℃）処理工程と、後段の漂白工程から成る。このように後段で漂白工程を行う理由としては、酸素による脱リグニン工程を経た後も数%程度のリグニンが着色成分としてパルプに残存するためである。脱リグニン処理工程と漂白工程とに加えて、キシラナーゼを作用させる工程を追加することで、リグニン及びセルロースに結合しているヘミセルロース鎖の切断が可能となる。これにより、リグニンを効果的に除去でき、漂白工程で用いる漂白薬剤の使用量を軽減できる効果が期待できる。

[0007] 前記キシラナーゼを作用させる工程を効率よく行うためには、70℃～80℃、pH10前後で数時間の処理に耐えうる特性を有するキシラナーゼを使用する必要がある。

*T. reesei*由来の耐熱性キシラナーゼ変異体（例えば、特許文献2、特許文献3、国際公開第2001/92487号パンフレット（特許文献5）及び国際公開第2003/046169号パンフレット（特許文献6）を参照）は、至適反応温度が70℃前後、至適反応pHが7～8であり、パ

ルブ漂白工程での利用の可能性が示されている。

- [0008] c) 動物飼料添加剤：動物飼料は植物繊維が豊富であるため、キシラナーゼを添加することにより、動物飼料中の植物細胞壁を分解できるため、動物による植物栄養の吸収効率を向上させることができる。

キシラナーゼを用いて動物飼料をペレット化する場合には、約70℃～約90℃で約10分の処理に耐えうる安定性がキシラナーゼに求められる。また、動物の消化器官の中でキシラナーゼが作用するためには、40℃前後、pH4.8程度の環境下において高い活性を示す必要がある。

*Trichoderma*属や*Acremonium*属といった糸状菌由来のキシラナーゼの多くは、至適pHがpH3～pH5であり、作用温度域は40℃前後である。

- [0009] 特許文献2、特許文献3、国際公開第2001/27252号パンフレット（特許文献7）及び国際公開第2005/108565号パンフレット（特許文献8）に記載されている耐熱性キシラナーゼ変異体の中には、至適pHがpH5～pH5.5付近の変異体が含まれている。

- [0010] d) 洗剤補助剤：洗剤補助剤としてキシラナーゼを使うことにより、衣類の毛羽立ちを除去することができる。

昨今のドラム式洗浄機は節水型となっているため、洗濯回数を重ねることにより微細な毛羽立ちが起きやすい。毛羽立ちが起きると、衣類の再汚染を生じやすい。

洗剤補助剤としてキシラナーゼを使用することにより、この毛羽立ちを取り去ることができる。そのため、再汚染を防ぐことも可能になる。また、衣服に付いた野菜や果物に由来する染みの主成分は、色素の結合した野菜や果物に由来する細胞壁である。そのため、洗濯の際にキシラナーゼを用いることにより、節水型のドラム式洗浄機を用いた場合でも効果的に洗浄できる。

- [0011] キシラナーゼを洗剤補助剤として使用する場合、アルカリ耐性や界面活性剤耐性を有するキシラナーゼを用いる必要がある。また、ランドリークリーニングでキシラナーゼを使用する場合は、50℃～70℃の高温域で安定に

作用するキシラナーゼを使用する必要がある。

T. r e e s e i 由来耐熱性耐アルカリ性キシラナーゼ変異体（例えば、特許文献2、特許文献3、特許文献5及び特許文献6を参照。）は、至適温度は62℃～75℃、至適pHはpH7～pH8といった性質を持つ。

特許文献8で示されているキシラナーゼ変異体は、至適pHはpH5と酸性側ではあるが、至適温度は70℃であり、pH8～pH9において60℃、10分間は100%活性を維持している。

B a c i l l u s 属由来の耐熱性耐アルカリ性キシラナーゼ（例えば、特許文献4及び特開2007-54050号公報（特許文献9）を参照。）は、いずれも50℃～70℃に至適温度域があり、至適pHはpH7～pH8という特性を持つ。4℃～5℃において、1日間～2日間、pH9で100%活性が維持されている。

[0012] e) 製パン改質剤：製パン改質剤としてキシラナーゼを用いることにより、製パンの質を改良することができる。

キシラナーゼは小麦粉のヘミセルロース部分を分解する性質を持つ。キシラナーゼによりヘミセルロース部分が分解されることにより、この部分に結合している水分がドウ中に放出され、ドウの性質に変化が生じる。その結果、製パンの粒子構造及びローフ体積が改善されることにより、製パンの良好な品質保持につながる。

ドウの作製時には、材料を攪拌し捏ねる工程で大きな物理的衝撃及び圧力負荷を伴うほか、発酵工程で35℃～40℃で1時間～2時間の時間を必要とする。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] しかしながら、(a) リグノセルロース原料の糖化で述べた糖化酵素の再利用は、糖生産コストやリグノセルロース資源の有効活用といった観点から、改良の余地がある。

特許文献1に記載の糖化酵素再利用では、酵素がリグノセルロース残渣に

結合することによって、酵素の糖化活性が低下することが示されている。このため、酵素や基質の投入量に大きな制限を設けている。

特に、酵素量について、特許文献 1 の実施例においては、リグノセルロースを 12 時間で 96% 以上分解可能な量と記載されており、多量の酵素の投入が必要な点が挙げられている。従って、経済的観点において、長期間にわたる酵素の再利用が必要になる。

また、基質としてのリグノセルロース濃度が 1% 程度と低く、生産される糖濃度も低い。そのため、エタノール発酵工程などへの糖の利用を考慮すると、糖化槽の容積効率やエタノール発酵生産前の濃縮等に対応するための設備投資が必要となり、経済的な観点において工業的な方法とは言い難い。

よって、ヘミセルロースを含むリグノセルロースの糖化においては、高濃度のリグノセルロースを分解でき、かつ長期間での再利用に耐えうる酵素が必要になると考えられるため、前記のように、キシラナーゼの安定性の低さが問題になる。

[0014] 一方で、特許文献 10 には、セルラーゼやヘミセルラーゼ等の酵素が、残渣に吸着した後も活性を維持することが記載されている。また、反応後にリグノセルロースへ糖化酵素を吸着して回収し、次の糖化反応で再利用する方法について記載されている。

しかしながら、特許文献 10 においては、糖化原料となるリグノセルロースを予め、酸性条件下で加熱処理し、リグノセルロース中のヘミセルロースの分解を行っている。そのため、加熱コストや耐酸性を有する圧力容器等の設備を設置する必要も生じることから、経済的な観点において好ましくない。

そこで、キシラナーゼによるヘミセルロースの分解が望まれるものの、糖化反応は長時間にわたるため、前記のように、その安定性の低さが問題になる。

[0015] 特許文献 11 においては、初発反応で使用する糖化酵素量を多くすることによって、酵素再利用時に失われた活性に相当する分の追加投入酵素量を軽

減し、全体として酵素のコストを削減できることが記載されている。

しかしながら、実際には、初発投入酵素量の 1 / 3 もの酵素量を追加投入しているため、経済的観点において好ましい方法ではない。また、特許文献 11 の実施例には、反応残渣を廃棄することが記載されている。残渣に吸着した酵素が失われていることが、追加投与する酵素量を軽減できない大きな要因である。

また、特許文献 11 の実施例においては、リグノセルロースに含まれるセルロースの利用、つまりグルコースの利用についてのみ述べられている。特許文献 11 の実施例で用いられている前処理済みの麦わらには、35%以上のヘミセルロース等が含まれている。リグノセルロース資源の有効活用や経済的な観点から考えると、ヘミセルロース中のキシロースも単糖として利用することが必要である。しかしながら、この場合、糖化からエタノール発酵までを想定した長時間反応後の酵素再利用を想定すると、キシラナーゼの安定性の低さが問題になる。

これらの解決策として、既存のキシラナーゼを改良した熱安定化キシラナーゼや耐熱菌由来の耐熱性キシラナーゼの利用が挙げられるが、現時点において、このようなキシラナーゼを用いた長時間の酵素再利用の報告例は無い。

[0016] (a) リグノセルロース原料の糖化で述べた特許文献 2 及び特許文献 3 に記載の *T. reesei* 由来耐熱性キシラナーゼ変異体は、リグノセルロース原料の糖化の際に要求される条件（酸性領域、高温下での長期間の使用）を満たすものであるか否かは定かではない。

同じく、(a) で述べた特許文献 4 に記載の *Bacillus* 属由来の耐熱性キシラナーゼについては、中性付近の pH 7.2 における熱処理時の残存活性に関する結果が示されている。そのため、リグノセルロースの糖化を行うために酸性下で数日間該耐熱性キシラナーゼを利用すれば、該耐熱性キシラナーゼの活性は低下する可能性が高い。

[0017] (b) パルプ漂白で述べた *T. reesei* 由来の耐熱性キシラナーゼ変

異体に関する特許文献2、特許文献3、特許文献5及び特許文献6には、pH 5、60℃～80℃で30分間処理した後の該*T. reesei*由来の耐熱性キシラナーゼの残存活性についてのデータが示されている。しかしながら、パルプ漂白の際に要求される条件（pH 10、70℃～80℃で数時間）を想定した該*T. reesei*由来の耐熱性キシラナーゼの安定性は示されていない。

- [0018] (c) 動物飼料添加剤で述べた*Trichoderma*属や*Acremonium*属といった糸状菌由来のキシラナーゼは、ペレット化に耐え得る熱安定性は持ち合わせていない。

同じく、(c)で述べた特許文献2、特許文献3、特許文献7及び特許文献8に記載されている耐熱性キシラナーゼ変異体の中には、至適pHがpH 5～pH 5.5付近の変異体が含まれている。しかし、いずれの変異体も60℃以上の高温域では顕著な熱失活が生じるため、動物飼料添加剤として用いることはできない。

- [0019] (d) 洗剤補助剤で述べた特許文献2、特許文献3、特許文献5及び特許文献6に記載されている*T. reesei*由来耐熱性耐アルカリ性キシラナーゼ変異体に関しては、一般的に洗浄に要する時間（1時間～2時間）における塩基性領域での該耐アルカリ性キシラナーゼ変異体の安定性に関する情報は皆無であり、洗剤補助剤として用いることができるか否かについては明らかではない。

同じく、(d)で述べた特許文献8に記載のキシラナーゼ変異体や、特許文献4及び特許文献9に記載の*Bacillus*属由来の耐熱性耐アルカリ性キシラナーゼが、ランドクリーニングでの洗剤補助剤としての使用に耐えるか否かについては明らかではない。

- [0020] (e) 製パン改質剤で述べた特許文献2、特許文献3、特許文献5及び特許文献6に記載の*T. reesei*由来の耐熱性キシラナーゼ変異体が、製パン時に加えられる大きな物理的衝撃及び圧力負荷に耐えうるか否かについては明らかにされていない。

また、製パン工程には、 $35^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ で1時間～2時間行われる発酵工程が含まれており、この工程にも対応しうることが要求される。

[0021] 以上に示したように、キシラナーゼを利用し得る用途の範囲は多岐に渡る。そのため、キシラナーゼに要求される条件も幅広い。例えば、 $\text{pH } 4\sim \text{pH } 10$ 、温度 $40^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 、数日間におよぶ使用時間といった酵素が失活しやすい厳しい条件が挙げられる。

このような多様なニーズに対応すべく、多種の変異型キシラナーゼや新規のキシラナーゼが報告されているものの、酵素が失活しやすい厳しい条件下において、十分に安定して作用しうるキシラナーゼは未だ見出されていないといえる。

[0022] また、耐熱性を向上させることを目的として得られた変異型キシラナーゼは、反応の初速度が大きく低下するという問題点がある。これは、耐熱性向上のために加えたアミノ酸配列上の変異等により、タンパク質全体の構造上のフレキシビリティが低下してしまうためであると推測される。

[0023] このような状況において、酸性領域（ $\text{pH } 4\sim \text{pH } 6$ ）、塩基性領域（ $\text{pH } 8\sim \text{pH } 10$ ）又は高温域（ $40^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ ）といった、酵素が失活しやすい厳しい条件下において、一定時間安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較して反応の初速度が大きく低下することのないキシラナーゼの開発が待ち望まれていた。

[0024] 本発明は、熱安定性キシラナーゼを用いた、リグノセルロースの安価で効率的な糖化方法を提供することを課題とする。また、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較して反応の初速度が大きく低下することのない置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼを提供することを課題とする。さらに、本発明は該変異型キシラナーゼを低コストで製造しうる製造方法を提供するとともに、該変異型キシラナーゼの様々な用途を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0025] 本発明は以下のとおりである。

〔１〕 リグノセルロース原料と熱安定性キシラナーゼとを接触させることを含むリグノセルロースの糖化物製造方法。

〔２〕 前記リグノセルロース原料がパルプである、〔１〕に記載の糖化物製造方法。

〔３〕 〔１〕又は〔２〕に記載の糖化物製造方法により得られたリグノセルロースの糖化物を含む糖化反応液から、熱安定性キシラナーゼを回収することと、回収された熱安定性キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させて糖化物を製造することと、を含む糖化物製造方法。

〔４〕 前記糖化反応液を遠心分離または精密濾過膜で固液分離し、分離した液体を限外濾過膜で限外濾過することにより、リグノセルロースの糖化物と前記熱安定性キシラナーゼを分離、回収する、〔３〕に記載の糖化物製造方法。

〔５〕 前記遠心分離または精密濾過膜で固液分離した固体および限外濾過膜で回収された熱安定性キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させて糖化物を製造する、〔４〕に記載の糖化物製造方法。

〔６〕 前記熱安定性キシラナーゼが、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が７０％以上であり、５０℃及び２４時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて５０％以上であり、かつ置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼである〔１〕から〔５〕のいずれか一つに記載の糖化物製造方法。

〔７〕 前記変異型キシラナーゼが、配列表の配列番号１記載のアミノ酸配列において、２９番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、５８番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、２７番目のチロシン残基がチロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換され、且つ４４番目のアスパラギン残基がアスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも有する変異型キシラナーゼである〔６〕に記載の糖化物製造方法。

〔８〕 前記変異型キシラナーゼの２７番目のチロシン残基と置換される、

チロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であり、且つ44番目のアスパラギン残基と置換される、アスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基がセリン残基である変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる〔7〕に記載の糖化物製造方法。

〔9〕 前記変異型キシラナーゼが、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、少なくとも154番目のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基に置換されている変異型キシラナーゼである〔6〕に記載の糖化物製造方法。

〔10〕 前記変異型キシラナーゼの、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、90番目のスレオニン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、174番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる〔9〕に記載の糖化物製造方法。

〔11〕 前記変異型キシラナーゼの、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる〔9〕に記載の糖化物製造方法。

〔12〕 前記変異型キシラナーゼの、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、59番目のセリン残基がスレオニン

残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、239番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び242番目のシステイン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる〔9〕に記載の糖化物製造方法。

〔13〕 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、29番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、58番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、27番目のチロシン残基がチロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換され、且つ44番目のアスパラギン残基がアスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも有する変異型キシラナーゼ。

〔14〕 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、27番目のチロシン残基と置換される、チロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であり、且つ44番目のアスパラギン残基と置換される、アスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基がセリン残基である〔13〕に記載の変異型キシラナーゼ。

〔15〕 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、少なくとも154番目のロイシン残基が、他のアミノ酸残基に置換されている変異型キシラナーゼ。

〔16〕 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、90番目のスレオニン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、174番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された置換アミノ酸残

基、及び217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる[15]に記載の変異型キシラナーゼ。

[17] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる[15]に記載の変異型キシラナーゼ。

[18] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、59番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、239番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び242番目のシステイン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる[15]に記載の変異型キシラナーゼ。

[19] [13]～[18]のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸。

[20] [19]に記載の核酸を含む発現ベクター。

[21] [20]に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

[22] 大腸菌、枯草菌、酵母、放線菌又は糸状菌由来の細胞を宿主細胞とする[21]に記載の形質転換体。

[23] 前記糸状菌が、*Trichoderma*属、*Acremonium*属、*Humicola*属又は*Aspergillus*属に属する[22]に記載の形質転換体。

[24] 前記糸状菌が、*Trichoderma viride*、*Acremonium cellulolyticus*、*Humicola insolens*又は*Aspergillus niger*である[22]又は[23]に記載の形質転換体。

〔25〕 〔21〕から〔24〕のいずれか一つに記載の形質転換体を培養し、培養された形質転換体及び該形質転換体の培養物のうち少なくともいずれか一方から、〔13〕～〔18〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼを回収することを含む変異型キシラナーゼの製造方法。

〔26〕 〔25〕に記載の製造方法によって製造された変異型キシラナーゼ。

〔27〕 〔13〕～〔18〕及び〔21〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼを含有する組成物。

〔28〕 〔13〕～〔18〕及び〔21〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼと、パルプとを接触させることを含むパルプの漂白方法。

〔29〕 〔13〕～〔18〕及び〔21〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼを含む洗剤。

〔30〕 〔13〕～〔18〕及び〔21〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼを含む動物飼料。

〔31〕 〔13〕～〔18〕及び〔21〕のいずれか一つに記載の変異型キシラナーゼを含む製パン改質剤。

発明の効果

〔0026〕 本発明によれば、熱安定性キシラナーゼを用いた、リグノセルロースの安価で効率的な糖化方法を提供することができる。また、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較して反応の初速度が大きく低下することのない置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼを提供することができる。さらに、本発明によれば、該変異型キシラナーゼを低コストで製造しうる製造方法を提供するとともに、該変異型キシラナーゼの様々な用途を提供することができる。

発明を実施するための形態

〔0027〕 本発明にかかる熱安定性キシラナーゼは、一定時間熱処理後のキシラナーゼ活性の程度が、熱処理前のキシラナーゼ活性と変わらないもの、もしくは

熱処理後のキシラナーゼ活性の減少が、熱処理前のキシラナーゼ活性と比べて少ないものであればよい。

例として、*Aspergillus* 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、アウレオバシウム (*Aureobasidium*) 属、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) 属等の糸状菌、バチルス (*Bacillus*) 属やクロストリジウム (*Clostridium*) 属、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属等の細菌類から得られるキシラナーゼが挙げられる。

前記の野生型キシラナーゼの中でも、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であることが好ましい。

また、本発明にかかる熱安定性キシラナーゼは、前記糸状菌、細菌類を含めた野生型のキシラナーゼに変異を導入し、必要に応じて熱安定性を向上させた変異型キシラナーゼでもよい。このような変異型キシラナーゼの場合、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であり、かつ置換アミノ酸を有するものがさらに好ましい。

本発明にかかる核酸は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示されるものである。

本発明にかかる発現ベクターは、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含むものである。

本発明にかかる宿主細胞は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換されたものである。

本発明にかかる変異型キシラナーゼの製造方法は、前記宿主細胞を培養し、培養された宿主細胞及び該宿主細胞の培養物のうち少なくともいずれか一方から、前記変異型キシラナーゼを採取することを含むものである。なお、

本発明にかかる変異型キシラナーゼには、前記変異型キシラナーゼの製造方法によって製造された変異型キシラナーゼも含む。

本発明にかかる組成物は、前記変異型キシラナーゼを含有するものである。

本発明にかかるリグノセルロースの糖化物の製造方法は、前記変異型キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させることを含むものである。

本発明にかかるパルプの漂白方法は、前記変異型キシラナーゼと、パルプとを接触させることを含むものである。

本発明にかかる洗剤、動物飼料又は製パン改質剤は、前記変異型キシラナーゼを含むものである。

[0028] 本発明において、変異型キシラナーゼをコードするアミノ酸配列及び塩基配列、又はプライマーの個々の配列に関して、これら互いの相補的な関係に基づいて記述された事項は、特に断らない限り、それぞれの配列と、各配列に対して相補的な配列とについても適用される。各配列に対して相補的な当該配列について本発明の事項を適用する際には、当該相補的な配列が認識する配列について、当業者にとっての技術常識の範囲内で、対応する本明細書に記載された配列に相補的な配列として、明細書全体を読み替えるものとする。

[0029] 本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけでなく、他の工程と明確に区別できない場合であっても本工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本明細書において、組成物中の各成分の量は、組成物中の各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

以下、本発明について説明する。

[0030] (1) 定義

〔キシラナーゼ活性と反応の初速度の定義〕

本発明において「キシラナーゼ活性」とは、主に植物細胞壁を構成するキシランの β -1, 4結合をランダムに加水分解し、還元末端を有するオリゴ糖（以下、「還元糖」とも略す。）を生成することを示す。

本発明において「反応の初速度」とは、キシラナーゼ活性の反応の初速度を示す。

反応の初速度は、次のようにして確認することができる。まず、基質として、100 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）に1%（w/w）のバーチウッドキシラン（シグマ・アルドリッチ社製）を激しく混合し、5000×gで15分間遠心し、クエン酸ナトリウム緩衝液中に存在する残存キシランを除いた上澄み液を準備する。次に、前記上澄み液を基質液として、該基質液に対してキシラナーゼを0.1%（w/w）となるよう混合し、45℃で30分間攪拌しながら反応させ、得られた反応液中の還元糖の量をDNS法（Bailey等、1992）で測定することにより、キシラナーゼ活性の反応の初速度を確認できる。

[0031] 〔野生型と同等の活性の定義〕

本明細書において「野生型と同等の活性」とは、野生型キシラナーゼの反応の初速度を1としたとき、変異型キシラナーゼの反応の初速度が0.7（70%）以上のことをいう。

〔酵素が安定に作用する範囲の定義〕

本明細書において「酵素が安定に作用する範囲」は、温度が30℃より大きく40℃より小さく、かつpHが6より大きく8より小さい範囲をいう。

本明細書において「酵素が失活しやすい厳しい条件」とは、酸性領域（pH 4～pH 6）、塩基性領域（pH 8～pH 10）及び高温域（40℃～80℃）をいう。

[0032] 〔残存活性と安定性の定義〕

本明細書において、「残存活性」とは、酵素が安定に作用する範囲外に、一定時間、酵素を曝した後の反応の初速度を、曝す前の反応の初速度で除し

、百分率表示したものを言う。具体的な測定方法は、50℃かつpH4.5で16時間、24時間、48時間、72時間加熱処理後、氷上で5分間静置し、反応の初速度を測定すると同時に、熱処理前の該酵素の初速度も測定し、除して百分率表示する。前記以外に、50℃かつpH8、pH9、pH10で1時間加熱処理後、60℃かつpH8、pH9、pH10で1時間加熱処理後、70℃かつpH5.5で5分間加熱処理後の反応の初速度についても同様に残存活性を測定する。

本明細書において、安定性は、前記酵素が失活しやすい厳しい条件下に酵素が曝されたときの残存活性の程度により判定する。

[0033] (2) 本発明の変異型キシラナーゼについて

本発明の変異型キシラナーゼは、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であり、かつ置換アミノ酸残基を有するものである。

本発明の変異型キシラナーゼは、置換アミノ酸残基を有することにより、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較しても反応の初速度が大きく低下することがない。

[0034] 本発明における変異型キシラナーゼとしては、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であり、かつ置換アミノ酸残基を有するものであれば、特に制限されるものではない。

[0035] 本発明における変異型キシラナーゼとしては、対応する野生型キシラナーゼと比較して、好ましくは反応の初速度が70%以上であることが挙げられる。

反応の初速度が70%以上であれば、変異型キシラナーゼの使用量が、変異型キシラナーゼに対応する野生型キシラナーゼの使用より多くなることが

ないため、産業利用上好ましい。

[0036] 本発明における変異型キシラナーゼとしては、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて、好ましくは50%以上であり、より好ましくは70%以上である。

50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であれば、酵素が安定に作用する範囲内で使用することができるため好ましい。具体的には、リグノセルロースの糖化といった長時間の酵素反応や酵素再利用を要する場合に、反応開始当初の反応初速度を維持するために大量の酵素を追加する必要もなく、結果としてコストがかさむ等の心配もなく、経済的な観点からも好ましい。

[0037] 本発明における変異型キシラナーゼとしては、その由来は特に制限されるものではない。例えば、枯草菌、クロストリジウム属菌、放線菌又は糸状菌、担子菌由来の変異型キシラナーゼが挙げられる。産業利用上の観点より、前記糸状菌の中でも、*Trichoderma*属、*Acremonium*属、*Humicola*属又は*Aspergillus*属由来の変異型キシラナーゼが好ましい。さらに、大量生産の観点より、*Trichoderma viride*、*Acremonium cellulolyticus*、*Humicola insolens*又は*Aspergillus niger*由来の変異型キシラナーゼがより好ましい。

[0038] 酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較して反応の初速度が大きく低下することがないという観点より、以下の二種の変異型キシラナーゼが、さらに好ましい変異型キシラナーゼとして挙げられる。

[0039] まず、第1の好ましい変異型キシラナーゼとしては、*Trichoderma*属糸状菌由来の変異型キシラナーゼが挙げられる。

[0040] 前記第1の好ましい変異型キシラナーゼは、さらに、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて5

0%以上であるという観点より、*Trichoderma viride*の変異型キシラナーゼであることが好ましい。

[0041] 前記第1の好ましい変異型キシラナーゼは、さらに、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上を達成しやすくするという観点より、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、29番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、58番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、27番目のチロシン残基がチロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換され、且つ44番目のアスパラギン残基がアスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換された置換アミノ酸残基を有する変異体キシラナーゼが挙げられる。

[0042] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列は、*Trichoderma viride*のキシラナーゼIをコードするアミノ酸配列である。

[0043] また、第2の好ましい変異型キシラナーゼとしては、*Acremonium*属糸状菌由来の変異型キシラナーゼが挙げられる。

[0044] 前記第2の好ましい変異型キシラナーゼは、さらに対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であるという観点より、*Acremonium cellulyticus*の変異型キシラナーゼであることが好ましい。

[0045] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列は、*Acremonium cellulyticus*のキシラナーゼIをコードするアミノ酸配列である。

[0046] 前記第2の好ましい変異型キシラナーゼは、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上を達成しやすくするという観点より、少なくとも154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基を含んでいることが好まし

い。

[0047] 本発明の変異型キシラナーゼの具体例としては、例えば以下表 1 で示すようにクローン番号 1 ～クローン番号 17 で示される置換アミノ酸残基を有するものが挙げられるが、本発明の変異型キシラナーゼはこれらに限定されるものではない。

[0048] [表1]

クローン番号	配列番号 (野生型)	置換アミノ酸残 基の位置	変異前	変異後
1	1	27	Tyr	Phe
	1	29	Asn	Leu
	1	44	Asn	Ser
	1	58	Lys	Arg
2	2	30	Ile	Val
3	2	33	Asn	Asp
4	2	36	Gly	Arg
5	2	59	Ser	Thr
6	2	90	Thr	Ser
7	2	132	Gln	Arg
8	2	154	Leu	Met
9	2	174	Ser	Thr
10	2	195	Pro	His
11	2	197	Ser	Asn
12	2	217	Gly	Glu
13	2	239	Tyr	His
14	2	242	Cys	Ser
15	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	90	Thr	Ser
	2	132	Gln	Arg
	2	154	Leu	Met
	2	174	Ser	Thr
	2	195	Pro	His
	2	197	Ser	Asn
16	2	217	Gly	Glu
	2	30	Ile	Val
	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
17	2	154	Leu	Met
	2	30	Ile	Val
	2	59	Ser	Thr
	2	154	Leu	Met
	2	239	Tyr	His
	2	242	Cys	Ser

[0049] 上記表 1 のうち、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度

が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上という観点より、変異型キシラナーゼTVX01（クローン番号1）、変異型キシラナーゼACX01（クローン番号15）、変異型キシラナーゼACX02（クローン番号16）又は変異型キシラナーゼACX03（クローン番号17）が好ましい。

[0050] 前記変異型キシラナーゼTVX01は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、29番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、58番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、27番目のチロシン残基がフェニルアラニン残基に置換され、且つ44番目のアスパラギン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を含んでいる。変異型キシラナーゼTVX01は、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であるという観点より好ましい。

[0051] 本発明にかかる変異型キシラナーゼTVX01は、好ましくは30℃～90℃の範囲で活性を有するものであり、より好ましくは、30℃～70℃の範囲で活性を有するものである。また、好ましくはpH3～pH9の範囲で活性を有するものであり、より好ましくはpH4～pH7の範囲で活性を有するものである。

[0052] 前記変異型キシラナーゼACX01は、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、90番目のスレオニン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、174番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び217番目

のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換された置換アミノ酸残基を含んでいる。変異型キシラナーゼACX01は、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であるという観点より好ましい。

[0053] 本発明にかかる変異型キシラナーゼACX01は、好ましくは30℃～80℃の範囲で活性を有するものであり、より好ましくは、30℃～65℃の範囲で活性を有するものである。また、好ましくはpH2～pH8の範囲で活性を有するものであり、より好ましくはpH2～pH5の範囲で活性を有するものである。

[0054] 前記変異型キシラナーゼACX02は、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基を含んでいる。変異型キシラナーゼACX02は、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であるという観点より好ましい。

[0055] 本発明にかかる変異型キシラナーゼACX02は、好ましくは30℃～80℃の範囲で活性を有するものであり、より好ましくは、30℃～65℃の範囲で反応活性を有するものである。また、好ましくはpH2～pH8の範囲で活性を有するものであり、より好ましくはpH2～pH5の範囲で活性を有するものである。

[0056] 前記変異型キシラナーゼACX03は、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、59番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、239番目のチロシン残基がヒス

チジン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び242番目のシステイン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を含んでいる。変異型キシラナーゼACX03は、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であるという観点より好ましい。

[0057] 本発明にかかる変異型キシラナーゼACX03は、好ましくは30℃～80℃の範囲で活性を有するものであり、より好ましくは、30℃～65℃の範囲で活性を有するものである。また、好ましくはpH2～pH8の範囲で活性を有するものであり、より好ましくはpH2～pH5の範囲で活性を有するものである。

[0058] 本発明の変異型キシラナーゼとしては、例えば変異型キシラナーゼTVX01と相同性が認められる各アミノ酸配列からなる変異型キシラナーゼも、本発明における変異型キシラナーゼに包含される。

相同性が認められるアミノ酸配列とは、例えば変異型キシラナーゼTVX01と同等程度のキシラナーゼ活性を示すアミノ酸配列であればよい。好ましくは変異型キシラナーゼTVX01のアミノ酸配列と80%以上の相同性、より好ましくは90%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する変異型キシラナーゼが挙げられる。80%以上の相同性を示すことにより、キシラナーゼの立体構造類似性が高くなると考えられるため、本発明で明らかになった変異点を導入して、本発明と同等程度の作用を示す変異型キシラナーゼを開発できる等の利点がある。

変異型キシラナーゼTVX01の他、変異型キシラナーゼACX01、変異型キシラナーゼACX02及び変異型キシラナーゼACX03についても同様である。

[0059] また、本発明における変異型キシラナーゼTVX01としては、変異型キシラナーゼTVX01と同等程度の作用を示すものであれば、変異型キシラナーゼTVX01をコードするアミノ酸配列にアミノ酸残基が挿入、欠失又

は置換した変異型キシラナーゼも、本発明における変異型キシラナーゼTVX01に含まれる。

[0060] アミノ酸残基が挿入、欠失又は置換されている場合、その挿入、欠失又は

置換の位置は、本発明で示された作用を損なわない限りにおいて、任意に決定できる。挿入、欠失又は置換したアミノ酸残基の数としては1アミノ酸残基又は2アミノ酸残基以上が挙げられ、例えば1アミノ酸残基～10アミノ酸残基、好ましくは1アミノ酸残基～5アミノ酸残基が挙げられる。具体的には、4重変異点を有すると同時に、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、47番目のグリシン残基がシスチン残基に置換したもの、52番目のグルタミン残基がリジン残基に置換したもの、59番目のバリン残基がイソロイシン残基に置換したもの、67番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換したもの、69番目のアスパラギン残基がイソロイシン残基に置換したもの、80番目のセリン残基がアラニン残基に置換したもの、97番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換したもの、105番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換したもの、109番目のアミノ酸残基がアラニン残基に置換したもの、120番目のアミノ酸残基がアルギニン残基に置換したもの、143番目のアミノ酸残基がイソロイシン残基に置換したもの、151番目のアスパラギン残基がセリン残基に置換したもの、161番目のセリン残基がロイシン残基に置換したもの、186番目のセリン残基がアミノ酸残基に置換したものなどが挙げられる。

[0061] 変異型キシラナーゼTVX01の他、変異型キシラナーゼACX01、変異型キシラナーゼACX02及び変異型キシラナーゼACX03についても同様である。具体的には、ACX01が有する変異点以外に、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、133番目のセリン残基がアスパラギン残基に、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換したものなどが挙げられる。

[0062] また、変異型キシラナーゼACX02についても同様に、その変異点すべてを有する多くの変異体がACX02と同程度の性質を示し、具体的には、

ACX02が有する変異点以外に、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、90番目のスレオニン残基がセリン残基に、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に、133番目のセリンがアスパラギン残基に、174番目のセリン残基がスレオニン残基に、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に、217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換したものなどが挙げられる。

[0063] さらに、変異型キシラナーゼACX03の変異点すべてを有する多くの変異体がACX03と同程度の性質を示し、具体的には、ACX03が有する変異点以外に、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換したものなどが挙げられる。

[0064] 本発明の変異型キシラナーゼは、公知の方法に従い合成することができる。遺伝子に変異を生じさせる方法としては、例えば、部位特異的変異法（Kramer, W. and Fritta, H. J., *Methods in Enzymology*, vol. 154, P. 350 (1987)）、リコンビナントPCR法（PCR Technology, Stockton Press (1989)）、特定の部分のDNAを化学合成する方法、遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法、遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、または、ニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤で処理する方法などが挙げられる。なお、本発明の変異型キシラナーゼを得る方法のうち、好ましい方法としては、以下に述べる変異型キシラナーゼの製造方法が挙げられる。

[0065] (3) 変異型キシラナーゼの製造方法

本発明にかかる変異型キシラナーゼの製造方法（以下、単に「製造方法」とも言う。）は、形質転換体を培養し、培養された形質転換体及び該形質転換体の培養物のうち少なくともいずれか一方から、前記変異型キシラナーゼを回収するものである。

ここで形質転換体とは、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換されたものを示

す。

本発明にかかる変異型キシラナーゼの製造方法は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養することにより変異型キシラナーゼを製造するものである。当該製造方法により、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示すとともに、対応する野生型キシラナーゼと比較しても反応の初速度が大きく低下することのない変異型キシラナーゼを、低コストで製造することができる。

[0066] 以下に、製造方法に含まれる各工程を説明するが、本発明にかかる変異型キシラナーゼの製造方法は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養する工程（宿主細胞培養工程）、及び培養された形質転換体及び該形質転換体の培養物のうち少なくともいずれか一方から、前記変異型キシラナーゼを回収する工程（変異型キシラナーゼ回収工程）を含んでいればよく、必要に応じてさらに他の工程を含んでいてもよい。

[0067] A. 形質転換体培養工程

形質転換体培養工程は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養する工程である。

[0068] [形質転換体]

本発明にかかる製造方法において、形質転換体とは前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターで形質転換されたものであれば特に限定されない。

前記形質転換体は、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、放線菌、糸状菌等由来の細胞を宿主細胞とするものが挙げられ、この中でも、目的酵素を菌体外に分泌生産させることができる枯草菌、酵母、放線菌又は糸状菌由来の細胞を宿主細胞とするものが産業利用上好ましい。

[0069] 酵母としては、例えば、サッカロミセス（*Saccharomyces*）

属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、またはピキア (*Pichia*) 属に属するものが挙げられ、好ましい酵母の一例は、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である。

[0070] また、糸状菌としては、例えば、フミコーラ (*Humicola*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、またはアクレモニウム (*Acremonium*) 属に属するものが挙げられ、好ましい糸状菌の例は、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) もしくはアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、またはトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*)、またはアクレモニウム・セルロリティカス (*Acremonium cellulolyticus*) である。さらに、産業利用上の観点より、トリコデルマ・ビリデ、アクレモニウム・セルロリティカス、フミコーラ・インソレンス又はアスペルギルス・ニガーがより好ましい。

[0071] [核酸]

前記核酸は、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される。

前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を合成する方法として、対応する野生型キシラナーゼをコードする塩基配列に変異点を導入する方法や、変異点を含む全塩基配列を化学的に合成する方法などが挙げられる。以下に、対応する野生型キシラナーゼをコードする塩基配列に変異点を導入する方法について、*Acremonium cellulolyticus* のキシラナーゼ I をコードする塩基配列及び *Trichoderma viride* のキシラナーゼ II をコードする塩基配列を用いて説明するが、本発明にかかる核酸はこれらに限定されるものではない。

[0072] [野生型キシラナーゼをコードする塩基配列への変異点の導入]

野生型キシラナーゼをコードする塩基配列の例としては、配列表の配列番

号3に記載の *Acremonium cellulolyticus* のキシラナーゼIをコードする塩基配列、及び配列番号4に記載の *Trichoderma viride* のキシラナーゼIIをコードする塩基配列が挙げられる。

これらの野生型キシラナーゼをコードする塩基配列を鋳型として、遺伝子に変異を生じさせる方法としては、例えば、部位特異的変異法 (Kramer, W. and fritta, H. J., *Methods in Enzymology*, vol. 154, P. 350 (1987))、リコンビナントPCR法 (PCR Technology, Stockton Press (1989))、特定の部分のDNAを化学合成する方法、遺伝子をヒドロキシアミン処理する方法、遺伝子を保有する菌株を紫外線照射処理、または、ニトロソグアニジンや亜硝酸などの化学薬剤で処理する方法、市販の突然変異導入キットなどにより、前記塩基配列に変異を導入することができる。

変異を導入する位置や種類としては、特に限定されるものではない。具体例として前記クローン番号1～前記クローン番号17で示される各種クローンの変異点を以下表2に示すが、変異を導入する位置及び種類としてはこれに限定されるものではない。

[0073]

[表2]

クローン番号 配列番号 (野生型)	塩基の位置	変異前	変異後
1	1	TAC	TTC,TTT
	1	85~87	AAT
	1	130~132	AAC
	1	172~174	AAG
	2	88~90	ATC
	2	97~99	AAT
	2	106~108	GAG
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	97~99	GAT,GAC
	4	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	5	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
15	2	79~81	TAC
	1	85~87	AAT
	1	130~132	AAC
	1	172~174	AAG
	2	88~90	ATC
	2	97~99	AAT
	2	106~108	GAG
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	97~99	GAT,GAC
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
16	2	88~90	ATC
	2	97~99	AAT
	2	106~108	GAG
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	97~99	GAT,GAC
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
17	2	724~726	AGC
	2	715~717	TAC
	2	460~462	TTG
	2	175~177	TCG
	2	88~90	ATC
	2	460~462	TTG
	2	106~108	GAG
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	97~99	GAT,GAC
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG
	2	106~108	AGG,CTG,CGA,CGC,CGG,AGA
	2	175~177	TCG

[0074] [発現ベクター]

前記発現ベクターは、前記変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含むものであれば特に限定されるものではないが、形質転換効率や翻訳効率を向上させるなどの観点より、以下に示すような構成を示すプラスミドベクターやファージベクターであることがより好ましい。

[0075] [発現ベクターの基本構成]

発現ベクターは、前記変異型キシラナーゼをコードする塩基配列を含み、前記宿主細胞を形質転換しうるものであれば特に限定されない。必要に応じて、該塩基配列の他に、他の領域を構成する塩基配列（以下、単に「他の領域」とも言う。）を含んでいてもよい。他の領域としては、例えば、前記形質転換体が、前記変異型キシラナーゼを産生するために必要とする制御領域や、自律複製に必要な領域などが挙げられる。

また、前記形質転換体の選択を容易にするという観点より、選択マーカーとなりうる選択遺伝子をコードする塩基配列をさらに含んでいてもよい。

前記変異型キシラナーゼを産生するために必要となる制御領域としては、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む。）、リボゾーム結合配列（SD配列）、転写終結配列等を挙げることができる。

[0076] [酵母を宿主細胞とした場合の発現ベクター]

酵母を宿主細胞とした場合、発現ベクターとしては、前記変異型キシラナーゼをコードする塩基配列の他に、前記変異型キシラナーゼの産生効率の観点より、プロモーター配列を含んでいることが好ましい。プロモーター配列としては、酵母を宿主細胞とする形質転換体中で前記変異型キシラナーゼを発現できるものであればいずれを用いてもよい。

[0077] 例えばアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH1）プロモーター、ホスホグリセレートキナーゼ（PGK1）プロモーター、ペプチド鎖伸長因子（TEF）プロモーター、グリセロール3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GPD）プロモーター、ガラクトキナーゼ（GAL1）プロモーター、メタロチオネイン（CUP1）プロモーター、抑制性酸性ホスファターゼ（PHO5）プロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）プロモーターなどのプロモーター配列が用いられる。

なお、上記プロモーター配列の由来は宿主細胞となる酵母に限定されない。

サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターなどのように、外来のプロ

モーターを用いてもよい。これらは用いる酵素の由来や種類によって適宜選択することができる。

[0078] また、前記発現ベクターは、分泌シグナルを有していてもよい。これにより、形質転換体が前記変異型キシラナーゼを産生した場合、細胞外に前記変異型キシラナーゼを分泌することが可能となる。

分泌シグナルとしては、宿主細胞となる酵母から前記変異型キシラナーゼを分泌できるものであれば、特に限定されない。分泌効率の観点より、 α ファクターシグナル配列、インベルターゼシグナル配列、酸ホスファターシグナル配列、グルコアミラーゼシグナル配列などを用いることが好ましい。

[0079] 以上のようなプロモーター配列や分泌シグナルを有する発現ベクターとしては、具体的には pRS423、pRS424、YEplac195等が挙げられる。

[0080] [糸状菌を宿主細胞とした場合の発現ベクター]

糸状菌を宿主細胞とした場合、発現ベクターとしては、前記変異型キシラナーゼをコードする塩基配列の他に、前記変異型キシラナーゼの産生効率の観点より、プロモーター配列を含んでいることが好ましい。プロモーター配列としては、糸状菌を宿主細胞とする形質転換体中で前記変異型キシラナーゼを発現できるものであればいずれを用いてもよい。

[0081] 糸状菌に対して適切な発現ベクターは、van den Hondel, C. A. M. J. J. et al. (1991) In: Bennett, J. W. and Lasure, L. L. (eds.) More gene Manipulations in Fungi. Academic Press, pp. 396-428に記載されている。

また、pUC18、pBR322、pUC100、pSL1180（ファルマシア・インク社製）、pFB6及びアスペルギルス（*Aspergillus*）pRAX、トリコデルマ（*Trichoderma*）pTEX等のような一般的に用いられる他の発現ベクターを用いることもできる。

[0082] [原核生物を宿主細胞とした場合の発現ベクター]

大腸菌、枯草菌、放線菌などの原核生物を宿主細胞とする場合、発現ベクターは、前記変異型キシラナーゼをコードする塩基配列の他に、前記変異型キシラナーゼの産生効率の観点より、プロモーター配列を含んでいることが好ましい。また、プロモーター配列の他にリボゾーム結合配列や転写終結配列等を含んでいてもよい。

[0083] プロモーター配列の例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンの *t r p* プロモーター、ラクトースオペロンの *l a c* プロモーター、ラムダファージ由来の *P L* プロモーター及び *P R* プロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター (*g n t*)、アルカリプロテアーゼプロモーター (*a p r*)、中性プロテアーゼプロモーター (*n p r*)、 α -アミラーゼプロモーター (*a m y*) 等が挙げられる。

また、*t a c* プロモーターのように独自に改変又は設計されたプロモーター配列も利用できる。

[0084] リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来または枯草菌由来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主細胞内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。

前記リボゾーム結合配列としては、例えば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列のうち、4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成した配列などが挙げられる。

転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター、*t r p* オペロンターミネーター等が利用できる。

これら制御領域の発現ベクター上での配列順序は、特に制限されるものではないが、転写効率を考慮すると5'末端側上流からプロモーター配列、リボゾーム結合配列、目的蛋白質をコードする遺伝子、転写終結配列の順に並ぶことが望ましい。

[0085] ここでいう発現ベクターの具体例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有している *p B R 3 2 2*、*p U C 1 8*、*B l u e s c r i p t* 11

S K (+)、p K K 2 2 3 - 3、p S C 1 0 1 や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有している p U B 1 1 0、p T Z 4、p C 1 9 4、 ρ 1 1、 ϕ 1、 ϕ 1 0 5 等を発現ベクターとして利用することができる。

また、2種類以上の宿主内での自律複製が可能な発現ベクターの例として、p H V 1 4、T R p 7、Y E p 7 及び p B S 7 等を発現ベクターとして利用することができる。

[0086] [形質転換体の作製方法]

本発明にかかる形質転換体は、公知の方法により作製することができる。例えば、本発明にかかる変異型キシラナーゼをコードする塩基配列と、必要に応じて前記他の領域とを含む前記発現ベクターを構築し、該発現ベクターを所望の宿主細胞に形質転換する方法等が挙げられる。具体的には、S a m b r o o k, J., e t. a l., " 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, 3 r d E d i t i o n", 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, (2001) 等に記載されている分子生物学、生物工学及び遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法を利用することができる。

[0087] 本発明にかかる形質転換体は、前記宿主細胞に前記発現ベクターを組み込むだけではなく、必要に応じて前記宿主細胞での使用頻度の低いコドンと、使用頻度の高いコドンにするように、サイレント変異を導入すること等を併せて行い作製することもできる。

これにより、発現ベクターに組み込んだ前記変異型キシラナーゼ由来のタンパク質の生産量を増加させることができる可能性がある。

[0088] サイレント変異の導入方法の例として、以下表3を例に挙げるが、サイレント変異の導入方法は、宿主細胞でのコドン使用頻度に発現ベクター上にある該キシラナーゼ遺伝子および該キシラナーゼ遺伝子を細胞外に分泌させるためのシグナル配列のコドンとを合わせる物であれば、その手法、変異点、変更する塩基の種類等は特に制限されない。

以下表3はT. v i r i d eにおいて、前記変異型キシラナーゼA C X O

2を、高い頻度で発現させるためにサイレント変異を加える塩基の位置及び変更する塩基の種類を示したものである。

表3中、配列名「ACX02」の「塩基の位置」は、配列番号4で示される塩基の位置を示す。配列名「A. cellulolyticus シグナル配列」の「塩基の位置」は、配列番号73で示される塩基の位置を示す。

[0089] [表3]

配列名	塩基の位置	変更前	変更後
A.cellulolyticus シグナル配列	12	A	C
	42	G	T
	66	A	C
	90	G	C
ACX02	37	A	T
	38	G	C
	39	T	C
	78	T	A
	81	T	C
	106	A	C
	108	G	C
	138	A	C
	279	A	C
	312	A	C
	405	G	C
	474	A	C
	495	A	C
	552	T	C
	573	A	C
	648	G	A
	663	C	G
	718	A	T
	719	G	C
	720	T	C

[0090] [形質転換体の培養方法]

前記発現ベクターで形質転換して得られた形質転換体の培養の条件は、形質転換前の宿主細胞の培養条件と同様であり、公知の条件を用いることができる。

培地としては炭素源、窒素源、無機物及びその他の栄養素を適量含有する培地ならば合成培地または天然培地のいずれでも使用可能である。培地に使用する成分としては、公知のものを用いることができる。例えば、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、ペプトン、NZアミン及びジャガイモ等の有機栄養源、グルコース、マルトース、しょ糖、デンプン及び有機酸等の炭素源、硫酸アンモニウム、尿素及び塩化アンモニウム等の窒素源、リン酸塩、マグネシウム、カリウム及び鉄等の無機栄養源、ビタミン類を適宜組み合わせ

て使用できる。

なお、前記選択マーカを含む発現ベクターにより形質転換した形質転換体の培養においては、例えば、前記選択マーカが薬剤耐性である場合には、それに対応する薬剤を含む培地を使用し、前記選択マーカが栄養要求性である場合には、それに対応する栄養素を含まない培地を使用する。培地のpHは、pH4～pH8の範囲で選べばよい。

培養は前記培地を含有する液体培地中で、前記形質転換体を振とう培養、通気攪拌培養、連続培養、流加培養などの通常の培養方法を用いて行なうことができる。

培養条件は、前記形質転換体、培地、培養方法の種類により適宜選択すればよく、形質転換体が生育し、本発明にかかる変異型キシラナーゼを産生できる条件であれば特に制限はない。

培養温度は20℃～45℃、好ましくは24℃～37℃で好氣的に培養を行う。

培養期間は1日間～7日間の範囲で目的の変異型キシラナーゼ活性を有する蛋白質の含量が最大になるまで培養すればよい。

[0091] B. 変異型キシラナーゼ回収工程

変異型キシラナーゼ回収工程は、培養された形質転換体及び該形質転換体の培養物のうち少なくともいずれか一方から、前記変異型キシラナーゼを回収する工程である。

[0092] 形質転換した形質転換体を培養した後、本発明にかかる前記変異型キシラナーゼを回収する方法は、この分野で慣用されている方法を使用することができる。

本発明にかかる前記変異型キシラナーゼが形質転換した形質転換体外に分泌される場合は、該形質転換体の培養物を遠心分離、ろ過等を行うことで粗酵素液を容易に得ることができる。また、本発明にかかる前記変異型キシラナーゼが形質転換した形質転換体内に蓄積される場合は、培養した該形質転換体を遠心分離等の手段により回収し、回収した該形質転換体を緩衝液に懸

濁し、リゾチーム処理、凍結融解、超音波破碎などの公知の方法に従い該形質転換体の細胞膜を破壊することにより、粗酵素液を回収すればよい。

[0093] 前記粗酵素液を、限外ろ過法などにより濃縮し、防腐剤などを加えて濃縮酵素として利用することが可能である。また、濃縮した後、スプレードライ法などによって前記変異型キシラナーゼの粉末酵素を得ることもできる。

回収されたキシラナーゼ活性を有する粗酵素液について、分離精製を必要とする場合は、例えば、硫酸アンモニウムなどによる塩析、アルコールなどによる有機溶媒沈殿法、透析及び限外ろ過などによる膜分離法、あるいはイオン交換体クロマトグラフィー、逆相高速クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの公知のクロマト分離法を適宜組み合わせて行うことができる。

[0094] (4) 変異型キシラナーゼの利用

本発明にかかる前記変異型キシラナーゼは、前述の通り酵素の失活しやすい条件下においても、長期間安定した活性を有する。そのため、本発明にかかる前記変異型キシラナーゼは、広範囲な用途に使用することが可能となる。

本発明の組成物は、前記変異型キシラナーゼを含有し、必要に応じて目的とする用途に適した任意の成分を含有することもできる。

本発明の組成物は、酵素の失活しやすい条件下においても、長期間安定して作用する前記変異型キシラナーゼを含有する。そのため本発明の組成物は、様々な用途に使用することができる。

前記変異型キシラナーゼの含有量は、その組成物の用途により適宜定めることができ、特に制限されない。

[0095] 本発明にかかる前記変異型キシラナーゼは、様々な用途に使用することができるが、好ましくは以下のように利用することが挙げられる。

[0096] [リグノセルロース原料の糖化物の製造方法]

本発明にかかるリグノセルロースの糖化物の製造方法は、前記変異型キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させることを含むものである。

本発明にかかるリグノセルロースの糖化物の製造方法は、酵素の失活しやすい条件下においても、長期間安定して作用することが可能な前記変異型キシラナーゼを使用するため、酵素の失活しやすい条件下で行うことができ、効率よくリグノセルロースの糖化を得られる。

[0097] リグノセルロース原料としては、リグニン含量の低いリグノセルロース原料であれば公知のものを使用することができる。

リグニン含量が低いとは、リグノセルロース原料の平均的なリグニン含量がリグノセルロース原料の全体量に対して約30質量%であるため、リグニン含量が30質量%より低いことを示す。好ましくはリグニン含量が20質量%以下、より好ましくはリグニン含量が10質量%以下のリグノセルロース原料が好適である。

このようなリグノセルロース原料としては、針葉樹、広葉樹、林地残材、建築廃材、剪定廃棄物、ソーダスト、ケナフ、稲藁、麦わらなどの農産破棄物等のリグノセルロース材料から、アルカリ抽出、アルカリ蒸解等の化学パルプ製造法、オルガノソルブなどの方法により、高度にリグニンを除去したセルロース、ヘミセルロースを主成分とするパルプ繊維などが挙げられる。好ましくは、広葉樹クラフトパルプ、針葉樹クラフトパルプ、機械パルプ、ケナフ等の草本由来パルプ、古紙パルプ、もしくはペーパースラッジ（紙パルプ工場から回収されるパルプ繊維分を含む）、またはこれらの混合物が挙げられる。特に、広葉樹クラフトパルプ、針葉樹クラフトパルプがより好ましい。

これらのリグノセルロース原料は、其々一般のパルプ製造企業から入手することができる。

[0098] 前記変異型キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させる方法としては、前記変異型キシラナーゼをリグノセルロース原料に加え、攪拌しながら反応を進行させる方法、振とうしながら反応を進行させる方法、変異型キシラナーゼとリグノセルロースを十分に混和の後、静置して反応を進行させる方法などが挙げられる。好ましくは、反応効率の観点より、前記変異型

キシラナーゼをリグノセルロース原料に加え、攪拌しながら反応を進行させる方法が挙げられる。

反応に使用可能な反応容器としては特に制限はない。好ましくは、装入したリグノセルロース原料及び前記変異型キシラナーゼが十分混和されるように攪拌できるとともに、前記変異型キシラナーゼの最適温度に保てるように温度調節機能を有する反応容器であることが好ましい。

反応温度は、前記変異型キシラナーゼの作用し得る温度であれば特に制限はされない。例えば40℃から60℃が挙げられ、好ましくは40℃から55℃が挙げられる。

糖化反応容器中の液のpHは、前記変異型キシラナーゼの作用しうるpHであれば特に制限されない。例えばpH4からpH7が挙げられ、好ましくはpH4からpH6が挙げられる。

[0099] 本発明にかかるリグノセルロースの糖化物の製造方法においては、本発明にかかる前記変異型キシラナーゼの他に、必要に応じて他の酵素を前記変異型キシラナーゼと組み合わせて使用することもできる。

他の酵素としては、セルラーゼ、キシロシダーゼ、マンナーゼ、ペクチナーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、アラビノフラノシダーゼ等の酵素を併用することができる。リグノセルロースの糖化物を効率よく製造するという観点から、セルラーゼを、前記変異型キシラナーゼに併用することが好ましい。

[0100] セルラーゼとしては、セルロースをグルコースに分解するものであれば制限されず、公知のものを使用することができる。セルラーゼとしては例えば、エンドグルカナーゼ、セロビオハイドロラーゼ及び β -グルコシダーゼの各活性の少なくとも1つの活性を有するものを挙げることができる。また、酵素活性の観点からは、これらの各活性を有する酵素混合物であることが好ましい。

[0101] 前記セルラーゼの起源は限定されることはなく、糸状菌、担子菌、細菌類等のセルラーゼを用いることができる。例えば、*Trichoderma*属

、*Acremonium*属、*Aspergillus*属等の糸状菌、*Irpe*属等の担子菌、*Aeromonas*属、*Clostridium*属、*Bacillus*属、*Pseudomonas*属、*Penicillium*属、*Humicola*属等の細菌などの各種の起源のものや、これらの起源のセルラーゼを鋳型として、遺伝子組み換えにより製造したものを単独若しくは二種以上を混合して用いることもできる。また、一般に市販されているセルラーゼ製剤や上記菌の培養物やその濾過液を直接使用することもできる。

なお、セルラーゼとしては、この中でも、*Trichoderma*（トリコデルマ）属由来のセルラーゼ又は*Acremonium*（アクレモニウム）属由来のセルラーゼなどが、強力なセルロース分解力を有するという観点より好ましい。

[0102] 市販のセルラーゼとしては、*Accelerase 1000*（Genencor社製）、*Accelerase 1500*（Genencor社製）、*Accelerase XC*（Genencor社製）、*Accelerase XY*（Genencor社製）、*Accelerase DUET*（Genencor社製）、*Accelerase TRIO*（Genencor社製）、*Celluclast*（Novozymes社製）、*Cellic CTec*（Novozymes社製）、*Cellic HTec*（Novozymes社製）、*Cellic CTec 2*（Novozymes社製）、*Cellic HTec 2*（Novozymes社製）、アクレモニウムセルラーゼ（Meiji Seika ファルマ（株）製）、メイセラーゼ（Meiji Seika ファルマ（株）製）、セルラーゼアマノA（天野エンザイム（株）製）、セルラーゼアマノT（天野エンザイム（株）製）、セルラーゼ ダイワ（大和化成（株）製）、セルライザー（ナガセ生化学工業（株）製）、ドリセラーゼ（協和発酵（株）製）、セルラーゼオノズカ（ヤクルト薬品工業（株）製）、セルロシン（阪急バイオインダストリー（株）製）等を用いることができる。

[0103] 前記変異型キシラナーゼのセルラーゼに対する混合比は、生産される還元

糖の量が最大になるような混合比であればいずれの割合でもよく、好ましくは前記変異型キシラナーゼを、セルラナーゼに対して20%~60%の割合で混合することが挙げられる。

[0104] 反応容器に仕込む基質としての、リグノセルロース原料と、前記変異型キシラナーゼ及びその他の酵素を合算した酵素全体（以下、単に「酵素」とも言う。）との濃度は、特に限定されるものではない。

リグノセルロース原料の移液、装入等の操作には、8質量%~30質量%の固形分濃度であることが好ましい。

また使用する酵素は、その活性に応じて基質を効率よく分解するに十分な量を投入すればよい。酵素の量は、酵素の種類等によって適宜調整が可能である。

本発明のリグノセルロース原料の糖化物の製造方法及び糖化酵素再利用によるリグノセルロース原料の糖化物の製造方法によって製造される糖化物としては、リグノセルロース由来の糖化物であればよい。糖化物としては、具体的には、単糖、二糖以上のオリゴ糖などが挙げられる。前記単糖としては、グルコース、キシロース、アラビノース、フルクトース、マンノース、ガラクトース等が挙げられる。

また、前記糖化物は、化学薬品や燃料、アラスチック、及び他の産物又は中間体の生産のために用いてよく、また、微生物を用いてこれらの物質を生産するための発酵原料として用いてもよい。

化学薬品や燃料、アラスチック、及び他の産物としては、エタノールやイソプロパノール、アセトン、アセチン、アセチンアルコール、ブタジオール、ポリビドロキシアルカン酸類（polyhydroxyalkanoates）、動物飼料及びキシロース等が挙げられる。特に、エタノール、イソプロパノール、乳酸等の発酵生産に好適に利用することができる。

[0105] [再利用のための変異型キシラナーゼの製造方法]

本発明の再利用のための変異型キシラナーゼの製造方法は、前記リグノセルロースの糖化物の製造方法により得られたリグノセルロースの糖化物を含む糖化反応液（以下、単に「糖化反応液」と称する場合がある。）から、本発明にかかる変異型キシラナーゼを回収すること（以下、「回収工程」と称する場合がある。）を含むものである。

これにより、本発明にかかる変異型キシラナーゼを低コストに製造することができる。

[0106] 前記回収工程では、回収方法として、公知の方法を使用すればよい。例えば、固液分離をして、その後、酵素を回収可能な膜装置や公知の装置を用いて酵素を回収する方法等が挙げられる。

固液分離の方法としては、前記糖化反応液を遠心分離または粗濾過する方法が挙げられる。

遠心分離又は粗濾過の条件は、当業界において通常用いられている方法をそのまま適用すればよく、例えば遠心分離の場合 $500 \times g \sim 10000 \times g$ とすればよい。

粗濾過の場合には、目開きサイズが $0.1 \mu m \sim 2 mm$ の、ステンレス製フィルター、セラミック製フィルター又は樹脂製濾過膜を用いて濾過すればよい。

また、精密濾過膜による精密濾過を行ってもよい。この場合には、平均細孔径 $0.01 \mu m \sim 10 \mu m$ の精密濾過膜の使用が好ましい。

精密濾過膜により精密濾過を行う方法としては、圧濾過、真空濾過、クロスフロー濾過、遠心濾過などがある。中でも、クロスフロー濾過を行うことにより、膜の目詰まりを低減することができる。

[0107] 固液分離した液体から酵素を回収する場合、例えば、樹脂カラムを使用する方法や、膜装置を使用する方法が挙げられる。

前記樹脂カラムを使用する方法としては、例えば、イオン交換体クロマトグラフィー、逆相高速クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の公知のクロマト分離法を挙げるこ

ができる。

前記膜装置としては、例えば限外濾過膜、透析膜等を備える膜装置を用いて回収すればよい。中でも、平均細孔径 $0.001\mu\text{m}\sim 0.01\mu\text{m}$ の限外濾過膜の使用がより好ましい。

限外濾過膜には平膜型、多段平膜型、中空糸型等のタイプがあるが、いずれの型式でもかまわない。平膜型では、適切な濾過速度を確保するためには槽内を加圧する。加圧するには窒素ガス、ヘリウムガス、空気等を用いることが好ましい。また、必要に応じて反応槽内にインペラーを設置することが好ましい。インペラーにより液の攪拌を行うことで、膜表面の目詰まりを防止し、よりよい濾過速度を維持することができる。一方、多段平膜型、中空糸型の場合はポンプを用いて基質供給槽から反応槽へ輸液することで、適切な濾過圧力と線速度を保持し、よりよい濾過速度を維持することができる。

濾過方式については、浸漬膜方式、限外濾過方式、精密濾過方式等が挙げられる。なお、圧濾過、真空濾過、クロスフロー濾過、遠心濾過等は、限外濾過方式及び精密濾過方式のどちらの方式でも用いることができる。前記濾過操作は、定圧濾過、定流濾過、非定圧非定流濾過に大別されるが、本発明において特に限定されない。

加えて、本発明に係る前記回収工程に用いられる膜の材質については、酢酸セルロース、芳香族ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリスルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリエチレン、ポリアクリロニトリル、セラミック、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン（テフロン（登録商標））などが例示できる。これらの中でも、セルラーゼの使用や酸性条件下での反応を鑑みて、非セルロース系かつ耐酸性の材質から成る、ポリアクリロニトリルやポリスルホン等の膜の使用がより好ましい。

なお、前記回収工程で用いられる糖化反応液は、前記固液分離等の前処理を行わずに、製造直後の糖化反応液を用いてもよい。

本発明の再利用のための変異型キシラナーゼの製造方法により製造された、再利用のための変異型キシラナーゼは、既述の本発明の変異型キシラナー

ぜと同様に、種々の用途に用いることができる。また、前記再利用のための変異型キシラナーゼは、以下の単糖製造方法に用いることができる。

[0108] [単糖製造方法]

本発明の単糖製造方法は、前記リグノセルロースの糖化物の製造方法により得られたリグノセルロースの糖化物を含む糖化反応液（以下、単に「糖化反応液」と称する場合がある。）から、本発明にかかる変異型キシラナーゼを回収すること（以下、「回収工程」と称する場合がある。）と、回収された変異型キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させて単糖を製造すること（以下、単に「再糖化工程」と称する場合がある。）と、を含むものである。

これにより、本発明にかかる変異型キシラナーゼを有効に活用することができる。

[0109] 前記回収工程としては、既述の回収工程を適用する。

前記再糖化工程では、回収された変異型キシラナーゼを含む酵素液に、既述のリグノセルロース原料及び水を追加し、pH、温度を制御し攪拌しながら再度糖化反応を行う。pHや反応温度の条件については、リグノセルロース原料の糖化物の製造方法に記載の条件と同一の条件にすればよい。

また、前記再糖化工程では、追加投与するリグノセルロース原料及び水に加えて、さらに前記回収工程中、固液分離の際に得られる固形物を追加することが好ましい。これにより、膜装置や樹脂カラムで固液分離した固形物中に含まれる未反応のリグノセルロースや該リグノセルロース等に吸着した変異型キシラナーゼを有効に活用することができる。

本発明にかかる再糖化工程では、前記変異型キシラナーゼ又は前記固形分離した固形物を追加してもよいし、両方を追加してもよい。

[0110] 本発明にかかる単糖製造方法において、前記回収工程及び再糖化工程は、繰り返し実施することができる。これにより、前記回収された変異型キシラナーゼの活性が維持される期間内において触媒コストを低減することが可能となる。

また、本発明にかかる単糖製造方法においては、前記回収工程及び再糖化工程を繰り返す場合には、新たに変異型キシラナーゼを前記再糖化工程の際に追加してもよい。追加する変異型キシラナーゼの量については特に限定されるものではないが、経済的な観点から、最初の糖化反応で使用した変異型キシラナーゼの量の50質量%以下であることが好ましい。また、最初の糖化反応で使用した変異型キシラナーゼの量の20質量%以下となることが、経済的な観点からより好ましく、最初の糖化反応で使用した変異型キシラナーゼの量の10質量%以下となることが更に好ましい。

本発明の単糖製造方法により、製造される単糖としては、リグノセルロース由来の単糖であればよい。具体的には、グルコース、キシロース、アラビノース、フルクトース、マンノース、ガラクトース等が挙げられる。

[0111] [パルプの漂白方法]

本発明にかかるパルプの漂白方法は、前記変異型キシラナーゼと、パルプとを接触させることを含むものである。

本発明にかかるパルプの漂白方法は、酵素の失活しやすい条件下においても、長期間安定して作用する前記変異型キシラナーゼを使用するため、一般に酵素の失活しやすい条件下で行うことができ、効率よくパルプを漂白できる。

[0112] 前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程に用いられるパルプとしては、木材パルプ及び非木材パルプが挙げられる。木材パルプとしては、例えば針葉樹や広葉樹などを原料としたものが挙げられる。また、非木材パルプとしては、例えばサトウキビの搾りかすであるバガスや、藁、麻、木綿などを原料としたものが挙げられる。加えて、新聞や雑誌などの古紙を原料とした古紙パルプも含まれる。

これらのパルプは、原料から物理的な力で繊維を取り出した機械パルプと、化学的に処理して繊維を取り出した化学パルプに大別される。機械パルプとしては、例えば、碎木パルプ、リファイナーグランドパルプ、サーモメカニカルパルプ、ケミサーモメカニカルパルプが挙げられる。また、化学パル

プとしては、例えば、クラフトパルプ、アルカリパルプ、サルファイトパルプが挙げられる。

- [0113] 前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程においては、前記変異型キシラナーゼに加えて、他のヘミセルラーゼやリグニン分解酵素を併用してもよい。これにより、パルプの漂白性を増強することができる。

ヘミセルラーゼやリグニン分解酵素の起源は限定されることはなく、糸状菌、担子菌、細菌類等が挙げられる。

- [0114] 本発明にかかるパルプ漂白方法は、前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程の他に、さらに、脱リグニン処理工程と、漂白工程とを含むことが好ましい。

本明細書においては、脱リグニン処理工程は、リグニンをパルプから積極的に除去するためのものであれば、どのような方法でもよく、従来から実施されている方法を使用することができる。例えば、特開2004-263310号公報に記載のような方法が挙げられる。

- [0115] 本明細書において、漂白工程とは、前記パルプに対して漂白処理を行う工程であればよく、例えば、パルプに残留するリグニンの除去、パルプの白色度の向上等を目的とした工程全般を包含するものである。また、該漂白工程は、前記脱リグニン処理工程に続く工程であり、従来から実施されている方法を使用することができる。例えば、特開2010-1594号公報に記載のような方法が挙げられる。

- [0116] 本発明にかかる前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程に、前記脱リグニン処理工程及び前記漂白工程を組み合わせる場合には、前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程は、前記脱リグニン処理工程から前記漂白工程に続く工程のうちのいずれかの時点で行えばよい。すなわち、前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程は、前記脱リグニン処理工程の前後及び前記漂白工程の前後のいずれかで行えばよい。また、前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程は、前記脱リグニン処理工程又は前記漂白工程と同時に行うこともできる。

本発明にかかる前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程は、前記漂白工程の一部として使用することが好ましい。なかでも、本願発明の変異型キシラナーゼの性能を最大限に発揮するという観点より、前記漂白工程中のリグニン含量が少ない段階での使用がより好ましい。

[0117] また、前記変異型キシラナーゼとパルプとを接触させる工程は、前記漂白工程のうち、例えば、塩素、二酸化塩素、二酸化窒素、次亜塩素酸塩、酸素、過酸化水素、オゾン等を用いる化学漂白の漂白工程の一部として使用することもできる。

[0118] [洗剤]

本発明の洗剤は、前記変異型キシラナーゼを含有し、必要に応じて他の成分を含有することもできる。

本発明の洗剤は、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示す前記変異型キシラナーゼを含有することにより、洗剤の性能を向上させることができる。

[0119] 本発明の洗剤には、衣料用洗剤、自動食器洗浄機用洗剤等の様々な洗剤が包含される。また、家庭用及び工業用の洗剤として用いることができる。さらに、本発明の洗剤は、衣料用繊維製品の改質剤として使用することもできる。

本発明の洗剤を衣料用繊維製品の改質剤として使用する場合に、衣料用繊維としては、木綿繊維、麻繊維、レーヨンやテンセルといったセルロース含有繊維等の改質剤と使用することができる。

[0120] 本発明の洗剤は、用途に応じて前記変異型キシラナーゼ以外にも、他の酵素が配合されていてもよい。他の酵素としては、この分野において公知のものを用いることができる。例えば、プロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼ、リパーゼが挙げられる。これらの他の酵素の起源は限定されることはなく、糸状菌、担子菌、細菌類等が挙げられる。

[0121] 本発明の洗剤は前記他の酵素以外にも、例えば界面活性剤、洗浄助剤、漂白剤、蛍光剤等の通常洗剤に用いられる各成分が配合されていてもよい。

前記界面活性剤としては、例えば陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤等を挙げることができる。好ましくは陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤が挙げられる。

前記陰イオン性界面活性剤としては、例えば、脂肪酸ナトリウム（石鹼）、 α -スルホン化脂肪酸エステルナトリウム、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）、アルキル硫酸エステルナトリウム（AS）、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム（AES）、 α -オレフィンスルホン酸ナトリウム（AOS）、アルキルスルホン酸ナトリウムが挙げられる。

前記非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル（AE）、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル（APE）、蔗糖脂肪酸塩エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、アルカノールアミドが挙げられる。

[0122] 前記洗浄助剤としては、アルカリ緩衝剤、二価金属イオン補足剤、再汚染防止剤等を挙げることができ、具体的には、トリポリリン酸塩、ピロリン酸塩などのポリリン酸塩、A型ゼオライトなどのアルミノケイ酸塩、炭酸ナトリウム、セスキ炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどの炭酸塩、ポリエチレングリコール、カルボン酸系ポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリグリシジル酸塩等のポリマー、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体、およびポリアスパラギン酸等のアミノカルボン酸系のポリマーが挙げられる。

[0123] 前記漂白剤としては、例えば、次亜塩素酸ナトリウム、ジクロロイソシアヌル酸塩、亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、過炭酸ナトリウム、過ホウ酸ナトリウム、過酢酸、ヒドロサルファイト、二酸化チオ尿酸が挙げられる。

前記蛍光剤としては、ビス（トリアジニルアミノ）スチルベンジスルホン酸誘導体やビススチリルビフェニル誘導体などが挙げられる。

[0124] 本発明の洗剤は、前記界面活性剤、前記洗浄助剤、前記漂白剤、前記蛍光

剤等と組み合わせて常法に従い製造することができる。

洗剤の形態は用途に応じて選択することができ、例えば液体、粉体、顆粒、ペースト、固形等にすることができる。

[0125] 〔動物飼料〕

本発明の動物飼料は、前記変異型キシラナーゼを含有し、必要に応じて他の成分を含有することもできる。

本発明の動物飼料は、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示す前記変異型キシラナーゼを含有する。これにより、本発明の動物飼料は、該動物飼料に含まれる豊富な植物繊維が分解されるため、該動物飼料を摂取した動物において植物栄養の吸収効率が向上するとともに、動物の胃内における消化能を改善できる。

本発明の動物飼料における前記変異型キシラナーゼの含有量は、動物飼料の動物の胃内における消化能を改善できる量であれば特に制限されない。

[0126] 前記動物飼料としては、例えば、キシランを含有する既成動物飼料、穀類などが挙げられる。なお、穀類の中でも特に、コムギ、トウモロコシ、ライムギ、オオムギ、オートムギ、トリチケール、イネおよびモロコシなどが好ましい。

[0127] 本発明の動物飼料における前記変異型キシラナーゼは、他の飼料添加剤や、他の酵素と組み合わせて用いることもできる。

前記他の飼料添加剤としては、例えば、ビタミン飼料添加剤、ミネラル飼料添加剤、アミノ酸飼料添加剤、浸透保護剤などが挙げられる。

前記他の酵素としては、例えば、セルラーゼやアミラーゼ、プロテアーゼなどが挙げられる。これらの酵素の起源は限定されることはなく、糸状菌、担子菌、細菌類等由来の酵素を用いることができる。

[0128] 本発明の動物飼料は、広範囲の動物に使用可能である。好ましくは、鶏、七面鳥、アヒル、ガチョウ等の家禽類、ウシ、ウマ、ヒツジ等の反芻動物、ブタ等のイノシシ類、ラビット等の齧歯類および魚類が挙げられる。

[0129] 本発明の動物飼料は、前記変異型キシラナーゼが添加されたものであれば

、どのような方法で製造されたものでもよく、該動物飼料の製造方法は特に限定されない。前記変異型キシラナーゼの動物飼料への添加は、例えば、飼料製造前、飼料製造中又は製造の最終段階等いずれの段階で行ってもよい。また、前記変異型キシラナーゼは、ペレット又はマッシュ形状に成形された既成の動物飼料に直接添加することもできる。なお、前記変異型キシラナーゼは、直接飲料水中に添加することにより、動物飼料中に含有させることもできる。

[0130] 〔製パン改質剤〕

本発明の製パン改質剤は、前記変異型キシラナーゼを含有し、必要に応じて他の成分を含有することもできる。

本発明の製パン改質剤は、酵素が失活しやすい厳しい条件下においても、安定した活性を示す前記変異型キシラナーゼを含有する。これにより、本発明にかかる製パン改質剤は、35℃～40℃の条件下で、1時間から2時間という製パン時の発酵工程中也安定した活性を示すため、小麦粉のヘミセルロース部分を分解することができ、製パンの性質を改質することができる。

[0131] 本発明の製パン改質剤は、前記変異型キシラナーゼの他に、他の製パン改質剤を含むことができる。前記他の製パン改質剤としては、例えば、モノグリセリド、有機酸モノグリセリド、グリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、リン脂質類、アスコルビン酸類およびその誘導体、有機酸類、アミノ酸類、塩類などが挙げられる。

[0132] 本発明の製パン改質剤を添加する対象となるパンの種類としては、パンの材料を混合し、捏ねて、発酵し、焼成等を行って製造されたものであればよく、食パン等の他に、特殊パン、調理パン、菓子パン、蒸しパン、ホットケーキ、ドーナツなどが含まれる。

前記パンの材料としては、小麦粉、水や乳製品などの水分、イースト、糖類、食塩、油脂類（ショートニング、ラード、マーガリン、バター、液状油等）などが挙げられる。必要に応じて、卵、調味料（グルタミン酸類、核酸

等)、膨張剤、香料等を添加することもできる。また、小麦粉が主原料であれば、ライ麦粉、米粉などを小麦粉に併用することも可能である。なお、本明細書においてドウとは、前記パンの材料を混合し、捏ねたものを意味する。

[0133] パンの製造方法は発酵工程を含むものであれば通常用いられる方法であれば特に制限はなく、例えば、ストレート法、中種法、液種法などが使用できる。

発酵工程は、通常用いられる方法を使用することができるが、発酵温度を室温より高めに設定することにより発酵時間を短縮できるため、35℃～40℃で1～2時間行うことが好ましい。

[0134] 本発明の製パン改質剤は、例えば、小麦粉等の原材料に粉体で混合したり、あらかじめ水中に溶かして使用したり、また、工程の途中で粉状又は液状の形態で添加してもよい。

以上、本発明の実施形態について述べたが、これは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

実施例

[0135] 以下の実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。また、実施例の組成物における含有成分量を示す「%」は、特に断らない限り質量基準である。

[0136] 〔実施例1〕キシラナーゼ活性の測定方法（スタンダードアッセイ）

加水分解したキシランの還元糖の量をDNS法（Bailey等、1992）により測定し、キシラナーゼ活性を測定した。

評価に用いた基質は、100mMのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）に1%（w/w）のバーチウッドキシラン（シグマ・アルドリッチ社製）を激しく混合し、5000×gで15分間遠心した後、上澄み液を用いた。

前記基質液に対してキシラナーゼを0.1%（w/w）となるよう混合し、45℃で30分間攪拌しながら反応させ、得られた反応液中の還元糖の量

を測定し、キシラナーゼ活性を測定した。

[0137] 〔実施例2〕 部位特異的突然変異誘発によるキシラナーゼ変異体の作製と評価

(1) 発現ベクターYE p-GAPDHp-GAs-TVX、YE p-GAPDHp-GAs-ACXの構築

(a) プロモーター配列の取得：Saccharomyces cerevisiaeのゲノムDNA配列を鋳型とし、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（以下GAPDHと略す）のプロモーター配列（GenBank Accession Number：A35397.1）をPCR法によって取得した。PCRに用いたプライマーは、下記表4の配列番号55及び56に記載した。

[0138] (b) シグナル配列の取得：Rhizopus oryzaeのゲノムDNA配列を鋳型とし、グルコアミラーゼ遺伝子のシグナル配列（GenBank Accession Number：D00049.1）をPCR法によって取得した。PCRに用いたプライマーは、下記表4の配列番号57及び58に記載した。

[0139] (c) プロモーター配列とシグナル配列との連結：PCR増幅された前記DNA配列を、フェノール／クロロホルム溶液で精製し、エタノール沈殿して回収した。精製されたプロモーター配列とシグナル配列とを制限酵素BglIIで消化した後、それぞれをアガロース電気泳動して目的DNAを含む断片を切り出し精製した。このようにして得られた断片を、DNAライゲース（宝酒造社製）を用いて連結した（以下、GAPDHp-GAsと略す）。

[0140] (d) T. viride由来キシラナーゼII遺伝子の増幅：T. virideのゲノムDNA配列を鋳型とし、T. viride由来キシラナーゼII遺伝子の全長（キシラナーゼ遺伝子をコードする塩基配列及び分泌シグナル配列）をPCR法によって取得した。PCRに用いたプライマーは、下記表4の配列番号59及び60に記載した。得られた配列は配列表の配列番

号 7 4 に記載した。

[0141] (e) *A. cellulolyticus* 由来キシラナーゼ遺伝子の増幅 : *A. cellulolyticus* のゲノム DNA 配列を鋳型とし、*A. cellulolyticus* 由来キシラナーゼ遺伝子の全長 (キシラナーゼ遺伝子をコードする塩基配列及び分泌シグナル配列) を PCR 法によって取得した。PCR に用いたプライマーは、下記表 4 の配列番号 6 1 及び 6 2 に記載。得られた配列は配列表の配列番号 7 5 に記載した。

[0142] (f) プロモーター配列、シグナル配列、キシラナーゼ遺伝子の連結 : (d) で取得した *T. viride* 由来キシラナーゼ II を鋳型に、シグナル配列を除くキシラナーゼ遺伝子をコードする塩基配列を PCR 法によって取得した。PCR に用いたプライマーは、下記表 4 の配列番号 6 3 及び 6 4 に記載した。その後、得られた断片を精製し、制限酵素 *Sac* I によって消化した後、前記 *GAPDH* p-GA s 断片とライゲーションした (以下、*GAPDH* p-GA s-TVX と略す)。

また、(e) で取得した *A. cellulolyticus* 由来キシラナーゼ I についても同様に、分泌タンパク質部分の遺伝子を PCR によって取得し、精製後、制限酵素 *Sac* I によって消化し、前記 *GAPDH* p-GA s 断片とライゲーションした (以下、*GAPDH* p-GA s-ACX と略す)。なお、PCR に用いたプライマーは、下記表 4 の配列番号 6 5 及び 6 6 に記載。

なお、ここで示す DNA 断片の精製やライゲーションの手法は、(c) と同様である。

[0143] (g) 発現ベクターへの導入 : 前記 *GAPDH* p-GA s-TVX 断片と出芽酵母用マルチコピーベクター YE p 2 4 (ATCC 7769) を制限酵素 *Xma* I と *Bam* H I で消化し (前者約 1.3 kbp、後者約 7.4 kbp)、精製後、ライゲーションし、*T. viride* 由来キシラナーゼ II 変異体作製用プラスミドを得た (以下 YE p-GAPDH p-GA s-TVX と略す)。また、同様に、*GAPDH* p-GA s-ACX と YE p 2

4 を制限酵素 *Xma*I と *Bam*HI 制限酵素で消化し（前者約 1.5 kbp、後者約 7.4 kbp）、精製後、ライゲーションし、*A. cellulolyticus* 由来キシラナーゼ I 変異体作成用発現ベクターを得た（以下 *YEp-GAPDHp-GAs-ACX* と略す）。

なお、ここで示す DNA 断片の精製やライゲーションの手法は（c）と同様である。また、*YEp24* は細胞・微生物バンクであるアメリカンタイプカルチャーコレクションより入手することができる。

[0144] [表4]

配列番号55	GACTAGCCCGGGTCGAGTTTATCATTATC
配列番号56	GACGAGAGATCTCCATTTTGTTTATTTATGTG
配列番号57	GACTAGAGATCTATGCAACTGTTCAATTTGCC
配列番号58	CAGCATGAGCTCAGCAGAAACCAGCAAAG
配列番号59	ATGGTTTCCTTCACCTCCCTCCTCGCCGGC
配列番号60	TTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGCCAGA
配列番号61	ATGGGCATCTCATCTATTCTTCTCTCTGCT
配列番号62	CTATTGGCACTGACTGTAGTAAGCGTTAAA
配列番号63	GATTAGGAGCTCCAGACGATTGGTCCCG
配列番号64	GACTAGGGATCCTTAGCTGACGGTAATAG
配列番号65	GATTATGAGCTCGCTGAGGCGATCAACTAC
配列番号66	GATTAGGGATCCCTATTGGCACTGACTGTAG

[0145] （2）部位特異的突然変異誘発

本発明の実施例において用いた突然変異体は、（1）で構築した発現ベクターを鋳型に、宝酒造社製の「*LA PCR in vitro mutagenesis Kit*」によって変異を導入した。

プライマーは、合成したオリゴヌクレオチドを用いた。

発現ベクター *YEp-GAPDHp-GAs-TVX* を鋳型として、以下表 5 の配列番号 5 及び配列番号 6 と、配列番号 7 及び配列番号 8 と、配列番号 9 及び配列番号 10 と、配列番号 11 及び配列番号 12 とをプライマーとして用いて PCR を実施し、変異型キシラナーゼ発現ベクター *YEp-GAPDHp-GAs-TVX01* を得た。

発現ベクター *YEp-GAPDHp-GAs-ACX* を鋳型として、以下表 5 の配列番号 21 及び配列番号 22 との配列をプライマーとして、配列表の配列番号 2 の 154 番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置

換アミノ酸残基を有するYE p-GAPDH p-GAs-L 154 Mを得た。

発現ベクターYE p-GAPDH p-GAs-ACXを鋳型として、以下表5の配列番号13及び配列番号14と、配列番号15及び配列番号16と、配列番号17及び配列番号18と、配列番号19及び配列番号20と、配列番号21及び配列番号22と、配列番号23及び配列番号24と、配列番号25及び配列番号26と、配列番号27及び配列番号28と、配列番号29及び配列番号30との配列をプライマーとして、同様にYE p-GAPDH p-GAs-ACX01を得た。

[0146] 発現ベクターYE p-GAPDH p-GAs-ACXを鋳型として、以下表5の配列番号15及び16と、配列番号21及び配列番号22と、配列番号31及び配列番号32と、配列番号33及び配列番号34との配列をプライマーとして、同様にYE p-GAPDH p-GAs-ACX02を得た。

[0147] 発現ベクターYE p-GAPDH p-GAs-ACXを鋳型として、以下表5の配列番号21及び配列番号22と、配列番号31及び配列番号32と、配列番号35及び配列番号36、配列番号37及び配列番号38と、配列番号39及び配列番号40との配列をプライマーとして、同様にYE p-GAPDH p-GAs-ACX03を得た。

該変異型キシラナーゼを含むプラスミドを大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）に形質転換し、形質転換体を得た。

この菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製し、DNAシーケンサーにてキシラナーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定し、鋳型であるYE p-GAPDH p-GAs-TVX、YE p-GAPDH p-GAs-ACXのキシラナーゼ遺伝子をコードする部分に、アミノ酸置換が導入されていることを確認した。

[0148]

[表5]

配列番号5	GTACACCCTCGGCCCGGCGGCCAG
配列番号6	CGGGGCCGAGGGTGTACGTCACGCC
配列番号7	CAAGAACAGGGTCATCAACTTCTCG
配列番号8	GATGACCCTGTTCTTGGTGCCGG
配列番号9	CGTGACGTTACCCCTCGGCCCGGCG
配列番号10	CGAGGGTGAACGTCACGCCGCCGTG
配列番号11	CTCGGGCAGCTTTGTCGGCGGCAAG
配列番号12	CGACAAAGCTGCCCGAGTTGGACCAG
配列番号13	CATCAACTACGATACGCAGGGGGAC
配列番号14	CCCTGCGTATCGTAGTTGATGGAG
配列番号15	GATACGCAGAGGGACTTTGTGGTGG
配列番号16	CAAAGTCCCTCTGCGTATCGTAGTTG
配列番号17	GATACCAGTCTGTCGGCACACACAAG
配列番号18	GCCGACAGACTGGTATCCGTCGTG
配列番号19	GATCCGCCGAAGCCCCCGGACGAG
配列番号20	GGGGGCTTCGGCGGATCGAGATGTAC
配列番号21	CAGGCGGGCATGAATCTCGGCACAATG
配列番号22	CCGAGATTCATGCCCGCCTGCGCCC
配列番号23	GCAGCGGCACTGGACAAATCTCGCTC
配列番号24	GATTTGTCCAGTGCCGCTGCCGCTCC
配列番号25	CACGGGTCACACCAGCACGAGCAC
配列番号26	GTGCTGGTGTGACCCGTGGGTGTG
配列番号27	GTACACCAACACGAGCACCGCTCC
配列番号28	GTGCTCGTGTTGGTGTGACCCGTGG
配列番号29	CAATGCGGAGAAATTGGCTGGACCGG
配列番号30	CCAGCCAATTTCTCCGCATTGTCCCC
配列番号31	CTTTCTCCGTCAACTACAATACGC
配列番号32	GTAGTTGACGGAGAAAGAACCCG
配列番号33	GTCAACTACGATACGCAGGGGGACTTTG
配列番号34	CCCTGCGTATCGTAGTTGACGGAGAAAG
配列番号35	CTCCTTCACGGCCTCGGGTCGGGTG
配列番号36	CCGAGGCCGTGAAGGAGCCGCTGTAG
配列番号37	CGCTTACCACAGTCAGTGCCAATAG
配列番号38	CACTGACTGTGGTAAGCGTTAAAGTAC
配列番号39	CAGTCAGAGCCAATAGGGATCCTC
配列番号40	CCTATTGGCTCTGACTGTAGTAAGC

[0149] (3) 酵母への形質転換と変異型キシラナーゼの生産

(2) によって作製された変異型キシラナーゼを有する発現ベクターを、Fast-Yeast Transformation Kit (G-Biosciences) を用いて *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 のコンピテントセルに形質転換し、SD-Ura 寒天培地 (0.67% Yeast-nitrogen base without amino acids (ディフコ社)、2% グルコース、0.5% カザミノ酸、0.077% -Ura DO Supplement (クロ

ンテック社)、2%寒天、脱イオン水) 上にて30℃、48時間培養した。
その結果取得した変異体を表6に示す。

[0150] [表6]

変異体名	配列番号	アミノ酸No.	変異前	変異後
TVX01	1	27	Tyr	Phe
	1	29	Asn	Leu
	1	44	Asn	Ser
	1	58	Lys	Arg
ACX01	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	90	Thr	Ser
	2	132	Gln	Arg
	2	154	Leu	Met
	2	174	Ser	Thr
	2	195	Pro	His
	2	197	Ser	Asn
	2	217	Gly	Glu
ACX02	2	30	Ile	Val
	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	154	Leu	Met
ACX03	2	30	Ile	Val
	2	59	Ser	Thr
	2	154	Leu	Met
	2	239	Tyr	His
	2	242	Cys	Ser

[0151] (4) 変異型キシラナーゼの安定性の評価

得られたコロニーをSD-Ura液体培地(4%グルコース、寒天なし、SD-Ura液体培地以外は前記培地組成と同じ)に植え、30℃で24時間前培養した後、2%植菌して48時間本培養し、該変異型キシラナーゼを含む上澄み液を遠心分離後、50℃~55℃で加熱処理し、実施例1に示した測定法によって残存活性を評価した。

[0152] <TVX01>

実施例2-(2)に記した手法により作製した変異型キシラナーゼを50℃で0~72時間熱処理後、実施例1の測定方法により残存活性を測定した。その結果を表7に示す。WTは野生型を、F、L、S、Rは、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、27番目のチロシン残基に相当する

アミノ酸残基がフェニルアラニン、２９番目のアスパラギン残基に相当するアミノ酸残基がロイシン残基、４４番目のアスパラギン残基に相当するアミノ酸残基がセリン残基、５８番目のリジン残基に相当するアミノ酸残基がアルギニン残基への置換を表す。なお、２７番目のチロシン残基に相当するアミノ酸残基がフェニルアラニン残基に置換した変異型キシラナーゼ（表７（e））の作製には、表８に記載の配列番号４１と配列番号４２とのプライマーを用いた。

[0153] [表7]

No.	キシラナーゼ名	熱処理前の 反応初速度 (対WT)	残存活性[%]			
			0時間	24時間	48時間	72時間
(a)	WT	1.00	100%	0%	0%	0%
(b)	FLSR(TVX01)	0.70	100%	97%	86%	75%
(c)	FLR	0.48	100%	84%	74%	55%
(d)	LR	0.66	100%	0%	0%	0%
(e)	F	0.79	100%	0%	0%	0%
(f)	L	0.57	100%	0%	0%	0%
(g)	S	0.99	100%	0%	0%	0%
(h)	R	0.96	100%	0%	0%	0%

[0154] [表8]

配列番号41	CGTGACGTTACCAATGGCCCCGGC
配列番号42	CATTGGTGAACGTCACGCCGCGTG

[0155] 国際公開第２００７／１１５３９１号パンフレット、国際公開第２００１／２７２５２号パンフレット、国際公開第２００５／１０８５６５号パンフレットで示されている熱安定化をもたらすと考えられている特定のアミノ酸残基の置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼは、表７の（d）、（f）及び（h）で示されるとおり、２４時間後に完全に失活した。

また、表７の（e）及び（g）で示されるとおり、２７番目のチロシン残基がフェニルアラニン残基に置換された置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼ又は４４番目のアスパラギン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼについても、２４時間後には完全に失活した。

[0156] しかしながら、２９番目のアスパラギン残基がロイシン残基および５８番

目のリジン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼ（表 7（d））は、27 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換することによって残存活性が向上し、72 時間後も 50% 以上の残存活性を示した（表 7（c））。

さらに前記変異型キシラナーゼの 44 番目のアスパラギン残基をセリン残基に置換することによって、野生型（表 7（a））並の活性を維持したまま、72 時間後も 70% の活性を残していた（表 7（b））。

なお、本発明の 4 重変異点を持つ多くの変異体が TVX01 と同程度の性質を有し、具体的には、4 重変異点を有すると同時に、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、47 番目のグリシン残基がシステイン残基に置換したもの、52 番目のグルタミン残基がリジン残基に置換したもの、59 番目のバリン残基がイソロイシン残基に置換したもの、67 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換したもの、69 番目のアスパラギン残基がイソロイシン残基に置換したもの、80 番目のセリン残基がアラニン残基に置換したもの、97 番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換したもの、105 番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換したもの、109 番目のスレオニン残基がアラニン残基に置換したもの、120 番目のスレオニン残基がアルギニン残基に置換したもの、143 番目のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換したもの、151 番目のアスパラギン残基がセリン残基に置換したもの、161 番目のセリン残基がロイシン残基に置換したもの、186 番目セリン残基がスレオニン残基に置換したものが挙げられる。

[0157] <L 1 5 4 M>

実施例 2-（2）に記した手法により作製した変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターにより、実施例 2-（3）に記した手法により酵母を形質転換し、変異型キシラナーゼ産生酵母を液体培養し、その培養液の上澄みを 50℃ で 24 時間熱処理後、実施例 1 に示す測定方法により残存活性を測定した。

該変異型キシラナーゼの残存活性は50%であった。また、熱処理前の反応初速度についても野生型1に対して該変異型キシラナーゼの方が1.13と高かった。

[0158] <ACX01, ACX02, ACX03>

実施例2-(2)に記した手法により作製した変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸を含む発現ベクターにより、実施例2-(3)に記した手法により酵母を形質転換し、変異型キシラナーゼ産生酵母を液体培養し、その培養液の上澄みを50℃で0~48時間熱処理後、実施例1に示す測定方法により残存活性を測定した。その結果を表9に示す。表中、WTは野生型を示す。

なお、ここで用いた液体培地は、4%のグルコースを含むSD(Uraを含まない)培地である。

[0159] [表9]

No.	キシラナーゼ名	熱処理前の 反応初速度 (対WT)	残存活性[%]			
			0時間	16時間	24時間	48時間
(i)	WT	1.00	100%	0%	0%	0%
(j)	ACX01	2.27	100%	89%	76%	59%
(k)	ACX02	0.92	100%	99%	92%	66%
(l)	ACX03	0.80	100%	85%	79%	61%

[0160] 野生型 *A. cellulolyticus* 由来キシラナーゼは、16時間の熱処理後、完全に失活した(表9(i))。一方、変異型キシラナーゼの残存活性は向上しており、48時間後も50%以上の残存活性を示した(表9(j)、(k)又は(l))。ACX02、ACX03(表9(k)及び(l))は、熱処理前の反応初速度についても野生型とほぼ同等であり、ACX01に至っては野生型の2倍近い活性を示した(表9(j))。

なお、ACX01の変異点すべてを有する多くの変異体がACX01と同程度の性質を示し、具体的には、ACX01が有する変異点以外に、配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列において、133番目のセリン残基がアスパラギン残基に、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換した

ものなどが挙げられる。

また、ACX02についても同様に、その変異点すべてを有する多くの変異体がACX02と同程度の性質を示し、具体的には、ACX02が有する変異点以外に、配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列において、90番目のスレオニン残基がセリン残基に、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に、133番目のセリンがアスパラギン残基に、174番目のセリン残基がスレオニン残基に、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に、217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換したものなどが挙げられる。

さらに、ACX03の変異点すべてを有する多くの変異体がACX03と同程度の性質を示し、具体的には、ACX03が有する変異点以外に、配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列において、176番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換したものなどが挙げられる。

[0161] [比較例]

変異導入によって酵素の耐熱性を向上させる場合、通常は反応の初速度が大幅に低下もしくは完全に失活してしまうことが知られている。本願においても、耐熱性は向上するものの、反応初速度が低下した変異体を得られることがほとんどだった。その一例を表10に示す。WTは野生型を、MTは変異型を表す。

なお、これらの変異体は、実施例2-(2)に記載の手法により作製した。

MT1は、プラスミドYE p-GAPDH p-GAs-TVXを鋳型に、以下表11の配列番号43及び配列番号44と、配列番号45及び配列番号46と、配列番号47及び配列番号48との配列をプライマーとした。

MT2は、プラスミドYE p-GAPDH p-GAs-TVXを鋳型として、以下表11の配列番号7及び配列番号8と、配列番号47及び配列番号48と、配列番号49及び配列番号50との配列をプライマーとした。

MT 3 は、プラスミド Y E p - G A P D H p - G A s - A C X を鋳型として、以下表 1 1 の配列番号 5 1 及び配列番号 5 2 と、配列番号 5 3 及び配列番号 5 4 との配列をプライマーとした。

[0162] 表 1 0 における MT 1 の変異点とは、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、1 3 番目のチロシン残基がフェニルアラニン残基 (T y r 1 3 P h e)、4 7 番目のグリシン残基がシステイン残基 (G l y 4 7 C y s)、1 5 1 番目のアスパラギン残基がセリン残基 (A s n 1 5 1 S e r) に置換されたことを示す。

また、MT 2 の変異点とは、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、4 6 番目のバリン残基がイソロイシン残基 (V a l 4 6 I l e)、5 8 番目のリジン残基がアルギニン残基 (L y s 5 8 A r g)、1 5 1 番目のアスパラギン残基がセリン残基 (A s n 1 5 1 S e r) に置換されたことを示す。

[0163] MT 3 の変異点とは、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、1 0 0 番目のセリン残基がシステイン残基 (S e r 1 0 0 C y s)、1 4 4 番目のアスパラギン残基がシステイン残基 (A s n 1 4 4 C y s) に置換されたことを示す。

[0164] [表10]

キシラーナーゼ名	変異点	残存活性 (対熱処理前)	熱処理前の 反応初速度 (対WT)
		16時間後	熱処理前
WT(T.viride)	-	5%	1.00
MT1(T.viride)	Tyr13Phe +Gly47Cys +Asn151Ser	69%	0.38
MT2(T.viride)	Val46Ile +Lys58Arg +Asn151Ser	39%	0.33
WT(A.cellulolyticus)	-	63%	1.00
MT3(A.cellulolyticus)	Ser100Cys +Asn144Cys	84%	0.25

[0165]

[表11]

配列番号43	CAACAACGGGCTTCTTCTACTGCTACTG
配列番号44	CGAGTAGAAGAAAGCCGTTGTTGAAGCC
配列番号45	CAACTTTGTTGTCGCGGCAAGGGATGG
配列番号46	CCATGCCGTTGCCGCAAGCAAAAGTTG
配列番号47	CTCCGTCAGCAAGGCGGAACCAAC
配列番号48	GTGGTTGCGCCGTTGCTGACGGAG
配列番号49	GCAAGTTTATCGGGCGGCAAGGGATG
配列番号50	CTTGCCGCGCGATAAAGTTGCCCGAG
配列番号51	CACGTGTGACGTTGCGACGCGCGGCGAC
配列番号52	CCGCCGTTGCGACGCTCAGCAGTGCC
配列番号53	CCGTGCAAGTGGCCACTTCAATGCC
配列番号54	CATTGAAGTGGGCACTGCAACGGTAAC

[0166] [実施例3] T. v i r i d e を宿主とした T V X 0 1 及び A C X 0 2 の大量生産

(1) T. v i r i d e を用いた T V X 0 1 の大量生産

(a) プラスミド T V X 0 1 - p C B 1 の構築

実施例2で得られた変異型キシラナーゼ T V X 0 1 をコードする塩基配列を鋳型とし、キシラナーゼ部分の D N A 配列を P C R 法によって取得した。P C R に用いたプライマーは、下記表12の配列番号67及び配列番号68に記載した。

実施例2-(1)(d)で取得した T. v i r i d e 由来キシラナーゼ遺伝子の全長を鋳型とし、シグナル部分の D N A 配列を P C R 法によって取得した。P C R に用いたプライマーは、下記表12の配列番号69及び配列番号70に記載した。

前記シグナル配列部分の D N A 配列ならびにキシラナーゼ部分の D N A 配列を P C R 法により連結し、前記シグナル配列部分の開始コドンの上流の配列に S t u I を、終始コドンの下流に X h o I を含む配列を取得した。

P C R に用いたプライマーは、下記表12の配列番号71及び配列番号72に記載した。増幅された0.7kbpのD N A 断片を、T O P O T A クローニングキット(イノビトロジェン社製)により、添付のプロトコルに従って p C R 2.1-T O P O 発現ベクターに挿入し、プラスミド T O P O -T V X 0 1 を得た。

[0167] [表12]

配列番号67	CAGACGATTGGTCCCGGCACGGGCTTCAACAACGGCTACT
配列番号68	CCCCTCGAGTTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGC
配列番号69	GGGAGGCCTGCGCATCATGGTTTCCTTCACTCCC
配列番号70	GTGCGGGGACCAATCGTCTGGCGCTTTTCAACGTCCACGG
配列番号71	GGGAGGCCTGCGCATCATGGTTTCCTTCACTCCC
配列番号72	CCCCTCGAGTTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGC

- [0168] プラスミド「TOPO-TVX01」をStuIおよびXhoIで切断し、約0.7 kbpの遺伝子断片「TVX01-N」を得た。一方、pCB1-Eg3X-hphless（国際公開第2011/021616号パンフレット）をStuIおよびXhoIで切断し、約7 kbpの断片を回収した。回収した断片に約0.7 kbpの遺伝子断片「TVX01-N」をDNAライゲース（宝酒造社製）で連結し、プラスミド「TVX01-pCB1」を作製した。酵素などの反応条件についてはキットに添付の説明書の条件に従った。プラスミド「TVX01-pCB1」は、宿主の*T. viride* 内にて、自身の開始コドンを用いてTVX01を発現するように構築した。
- [0169] (b) プラスミド「TVX01-pCB1」による*T. viride*の形質転換体の作製 実施例3-(1)-(a)で得られたプラスミド「TVX01-pCB1」による*T. viride*の形質転換は、国際公開第2011/021616号パンフレットに記載の方法に従い、実施した。ウラシル合成遺伝子(*pyr4*)欠損株である*T. viride strain 2*株を宿主とし、選択マーカーとしてニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)の*pyr4*遺伝子を用いたコートランスフォーメーション法により形質転換を実施した。なお、*T. viride strain 2*株は、日本特許第4644603号明細書の段落番号[0102]に記載の方法に従い取得することができる。すなわち、特許第4644603号明細書の段落番号[0102]に記載の通り、トリコデルマ・ビリデMC300-1株(FERM BP-6047)の10⁹CFU/ml程度の孢子懸濁液を、UV灯2灯を30cmの高さで点灯下、穏やかに混和しながら照射した。UV照射後の孢子懸濁液を選択培地に塗布し、28℃で7日間培養し

た。生育した株を選抜し、トリコデルマ・ビリデのウラシル要求株である *T. viride strain 2* 株を取得した。選択培地の組成は、最少培地 [0.2%リン酸2水素1カリウム、0.4%硫酸アンモニウム、0.03%尿素、0.03%硫酸マグネシウム7水和物、0.03%塩化カルシウム、0.5%グルコース、2.5%寒天、0.01%トレースエレメント (5 mg 硫酸鉄7水和物、1.56 mg 硫酸マンガン7水和物、1.4 mg 硫酸亜鉛7水和物、2 mg 塩化コバルトを1 Lの水に溶解したもの)] に10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のウリジン及び1 mg/mLの5-フルオロオロチン酸を添加したものである。

T. viride strain 2 株をプロトプラスト化酵素溶液 (1 mg/mL β -グルクロニダーゼ、0.3 mg/mL キチナーゼ、0.3 mg/mL ザイモリエース、0.5 mol/L シュークロース) に懸濁し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過及び遠心した後、SUTC緩衝液 (0.5 mol/L シュークロース、10 mmol/L 塩化カルシウム、10 mmol/L トリス塩酸 (pH 7.5)) で洗浄した。

[0170] 上記プロトプラストを100 μL のSUTC緩衝液に懸濁し、そこに10 μg 分のプラスミド「TVX01-pCB1」が入ったDNA溶液10 μL とpyr4遺伝子が入ったDNA溶液10 μL とを加え、氷中に5分間静置した。次に400 μL のPEG溶液 (60% PEG4000、10 mmol/L 塩化カルシウム、10 mmol/L トリス塩酸 (pH 7.5)) を加え、氷中に20分間静置した後、10 mLのSUTC緩衝液を加え、遠心分離した。集めたプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁し、200 μL ずつ0.5 mol/L シュークロースを含む最少培地に軟寒天とともに重層し、28°Cで5日間培養後、生育したコロニーを再度最少培地に移植し、ここで形成したコロニーを形質転換体とした。

[0171] (c) 「TVX01-pCB1」の形質転換体の培養および同定

プラスミド「TVX01-pCB1」を導入し最少培地で生育した株を選

抜し、国際公開第98／11239号パンフレットに記載の方法に従い培養した。得られた培養液を遠心し、菌体と培養上清に分離した後、該培養上清をフィルター（孔径：0.2μm）に通してろ過滅菌することにより培養上清液を調製した。この培養上清液を12% Gel SDS-PAGE method（テフコ社製）を用いて電気泳動分離を行い、TVX01のバンドが良好に検出される培養上清を選抜した。選抜した培養上清液を、「大量調製したTVX01」とした。

[0172] (2) T. virideを用いたACX02の大量生産

(a) T. virideでの発現に適したACX02遺伝子コドンの改変
ACX02遺伝子をT. virideにおいて、活性あるタンパク質として高発現させるために、A. cellulolyticusのシグナル配列とACX02遺伝子に計24箇所の塩基の変更を伴うDNAを作成した。表13中、配列名「ACX02」の「塩基の位置」は、配列番号4で示される野生型A. cellulolyticusキメラナーゼ遺伝子の塩基の位置と一致する。また、配列名「A. cellulolyticusシグナル配列」の「塩基の位置」は、配列番号73で示される塩基の位置を示す。

[表13] [0173]

配列名	塩基の位置	変更前	変更後
Acellulolyticusシグナル配列	12	A	C
	42	G	T
ACX02	66	A	C
	90	G	C
	37	A	T
	38	G	C
	39	T	C
	78	T	A
	81	T	C
	106	A	C
	108	G	C
	138	A	C
	279	A	C
	312	A	C
	405	G	C
	474	A	C
	495	A	C
	552	T	C
	573	A	C
	648	G	A
	663	C	G
	718	A	T
	719	G	C
	720	T	C

[0174] この改変ACX02遺伝子は、*T. viride*におけるコドンの使用頻度分布を考慮してデザインしたものである。この改変ACX02遺伝子を、株式会社ジーンデザインで、人工的に合成した。なお人工合成の際、開始コドンの上流の配列にEcoRIとStuIを、終始コドンの下流にXhoIとHindIIIを含むように設計した。pUC19のEcoRI／HindIIIに、コドン改変ACX02遺伝子が挿入されたプラスミド「pACX02」を得た。

[0175] (b) プラスミドACX02－pCB1の構築

プラスミド「pACX02」をStuIおよびXhoIで切断し、約850bpの遺伝子断片「ACX02－N」を得た。一方、pCB1－Eg3X－hphless（国際公開第2011／021616号パンフレット）をStuIおよびXhoIで切断し、約7kbpの断片を回収した。回収した断片に約850bpの遺伝子断片「ACX02－N」をDNAライゲース（宝酒造社製）で連結し、プラスミド「ACX02－pCB1」を作製した。酵素などの反応条件についてはキットに添付の説明書の条件に従った。プラスミド「ACX02－pCB1」は、宿主の*Trichoderma viride*内にて、自身の開始コドンを用いてACX02を発現するように構築した。

[0176] (c) プラスミド「ACX02－pCB1」による*Trichoderma viride*の形質転換体の作製

実施例3－(2)－(b)で得られたプラスミド「ACX02－pCB1」による*Trichoderma viride*の形質転換は、国際公開第2011／021616号パンフレットに記載の方法に従い、実施した。ウラシル生合成遺伝子（*pyr4*）欠損株であるトリコデルマ・ビリデ strain2株を宿主とし、選択マーカーとしてニューロスポラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）の*pyr4*遺伝子を用いたコートランスフォーメーション法により形質転換を実施した。*Trichoderma viride* strain2株をプロトプラスト化酵素溶液（1mg

／mL β -グルクロニダーゼ、0.3 mg／mL キチナーゼ、0.3 mg／mL ザイモリエース、0.5 mol／L シュークロース) に懸濁し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過・遠心した後、SUTC緩衝液(0.5 mol／L シュークロース、10 mmol／L 塩化カルシウム、10 mmol／L トリス塩酸(pH 7.5)) で洗浄した。

上記プロトプラストを100 μ LのSUTC緩衝液に懸濁し、そこに10 μ g分のプラスミド「ACX02-pCB1」が入ったDNA溶液10 μ Lとpyr4遺伝子が入ったDNA溶液10 μ Lを加え、氷中に5分間静置した。次に400 μ LのPEG溶液(60% PEG4000、10 mmol／L 塩化カルシウム、10 mmol／L トリス塩酸(pH 7.5))を加え、氷中に20分間静置した後、10 mLのSUTC緩衝液を加え、遠心分離した。集めたプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁し、200 μ Lずつ0.5 mol／L シュークロースを含む最少培地に軟寒天とともに重層し、28℃で5日間培養後、生育したコロニーを再度最少培地に移植し、ここで形成したコロニーを形質転換体とした。

[0177] (d) 「ACX02-pCB1」の形質転換体の培養および同定

プラスミド「ACX02-pCB1」を導入し最少培地で生育した株を選抜し、国際公開第98／11239号パンフレットに準じて培養した。

得られた培養液を遠心し、菌体と培養上清に分離した後、該培養上清をフィルター(孔径: 0.2 μ m)に通してろ過滅菌することにより培養上清液を調製した。この培養上清液をSDS-PAGEに処し、ACX02のバンドが良好に検出される培養上清を選抜した。選抜した培養上清液を、「大量調製したACX02」とした。

[0178] [実施例4] 温度とpHの変化に伴うTVX01の安定性の推移

実施例3に示した方法によって大量調製したTVX01を用いて、以下に記す実験を行った。200 mMの各種緩衝液(後記)とキシラナーゼを1:1で混合し、各種温度で一定時間処理後、5分間アイスバスに静置した後、実施例1に示す方法にて残存活性を測定した。なお、ここで用いた緩衝液は

、クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）、トリス塩酸緩衝液（pH 8～pH 9）、グリシンナトリウム緩衝液（pH 10）とした。

TVX01は、pH 4.5、50℃において、72時間熱処理後も86%の活性を有した。また、さらに高温である70℃において、pH 5.5（該変異体キシラナーゼ原液のpH）、5分間の熱処理後も68%の活性を有した。いずれの条件においても、野生型は完全に活性を失う条件であり、該変異体は、酸性かつ高温下において残存活性が向上していた。

また、pH 8～pH 10、50℃において60分間の熱処理後、野生型の残存活性は、pH 8で28%、pH 9で8%であり、pH 10においては完全に失活するのに対し、該変異体は、pH 8で83%、pH 9で60%、pH 10においても56%の活性を有した。加えて、野生型が完全に活性を失う60℃、60分間の熱処理後においても、該キシラナーゼは、pH 8で30%、pH 9で17%、pH 10においても10%の活性を有しており、塩基性かつ高温下においても残存活性が向上していた。

[0179] 以上のように、本発明のTVX01は、pH 4.5、pH 8～pH 10、かつ50℃～70℃といった野生型酵素が顕著に失活する条件において、有意な残存活性の向上を示した。

[0180] 〔実施例5〕温度とpHの変化に伴うACX02の安定性の推移

実施例3に示した方法によって大量調製したACX02を用いて、実施例4と同様に実験を行った。

大量調製したACX02は、pH 4.5、50℃において、72時間熱処理後も84%の活性を有した。同様に処理した野生型のキシラナーゼは、45%まで活性が低下しており、該変異型キシラナーゼは野生型と比して、酸性かつ高温下において残存活性が向上していた。

また、pH 8～pH 10、50℃において60分間の熱処理後、野生型は完全に活性を失ったのに対し、ACX02は、pH 8で34%、pH 9で5%、pH 10においても2%の活性を有しており、塩基性かつ高温下においても残存活性が向上していた。

以上のように、本発明のACX02は、pH4.5、pH8～pH10、かつ50℃といった野生型が顕著に失活する条件において、有意な残存活性の向上を示した。

[0181] [実施例6] リグノセルロース原料の糖化反応（1）

三角フラスコに乾燥重量2gの広葉樹クラフトパルプ（LBKP）を入れた後、実施例3の方法によって大量調製したACX02、TVX01、実験対照として*T. viride*由来の野生型キシラナーゼ及び*A. cellulolyticus*由来の野生型キシラナーゼを含むセルラーゼ水溶液をそれぞれ蛋白質重量で52mg相当ずつ該三角フラスコに加え、20mMのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）を注入して20gの反応液を調製し、シリコン栓で密閉した。その後、50℃にて緩やかに攪拌して糖化反応を行った。その結果を表14に示す。WTは野生型キシラナーゼを表す。

[0182] [表14]

No.	キシラナーゼ名	残存活性[%]
(m)	WT(<i>T.viride</i>)	27
(n)	TVX01	90
(o)	WT(<i>A.cellulolyticus</i>)	35
(p)	ACX02	90

[0183] 72時間経過後、*A. cellulolyticus*由来および*T. viride*由来の野生型キシラナーゼの残存活性が30%前後まで低下していたのに対し（表14（m）、（o））、大量調製したACX02及び大量調製したTVX01は90%以上の残存活性を示していた（表14（n）、（p））。

[0184] [実施例7] リグノセルロース原料の糖化反応（2）

（1）糖化反応

セパラブルフラスコに乾燥重量40gの広葉樹クラフトパルプ（LBKP）を入れた後、実施例3の方法によって大量調製したTVX01、ACX02を含むセルラーゼ水溶液をそれぞれ蛋白質重量で347mg相当ずつ該セパラブルフラスコに加え、20mMのクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）を注入して400gの反応液を調製した。その後、50℃にて緩やかに

攪拌して糖化反応を行い、72時間反応後の生成単糖量をHPLCにて分析した。

＜HPLC分析条件＞

分析機器： 日本分光HPLC

カラム： ULTRON PS-80H (300×8mm；信和化工株式会社製)

分析温度： 50℃

移動相： 過塩素酸水溶液 pH2.1

[0185] (2) 酵素の回収

この糖化反応液(72時間反応液)を7000×gで遠心した沈殿物を回収した。一方の遠心上清液を市販のUF膜(商品名；マイクロザUFペンシル型モジュールAIP-0013D、旭化成ケミカルズ株式会社製)にて処理し、濃縮画分を得た。

[0186] (3) 回収した酵素を用いた再糖化反応

セパラブルフラスコに、上記糖化反応液の7000×g遠心沈殿物と、UF膜処理にて得られた濃縮画分を装入し、広葉樹クラフトパルプ(LBK P)を終固形分として40gとなる様に加え、50℃にて緩やかに攪拌して糖化反応を行い、72時間反応後の生成単糖量をHPLCにて分析した。

[0187] (4) 糖化反応結果

最初の反応(酵素再利用0回目)を始めて72時間後、TVX01を含む糖化反応液中のグルコース及びキシロースの蓄積濃度は79.1g/Lであった。そのうち、グルコースの蓄積濃度は65.1g/Lであった。一方、野生型のT. viride由来キシラナーゼを含む糖化反応液中のグルコース及びキシロースの蓄積濃度は78.0g/L、グルコースの蓄積濃度は64.7g/Lであった。同様に、ACX02を含む糖化反応液中では、グルコース及びキシロースの蓄積濃度は61.3g/L、グルコースの蓄積濃度は49.9g/Lであった。これらの糖化反応液中の酵素を、前記の方法によって糖化反応に再利用した。

[0188] 再利用1回目のグルコース及びキシロースの蓄積濃度は、TVX01を含む糖化反応液で70.7 g/L、野生型のT. viride由来キシラナーゼを含む糖化反応液で53.3 g/L、ACX02を含む糖化反応液中で53.1 g/Lだった。

再利用1回目のグルコースの蓄積濃度は、TVX01を含む糖化反応液で58.7 g/L、野生型のT. viride由来キシラナーゼを含む糖化反応液で45.0 g/L、ACX02を含む糖化反応液中で43.5 g/Lだった。

[0189] 再利用2回目のグルコースとキシロースの蓄積濃度は、TVX01を含む糖化反応液で63.6 g/L、野生型のT. viride由来キシラナーゼを含む糖化反応液で42.3 g/L、ACX02を含む糖化反応液中で42.6 g/Lだった。

再利用2回目のグルコースの蓄積濃度は、TVX01を含む糖化反応液で53.0 g/L、野生型のT. viride由来キシラナーゼを含む糖化反応液で35.8 g/L、ACX02を含む糖化反応液中で34.6 g/Lだった。

得られた結果を再利用0回目の糖蓄積濃度を100%としたときの相対値で表す。その結果を表15及び表16に示す。なお、WTは野生型キシラナーゼを表す。

[0190] [表15]

		グルコース及びキシロースの蓄積濃度(相対値)		
No.	キシラナーゼ名	0回目	1回目	2回目
(m)	WT(T.viride)	100	68	54
(n)	TVX01	100	89	80
(p)	ACX02	100	87	70

[0191] [表16]

		グルコースの蓄積濃度 (相対値)		
No.	キシラナーゼ名	0回目	1回目	2回目
(m)	WT(T.viride)	100	70	55
(n)	TVX01	100	90	81
(p)	ACX02	100	87	69

[0192] 表15に示すように、酵素を再利用した糖化反応において、本発明の変異

型キシラナーゼTVX01およびACX02が好適に利用できることが明らかとなった。

また、表16に示すように、本発明の変異型キシラナーゼを用いることで、キシロースの生産性だけでなく、グルコースの生産性も向上できることが明らかになった。

加えて、針葉樹由来パルプ（NBKP）に本発明のTVX01およびACX02を用いても、前記同様の効果が得られた。

[0193] 〔実施例8〕パルプの漂白方法

（1）パルプのキシラナーゼ処理

パルプとして、市販の牛乳パックを用いる。牛乳パックの原料は、針葉樹の間伐材や製材されたときに出る端材等であり、着色成分であるリグニンを含むバージンパルプである。

よく洗った牛乳パックを5cm角程度に裁断し、2日～5日程度の間、水に浸ける。その後、表面のポリエチレンフィルムをはがす。

前紙片を浸した水を50℃に加熱し、本発明の変異型キシラナーゼTVX01および変異型キシラナーゼACX02を添加する。また、比較対象として、それぞれの野生型のキシラナーゼでも同様に処理する。ここで使用するキシラナーゼは、いずれも糸状菌由来のものとする。キシラナーゼの添加量は、最適な配合比となるよう検討する。また、処理時間も最適となるよう検討する。加えてキシラナーゼ処理しないものも準備する。

[0194] その後、市販の塩素系漂白剤を加え、pH7～pH10において、前記の紙片を半日間静置する。よく水洗いした後、細かくちぎり、適量の水と同時に家庭用のミキサーで紙片が見えなくなるまで攪拌する。

市販の紙すき器を用いて前記繊維を紙状に加工し、水分を除いた後、乾燥させる。

[0195] （2）白色度の測定

紫外可視分光白色度計で、前記で作成された紙の白色度（JIS Z 8715）を測定する。

(3) 本発明の変異型キシラナーゼTVX01および変異型キシラナーゼACX02を添加した場合には、pH7～pH10の条件下においてもパルプを漂白できる。

[0196] 〔実施例9〕洗剤

(1) 毛羽立ち布の洗浄

洗濯の対象には、毛羽立たせた古い布地を用いる。また、洗剤としては、市販の洗剤に、本発明の変異型キシラナーゼTVX01または変異型キシラナーゼACX02を添加したものを使用する。また、比較対象として、それぞれの野生型のキシラナーゼでも同様に処理する。ここで使用するキシラナーゼは、いずれも糸状菌由来のものとする。加えてキシラナーゼ処理しないものも準備する。キシラナーゼの添加量は、最適な配合比となるよう検討する。添加するタイミングは、洗剤を投入するのと同様になるようにする。

[0197] 1Lのセパラブルフラスコ中に800mlの水を入れ、前記洗剤とキシラナーゼを添加し、60rpmで回転させながら、pH7～pH10、50℃で、1時間の洗浄を行う。その後、自然乾燥させる。

[0198] (2) 毛羽立ち除去度の測定

実体顕微鏡で毛羽立ちの除去具合を観察する。また、分光測色計を用いて洗浄後の布地の毛羽立ち除去度を測定する。

(3) 本発明の変異型キシラナーゼTVX01および変異型キシラナーゼACX02を添加した場合には、pH7～pH10、温度50℃の条件下において毛羽立ちを抑制する。

[0199] 〔実施例10〕動物飼料

(1) 動物飼料の製造

実験動物用粉末飼料に、本発明の変異型キシラナーゼTVX01または変異型キシラナーゼACX02を添加する。また、比較対象として、それぞれの野生型のキシラナーゼでも同様に処理する。ここで使用するキシラナーゼは、いずれも糸状菌由来のものとする。加えてキシラナーゼ処理しないものも準備する。キシラナーゼの添加量は、最適な配合比となるよう検討し、混

合物をペレット化する。

[0200] (2) 成型後動物飼料中の細胞壁分解度の測定

成型した動物飼料を一晩静置した後、市販のカミソリの刃でスライスし、プレパラート上でグラム染色を行い、光学顕微鏡で細胞壁の染色度を観察する。また、一晩静置した動物飼料を、100 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に激しく混合し、5000×gで15分間遠心した後、上澄み液を分取し、上澄み液に含まれる還元糖の量をDNS法 (Bailey等、1992) によって測定する。

[0201] [実施例11] 製パン改質剤

(1) パンの製造

ストレート法により、パンの製造を行う。原料の配合は、以下の表17に示すとおりである。すべて一般に市販されている家庭用の材料を用いる。

[0202] [表17]

原料名	配合量(g)
強力粉	320
牛乳	100
バター	25
ドライイースト	4
塩	5
砂糖	20

[0203] 製パン改質剤として、本発明の変異型キシラナーゼTVX01または変異型キシラナーゼACX02を添加する。また、比較対象として、それぞれの野生型のキシラナーゼでも同様に処理する。

添加するタイミングは、原料を混合するのと同時にする。キシラナーゼの添加量は、最適な配合比となるよう検討する。また、キシラナーゼ処理しないものも準備する。

出来上がったドウは、約37℃でおよそ2倍の大きさになるまで約1時間～2時間をかけて醗酵させた。その後、電子レンジで焼成する。

[0204] (2) パンの粒子構造観察

焼成したパンを市販のカミソリの刃でスライスし、実体顕微鏡により粒子構造を観察する。

(3) ローフ体積の測定

焼成したパンを一晚静置後、菜種置換法により、焼成したパンのローフ体積を測定する。

(4) 本発明の変異型キシラナーゼTVX01および変異型キシラナーゼA C×02を添加した場合には、発酵工程における35℃～40℃で1時間から2時間の条件下において、安定して反応しうるものである。

[0205] 2011年11月25日出願の日本国出願番号第2011-257389号及び2012年4月24日出願の日本国出願番号第2012-099096号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] リグノセルロース原料と熱安定性キシラナーゼとを接触させることを含むリグノセルロースの糖化物製造方法。
- [請求項2] 前記リグノセルロース原料がパルプである、請求項1に記載の糖化物製造方法。
- [請求項3] 請求項1又は請求項2に記載の糖化物製造方法により得られたリグノセルロースの糖化物を含む糖化反応液から、熱安定性キシラナーゼを回収することと、回収された熱安定性キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させて糖化物を製造することと、を含む糖化物製造方法。
- [請求項4] 前記糖化反応液を遠心分離または精密濾過膜で固液分離し、分離した液体を限外濾過膜で限外濾過することにより、リグノセルロースの糖化物と前記熱安定性キシラナーゼとを分離、回収する、請求項3に記載の糖化物製造方法。
- [請求項5] 前記遠心分離または精密濾過膜で固液分離した固体および限外濾過膜で回収された熱安定性キシラナーゼと、リグノセルロース原料とを接触させて糖化物を製造する、請求項4に記載の糖化物製造方法。
- [請求項6] 前記熱安定性キシラナーゼが、対応する野生型キシラナーゼと比較して、反応の初速度が70%以上であり、50℃及び24時間の熱処理後のキシラナーゼ活性が熱処理前のキシラナーゼ活性に比べて50%以上であり、かつ置換アミノ酸残基を有する変異型キシラナーゼである請求項1から請求項5のいずれか一項に記載の糖化物製造方法。
- [請求項7] 前記変異型キシラナーゼが、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列において、29番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、58番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、27番目のチロシン残基がチロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換され、且つ44番目のアスパラギン残基がアスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも有する変異

型キシラナーゼである請求項6に記載の糖化物製造方法。

[請求項8] 前記変異型キシラナーゼの27番目のチロシン残基と置換される、チロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であり、且つ44番目のアスパラギン残基と置換される、アスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基がセリン残基である変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる請求項7に記載の糖化物製造方法。

[請求項9] 前記変異型キシラナーゼが、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、少なくとも154番目のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基に置換されている変異型キシラナーゼである請求項6に記載の糖化物製造方法。

[請求項10] 前記変異型キシラナーゼの、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、90番目のスレオニン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、174番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる請求項9に記載の糖化物製造方法。

[請求項11] 前記変異型キシラナーゼの、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残

基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる請求項 9 に記載の糖化物製造方法。

[請求項12] 前記変異型キシラナーゼの、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、59番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、239番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び242番目のシステイン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる変異型キシラナーゼを糖化物製造に用いる請求項 9 に記載の糖化物製造方法。

[請求項13] 配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、29番目のアスパラギン残基がロイシン残基に置換され、58番目のリジン残基がアルギニン残基に置換され、27番目のチロシン残基がチロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換され、且つ44番目のアスパラギン残基がアスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも有する変異型キシラナーゼ。

[請求項14] 配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、27番目のチロシン残基と置換される、チロシン残基とは異なる他のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基であり、且つ44番目のアスパラギン残基と置換される、アスパラギン残基とは異なる他のアミノ酸残基がセリン残基である請求項 13 に記載の変異型キシラナーゼ。

[請求項15] 配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、少なくとも154番目のロイシン残基が、他のアミノ酸残基に置換されている変異型キシラナーゼ。

[請求項16] 配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、90番目のスレオニン残基がセリン残基に置換された置換アミ

ノ酸残基、132番目のグルタミン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、174番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、195番目のプロリン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、197番目のセリン残基がアスパラギン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び217番目のグリシン残基がグルタミン酸残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる請求項15に記載の変異型キシラナーゼ。

[請求項17] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、33番目のアスパラギン残基がアスパラギン酸残基に置換された置換アミノ酸残基、36番目のグリシン残基がアルギニン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる請求項15に記載の変異型キシラナーゼ。

[請求項18] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列において、30番目のイソロイシン残基がバリン残基に置換された置換アミノ酸残基、59番目のセリン残基がスレオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、154番目のロイシン残基がメチオニン残基に置換された置換アミノ酸残基、239番目のチロシン残基がヒスチジン残基に置換された置換アミノ酸残基、及び242番目のシステイン残基がセリン残基に置換された置換アミノ酸残基を少なくとも含んでいる請求項15に記載の変異型キシラナーゼ。

[請求項19] 請求項13から請求項18のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列で示される核酸。

[請求項20] 請求項19に記載の核酸を含む発現ベクター。

[請求項21] 請求項20に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

[請求項22] 大腸菌、枯草菌、酵母、放線菌又は糸状菌由来の細胞を宿主細胞と

する請求項 2 1 に記載の形質転換体。

[請求項23] 前記糸状菌が、*Trichoderma* 属、*Acremonium* 属、*Humicola* 属又は *Aspergillus* 属に属する請求項 2 2 に記載の形質転換体。

[請求項24] 前記糸状菌が、*Trichoderma viride*、*Acremonium cellulolyticus*、*Humicola insolens* 又は *Aspergillus niger* である請求項 2 2 又は請求項 2 3 に記載の形質転換体。

[請求項25] 請求項 2 1 から請求項 2 4 のいずれか一項に記載の形質転換体を培養し、培養された形質転換体及び該形質転換体の培養物のうち少なくともいずれか一方から、請求項 1 3 から請求項 1 8 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼを回収することを含む変異型キシラナーゼの製造方法。

[請求項26] 請求項 2 5 に記載の製造方法によって製造された変異型キシラナーゼ。

[請求項27] 請求項 1 3 から請求項 1 8 及び請求項 2 1 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼを含有する組成物。

[請求項28] 請求項 1 3 から請求項 1 8 及び請求項 2 1 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼと、パルプとを接触させることを含むパルプの漂白方法。

[請求項29] 請求項 1 3 から請求項 1 8 及び請求項 2 1 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼを含む洗剤。

[請求項30] 請求項 1 3 から請求項 1 8 及び請求項 2 1 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼを含む動物飼料。

[請求項31] 請求項 1 3 から請求項 1 8 及び請求項 2 1 のいずれか一項に記載の変異型キシラナーゼを含む製パン改質剤。