

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-513207

(P2012-513207A)

(43) 公表日 平成24年6月14日(2012.6.14)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/24 (2006.01)		C 1 2 N	9/24 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 A	4 B O 5 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2011-542679 (P2011-542679) (86) (22) 出願日 平成21年12月23日 (2009.12.23) (85) 翻訳文提出日 平成23年8月18日 (2011.8.18) (86) 国際出願番号 PCT/DK2009/050352 (87) 国際公開番号 W02010/072225 (87) 国際公開日 平成22年7月1日 (2010.7.1) (31) 優先権主張番号 08172755.4 (32) 優先日 平成20年12月23日 (2008.12.23) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (31) 優先権主張番号 61/146,170 (32) 優先日 平成21年1月21日 (2009.1.21) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 508122275 ダニスコ・アクティーゼルスカプ D a n i s c o A / S デンマーク、デーコーー１００１コペンハーゲン・コー、パー・オー・ボックス１７、ランゲブロジーゼ１番 (74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄 (74) 代理人 100084146 弁理士 山崎 宏 (74) 代理人 100122301 弁理士 富田 憲史 (74) 代理人 100127638 弁理士 志賀 美苗
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キシラナーゼ活性を有するポリペプチド

(57) 【要約】

ふすま可溶化および／またはキシラナーゼ活性を増加させるために修飾されたキシラナーゼ活性を有するポリペプチド。修飾は、位置１２または１３の１つまたはそれ以上のアミノ酸修飾と、位置１５、３４、５４、７７、８１、８２、９９、１０４、１１０、１１３、１１４、１１８、１２２、１４１、１５４、１５９、１６２、１６４、１６６、１７５または１７９の１つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾との組み合わせを含み、該位置は、枯草菌キシラナーゼ（配列番号１）の位置に対応する位置として決定される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キシラナーゼ活性を有し、配列番号 1 - 22 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75% 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

i) 12 および 13 から選択される位置において 1 または 2 つのアミノ酸修飾、および
ii) 15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175 および 179 から選択される位置において 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号 1 に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチド。

10

【請求項 2】

12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175 および 179 からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【請求項 3】

12F、13Y、15Y、34K、77V、77M、77Y、77L、77S、81I、82I、99Y、104W、110A、113D、113A、114F、114D、114Y、118V、122F、122D、154R、159D、162E、162D、164F、166F、175L、175K、175E、175Y および 179Y からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む請求項 1 - 2 のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

20

【請求項 4】

G12F、G13Y、I15Y、G34K、I77V、I77M、I77Y、I77L、I77S、V81I、V82I、K99Y、T104W、T110A、Y113D、Y113A、N114F、N114D、N114Y、I118V、R122F、R122D、K154R、N159D、S162E、S162D、164F、Y166F、Q175L、Q175K、Q175E、Q175Y および S179Y からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む請求項 1 - 3 のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

30

【請求項 5】

配列番号 1 - 22 から選択される最も高い同一性パーセントを有する配列と少なくとも 76、78、80、85、90、95、98 または 95% 同一性を有する、請求項 1 - 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 6】

- ゼリーロール折り畳みを有する、請求項 1 - 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 7】

12 および 13 から選択される位置における 1 または 2 つのアミノ酸修飾がアミノ酸置換である、請求項 1 - 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

40

【請求項 8】

位置 12 におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか 1 つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換である、請求項 1 - 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 9】

位置 13 におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン

50

、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換である、請求項1 - 8のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項10】

位置12におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換である、請求項1 - 9のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項11】

位置13におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換である、請求項1 - 10のいずれかに記載のポリペプチド。

10

【請求項12】

全250未満のアミノ酸、例えば、240未満、例えば、230未満、例えば、220未満、例えば、210未満、例えば、200未満のアミノ酸、例えば、160から240の範囲、例えば、160から220の範囲のアミノ酸を有する、請求項1 - 11のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項13】

アミノ酸位置12、13、34、77、81、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166および175のいずれか1つまたはそれ以上で1つまたはそれ以上の修飾を含む請求項1 - 12のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

20

【請求項14】

12F、13Y、13F、110A、122D、113A、13Y、113D、175L、122F、34K、99Y、104W、154R、159D、175K、81I、166F、162E、162D、164F、114D、114Y、114F、118V、175K、77L、77M、77S、77Vおよび77Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む請求項1 - 13のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

30

【請求項15】

G12F、G13Y、G13F、T110A、R122D、Y113A、G13Y、Y113D、Q175L、R122F、G34K、K99Y、T104W、K154R、N159D、Q175K、V81I、Y166F、S162E、S162D、W164F、N114D、N114Y、N114F、I118V、I77L、I77M、I77S、I77VおよびI77Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む請求項1 - 14のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドおよびその使用に関する。本発明は、また、キシラナーゼ活性および/またはふすま可溶化に影響を及ぼす、好ましくは増加させるために、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドを修飾する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

長年、エンド - 1, 4 - キシラナーゼ (EC 3.2.1.8) (本明細書におい

50

てキシラナーゼと称する)は、植物細胞壁原料由来の複合炭水化物の修飾のために使用されている。(異なる微生物または植物由来の)異なるキシラナーゼの機能性は非常に異なっていることが当分野でよく知られている。構造および遺伝情報に基づいて、キシラナーゼは、種々のグリコシドヒドロラーゼファミリー(GH)に分類されている(Henrissat, 1991; Coutinho and Henrissat, 1999)。最近まで、全ての知られており、特徴付けられているキシラナーゼは、ファミリーGH10またはGH11に属していた。最近の研究によって、ファミリーGH5、GH7、GH8およびGH43に属するキシラナーゼの多数の他の型が同定された(Coutinho and Henrissat, 1999; Collinsら., 2005)。今までのところ、GH11ファミリーは、他の全てのGHと異なっており、キシラン特異的キシラナーゼのみからなる唯一のファミリーである。GH11キシラナーゼの構造は、ゼリーロール(jelly roll)構造として描写することができる(本明細書の図1参照)。

【0003】

US6,682,923は、キシラナーゼ活性タンパク質および核酸に関する。

【0004】

キシラナーゼの機能性を特徴付ける包括的な研究は、よく特徴付けられた純粋な基質上で行われている(Kormelinkら., 1992)。これらの研究は、異なるキシラナーゼがアラビノキシラン(AX)のキシロース骨格の置換に関して、異なる特定の要件を有することを示す。いくつかのキシラナーゼは、キシロース骨格を加水分解するために3つの置換されていないキシロース残基を必要とし;他のものは1または2つのみ必要とする。特異性におけるこれらの相違の理由は、回りまわってキシラナーゼの一次構造、すなわちアミノ酸配列に依存する触媒ドメイン内の三次元構造によると考えられる。しかしながら、今までに、キシラナーゼが複合環境、例えば、植物原料において作用する場合の、アミノ酸配列におけるこれらの相違のキシラナーゼの機能性における相違への翻訳は、証明されていない。

【0005】

小麦(小麦粉)において見出されたキシラナーゼ基質は、従来、2つの画分、すなわち、水で抽出不可能なAX(WU-AX)および水で抽出可能なAX(WE-AX)に分けられている。WU-AX:WE-AX比は、小麦粉において約70:30である。なぜAXに2つの異なる画分があるのかに関しては、多数の解釈が存在している。古い文献(D'Appolonia and MacArthur (1976) and Montgomery and Smith (1955))は、WE-AXとWU-AX間の置換の程度の極めて大きい違いを記載している。最も高い程度の置換が、WE-AXにおいて見出された。なぜいくつかのAXが抽出可能であるかを説明するために、これが使用された。低い置換の程度と比較して、高い程度の置換は、ポリマーを可溶性にし、それは、ポリマー間の水素結合および結果として沈降を引き起こした。

【0006】

異なるキシラナーゼの機能性間の違いは、キシラナーゼ特異性における違い、それによるWU-AXまたはWE-AX基質の選択によると考えられている。

【0007】

しかしながら、さらに最近の文献は、WE-AXとWU-AX間の置換の程度の同様の大きな違いを見つけていない。したがって、キシラナーゼ基質特異性よりも他のパラメーターが重要であり得る。これらのパラメーターは、古典的な基質特異性以外の方法により決定される、WE-AX対WU-AXのキシラナーゼ選択であり得る。このパラメーターは、基質選択性として文献において記載されているのを見ることができる。

【0008】

いくつかの適用(例えば、ベーカリー)において、WU-AX分画から高分子量(HMW)可溶性ポリマーを生産することが望ましい。このようなポリマーは、パン製造における容量増加と相関している(Rouau, 1993; Rouauら., 1994 and Courtinら., 1999)。

【0009】

他の適用において、WU-AXおよびWE-AXの両方を修飾して、WU-AXを可溶化し、分子量をより小さくし、それらの親水コロイド効果を減少させ、アラビノキシラン

10

20

30

40

50

オリゴ糖を生産し、他の細胞壁成分のさらなる分解を容易にする（例えば、クラッカー生産、穀穀粉分離、飼料適用、バイオエタノール生産、プレバイオティクスなどにおいて）ことが望ましい。

【0010】

種々の適用において使用されるキシラナーゼのすべての上記特性は、キシラナーゼ性能に向けられ、必要な機能性を成し遂げるために非常に重要である。しかしながら、特定の適用のための正しい特性を有するか、またはそれを成し遂げるために既知のキシラナーゼを操作するキシラナーゼの選択は、しばしば、効率の悪いキシラナーゼ分子、例えば、低い触媒活性（すなわち、分子ユニット/mgキシラナーゼタンパク質により特徴付けられる比活性）を有する分子をもたらす。これらの分子は商業的適用において使用されるべきであるため、できるだけ高い触媒活性を有することが非常に重要である。この特性の改良は、農業副産物、例えば、穀物ふすまの使用の増加またはセルロース性バイオエタノール生産における使用によって、将来的にこれらの酵素の商業的適用を成し遂げるために、ますます重要となるであろう。

10

【発明の概要】

【0011】

発明の概要

本発明は、配列番号1に示される枯草菌(*B. subtilis*)キシラナーゼポリペプチド配列と比較して、12および13から選択される位置の1または2つのアミノ酸修飾と、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置の1つまたはそれ以上のアミノ酸修飾との組み合わせでキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを修飾することにより、該酵素のふすま可溶化および/またはキシラナーゼ活性を増加させることが可能であるという驚くべき結果を前提とする。

20

【0012】

したがって、増加したキシラナーゼ活性および/またはふすま可溶化を有するキシラナーゼポリペプチドを生産することが可能であることが、本発明者らにより示されている。これは、例えば、セルロース系バイオエタノール生産に関連する穀物加工中にヘミセルロース性画分を加水分解することを可能にさせるか、または多くの適用、例えば、動物飼料、デンプン液化、ベーカリー、穀粉分離（湿潤製粉）、プレバイオティクスの生産および紙パルプ生産に必要なキシラナーゼの量の減少を可能にさせる。

30

【0013】

第1の局面において、本発明は、キシラナーゼ活性を有し、配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

i) 12および13から選択される位置において1または2つのアミノ酸修飾、および
ii) 15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置において1つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号1に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチドに関する。

40

【0014】

第2の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドを同定する方法であって、
(i) 配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一性を有するポリペプチドであって、12および13から選択される位置において1または2つのアミノ酸修飾、および15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置において1つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾のアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号1に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチドを製造し、

50

(i i) 該ポリペプチドのふすま可溶化および／またはキシラナーゼ活性を、最も高い同一性パーセントを有する配列番号 1 - 22 から選択されるアミノ酸配列のふすま可溶化および／またはキシラナーゼ活性と比較し、

(i i i) 最も高い同一性パーセントを有する配列番号 1 - 22 から選択されるアミノ酸配列と比較して、改良されたふすま可溶化および／または改良されたキシラナーゼ活性を有する該ポリペプチドを選択する

ことを含む方法に関する。

【 0 0 1 5 】

第 3 の局面において、本発明は、本発明のポリペプチドを製造する方法であって、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させ、所望により発現後のポリペプチドを単離および／または精製することを含む方法に関する。

10

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、示される位置のポリペプチドアミノ酸配列またはポリペプチドアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列における示される位置のアミノ酸残基をコードするコドンのいずれかを修飾することにより製造され、示される位置は配列番号 1 に示される枯草菌キシラナーゼ配列を基準に決定される。

【 0 0 1 7 】

さらなる局面において、本発明は、キシラナーゼ活性を有し、配列番号 1 - 22 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 75 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

20

i) 12 および 13 から選択される位置において 1 または 2 つのアミノ酸修飾、および
i i) 15、34、54、77、81、82、99、104、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175 および 179 から選択される位置において 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号 1 に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチドに関する。

【 0 0 1 8 】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

30

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている細胞に関する。

【 0 0 1 9 】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている宿主生物に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドを含む組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明の方法にしたがって同定されるポリペプチドを含む組成物に関する。

40

【 0 0 2 0 】

さらなる局面において、本発明は、本発明にしたがって製造されるポリペプチドを含む組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを含む組成物に関する。

【 0 0 2 1 】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配

50

列で形質転換されている細胞を含む組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターを含む組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、非毒性成分と混合された本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列または本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換されている生物を含む組成物に関する。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物を含むドー(dough)に関する。

10

【0023】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物または本発明のドーを含むベーカリー産物に関する。

【0024】

さらなる局面において、本発明は、本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物を含む動物飼料に関する。

20

【0025】

さらなる局面において、本発明は、キシラナーゼを含む洗浄組成物に関する。いくつかの態様において、洗浄組成物は洗濯洗剤組成物であるが、他の態様において、洗浄組成物は食器用洗剤である。いくつかのさらなる態様において、食器用洗剤は自動食器洗い用洗剤である。いくつかのさらなる態様において、キシラナーゼを含む洗浄組成物は、1つ以上のさらなる酵素をさらに含む。いくつかの態様において、さらなる酵素は、ヘミセルラーゼ、セルラーゼ、ペルオキシダーゼ、プロテアーゼ、キシラナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、エステラーゼ、クチナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、ケラチナーゼ、レダクターゼ、オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、リボキシゲナーゼ、リグニナーゼ、プルナーゼ、タンナーゼ、ペントサナーゼ(pentosanase)、マラーゼ(malase)、 α -グルカナーゼ、アラビノシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ、ラッカーゼおよびアミラーゼ、またはそれらの混合物から選択される。いくつかの態様において、酵素の組合せの使用が見出される(すなわち、「カクテル」)。

30

【0026】

さらなる局面において、本発明は、植物細胞壁を分解または修飾する方法であって、該植物細胞壁を本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物と接触させることを含む方法に関する。

40

【0027】

さらなる局面において、本発明は、植物原料を処理する方法であって、該植物原料を本発明のいずれか1つのポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物と接触させることを含む方法に関する。

【0028】

さらなる局面において、本発明は、植物原料を修飾する方法における本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造さ

50

れるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物の使用に関する。

【 0 0 2 9 】

さらなる局面において、本発明は、ベーキング、穀類加工、デンプン液化、セルロース性原料からのバイオエタノールの生産、動物飼料、木材加工、木材パルプの漂白の強化のいずれか1つまたはそれ以上における、本発明のポリペプチドまたは本発明にしたがって同定されるポリペプチドまたは本発明にしたがって製造されるポリペプチドまたは本発明のヌクレオチド配列または本発明のベクターまたは本発明の細胞または非毒性成分と混合された本発明の生物または本発明の組成物の使用に関する。

10

【 0 0 3 0 】

さらなる局面において、本発明は、実施例および図面を基準に、実質的に上記のポリペプチドまたはフラグメントに関する。

さらなる局面において、本発明は、実施例および図面を基準に、実質的に上記の方法に関する。

【 0 0 3 1 】

さらなる局面において、本発明は、実施例および図面を基準に、実質的に上記の組成物に関する。

さらなる局面において、本発明は、実施例および図面を基準に、実質的に上記の使用に関する。

20

【 0 0 3 2 】

図面の簡単な説明

参照として、以下の図面を本明細書に包含させる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】 図 1 は、枯草菌(*Bacillus subtilis*) X y n A 変異体キシラナーゼ (T 1 1 0 A) (黒色)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*) X y n 2 変異体キシラナーゼ (T 1 2 0 A) (濃い灰色) およびサーモミセス・ラヌギノサス(*Thermomyces lanuginosus*) X y n A 変異体キシラナーゼ (T 1 2 0 A) (薄い灰色) を重ね合わせたものを示す。T 1 1 0 および T 1 2 0 のそれぞれの変位した残基を強調する。

30

【 図 2 】 図 2 は、多数のアラインメントに対するデフォルトパラメーター(ギャップオープンペナルティ: 10 og ギャップ伸長ペナルティ 0.05)を用いる A l i g n X プログラム (v e c t o r N T I s u i t e の一部) における配列番号 1 - 2 2 の複数の配列アラインメントを示す。配列の左の数は配列番号を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 4 】

発明の詳細な説明

キシラナーゼ酵素は、植物、真菌および細菌を含む約 1 0 0 の異なる生物から報告されている。キシラナーゼ酵素は、グリコシルヒドロラーゼ酵素の 4 0 種以上のファミリーのいくつかに分類される。キシラナーゼ、マンナーゼ、アミラーゼ、 - グルカナーゼ、セルラーゼおよび他のカルボヒドロラーゼを含むグリコシルヒドロラーゼ酵素は、触媒部位のアミノ酸配列、三次元構造および形状のような特性に基づいて分類される (Gilkes ら., 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315)。

40

【 0 0 3 5 】

1 つの局面において、本発明は、キシラナーゼ活性を有し、配列番号 1 - 2 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と比較して、少なくとも 3、例えば、5、6、7、8、9 または 1 0 個のアミノ酸置換を含むポリペプチドであって、

i) 1 2 および 1 3 から選択される位置において 1 または 2 つのアミノ酸修飾、および
i i) 1 5、3 4、5 4、7 7、8 1、8 2、9 9、1 0 4、1 1 0、1 1 3、1 1 4、
1 1 8、1 2 2、1 4 1、1 5 4、1 5 9、1 6 2、1 6 4、1 6 6、1 7 5 および 1 7

50

9 から選択される位置において 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号 1 に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチドに関する。

【0036】

本発明のポリペプチド内の特定のアミノ酸の位置は、標準配列アラインメントツールを使用する配列番号 1 と該ポリペプチドのアミノ酸配列とのアラインメントにより、例えば、Smith-Waterman アルゴリズムまたは CLUSTAL W 2 アルゴリズムを使用する 2 つの配列のアラインメントにより決定される（アラインメントスコアが最も高いとき、配列はアラインされていると言われる）。アラインメントスコアは、Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. (1983) Rapid similarity searches of nucleic acid and prote

10

【0037】

好ましくは、本発明のポリペプチド内の特定のアミノ酸の位置は、多数のアラインメントのためのデフォルトパラメーター（ギャップオープンペナルティ：10 log ギャップ伸長ペナルティ 0.05）で AlignX プログラム（Vector NTI suite の一部）を使用して、配列番号 1 と該ポリペプチドのアミノ酸配列とのアラインメントにより決定される。本発明のいくつかの態様のために、アラインメントは、本明細書に記載されている図 2 を使用することにより作成され得る。他に記載のない限り、本明細書において使用されるアミノ酸に対する「配列同一性」なる用語は、 $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$ として計算される配列同一性（式中、 n_{dif} は、アラインされたとき、2 つの配列中の同一でない残基の全数であり、 n_{ref} は、配列の一方における残基の数である）を示す。したがって、アミノ酸配列 ASTDYWNWT は、配列 ASTGYWQAWT と 80% の配列同一性を有する（ $n_{dif} = 2$ および $n_{ref} = 10$ ）。

20

【0038】

いくつかの態様において、配列同一性は、慣用の方法、例えば、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482 により、Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 の類似法の探索により、CLUSTAL W algorithm of Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380 を使用して、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行により（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group における G A P、B E S T F I T、F A S T A および T F A S T A）決定される。ソフトウェアが National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/ から得られる B L A S T アルゴリズム（Altschulら., 1990, Mol. Biol. 215:403-10）も使用され得る。任意の上記アルゴリズムを使用するとき、「ウインドウ」長、ギャップペナルティなどのためのデフォルトパラメーターが使用される。

30

【0039】

本明細書において使用される「修飾」なる用語は、いずれか 1 つのアミノ酸または配列番号 1 - 22 から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列に対する任意の化学的修飾、ならびにポリペプチドをコードする DNA の遺伝子操作を意味する。該修飾は、1 つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失および / または挿入ならびに 1 つまたはそれ以上のアミノ酸側鎖の置き換えであり得る。

40

【0040】

所定のポリペプチドにおける「修飾」は、この所定のポリペプチドと最も高い配列同一性パーセントを有する配列番号 1 - 22 から選択されるポリペプチドと比較すると理解すべきである。

【0041】

50

この記載において使用されるアミノ酸置換に関する用語は以下のとおりである。1文字目は、特定の配列の位置で天然に存在するアミノ酸を示す。次の数は、配列番号1と比較しての位置を示す。2文字目は、天然アミノ酸を置換する異なるアミノ酸を示す。例えば、G 1 3 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 Lは、配列番号1の位置13のグリシンがフェニルアラニンにより置換され、配列番号1の位置113のチロシンがアスパラギン酸により置換され、位置122のアルギニンがアスパラギン酸により置換され、位置175のグルタミンがロイシンにより置換されており、全4つの変異はキシラナーゼ活性を有する同じポリペプチドにある。

【0042】

本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドにおけるアミノ酸修飾を除けば、本発明のポリペプチドは、あまり重要でない性質のアミノ酸修飾、すなわち、タンパク質の折り畳みおよび/または活性に有意に影響しない保存アミノ酸置換または挿入；一般的に1から約30個のアミノ酸の小さい欠失；小さいアミノ-もしくはカルボキシル末端伸長、例えば、アミノ末端メチオニン残基；約20-25個までの残基の小さいリンカーペプチド；または、正味荷電または別の機能を変化させることにより精製を容易にする小さい伸長、例えば、ポリヒスチジントラクト、抗原エピトープまたは結合ドメインを有し得る。

【0043】

保存的置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジンおよびヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸およびアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミンおよびアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシンおよびバリン）、芳香族性アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシン）および小さいアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、スレオニンおよびメチオニン）のグループ内である。一般的に比活性が変化しないアミノ酸置換は、当分野で知られており、例えば、H. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New Yorkにより記載されている。最も一般的に起こる交換は、AlaからSer、ValからIle、AspからGlu、ThrからSer、AlaからGly、AlaからThr、SerからAsn、AlaからVal、SerからGly、TyrからPhe、AlaからPro、LysからArg、AspからAsn、LeuからIle、LeuからVal、AlaからGluおよびAspからGlyである。

【0044】

20個の標準アミノ酸に加えて、非標準アミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン、6-/V-メチルリジン、2-アミノイソ酪酸、イソバリンおよびアルファ-メチルセリン）が、野生型ポリペプチドのアミノ酸残基を置換し得る。限定された数の非保存アミノ酸、遺伝子コードによってコードされないアミノ酸および非天然アミノ酸が、アミノ酸残基を置換し得る。「非天然アミノ酸」は、タンパク質合成後に修飾されており、および/または標準アミノ酸と異なる側鎖における化学構造を有する。非天然アミノ酸は、化学的に合成することができ、好ましくは市販されており、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3-および4-メチルプロリンならびに3,3-ジメチルプロリンを含む。

【0045】

本明細書において使用される「宿主生物」なる用語は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸構築物または発現ベクターで形質転換、トランスフェクション、形質導入などを起こしやすいあらゆる細胞型を含む。

【0046】

本目的のために、キシラナーゼは、キシラナーゼ活性を有するタンパク質またはポリペプチドを意味する。

【0047】

本明細書において使用される「キシラナーゼ活性を有するポリペプチド」なる句は、本明細書に記載されているようなキシラナーゼアッセイにおいて活性を有するあらゆるタンパク質またはポリペプチドを示す。

10

20

30

40

50

【0048】

キシラナーゼ活性は、キシランにおいて1, 4-ベータ-D-キシロシドエンド-結合を含む基質が使用される任意のアッセイを使用して測定することができる。アッセイに使用されるpHおよび温度は、問題になっているキシラナーゼに適合させるべきである。適当なpH値の例は、4、5、6、7、8、9、10または11である。適当な温度の例は、30、35、37、40、45、50、55、60、65、70または80である。違う種類の基質、例えば、Xylazyme錠剤(tablet)(架橋され、染色されたキシラン基質、Megazyme, Bray, Ireland)をキシラナーゼ活性の測定のために利用できる。

【0049】

好ましくは、キシラナーゼ活性は、以下のアッセイを使用して測定される。

10

【0050】

キシラナーゼアッセイ(エンド-1, 4-キシラナーゼ活性)

このアッセイにおいてOD₅₉₀ = 約0.7を得るように、サンプルをクエン酸(0.1M)-リン酸水素二ナトリウム(0.2M)バッファー、pH5.0に希釈した。サンプルの3つの異なる希釈物を5分40でプレインキュベートした。時間=5分で、1つのXylazyme錠剤(架橋され、染色されたキシラン基質、Megazyme, Bray, Ireland)を、1mlの反応容量の酵素溶液に加えた。時間=15分で、10mlの2%のTRIS/NaOH、pH12を加えることにより、反応を終了した。ブランクは、酵素溶液の代わりに1000μlのバッファーを使用して製造した。反応混合物を遠心し(1500×g、10分、20)、上清のODを590nmで測定した。1キシラナーゼユニット(XU)は、1分あたりOD₅₉₀が0.025増加するキシラナーゼ活性として定義される。

20

【0051】

上記アッセイにおいて使用される基質(小麦から抽出された架橋され、染色されたアラビノキシラン)は、商業的適用における対応する基質に非常に近い。

【0052】

酵素は、さらに便覧(Enzyme Nomenclature from NC-IUBMB, 1992)に基づいて分類することができる、インターネット<http://www.expasy.ch/enzyme/>のENZYM Eサイトも参照。ENZYM Eは、酵素の命名に関する情報の貯蔵庫である。主にNomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology(IUB-MB)の推奨に基づき、EC(Enzyme Commission)番号が提供されている特徴付けられている酵素のそれぞれの型を記載している(Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305)。このIUB-MB酵素命名は、それらの基質特異性および時折、それらの分子メカニズムに基づき、このような分類は、これらの酵素の構造的特徴を反映していない。

30

【0053】

本発明の1つの局面において、キシラナーゼは、EC 3.2.1.8に分類される酵素である。正式名称は、エンド-1, 4-ベータ-キシラナーゼである。組織名は、1, 4-ベータ-D-キシランキシラノヒドロラーゼである。他の名前は、例えば、エンド-(1-4)-ベータ-キシラナーゼ; (1-4)-ベータ-キシラン4-キシラノヒドロラーゼ; エンド-1, 4-キシラナーゼ; キシラナーゼ; ベータ-1, 4-キシラナーゼ; エンド-1, 4-キシラナーゼ; エンド-ベータ-1, 4-キシラナーゼ; エンド-1, 4-ベータ-D-キシラナーゼ; 1, 4-ベータ-キシランキシラノヒドロラーゼ; ベータ-キシラナーゼ; ベータ-1, 4-キシランキシラノヒドロラーゼ; エンド-1, 4-ベータ-キシラナーゼ; ベータ-D-キシラナーゼを使用され得る。触媒される反応は、キシランにおける1, 4-ベータ-D-キシロシド結合の内部加水分解(endohydrolysis)である。

40

【0054】

アミノ酸配列類似性に基づくファミリーにおける特定のグリコシドヒドロラーゼ酵素、例えば、エンドグルカナーゼ、キシラナーゼ、ガラクタナーゼ、マンナーゼ、デキスト

50

ラナーゼおよびアルファ - ガラクトシダーゼの別の分類が、数年前に提案されている。それらは、現在、90個の異なるファミリーに分類される：CAZY (ModO) インターネットサイト参照 (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) (対応する論文: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active Enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", HJ. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) The modular structure of cellulases and other Carbohydrate -active Enzymes: an integrated database approach. In "Genetics, Biochemistry and Ecology of cellulose Degradation" ., K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23)。

10

【0055】

本発明の1つの局面において、本発明のキシラナーゼは、グリコシドヒドロラーゼ (hydrolase) (GH) ファミリー11のキシラナーゼである。「グリコシドヒドロラーゼ (GH) ファミリー11」なる用語は、問題になっているキシラナーゼがGHファミリー11に分類されるか、または分類され得ることを意味する。

【0056】

タンパク質類似性探索 (Protein Blastのような、例えば、http://toolkit.tuebingen.mpg.de/prot_blast) は、未知の配列が実際にGH11キシラナーゼファミリーメンバーなる用語に分類されるか否かを必ずしも決定できないことを理解すべきである。ブラスト探索を使用して見出されるタンパク質配列は、比較的高い同一性/相同性を有し得るが、実際のキシラナーゼではなく、さらに、GH11に属するキシラナーゼではない。あるいは、タンパク質配列は、比較的低い一次アミノ酸配列同一性を有し得、未だGH11キシラナーゼファミリーメンバーである。未知のタンパク質配列が実際にGH11ファミリー内のキシラナーゼタンパク質であるか否かを決定するために、GH - ファミリー内の分類が3D折り畳みに頼るため、評価は、配列類似性においてだけでなく、3D構造類似性においてもまた行われるべきである。未知のタンパク質配列の3D折り畳みを予測するソフトウェアは、HHpredである (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>)。タンパク質構造予測のためのこのソフトウェアの力は、鋳型として使用される既知の構造と相同の配列を同定することに頼る。構造は一次配列よりもさらにいっそうゆっくり分かれるため、これは非常にうまく働く。同じファミリーのタンパク質は、これらの配列が見分けのつかないほど分かれているときでさえ、非常に類似の構造を有し得る。

20

30

【0057】

実際には、未知の配列をFASTAフォーマットにおけるソフトウェアに貼り付けることができる (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>)。これを行うと、探索に付すことができる。探索のアウトプットは、既知の3D構造を有する配列の一覧を示す。未知の配列が実際にGH11キシラナーゼであることを裏付けるために、GH11キシラナーゼは、>90の確率を有する相同体の一覧内に見出されるべきである。相同体として同定されるすべてのタンパク質がGH11キシラナーゼとして特徴付けられるとは限らないが、いくつかは特徴付けられる。後者のタンパク質は、それらをキシラナーゼとして同定する既知の構造および生化学的特性を有するタンパク質である。前者は、GH11キシラナーゼとして生化学的に特徴付けられていない。いくつかの文献は、このプロトコル、例えば、Soeding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125)およびSoeding J, Biegert A, and Lupas AN. (2005) The HHpred interactive server for Protein homology detection and structure predictionを記載している。 *Nucleic Acids Research* 33, W244--W248 (Web Server issue) (doi:10.1093/nar/gki40)。

40

【0058】

CAZY (ModO) サイトにしたがって、ファミリー11グリコシドヒドロラーゼは

50

以下のとおりに特徴付けることができる：

既知の活性：キシラナーゼ（EC 3.2.1.8）

メカニズム：維持

触媒求核原子／塩基：Glu（実験的）

触媒プロトン供与体：Glu（実験的）

3D構造状態：折り畳み： - ゼリーロール

クラン：GH - C

【0059】

本明細書において使用される「クランC」は、共通の三次元折り畳みおよび同一の触媒機構を共有するファミリーのグループを示す（例えば、Henrissat, B. and Bairoch, A., (1996) Biochem. J., 316, 695-696参照）。

10

【0060】

本明細書において使用される「ファミリー11」は、Henrissat and Bairoch (1993) Biochem J., 293, 781-788 (Henrissat and Davies (1997) Current Opinion in Structural Biol. 1997, 7:637-644も参照) により確立されている酵素のファミリーを示す。ファミリー11メンバーの一般的な特性は、高い遺伝的相同性、約20kDaのサイズおよび二重置換触媒メカニズムを含む（Tenkanenら., 1992; Wakarchukら., 1994参照）。ファミリー11キシラナーゼの構造は、 - 鎖から作られる2つの大型の - シートおよび - ヘリックスを含む。

20

【0061】

ファミリー11キシラナーゼは、黒色アスペルギルス(*Aspergillus niger*) XynA、アスペルギルス・カワチ(*Aspergillus kawachii*) XynC、アスペルギルス・ツビゲンシス(*Aspergillus tubigenensis*) XynA、パチルス・シルクランス(*Bacillus circulans*) XynA、パチルスブンジルス(*Bacillus punzilus*) XynA、枯草菌 XynA、ネオカリマスチクスフロンタリス(*Neocalliniastix patriciarum*) XynA、ストレプトミセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*) XynB、ストレプトミセス・リビダンス XynC、ストレプトミセス・ゼリノビオラセウス(*Streptomyces therinoviolaceus*) XynII、好熱性放線菌 XynA、トリコデルマ・ハルジアナム(*Trichoderma harzianum*) Xyn、トリコデルマ・リーゼイ XynI、トリコデルマ・リーゼイ XynII、トリコデルマビリデ(*Trichoderma viride*) Xynを含むが、これらに限定されない。

30

【0062】

本明細書において使用される「野生型」は、自然または天然の配列またはタンパク質を示す。

【0063】

別の特定の態様において、本発明のキシラナーゼは、例えば、(i) グラム陽性細菌門；(ii) パチルス綱；(iii) パチルス目；(iv) パエニバチラセアエ(*Paenibacillaceae*) 科；または(v) パエニバチルス(*Paenibacillus*) 属の細菌；さらに好ましくは、(vi) パエニバチルス・パブリ(*Paenibacillus pabuli*)、パエニバチルス・ポリミクサ(*Paenibacillus polymyxa*) またはパエニバチルスの種の細菌；さらに好ましくは、(vii) パエニバチルス・パブリまたはパエニバチルス・ポリミクサの株由来の細菌キシラナーゼ由来である。

40

【0064】

上記において使用される表現「細菌キシラナーゼ由来のキシラナーゼ」は、問題になっている細菌から単離されるあらゆる野生型キシラナーゼ、ならびにキシラナーゼ活性を維持するそれらの変異体またはフラグメントを含む。

【0065】

さらなる特定の態様において、本発明のキシラナーゼは、真菌キシラナーゼ由来である。

【0066】

上記定義の「由来」（細菌キシラナーゼとの関連で）は、真菌キシラナーゼに対しても

50

同様に適用される。

【 0 0 6 7 】

ファミリー 1 1 グリコシドヒドロラーゼの真菌キシラナーゼの例は、以下の真菌属：アスペルギルス、アウレオバシジウム (*Aureobasidium*)、エメリセラ (*Emericella*)、フザリウム (*Fusarium*)、ガエウマノミセス (*Gaeumannomyces*)、フミコーラ (*Humicola*)、レンチヌラ (*Lentinula*)、マグナポルテ (*Magnaporthe*)、ネオカリマスティクス (*Neocallimastix*)、ノカルジオプシス (*Nocardioopsis*)、オルピノミセス (*Orpinomyces*)、ペシロミセス (*Paecilomyces*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、ピチア (*Pichia*)、スエヒロタケ、タラロミセス (*Talaromyces*)、サーモマイセス (*Thermomyces*)、トリコデルマ由来のものである。

【 0 0 6 8 】

真菌キシラナーゼは、酵母菌および糸状菌キシラナーゼを含む。好ましい態様において、キシラナーゼは、(i) 子囊菌門；(i i) チャワントケ綱；(i i i) ユーロチウム (*Eurotiomycetes*) 目；(i v) ユーロチウム亜目；(v) マユハキタケ科、好ましくは、栄養胞子形成マユハキタケ科；さらに好ましくは (v i) アスペルギルス属の真菌；より好ましくは、(v i i) 黒色アスペルギルスの株由来である。前記の種の定義は、知られている種名にかかわらず、完全および不完全な状態の両方、ならびに他の分類学的同等物、例えば、アナモルフ (*anamorphs*) を含むことが理解される。当業者は、適当な同等物の同一性を容易に認識する。

【 0 0 6 9 】

上記細菌および真菌の株は、多くのカルチャー・コレクション、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C)、ドイツ微生物細胞培養コレクション (D S M Z)、オランダ菌株コレクション (C B S) およびアグリカルチュアル・リサーチ・サービス・プラント・カルチャー・コレクション、ノーザン・リージョナル・リサーチ・センター (N R R L) において容易に一般的に公開されている。

【 0 0 7 0 】

分類に関する問題は、分類データベース、例えば、以下のインターネットサイト：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/> で利用できる N C B I Taxonomy Browser を閲覧することにより解決することができる。しかしながら、好ましくは以下の便覧：Dictionary of the Fungi, 9th edition, edited by Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David & J.A. Stalpers, CAB Publishing, 2001; and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second edition (2005) を参照。

【 0 0 7 1 】

本発明は、特定のアミノ酸位置の修飾に関する。これらの位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列を基準に記載されている。本発明において、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号 1 に示される枯草菌配列と比較して、1 2 および 1 3 から選択される位置において少なくとも 1 または 2 つのアミノ酸修飾、および 1 5、3 4、5 4、7 7、8 1、8 2、9 9、1 0 4、1 1 0、1 1 3、1 1 4、1 1 8、1 2 2、1 4 1、1 5 4、1 5 9、1 6 2、1 6 4、1 6 6、1 7 5 および 1 7 9 から選択される位置において 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾の修飾を有する。他のファミリー 1 1 キシラナーゼにおける同等の位置は、配列番号 1 と他のファミリー 1 1 キシラナーゼをアラインし、アミノ酸が配列番号 1 の特定のアミノ酸とアラインすると決定することにより見いだされ得る。このようなアラインメントおよび第 1 の参照としての 1 つの配列の使用は、当業者にとって簡単に日常的な事である。

【 0 0 7 2 】

1 つの局面において、本発明の変異体キシラナーゼは、「ふすま可溶化アッセイ」において測定されるとき、対応する野生型キシラナーゼまたは配列番号 1 - 2 2 から選択されるアミノ酸配列を含むいずれか 1 つのキシラナーゼの使用により得ることができるものよりも高い改善されたふすま可溶化活性を有する。

【 0 0 7 3 】

1 つの局面において、本発明のキシラナーゼは、1 2 および 1 3 から選択される位置の

10

20

30

40

50

修飾と、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置の1つまたはそれ以上のアミノ酸修飾との組み合わせの結果として改善されたふすま可溶化活性を有する。

【0074】

適当には、キシラナーゼふすま可溶化活性は、本明細書において提供されるふすま可溶化アッセイを使用して測定され得る。したがって、増加したキシラナーゼ活性および/または増加したふすま可溶化活性を有するポリペプチドが提供され得る。多数の適用において高濃度で穀物ふすまを使用しているため、WU-A Xに関する特異性の必要性はますます重要である。例えば、パン製造産業は、健康および栄養問題のために、多数の製品においてふすま濃度を増加させ、飼料産業は、バイオエタノール生産における穀物の使用のために、ふすま原料（線維、穀類蒸留粕（DDGS））の増量を取り入れている。したがって、増加した特異性、したがって、このふすま原料の可溶化における有効性を有する新規キシラナーゼを提供することは、利点がある。

【0075】

ふすま可溶化アッセイ

好ましくは、ふすま溶解度は、以下のアッセイを使用して測定される。

【0076】

(0.1 M) - リン酸水素二ナトリウム (0.2 M) バッファー、pH 5.0 中の小麦ふすまの懸濁液を、1, 33% のふすまの濃度 (w/w) に調製する。この懸濁液から、750 μ l のアリコートを手振り下でエッペンドルフチューブに移す。それぞれの基質チューブを40 で5分間予め加熱する。そこに、250 μ l の酵素溶液を加え、基質1%の最終濃度を作る。各測定時間(0、30、60および240分)に対し、酵素濃度を増加させて(0, 33; 1, 0および3, 0 μ g のキシラナーゼ/グラムふすま)、各キシラナーゼから3つの希釈物(デュプリケート)を作る。ブランクとして、キシラナーゼの熱変性した溶液を使用する。反応は、95 でチューブをインキュベーターセットに移すことにより、所定の時間に終了する。全酵素反応が終了するまで、熱変性したサンプルを4で維持する。全酵素反応が終了したとき、エッペンドルフチューブを遠心し、透明な上清を得る。ふすまを可溶性にする酵素能力は、PAHBAHを使用して測定される末端基の還元の増加として示される(Lever, 1972)。

【0077】

副活性、例えば、アミラーゼ活性が上記アッセイを妨げ得るため、ふすま可溶化アッセイは、精製されたキシラナーゼサンプルで実施されるべきである(実施例2参照)。

【0078】

1つの局面において、本発明のキシラナーゼは、いずれか1つの野生型キシラナーゼまたは配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列を含むいずれか1つのキシラナーゼと比較して、キシラナーゼ阻害剤に対する減少した感度を有する。

【0079】

さらなる局面において、本発明のキシラナーゼは、12および13から選択される位置の修飾と、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置の1つまたはそれ以上のアミノ酸修飾との組み合わせの結果として、キシラナーゼ阻害剤に対する減少した感度を有する。

【0080】

該阻害剤は、植物組織において天然に見出される阻害剤であり得る。

【0081】

本明細書において使用される「キシラナーゼ阻害剤」なる用語は、役割が複合炭水化物、例えば、植物細胞壁において見出されるアラビノキシランの脱重合をコントロールすることである化合物、一般的にタンパク質を示す。これらのキシラナーゼ阻害剤は、天然キシラナーゼ酵素ならびに真菌または細菌起源のものの活性を減少させることが可能である

。キシラナーゼ阻害剤の存在は、穀物種子において報告されている（例えば、McLauchlanら 1999a; Rouau and Suget 1998参照）。

【0082】

McLauchlanら(1999a)は、2つのファミリー - 11キシラナーゼに結合し、阻害する小麦由来のタンパク質の単離および特性を記載している。同様に、WO 98 / 49278は、全てファミリー11キシラナーゼとして分類される微生物キシラナーゼのグループの活性に対する小麦粉抽出物の効果を証明している。Debyserら.(1999)は、また、両方ともファミリー11キシラナーゼのメンバーである黒色アスペルギルスおよび枯草菌由来のエンドキシラナーゼが、TAXIと呼ばれる小麦キシラナーゼ阻害剤により阻害されることを記載している。McLauchlanら(1999b)は、市販の穀粉、例えば、小麦、大麦、ライ麦およびトウモロコシ由来の抽出物が、ファミリー10および11キシラナーゼの両方を阻害することが可能であることを示唆している。

10

【0083】

キシラナーゼ阻害剤は、任意の適当なキシラナーゼ阻害剤であり得る。例として、キシラナーゼ阻害剤は、WO - A - 98 / 49278に記載されている阻害剤および/または Rouau, X. and Surget, A. (1998)、McLauchlan, R., ら. (1999)により記載されているキシラナーゼ阻害剤および/または英国特許出願番号9828599.2(1998年12月23日出願)、英国特許出願番号9907805.7(1999年4月6日出願)および英国特許出願番号9908645.6(1999年4月15日出願)において記載されているキシラナーゼ阻害剤であり得る。

20

【0084】

先行技術に記載されている阻害剤は、また、キシラナーゼ阻害剤に対する本発明の変異体ポリペプチドの感度を測定するためのアッセイにおいて使用され得る。それらは、また、キシラナーゼの機能性を調節するために以下に記載されるとおりに使用され得る。

【0085】

キシラナーゼ阻害剤アッセイ

好ましくは、キシラナーゼ阻害活性は、以下のアッセイを使用して測定される。

【0086】

100 μ lの阻害剤調製物(種々の濃度のキシラナーゼ阻害剤を含む(定量化のために、以下のキシラナーゼ阻害剤定量化を参照))、250 μ lのキシラナーゼ溶液(12 X U キシラナーゼ/mlを含む)および650 μ lのバッファー(0.1Mのクエン酸 - 0.2Mのリン酸水素二ナトリウムバッファー、1%のBSA(Sigma-Aldrich, USA)、pH5.0)を混合した。混合物を40.0で5分間調温した。時間=5分に、1つのXylazyme錠剤を加えた。時間=15分に、10mlの2%TRIS/NaOH、pH12を加えることにより、反応を終了させた。反応混合物を遠心し(1500 \times g、10分、20)、上清を590nmで測定した。キシラナーゼ阻害を、ブランクと比較して、%で残存活性として計算した。

30

【0087】

使用される内因性エンド - 1, 4 - キシラナーゼ阻害剤は小麦粉から得ることができる。阻害剤は、約40kDaのMW(SDS-PAGEまたは質量分析により測定)および約8から約9.5のpIを有するジペプチドである。これまでの配列分析によって、阻害剤は配列番号24として示される配列を有するか、またはそれと高い相同性であることが示されている。

40

【0088】

所定の阻害剤調製物における阻害剤濃度を定量する方法は、実施例3において見出すことができる。

ブランクは、阻害剤溶液を水と置き換えているが、同じ方法で製造した。

【0089】

本発明は、また、コントロール配列と適合性である条件下で、適当な宿主細胞におけるコード配列の発現を指向する1つまたはそれ以上のコントロール配列に作動可能に連結し

50

たヌクレオチド配列を含む本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に関する。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ポリペプチドの発現を提供するように、種々の方法において操作され得る。発現ベクターにもよるが、ベクターへの挿入の前のポリヌクレオチドの配列の操作が望ましいか、または必要であり得る。組換えDNA方法を利用するポリヌクレオチド配列を修飾するための技術は、当分野でよく知られている。

【 0 0 9 0 】

コントロール配列は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現のための宿主細胞により認識されるヌクレオチド配列である適当なプロモーター配列であり得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を介在する転写コントロール配列を含む。プロモーターは、変異、切断およびハイブリッドプロモーターを含む選択された宿主細胞において転写活性を示す任意のヌクレオチド配列であり得、宿主細胞に対して同種または異種のいずれかの細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得ることができる。

【 0 0 9 1 】

とりわけ細菌宿主細胞における本発明の核酸構築物の転写を指向するための適当なプロモーターの例は、大腸菌 *lac* オペロン、ストレプトミセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*) アガラーゼ遺伝子 (*dagA*)、枯草菌 レバンスクラーゼ遺伝子 (*sacB*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) マルトース生成アミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、バチルス・リケニフォルミス ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、枯草菌 *xyIA* および *xyIB* 遺伝子ならびに原核生物ベータ - ラクタマーゼ遺伝子 (Villa-Kamaroffら., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731)、ならびに *tac* プロモーター (DeBoerら., 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25) から得られるプロモーターである。さらなるプロモーターは、*Scientific American*, 1980, 242: 74-94の "Useful proteins from recombinant bacteria"; および Sambrookら., 1989 (上記) に記載されている。

【 0 0 9 2 】

糸状菌宿主細胞における本発明の核酸構築物の転写を指向するための適当なプロモーターの例は、アスペルギルスオリザエ (*Aspergillus oryzae*) *TAKA* アミラーゼ、リゾムコールミーヘイ (*Rhizomucor miehei*) アスパラギン酸プロテイナーゼ、黒色アスペルギルス 中性アルファ - アミラーゼ、黒色アスペルギルス 酸安定アルファ - アミラーゼ、黒色アスペルギルスまたはアスペルギルスアワモリ (*Aspergillus awamori*) グルコアミラーゼ (*glA*)、リゾムコールミーヘイ リパーゼ、アスペルギルスオリザエ アルカリプロテアーゼ、アスペルギルスオリザエ トリオースリン酸イソメラーゼ、アスペルギルスニデュランス (*Aspergillus nidulans*) アセタミダーゼ (acetamidase)、フザリウムベネナツム (*Fusarium venenatum*) アミログルコシダーゼ (*WO 0 0 / 5 6 9 0 0*)、フザリウムベネナツムダリア (*Fusarium venenatum Daria*) (*WO 0 0 / 5 6 9 0 0*)、フザリウムベネナツムクイン (*Fusarium venenatum Quinn*) (*WO 0 0 / 5 6 9 0 0*)、フザリウムオキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) トリプシン様プロテアーゼ (*WO 9 6 / 0 0 7 8 7*)、トリコデルマ・リーゼイベータ - グルコシダーゼ、トリコデルマ・リーゼイ セロビオヒドロラーゼ I、トリコデルマ・リーゼイ セロビオヒドロラーゼ II、トリコデルマ・リーゼイ エンドグルカナーゼ I、トリコデルマ・リーゼイ エンドグルカナーゼ II、トリコデルマ・リーゼイ エンドグルカナーゼ III、トリコデルマ・リーゼイ エンドグルカナーゼ IV、トリコデルマ・リーゼイ エンドグルカナーゼ V、トリコデルマ・リーゼイ キシラナーゼ I、トリコデルマ・リーゼイ キシラナーゼ II、トリコデルマ・リーゼイ ベータ - キシロシダーゼの遺伝子から得られるプロモーター、ならびに *NA 2 - tpi* プロモーター (黒色アスペルギルス 中性アルファ - アミラーゼお

よびアスペルギルスオリザエ トリオースリン酸イソメラーゼの遺伝子由来のプロモーターのハイブリッド) ; ならびにそれらの変異、切断およびハイブリッドプロモーターである。

【 0 0 9 3 】

酵母菌宿主において、有用なプロモーターは、出芽酵母 エノラーゼ (E N O - 1) 、出芽酵母 ガラクトキナーゼ (G A L 1) 、出芽酵母 アルコールデヒドロゲナーゼ / グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (A D H 1 、 A D H 2 / G A P) 、出芽酵母 トリオース (those) リン酸イソメラーゼ (T P I) 、出芽酵母 メタロチオネイン (C U P 1) および出芽酵母 3 - p h o s p h o g l y c e r a t e キナーゼに対する遺伝子から得られる。酵母菌宿主細胞に対する他の有用なプロモーターは、Romanosら . , 1992, Yeast 8: 423-488に記載されている。

10

【 0 0 9 4 】

コントロール配列は、また、転写を終了するように宿主細胞により認識される配列である適当な転写ターミネーター配列であり得る。ターミネーター配列は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端に作動可能に連結している。選択された宿主細胞において機能するあらゆるターミネーターが本発明において使用され得る。

【 0 0 9 5 】

糸状菌宿主細胞に対するターミネーターは、アスペルギルスオリザエ T A K A アミラーゼ、黒色アスペルギルス グルコアミラーゼ、アスペルギルスニデュランス アントラニル酸塩合成酵素、黒色アスペルギルス アルファ - グルコシダーゼおよびフザリウムオキシスポラム トリブシン様プロテアーゼに対する遺伝子から得ることができる。酵母菌宿主細胞に対するターミネーターは、出芽酵母 エノラーゼ、出芽酵母 シトクロム C (C Y C 1) および出芽酵母 グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼに対する遺伝子から得ることができる。酵母菌宿主細胞に対する他の有用なターミネーターは、Romanosら . , 1992 (上記) に記載されている。

20

【 0 0 9 6 】

コントロール配列は、また、宿主細胞による翻訳に重要である m R N A の非翻訳領域である適当なリーダー配列であり得る。リーダー配列はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の 5 ' 末端に作動可能に連結している。選択された宿主細胞において機能するあらゆるリーダー配列が本発明において使用され得る。

30

【 0 0 9 7 】

糸状菌宿主細胞に対するリーダーは、アスペルギルスオリザエ T A K A アミラーゼおよびアスペルギルスニデュランス トリオースリン酸イソメラーゼに対する遺伝子から得ることができる。

【 0 0 9 8 】

酵母菌宿主細胞に対する適当なリーダーは、出芽酵母 エノラーゼ (E N O - 1) 、出芽酵母 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ、出芽酵母 アルファ因子および出芽酵母 アルコールデヒドロゲナーゼ / グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (A D H 2 / G A P) に対する遺伝子から得られる。

【 0 0 9 9 】

コントロール配列は、また、転写されるとき、ポリアデノシン残基を転写された m R N A に付加するためのシグナルとして宿主細胞により認識される、ヌクレオチド配列の 3 ' 末端に作動可能に連結した配列であるポリアデニル化配列であり得る。選択された宿主細胞において機能するあらゆるポリアデニル化配列が本発明において使用され得る。

40

【 0 1 0 0 】

糸状菌宿主細胞に対するポリアデニル化配列は、アスペルギルスオリザエ T A K A アミラーゼ、黒色アスペルギルス グルコアミラーゼ、アスペルギルスニデュランス アントラニル酸塩合成酵素、フザリウムオキシスポラム トリブシン様プロテアーゼおよびアスペルギルス n / g e r アルファ - グルコシダーゼに対する遺伝子から得ることができる。

50

【 0 1 0 1 】

酵母菌宿主細胞に有用なポリアデニル化配列は、Guo and Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990に記載されている。

【 0 1 0 2 】

コントロール配列は、また、ポリペプチドのアミノ末端に連結したアミノ酸配列をコードし、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路へ指向するシグナルペプチドコード領域であり得る。ヌクレオチド配列のコード配列の5'末端は、分泌されるポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと翻訳リーディングフレームにおいて天然に連結しているシグナルペプチドコード領域を本質的に含み得る。あるいは、コード配列の5'末端は、コード配列にとって異質であるシグナルペプチドコード領域を含み得る。外来シグナルペプチドコード領域は、コード配列がシグナルペプチドコード領域を天然に含まないとき必要であり得る。あるいは、外来シグナルペプチドコード領域は、ポリペプチドの分泌を増強するために、天然シグナルペプチドコード領域と簡単に置き換えられ得る。しかしながら、発現されたポリペプチドを選択された宿主細胞の分泌経路に指向する(すなわち、培養培地に分泌される)あらゆるシグナルペプチドコード領域が本発明において使用され得る。

10

【 0 1 0 3 】

細菌宿主細胞に対する有効なシグナルペプチドコード領域は、バチルス属 *N C I B* 11837 マルトース生成アミラーゼ、バチルス・ステアロサーモフィラス アルファ-アミラーゼ、バチルス・リケニフォルミス サブチリシン、バチルス・リケニフォルミス ベータ-ラクタマーゼ、バチルス・ステアロサーモフィラス 中性プロテアーゼ(*n p r T*、*n p r S*、*n p r M*)および枯草菌 *p r s A*に対する遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、Simonen and Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137に記載されている。

20

【 0 1 0 4 】

糸状菌宿主細胞に対する有効なシグナルペプチドコード領域は、アスペルギルスオリザエ *T A K A* アミラーゼ、黒色アスペルギルス 中性アミラーゼ、黒色アスペルギルス グルコアミラーゼ、リゾムコールミーハイ アスバラギン酸プロテイナーゼ、フミコーラ・インソレンス(*Humicola insolens*) セルラーゼ、フミコーラ・インソレンス エンドグルカナーゼ *V*およびフミコーラ・ラヌギノーサ(*Humicola lanuginosa*)リパーゼに対する遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。

30

【 0 1 0 5 】

酵母菌宿主細胞に対する有用なシグナルペプチドは、出芽酵母 アルファ因子および出芽酵母 インベルターゼに対する遺伝子から得られる。他の有用なシグナルペプチドコード領域は、Romanos et al., 1992(上記)により記載されている

【 0 1 0 6 】

コントロール配列は、また、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域であり得る。得られたポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド(または、いくつかの場合において酵素前駆体)として知られている。プロポリペプチドは、一般的に不活性であり、プロポリペプチドからプロペプチドの触媒的または自己触媒的開裂により成熟活性ポリペプチドに変換することができる。プロペプチドコード領域は、枯草菌 アルカリプロテアーゼ(*a p r E*)、枯草菌 中性プロテアーゼ(*n p r f*)、出芽酵母 アルファ因子、リゾムコールミーハイ アスバラギン酸プロテイナーゼおよびミセリオフィソーラ・サーモフィラ(*Myceliophthora thermophila*) ラッカーゼ(*W O 9 5 / 3 3 8 3 6*)に対する遺伝子から得ることができる。

40

【 0 1 0 7 】

シグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在するとき、プロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の次に位置し、シグナルペプチド領域は、プロペプチド領域のアミノ末端の次に位置する。

【 0 1 0 8 】

50

また、宿主細胞の増殖と比較して、ポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することが望ましい場合もある。調節系の例は、調節化合物の存在を含む化学または物理刺激に対する応答をオンまたはオフにさせる遺伝子の発現を引き起こすものである。原核生物系における調節系は、lac、tecおよびtipオペレーター系を含む。酵母において、ADH2系またはGAL1系が使用され得る。糸状菌において、TAKA アルファ-アミラーゼプロモーター、黒色アスペルギルス グルコアミラーゼプロモーターおよびアスペルギルスオリザエ グルコアミラーゼプロモーターが調節配列として使用され得る。調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にするものである。真核系において、これらは、メトトレキサートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子および重金属で増幅されるメタロチオネイン遺伝子を含む。これらの場合において、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、調節配列と作動可能に連結される。

10

【0109】

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、プロモーターならびに転写および翻訳停止シグナルを含む組換え発現ベクターに関する。本明細書に記載されている種々の核酸およびコントロール配列を互いに結合させ、1つ以上の便利な制限酵素認識部位を含み、このような部位でポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の挿入または置換を可能にし得る組換え発現ベクターを生産してもよい。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列または該配列を含む核酸構築物を発現のための適当なベクターに挿入することにより発現させてもよい。発現ベクターの創造において、コード配列は、コード配列が発現のための適当なコントロール配列と作動可能に連結するようにベクター中に配置する。

20

【0110】

組換え発現ベクターは、組換えDNA方法に便利に付することができ、ヌクレオチド配列の発現を引き起こすことができるあらゆるベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であり得る。ベクターの選択は、一般的に、ベクターが導入される宿主細胞とベクターの互換性に依存する。ベクターは、直鎖または閉環プラスミドであり得る。

【0111】

ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、複製が染色体複製と独立している染色体外物、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体または人工染色体として存在するベクターであり得る。ベクターは、自己複製を保証するためのあらゆる手段を含み得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞に形質導入されたとき、ゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであり得る。さらに、宿主細胞のゲノムに形質導入されたDNA全体を共に含む単一のベクターもしくはプラスミドまたは2つ以上のベクターもしくはプラスミド、またはトランスポゾンが使用され得る。

30

【0112】

本発明のベクターは、好ましくは、形質転換された、トランスフェクトされた、形質導入されたなどの細胞の容易な選択を可能にする1つ以上の選択可能なマーカーを含む。選択可能なマーカーは、殺生物剤またはウイルス耐性、重金属耐性、栄養要求体に対する栄養体などを提供する産物の遺伝子である。

【0113】

細菌の選択可能なマーカーの例は、枯草菌またはバチルス・リケニフォルミス由来のdial遺伝子、または抗生物質耐性、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリン耐性を与えるマーカーである。酵母菌宿主細胞に対する適当なマーカーは、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1およびURA3である。糸状菌宿主細胞において使用するための選択可能なマーカーは、amdS（アセタミダーゼ）、argB（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、bar（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、hph（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、niaD（硝酸レダクターゼ）、pyrG（オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、sc（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）およびtrpC（アントラニル酸塩合成酵素）、ならびにそれらの同等物を含むが、これらに限定さ

40

50

れない。いくつかの態様において、アスペルギルスニデュランスまたはアスペルギルスオリザエの *amdS* および *pyrG* 遺伝子ならびにストレプトマイセス・ハイグロスコピカス (*Streptomyces hygroscopicus*) の *bar* 遺伝子が、アスペルギルス細胞において使用される。

【0114】

本発明のベクターは、好ましくは、宿主細胞のゲノムへのベクターの組み込み、またはゲノムと独立している細胞におけるベクターの自己複製を可能にするエレメントを含む。宿主細胞ゲノムへの組み込みにおいて、ベクターは、相同または非同相組換えによるゲノムへの組み込みのためのベクターのポリペプチドまたは他の任意のエレメントをコードするポリヌクレオチドの配列に頼ってもよい。あるいは、ベクターは、染色体における正確な位置の宿主細胞のゲノムへの非同相組換えによる組み込みを指向するためのさらなるヌクレオチド配列を含み得る。正確な位置への組み込みの可能性を増加させるために、組み込みエレメントは、好ましくは、非同相組換えの確率を高めるための対応する標的配列と高度の同一性を有する十分な数の核酸、例えば、100から10,000塩基対、好ましくは400から10,000塩基対、より好ましくは800から10,000塩基対を含むべきである。組み込みエレメントは、宿主細胞のゲノムにおける標的配列と同一性であるあらゆる配列であり得る。さらに、組み込みエレメントは、ヌクレオチド配列をコードしなくてもよく、またはコードしてもよい。他方では、ベクターは、非同相組換えにより宿主細胞のゲノムに組み込まれ得る。自己複製のために、ベクターは、ベクターが問題になっている宿主細胞において自己複製することが可能である複製起点をさらに含み得る。複製起点は、細胞において機能する自己複製を介在するあらゆるプラスミド自己複製子であり得る。「複製起点」または「プラスミド自己複製子」なる用語は、プラスミドまたはベクターがインビボで複製可能であるようにするヌクレオチド配列として本明細書において定義される。

【0115】

細菌の複製起点の例は、大腸菌において複製を可能にするプラスミド *pBR322*、*pUC19*、*pACYC177* および *pACYC184*、ならびにバチルス属において複製を可能にする *pUB110*、*pE194*、*pTA1060* および *pAM* の複製起点である。

【0116】

酵母菌宿主細胞において使用するための複製起点の例は、2ミクロン複製起点、*ARS1*、*ARS4*、*ARS1* および *CEN3* の組合せ、ならびに *ARS4* および *CEN6* の組合せである。

【0117】

糸状菌細胞に有用な複製起点の例は、*AMA1* および *ANSI* である (Gemsら., 1991, *Gene* 98: 61-67; Cullenら., 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175; WO 00/24883)。 *AMA1* 遺伝子の単離および該遺伝子を含むプラスミドまたはベクターの構築は、WO 00/24883に記載されている方法にしたがって成し遂げることができる。

【0118】

本発明のポリヌクレオチドの2コピー以上が、遺伝子産物の生産を増加させるために宿主細胞に挿入され得る。該ポリヌクレオチドのコピー数の増加は、配列の少なくとも1つのさらなるコピーを宿主細胞ゲノム中へ組み込むことにより、またはポリヌクレオチドと共に増幅可能な選択可能なマーカー遺伝子を含むことにより得ることができ、ここで、選択可能なマーカー遺伝子の増幅されたコピー、それによるポリヌクレオチドのさらなるコピーを含む細胞は、適当な選択可能な薬剤の存在下で細胞を培養することにより選択することができる。

【0119】

本発明の組換え発現ベクターを構築するための上記エレメントを結合するために使用される方法は、当業者によく知られている (例えば、Sambrookら., 1989 (上記) 参照)。

【 0 1 2 0 】

本発明は、また、ポリペプチドの組換え生産において有利に使用される本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞に関する。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターは、ベクターが染色体成分として、または前記のとおり自己複製染色体外ベクターとして維持するように、宿主細胞に形質導入される。「宿主細胞」なる用語は、複製中に起こる変異によって親細胞と同一でない親細胞のあらゆる後代を包含する。宿主細胞の選択は、ポリペプチドをコードする遺伝子およびその供給源に依存して、かなりの範囲まで決定される。

【 0 1 2 1 】

宿主細胞は、単細胞微生物、例えば、原核生物、または非単細胞微生物、例えば、真核生物であり得る。有用な単細胞微生物は、細菌細胞、例えば、グラム陽性細菌、バチルス細胞、例えば、バチルス・アルカロフィラス(*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルスブレビス(*Bacillus brevis*)、バチルス・シルクランス、バチルス・クラウシイ(*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグランス(*Bacillus coagulans*)、バチルス・ロータス(*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス(*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バチルス・ステアロサーモフィラス、枯草菌およびバチルス・チューリンゲンシス(*Bacillus thuringiensis*)；または、ストレプトミセス細胞、例えば、ストレプトミセス・リビダンスおよびストレプトミセス・ムリナス(*Streptomyces murinus*)、またはグラム陰性細菌、例えば、大腸菌およびシュードモナス(*Pseudomonas*)属を含むが、これらに限定されない。1つの局面において、細菌宿主細胞は、バチルス・レントス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・ステアロサーモフィラスまたは枯草菌細胞である。別の局面において、バチルス属細胞は好アルカリ性バチルス属である。細菌宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、コンピテント細胞（例えば、Young and Spizizen, 1961, *Journal of Bacteriology* 81 : 823-829、またはDubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221参照）、エレクトロポレーション（例えば、Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751参照）または接合（例えば、Koehler and Thome, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278参照）を使用する、プロトプラスト形質転換（例えば、Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115参照）により達成され得る。

【 0 1 2 2 】

宿主細胞は、また、真核生物、例えば、哺乳動物、昆虫、植物または真菌細胞であり得る。

【 0 1 2 3 】

1つの局面において、宿主細胞は真菌細胞である。本明細書において使用される「真菌」は、子囊菌門、担子菌門、ツボカビ門および接合菌門（Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UKにおいてHawksworthらにより定義されているとおり）ならびに卵菌門（Hawksworthら., 1995, *supra*, page 171において引用されるとおり）およびすべての栄養孢子形成真菌（Hawksworthら., 1995（上記））を含む。別の局面において、真菌宿主細胞は酵母細胞である。本明細書において使用される「酵母菌」は、有子嚢孢子酵母（エンドミセス）、担子菌酵母および不完全菌類に属する酵母（不完全酵母）を含む。酵母菌の分類が将来に変化することがあり得るため、本発明の目的のために、酵母菌はBiology and Activities of Yeastに記載されているとおりに定義される（Skinner, F. A., Passmore, S. M., and Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9*, 1980）。

【 0 1 2 4 】

さらなる局面において、酵母菌宿主細胞は、カンジダ(*Candida*)、ハンゼヌラ(*Hansenula*)、クルイウェロマイセス(*Kluyveromyces*)、ピチア、サッカロマイセス(*Saccharomyces*)、シゾサッカロマイセス(*Schizosaccharomyces*)またはヤロウイア(*Yarrowia*)細胞である。

【 0 1 2 5 】

1つの特定の局面において、酵母菌宿主細胞は、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)、出芽酵母、サッカロマイセス・ダイアスタティカス(*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロマイセス・ドウグラシ(*Saccharomyces douglasii*)、サッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロマイセス・ノルベンシス(*Saccharomyces norbensis*)またはサッカロマイセス・オビフォルミス(*Saccharomyces oviformis*)細胞である。別の局面において、酵母菌宿主細胞はキラ酵母細胞である。別の局面において、酵母菌宿主細胞はアルカン資化酵母細胞である。

【 0 1 2 6 】

別の局面において、真菌宿主細胞は糸状菌細胞である。「糸状菌」は、下位部門の真菌類および卵菌門の全ての糸状型を含む(Hawksworthら., 1995(上記)により定義されたとおり)。糸状菌は、一般的に、キチン、セルロース、グルカン、キトサン、マンナン、および他の複合多糖から構成される菌糸壁により特徴付けられる。栄養増殖は菌糸伸長により、炭素異化は偏性好気性である。対照的に、酵母菌、例えば、出芽酵母による栄養増殖は単細胞性葉状体の出芽により、炭素異化は発酵であり得る。

【 0 1 2 7 】

別の局面において、糸状菌宿主細胞は、アクレモニウム(*Acremonium*)、アスペルギルス、アウレオバシジウム、ヤケイロタケ、セリポリオプシス(*Ceriporiopsis*)、コプリナス(*Coprinus*)、コリオラス(*Coriolus*)、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)、フィリバシジウム(*Filibasidium*)、フザリウム、フミコーラ、マグナボルテ、ムコール(*Mucor*)、ミセリオフィソーラ、ネオカリマスティクス、ノイロスポラ(*Neurospora*)、ペシロミセス、ペニシリウム、ファネロキーテ(*Phanerochaete*)、フレビア(*Phlebia*)、ピロミセス(*Piromyces*)、ヒラタケ、スエヒロタケ、タラロミセス、サーモアスカス(*Thermoascus*)、チエラビア(*Thielavia*)、トリボクラジウム(*Tolypocladium*)、トラメテス(*Trametes*)またはトリコデルマ細胞である。

【 0 1 2 8 】

別の局面において、糸状菌宿主細胞は、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・フミガーツス(*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フォエティダス(*Aspergillus foetidus*)、アスペルギルス・ジャポニカス(*Aspergillus japonicus*)、アスペルギルスニデュランス、黒色アスペルギルスまたはアスペルギルスオリザエ細胞である。別の局面において、糸状菌宿主細胞は、フザリウム・バクトリジオイデス(*Fusarium bactridioides*)、フザリウム・セラリス(*Fusarium cerealis*)、フザリウム・クルックウェレンセ(*Fusarium crookwellense*)、フザリウム・カルモラム(*Fusarium culmorum*)、フザリウム・グラミネアラム(*Fusarium graminearum*)、フザリウム・グラミンム(*Fusarium graminum*)、フザリウム・ヘテロスポラム(*Fusarium heterosporum*)、フザリウム・ネグンジ(*Fusarium negundi*)、フザリウムオキシスポラム、フザリウム・レチクラツム(*Fusarium reticulatum*)、フザリウム・ロゼウム(*Fusarium roseum*)、フザリウム・サンブシナム(*Fusarium sambucinum*)、フザリウム・サルコクロウム(*Fusarium sarcochroum*)、フザリウム・スポロトリキオイデス(*Fusarium sporotrichioides*)、フザリウム・スルフレウム(*Fusarium sulphureum*)、フザリウム・トルロスム(*Fusarium torulosum*)、フザリウム・トリコテキオイデス(*Fusarium trichothecioides*)またはフザリウムベネナツム細胞である。別の局面において、糸状菌宿主細胞は、ヤケイロタケ、セリポリオプシス・アネイリナ(*Ceriporiopsis aneirina*)、セリポリオプシス・カレギエア(*Ceriporiopsis caregiea*)、セリポリオプシス・ギルベスセンス(*Ceriporiopsis gilvescens*)、セリポリオプシス・パノシクタ(*Ceriporiopsis pannocinta*)、セリポリオプシス・リプロサ(*Ceriporiopsis rivulosa*)、セリポリオプシス・スブルファ(*Ceriporiopsis subrufa*)、セリポリオプシス・サブヴェルミスポラ(*Ceriporiopsis subvermispora*)、ウシグソヒトヨタケ、アラゲカワラタケ、フミコーラ・インソレンス、フミコーラ・ラヌギノーサ、ムコール・ミーハイ(*Mucor miehei*)、ミセリオフィソーラ・サーモフィラ、アカパンカビ、ペニシリウム・パルロゼラム(*Penicillium purpurogenum*)、ファネロキーテ・クリソスポリウム(*Phanerochaete chrysospori*

10

20

30

40

50

um)、コガネシワウロコタケ、エリンギ、チエラピア・テルレストリス(*Thielavia terrestris*)、トラメテス・ビローサ(*Trametes villosa*)、カワラタケ、トリコデルマ・ハルジアナム、トリコデルマ・コニング(*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギブラキアタム(*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーゼイまたはトリコデルマ・ビリデ(*Trichoderma viride*)細胞である。真菌細胞は、それ自体既知の方法におけるプロトプラスト形成、プロトプラストの形質転換および細胞壁の再生を含む工程により形質転換され得る。アスペルギルスおよびトリコデルマ宿主細胞の形質転換のための適当な手段は、E P 2 3 8 0 2 3 および Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81 : 1470-1474 に記載されている。フザリウム種を形質転換するための適当な方法は、Malardier ら., 1989, Gene 78: 147-156 および W O 9 6 / 0 0 7 8 7 により記載されている。酵母菌は、Becker and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito ら., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; および Hinnen ら., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920 により記載されている手段を使用して形質転換され得る。

10

【 0 1 2 9 】

本発明は、また、(a) ポリペプチドの生産のために貢献する条件下で、ポリペプチドを生産することが可能である野生型形態における細胞を培養すること；および (b) ポリペプチドを回収することを含む、本発明のポリペプチドを生産するための方法に関する。好ましくは、細胞はアスペルギルス属、さらに好ましくはアスペルギルス・フミガーツスのものである。

20

【 0 1 3 0 】

本発明は、また、(a) ポリペプチドの生産のために貢献する条件下で宿主細胞を培養すること；および (b) 該ポリペプチドを回収することを含む本発明のポリペプチドを生産するための方法に関する。

【 0 1 3 1 】

本発明の生産方法において、細胞は、当分野でよく知られている方法を使用してポリペプチドの生産に適当な栄養培地において培養される。例えば、細胞は、適当な培地中で、ポリペプチドが発現され、および / または単離される条件下で行われる、振とうフラスコ培養および研究室または産業発酵槽中の小規模または大規模発酵（連続的な、バッチ、フェドバッチまたは固体発酵を含む）により培養され得る。培養は、当分野で知られている方法を使用して、炭素および窒素供給源ならびに無機塩を含む適当な栄養培地中で行う。適当な培地は、市販の供給者から入手できるか、または公開された組成（例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカatalog）にしたがって製造され得る。ポリペプチドが栄養培地に分泌されるとき、ポリペプチドは、培地から直接、回収することができる。ポリペプチドが培地に分泌されないとき、それは、細胞溶解物から回収することができる。

30

【 0 1 3 2 】

該ポリペプチドは、ポリペプチドに対して特異的である当分野で知られている方法を使用して検出され得る。これらの検出方法は、特異的抗体の使用、酵素生成物の形成または酵素基質の消失を含み得る。

40

【 0 1 3 3 】

例えば、酵素アッセイは、本明細書に記載されているポリペプチドの活性を測定するために使用され得る。

【 0 1 3 4 】

得られるポリペプチドは、当分野で知られている方法を使用して回収され得る。例えば、ポリペプチドは、遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発または沈降を含むが、これらに限定されない慣用の処理により、栄養培地から回収され得る。本発明のポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチドを得るために、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換

50

、親和性、疎水性、クロマト分画およびサイズ排除)、電気泳動処理(例えば、分取用等電点電気泳動)、示差溶解度(例えば、硫酸アンモニウム沈殿)、SDS-PAGEまたは抽出(例えば、Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989参照)を含むが、これらに限定されない当分野で知られている種々の処理により精製され得る。

【0135】

1つの局面において、少なくとも1つ、例えば、2つ、例えば、3つ、例えば、4つのアミノ酸修飾は、アミノ酸置換である。

1つの局面において、本発明のポリペプチドにおけるすべてのアミノ酸修飾はアミノ酸置換である。

10

【0136】

1つの局面において、少なくとも1つ、例えば、2つ、例えば、3つ、例えば、4つのアミノ酸修飾は、アミノ酸欠失である。

1つの局面において、本発明のポリペプチドにおけるすべてのアミノ酸修飾はアミノ酸欠失である。

【0137】

1つの局面において、少なくとも1つ、例えば、2つ、例えば、3つ、例えば、4つのアミノ酸修飾は、アミノ酸挿入である。

1つの局面において、本発明のポリペプチドにおけるすべてのアミノ酸修飾はアミノ酸挿入である。

20

【0138】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドの配列同一性は、配列番号1と比較して測定される(ここで、配列番号1のアミノ酸配列は、シグナルペプチド配列、例えば、その天然シグナルペプチド配列をさらに含む)。

【0139】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179からなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

30

【0140】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12F、13Y、15Y、34K、54Q、54W、77V、77M、77Y、77L、77S、81I、82I、99Y、104W、110A、113D、113A、114F、114D、114Y、118V、122F、122D、141Q、154R、159D、162E、162D、164F、166F、175L、175K、175E、175Yおよび179Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0141】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、G12F、G13Y、I15Y、G34K、N54Q、I77V、I77M、I77Y、I77L、I77S、V81I、V82I、K99Y、T104W、T110A、Y113D、Y113A、N114F、N114D、N114Y、I118V、R122F、R122D、N141Q、K154R、N159D、S162E、S162D、164F、Y166F、Q175L、Q175K、Q175E、Q175YおよびS179Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

40

【0142】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号1-22から選択される最も高い同一性パーセントを有する配列と少なくとも76、7

50

8、80、85、90、95、98または95%同一性を有する。

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、 - ゼリーロール折り畳みを有する。

【0143】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12および13から選択される位置における1または2つのアミノ酸修飾がアミノ酸置換であるポリペプチドである。

【0144】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、位置12におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換であるポリペプチドである。

10

【0145】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、位置13におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換であるポリペプチドである。

20

【0146】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、位置12におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換であるポリペプチドである。

【0147】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、位置13におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換であるポリペプチドである。

【0148】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、全250未満のアミノ酸、例えば、240未満、例えば、230未満、例えば、220未満、例えば、210未満、例えば、200未満のアミノ酸、例えば、160から240の範囲、例えば、160から220の範囲のアミノ酸を有する。

30

【0149】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、アミノ酸位置12、13、34、77、81、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166および175のいずれか1つまたはそれ以上で1つまたはそれ以上の修飾を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

40

【0150】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12F、13Y、13F、110A、122D、113A、13Y、54Q、54W、113D、175L、122F、34K、99Y、104W、141Q、154R、159D、175K、81I、166F、162E、162D、164F、114D、114Y、114F、118V、175K、77L、77M、77S、77Vおよび77Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0151】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、G12

50

F、G 1 3 Y、G 1 3 F、N 5 4 Q、T 1 1 0 A、R 1 2 2 D、Y 1 1 3 A、G 1 3 Y、Y 1 1 3 D、Q 1 7 5 L、R 1 2 2 F、G 3 4 K、K 9 9 Y、T 1 0 4 W、N 1 4 1 Q、K 1 5 4 R、N 1 5 9 D、Q 1 7 5 K、V 8 1 I、Y 1 6 6 F、S 1 6 2 E、S 1 6 2 D、W 1 6 4 F、N 1 1 4 D、N 1 1 4 Y、N 1 1 4 F、I 1 1 8 V、、I 7 7 L、I 7 7 M、I 7 7 S、I 7 7 VおよびI 7 7 Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0152】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12、13、99、104、110、113、122、141、154、159および175の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の修飾を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

10

【0153】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、13および122のアミノ酸位置で置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0154】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、114および166の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の修飾をさらに含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

20

【0155】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、114および166の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の置換をさらに含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0156】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、以下のアミノ酸位置12、13、99、104、110、113、114、122、141、154、159、166および175の少なくとも4つで置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

30

【0157】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、13、113および122のアミノ酸位置で置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0158】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12、113および122のアミノ酸位置で置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0159】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、13、113、122および175のアミノ酸位置で置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

40

【0160】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12F、13Y、99Y、104W、110A、113D、114D、114F、122F、154R、159D、166F、175Kおよび175Lからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0161】

50

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、アミノ酸配列が、最も高い同一性を有する配列番号 1 - 22 から選択される配列と比較して、少なくとも 5、6、7、8、9 または 10 個のアミノ酸置換を有するポリペプチドである。

【0162】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、アミノ酸配列が、少なくとも 9 または 10 個のアミノ酸置換を有するポリペプチドである。

【0163】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、ふすま可溶化活性を有する。

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、単離された形態である。

【0164】

本明細書において使用される「単離された」なる用語は、ポリペプチドが、自然界においてその配列が本来結合している少なくとも 1 つの他の成分から少なくとも実質的に遊離していることを意味する。

【0165】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、キシラナーゼ活性アッセイにおいて測定されるとき、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列と比較して、改善されたキシラナーゼ活性を有する。

【0166】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175 および 179 から選択される位置の修飾の結果として改善されたキシラナーゼ活性を有し、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0167】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、ふすま可溶化活性アッセイにおいて測定されるとき、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列と比較して、改善されたふすま可溶化活性を有する。

【0168】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175 および 179 から選択される位置の修飾の結果として改善されたふすま可溶化活性を有し、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【0169】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、キシラナーゼ阻害剤に対する減少した感度を有する。

【0170】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、

- a) 13 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- b) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 166 / 175 ;
- c) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- d) 13 / 110 / 113 / 122 / 175 ;
- e) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- f) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- g) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- h) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- i) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
- j) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;

k) 1 3 / 7 7 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 l) 1 3 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 m) 1 3 / 8 1 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 n) 1 3 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 6 4 / 1 7 5 ;
 o) 1 3 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 6 2 / 1 7 5 ;
 p) 1 3 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 q) 1 3 / 7 7 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 r) 1 3 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 s) 1 2 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 t) 1 3 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 u) 1 3 / 3 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 v) 1 3 / 7 7 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 w) 1 3 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 x) 1 3 / 7 7 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 y) 1 3 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 8 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 z) 1 3 / 1 5 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 7 5 ;
 a a) 1 3 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 6 2 / 1 7 5 ;
 b b) 1 3 / 7 7 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 c c) 1 3 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;
 ;
 d d) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 /
 1 7 5 ;
 e e) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 /
 1 7 5 ;
 f f) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 /
 1 7 5 ;
 g g) 1 3 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9
 / 1 7 5 ; および
 h h) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 /
 1 5 9 / 1 7 5

10

20

30

からなる一覧から選択される位置の修飾を含むアミノ酸配列を有し、該位置は、配列番号
 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。

【 0 1 7 1 】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、

a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 b) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 6 6 F / 1 7 5 L ;
 c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 d) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;
 e) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 7 5 L ;
 f) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 7 5 K ;
 g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 K ;
 h) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 i) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

40

50

- j) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 114Y / 122F / 154R / 159D / 175K ;
- k) 13Y / 77L / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- l) 13Y / 113D / 122D / 175L ;
- m) 13Y / 81I / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- n) 13Y / 110A / 113D / 122D / 164F / 175L ;
- o) 13Y / 110A / 113D / 122D / 162D / 175L ;
- p) 13Y / 110A / 113D / 122D / 175L ; 10
- q) 13Y / 77Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- r) 13F / 113D / 122D / 175L ;
- s) 12F / 113D / 122D / 175L ;
- t) 13Y / 113D / 122F / 175L ;
- u) 13Y / 34K / 110A / 113D / 122D / 175L ;
- v) 13Y / 77V / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- w) 13Y / 99Y / 104W / 113D / 122D / 175L ;
- x) 13Y / 77M / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ; 20
- y) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 118V / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- z) 13Y / 15Y / 113D / 122D / 175L ;
- aa) 13Y / 110A / 113D / 122D / 162E / 175L ;
- bb) 13Y / 77S / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- cc) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 141Q / 154R / 159D / 175L ;
- dd) 13Y / 54Q / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 141Q / 154R / 159D / 175L ; 30
- ee) 13Y / 54W / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 141Q / 154R / 159D / 175L ;
- ff) 13Y / 54Q / 99Y / 104W / 110A / 113D / 114F / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- gg) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 114F / 122F / 141Q / 154R / 159D / 175L ; および
- hh) 13Y / 54Q / 99Y / 104W / 110A / 113D / 114F / 122F / 141Q / 154R / 159D / 175L
- からなる一覽から選択されるアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有し、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。 40

【0172】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、

- a) 13Y / 110A / 113D / 122D / 154R / 159D / 175L ;
- b) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 166F / 175L ;
- c) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 114F / 122F / 154R / 159D / 175L ;
- d) 13Y / 110A / 113D / 122F / 175L ;
- e) 13Y / 99Y / 104W / 110A / 113D / 122F / 154R / 159D / 50

1 7 5 L ;
 f) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 7 5 K ;
 g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 K ;
 h) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 i) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 j) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 10
 1 5 9 D / 1 7 5 K ;
 k) 1 3 Y / 7 7 L / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 l) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 m) 1 3 Y / 8 1 I / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 n) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 4 F / 1 7 5 L ;
 o) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 D / 1 7 5 L ;
 p) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 q) 1 3 Y / 7 7 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 20
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 r) 1 3 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 s) 1 2 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 t) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;
 u) 1 3 Y / 3 4 K / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 v) 1 3 Y / 7 7 V / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 w) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 x) 1 3 Y / 7 7 M / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ; 30
 y) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 8 V / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 z) 1 3 Y / 1 5 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 a a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 E / 1 7 5 L ; および
 b b) 1 3 Y / 7 7 S / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L
 c c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q / 1 5 4 R
 / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 d d) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ; 40
 e e) 1 3 Y / 5 4 W / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 g g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 4 1 Q
 / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ; および
 h h) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 4 1 Q / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L
 からなる一覧から選択されるアミノ酸置換からなるアミノ酸配列を有し、該位置は、配列
 番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定される。 50

【 0 1 7 3 】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、

- a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- b) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Y 1 6 6 F / Q 1 7 5 L ;
- c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- d) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
- e) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; 10
- f) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
- g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
- h) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- i) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- j) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ; 20
- k) G 1 3 Y / I 7 7 L / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- l) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- m) G 1 3 Y / V 8 1 I / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- n) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / W 1 6 4 F / Q 1 7 5 L ;
- o) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 D / Q 1 7 5 L ;
- p) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- q) G 1 3 Y / I 7 7 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; 30
- r) G 1 3 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- s) G 1 2 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- t) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
- u) G 1 3 Y / G 3 4 K / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- v) G 1 3 Y / I 7 7 V / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- w) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- x) G 1 3 Y / I 7 7 M / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; 40
- y) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / I 1 1 8 V / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- z) G 1 3 Y / I 1 5 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
- aa) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 E / Q 1 7 5 L ;
- bb) G 1 3 Y / I 7 7 S / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- cc) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / N 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
- dd) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / N 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; 50

e e) G 1 3 Y / N 5 4 W / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

f f) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

g g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; および

h h) G 1 3 Y / 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L

からなる一覧から選択されるアミノ酸置換を含む配列番号1のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 7 4 】

いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、

a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

b) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Y 1 6 6 F / Q 1 7 5 L ;

c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

d) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;

e) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

f) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;

g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;

h) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

i) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

j) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;

k) G 1 3 Y / I 7 7 L / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

l) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

m) G 1 3 Y / V 8 1 I / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

n) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / W 1 6 4 F / Q 1 7 5 L ;

o) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 D / Q 1 7 5 L ;

p) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

q) G 1 3 Y / I 7 7 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

r) G 1 3 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

s) G 1 2 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

t) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;

u) G 1 3 Y / G 3 4 K / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

v) G 1 3 Y / I 7 7 V / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

w) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;

x) G 1 3 Y / I 7 7 M / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;

y) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / I 1 1 8 V / R 1 2 2

10

20

30

40

50

F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 z) G 1 3 Y / I 1 5 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 a a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 E / Q 1 7 5 L ;
 b b) G 1 3 Y / I 7 7 S / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5
 c c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / N 1 4
 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 d d) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / N 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 e e) G 1 3 Y / N 5 4 W / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4
 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 g g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2
 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; および
 h h) G 1 3 Y / 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F
 / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L

10

からなる一覽から選択されるアミノ酸置換からなる配列番号1のアミノ酸配列を有する。

【0175】

本発明のいくつかの態様において、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは大規模適
 用のために使用される。

20

【0176】

好ましくは、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、宿主生物の培養後の全細胞培
 養容量が1g/リットルから約100g/リットルの量で生産される。

【0177】

本発明は、また、本明細書に記載されているキシラナーゼ活性を有するポリペプチドお
 よび/またはキシラナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含
 む組成物に関する。

【0178】

本発明の組成物は、匂い、香味、口当たりのよい、一貫性、質感、こく、食感、硬度、
 粘度、ゲルの破壊、構造および/または官能特性ならびに該組成物を含む消費産物の栄
 養摂取の改善をもたらすことができる。さらに、本発明の組成物は、また、該改良を送達
 するために他の消費産物の成分と組み合わせて使用することができる。

30

【0179】

本発明の組成物は、匂い、香味、口当たりのよい、一貫性、質感、こく、食感、硬度、
 粘度、ゲルの破壊、構造、表面の滑らかさおよび/または官能特性ならびに該組成物を含
 む消費産物の栄養摂取を改善するために使用されることが好ましいが、本発明は、また
 、消費者へ医薬的または生理学的利益を送達するために他の成分との医薬組合せの成分と
 して、本発明の組成物を使用することを包含する。

【0180】

したがって、本発明の組成物は、他の成分と組み合わせて使用され得る。

40

【0181】

他の成分の例は、1つ以上の増粘剤、ゲル化剤、乳化剤、結合剤、結晶修飾剤、甘味剤
 (人工甘味剤を含む)、レオロジー修飾剤、安定剤、酸化防止剤、色素、酵素、担体、ビ
 ヒクル、賦形剤、希釈剤、滑剤、香味剤、着色物質、懸濁剤、崩壊剤、造粒結合剤など
 を含む。これらの他の成分は天然であり得る。これらの他の成分は、化学および/または酵
 素技術の使用により製造され得る。

【0182】

本明細書において使用される「増粘剤またはゲル化剤」なる用語は、不混和液体、気体
 または不溶性固体の小滴のいずれかの粒子の動きをゆっくりにするか、または防止するこ

50

とにより、分離を防止する産物を示す。増粘は、個々の水和分子が粘度の増加を引き起こすときに起こり、分離をゆっくりにする。ゲル化は、水和分子が粒子をトラップする三次元ネットワークを形成するために連結するときに起こり、それによりそれらを固定する。

【0183】

本明細書において使用される「安定剤」なる用語は、時間による変化から産物（例えば、食品）を維持する成分または成分の組合せとして定義される。

【0184】

本明細書において使用される「乳化剤」なる用語は、エマルジョンの分離を防止する成分（例えば、食品成分）を示す。エマルジョンは、一方がもう一方に包含されて小滴形態において存在する2つの不混和物質である。エマルジョンは、小滴または分散相が油であり、そして連続的な相が水である水中油型、または水が分散相になり、そして連続的な相が油である油中水型からなることができる。液体中気体型である泡、および液体中固体型である懸濁液は、また、乳化剤の使用を介して安定させることができる。エアレーションは、気体が液体油により取り込まれ、次に、乳化剤で安定化された凝集脂肪結晶により安定される三相系となることができる。乳化剤は、水に対して親和性（親水性）を有する極性基および油に引かれる（親油性）非極性基を有する。それらは、2つの物質の接合部分で吸収され、界面膜作用を提供し、エマルジョンを安定させる。乳化剤の親水性／親油性特性は、分子の構造により影響を受ける。これらの特性は、親水性／親油性バランス（HLB）値により同定される。低いHLB値は、油中水型エマルジョンを安定させるために使用されるより良い親油性傾向を示す。高いHLB値は、一般的に水中油型エマルジョンにおいて使用される親水性乳化剤に割り当てられる。これらの値は、簡単なシステム由来である。食物は、しばしば、乳化特性に影響を及ぼす他の成分を含むため、HLB値は、いつも、乳化剤選択のための確かな指標であるとは限らない。

【0185】

本明細書において使用される「結合剤」なる用語は、物理的または化学的反応を介して、産物と結合する成分（例えば、食物成分）を示す。「イレーション(elation)」中に、例えば、水を吸収し、結合効果を提供する。しかしながら、結合剤は、他の液体、例えば、油を吸収し、産物内にそれらを維持することができる。本発明の文脈において、結合剤は、一般的に、固体または低水分産物、例えば、ベーキング産物：ペストリー、ドーナツ、パンおよび他のものにおいて使用される。

【0186】

本明細書において使用される「結晶修飾剤」なる用語は、脂肪または水のいずれかの結晶化に影響を及ぼす成分（例えば、食物成分）を示す。氷晶の安定化は2つの理由のために重要である。第1は、分離観点から産物安定性に直接関連する。凍結融解サイクルに産物が遭遇すればするほど、より大きな氷晶となる。これらの大型結晶は、細胞壁の場合のように天然の、または「イレーション」により創造される、産物構造を破壊し得る。水がもはや適所に支えられていないため、産物は、解凍後、シネレシス、または浸出を示し得る。

【0187】

第2に、消費される産物が凍っている場合、これらの大型結晶は望ましくないザラザラした食感をもたらす。

【0188】

「担体」または「ビヒクル」は、化合物投与のために適当な原料を意味し、非毒性であり、有害な様式で組成物の何らかの成分と相互作用しない当分野で知られているあらゆる原料、例えば、あらゆる液体、ゲル、溶媒、液体希釈剤、可溶化剤などを含む。

【0189】

栄養的に許容される担体の例は、例えば、水、塩溶液、アルコール、シリコーン、ワックス、ワセリン、植物油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、リボソーム、糖、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、界面活性剤、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、ペト

10

20

30

40

50

ロエスラル(petroethral)脂肪酸エステル、ヒドロキシメチル - セルロース、ポリビロピロリドンなどを含む。

【0190】

賦形剤の例は、1つ以上の微結晶セルロースおよび他のセルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、第二リン酸カルシウム、グリシン、デンプン、乳糖および高分子量ポリエチレングリコールを含む。

【0191】

崩壊剤の例は、1つ以上のデンプン（好ましくはトウモロコシ、ジャガイモまたはタピオカデンプン）、グリコール酸ナトリウムデンプン、クロスカルメロースナトリウムおよび特定の複合珪酸塩を含む。

【0192】

造粒結合剤の例は、1つ以上のポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、スクロース、マルトース、ゼラチンおよびアカシアを含む。

【0193】

滑剤の例は、1つ以上のステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリルおよびタルクを含む。

【0194】

希釈剤の例は、1つ以上の水、エタノール、プロピレングリコールおよびグリセリンならびにそれらの組合せを含む。

【0195】

他の成分は、同時に（例えば、それらが一緒に混合物であるとき、または、それらが異なる経路により送達されるとき）または連続して（例えば、それらが異なる経路により送達されもよい）使用され得る。

【0196】

本明細書において使用される「動物またはヒト消費のために適当な成分」なる用語は、栄養利益、ファイバー代替物であり得るか、または一般的に消費者に対して有益な効果を有する補助食品として、本発明の組成物に加えられるか、または加えることができる化合物を意味する。該成分は、不必要な粘度を加えることなく、ゲル化、キメ出し(texturising)、安定化、懸濁、皮膜形成および構造化、みずみずしさの保持を必要とする多種多様の産物において使用することができる。好ましくは、該成分は、生存可能な培養物の貯蔵寿命および安定性を改善することができる。

【0197】

例として、成分は、プレバイオティクス、例えば、アルギン酸塩、キサンタン、ペクチン、イナゴマメガム（LBG）、イヌリン、グアーガム、ガラクトオリゴ糖（GOS）、フラクトオリゴ糖（FOS）、乳果オリゴ糖、大豆オリゴ糖、パラチノース、イソマルトオリゴ糖、グルコースオリゴ糖およびキシロオリゴ糖であり得る。

【0198】

本発明の組成物は、食物として、またはそれらの製造において使用され得る。ここで、「食物」なる用語は、広い意味において使用され、ヒトのための食物ならびに動物のための食物（すなわち、えさ）を含む。好ましい局面において、食物はヒト消費のためである。

【0199】

食物は、使用および/または適用様式および/または投与経路に依存して、溶液形態において、または固体としてであり得る。

【0200】

食物、例えば、機能性食品として、またはそれらの製造において使用されるとき、本発明の組成物は、1つ以上の栄養的に許容される担体、栄養的に許容される希釈剤、栄養的に許容される賦形剤、栄養的に許容されるアジュバント、栄養的に活性な成分と組み合わせて使用され得る。

10

20

30

40

50

本発明の組成物は、食物成分として使用され得る。

【0201】

本明細書において使用される「食物成分」なる用語は、栄養補助食品および／または食物繊維補助食品として機能性食品または食料品に加えられるか、または加えることができる製剤を含む。本明細書において使用される食物成分なる用語は、また、粘度を加えることなく、ゲル化、キメ出し、安定化、懸濁、皮膜形成および構造化、みずみずしさの保持ならびに食感の改善を必要とする多種多様の産物において低レベルで使用するすることができる製剤を示す。

【0202】

食物成分は、使用および／または適用様式および／または投与経路に依存して、溶液形態において、または固体としてであり得る。

10

【0203】

本発明の組成物は、食物補助食品であってもよく、またはそれに加えられてもよい。

本発明の組成物は、機能性食品であってもよく、またはそれに加えられてもよい。

【0204】

本明細書において使用される「機能性食品」なる用語は、栄養効果および／または味の満足感を提供することができるだけでなく、消費者にさらなる有益な効果を送達することも可能である食物を意味する。

【0205】

したがって、機能性食品は、純粋な栄養効果以外の特定の機能、例えば、医薬的または生理学的利点を食物に与える、食物に包含されている要素または成分（例えば、本明細書に記載されているもの）を有する普通の食物である。

20

【0206】

機能性食品の法的な定義はないが、分野における多数の関係者が、特定の健康への影響を有するとして市販されている食物と一致する。

【0207】

いくつかの機能性食品は栄養補助食品である。本明細書において「栄養補助食品」なる用語は、栄養効果および／または味の満足感を提供することができるだけでなく、消費者に治療（または他の有益な）効果を送達することも可能である食物を意味する。栄養補助食品は、食物と医薬の従来境界線を交差する。

30

【0208】

調査により、消費者が心臓疾患に関する機能性食品に最も重点を置いていることが示唆されている。癌の予防は、栄養摂取の別の局面であり、多くの消費者に関心をもたせているが、興味深いことに、わずかにコントロールできると消費者が感じている領域である。事実、世界保健機関によると、少なくとも35%の癌の原因は食事関連である。骨粗鬆症、消化管の健康および肥満効果に関連するさらなる要求は、また、機能性食品購入を刺激し、市場開発を動かす可能性のある重要な因子である。

【0209】

本発明の組成物は、食品の製造物、例えば、1つ以上のジャム、マーマレード、ゼリー、乳製品（例えば、ミルクまたはチーズ）、肉製品、鳥肉製品、魚製品およびベーカリー産物において使用することができる。

40

【0210】

例として、本発明の組成物は、清涼飲料、乳漿タンパク質を含む果汁または飲料、ヘルステイ(health tea)、ココア飲料、ミルク飲料および乳酸菌飲料、ヨーグルトおよび飲料ヨーグルト、チーズ、アイスクリーム、水氷およびデザート、菓子、ビスケットケーキおよびケーキ粉末食品、スナック食品、朝食用の穀物、即席めんおよびカップめん、即席スープおよびカップスープ、バランスのとれた食物および飲料、甘味剤、質感が改善されたスナック食品の棒状物、繊維棒状物、焼きに安定なフルーツ充填物、保護グレイズ(car e glaze)、チョコレートベーカリー充填物、チーズケーキ香味付け充填物、フルーツ香味付けケーキ充填物、ケーキおよびドーナツの砂糖衣、熱安定なベーカリー充填物、即席ベ

50

ーカリ－充填物クリーム、クッキー用の充填物、すぐに食べられるベーカリ－充填物、低カロリー充填物、成人用栄養飲料、酸性大豆／汁飲料、無菌／レトルトチョコレート飲料、棒状物の粉末食品、飲料粉末、カルシウム強化大豆／プレーン(plain)およびチョコレートミルク、カルシウム強化コーヒー飲料に対する成分として使用することができる。

【0211】

本発明の組成物は、さらに、食品、例えば、アメリカンチーズソース、粉＆細切りチーズのための凝固阻止剤、チップディップ、クリームチーズ、乾燥混合ホイップディップ(whipped topping)脂肪非含有サワークリーム、凍結／解凍された乳製品ホイッピング・クリーム、凍結／解凍された安定なホイップディップ(whipped tipping)、低脂肪＆低カロリーのナチュラルCHEDDAR・チーズ、低脂肪スイススタイル(Swiss style)ヨーグルト、気泡含有(aerated)凍結デザート、およびノベルティーバー(novelty bars)、ハードバックアイスクリーム、ラベルフレンドリー(label friendly)、経済的に改善された&インダulgence(indulgence)のハードバックアイスクリーム、低脂肪アイスクリーム：ソフトクリーム、パーベキューソース、チーズディップソース、カッテージ・チーズドレッシング、乾燥混合物アルフレド(Alfredo)ソース、ミックスチーズソース、乾燥混合物トマトソースおよび他のものの成分として使用することができる。

10

【0212】

ある局面において、好ましくは、食料品は飲料である。

ある局面において、好ましくは、食料品はベーカリ－産物、例えば、パン、デニッシュ・ペストリー、ビスケットまたはクッキーである。

20

【0213】

本発明は、また、食物または食物成分を製造する方法であって、本発明のプロセスにより生産されるキシラナーゼまたは本発明の組成物を別の食物成分とともに含む方法を提供する。製造方法または食物成分も、また、本発明の別の局面である。

【0214】

一般的な意味において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、アラビノキシランを含む不溶性の植物細胞壁原料を可溶性にする、および／または分解し、植物細胞壁原料を含む溶液または系において、ヘミセルロースまたはアラビノキシランの存在由来の粘度を改変する、例えば、減少させるために使用され得る。一般的に、該植物細胞壁原料は、1つ以上のキシラナーゼ阻害剤を含む。

30

【0215】

具体的には、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、食料品、例えば、動物飼料として使用するための植物原料の処理、デンプン生産、ベーキング、セルロース性原料からのバイオエタノールの生産および紙を作るための木材パルプの処理において使用され得る。

【0216】

本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、植物原料、例えば、動物飼料を含む食料品において使用される穀物を処理するために使用され得る。本明細書において使用される「穀物」なる用語は、食物のために使用される穀粒のあらゆる種類、および／またはこの穀粒、例えば、限定はしないが、小麦、粉碎小麦、大麦、メイズ、モロコシ、ライ麦、カラスムギ、ライコムギおよびコメのいずれか1つまたはそれらの組合せを生産するあらゆる植物体を意味する。1つの好ましい態様において、穀物は小麦穀物である。

40

【0217】

食物および／または飼料補助食品におけるキシランは、キシランを本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドと接触させることにより修飾されている。

【0218】

本明細書において使用される「接触」なる用語は、食物および／または飼料補助食品に本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを噴霧する、食物および／または飼料補助食品を本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドでコーティングする、含浸するまたは層を成すことを含むが、これらに限定されない。

50

【0219】

1つの態様において、本発明の食物および/または飼料補助食品は、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドを食物および/または飼料補助食品と直接混合することにより製造され得る。例として、キシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、穀物ベース食物および/または飼料補助食品、例えば、粉碎小麦、メイズまたは大豆穀粉に接触させ得る（例えば、噴霧することにより）。

【0220】

後に本発明の食物および/または飼料補助食品に加えられる第2の（および異なる）食物および/または飼料または飲料水にキシラナーゼ活性を有するポリペプチドを包含させることも可能である。したがって、本発明により提供されるキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、穀物ベース食物および/または飼料補助食品それ自体に包含されることは必須ではないが、このような包含が本発明の特に好ましい局面を形成する。

【0221】

本発明の1つの態様において、食物および/または飼料補助食品は、他の食物および/または飼料成分と混合され、穀物ベース食物および/または飼料を生産し得る。このような他の食物および/または飼料成分は、1つ以上の他の（好ましくは熱安定な）酵素補助食品、ビタミン食物および/または飼料補助食品、ミネラル食物および/または飼料補助食品およびアミノ酸食物および/または飼料補助食品を含み得る。恐らくいくつかの異なる型の化合物を含む、得られる（混合された）食物および/または飼料補助食品は、次に、他の食物および/または飼料成分、例えば、穀物およびタンパク質補助食品と適当な量で混合され、ヒト食物および/または動物飼料を形成することができる。

【0222】

1つの好ましい態様において、本発明の食物および/または飼料補助食品は、適当な活性を有する異なる酵素と混合することにより、酵素混合物を生産することができる。例として、例えば、粉碎小麦またはメイズから形成される穀物ベース食物および/または飼料補助食品は、キシラナーゼ酵素および適当な活性を有する他の酵素と同時に、または連続してのいずれかで接触させられ得る（例えば、噴霧により）。これらの酵素は、任意の1つ以上のアミラーゼ、グルコアミラーゼ、マンナーゼ、ガラクトシダーゼ、フィターゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、ガラクトリパーゼ、グルカナーゼ、アラビノフラノシダーゼ、フェルロイルエステラーゼ、ペクチナーゼ、プロテアーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼおよびキシラナーゼを含み得るが、これらに限定されない。所望の活性を有する酵素は、例えば、これらの酵素を穀物ベース食物および/または飼料補助食品と接触させる前に、本発明のキシラナーゼと混合させてもよく、あるいは、このような酵素は、このような穀物ベース補助食品と同時に、または連続して接触させてもよい。次に、食物および/または飼料補助食品は、穀物ベース食物および/または飼料と同様に混合させ、最終食物および/または飼料を製造する。また、個々の酵素活性の溶液として食物および/または飼料補助食品を調製し、次に、この溶液を食物および/または飼料原料と混合させ、食物および/または飼料補助食品をペレットに、またはマッシュ(mash)として処理することも可能である。

【0223】

本発明は、食料品を製造するためのプロセスにおける本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドの使用を提供する。本発明における典型的なベーカリー（ベークド）産物は、パン、例えば、ローフ、ロールパン、丸いパン、ピザベースなど、プレッツェル、トルティヤ、ケーキ、クッキー、ビスケット、クラッカーなどを含む。食料品、例えば、ベーカリー産物の製造は、当分野でよく知られている。ドー生産は、例えば、実施例4に記載されている。ベーキング性能を変える本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドの使用は、実施例4に記載されている。

【0224】

本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、また、穀物および塊茎、例えば、ジャガイモ由来の植物原料からのデンプン生産において使用され得る。

【 0 2 2 5 】

本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、また、木材加工パルプ、例えば、紙の製造において使用され得る。

【 0 2 2 6 】

バイオエタノール生産のためのセルロース性原料の処理

本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、また、バイオエタノールに対する発酵性の糖の生産のためのセルロース性植物原料の加水分解において使用され得る。

【 0 2 2 7 】

いくつかの特定の態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、ドー処理温度、例えば、約 20 から約 40 の範囲で最適なキシラナーゼ活性を有する。いくつかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、ベーキング処理中、不活性である。

【 0 2 2 8 】

いくつかのほかの態様において、本発明のキシラナーゼ活性を有するポリペプチドは、対応する野生型酵素と比較して、熱安定性および/または最適温度が増加しており、熱処理後に安定性を維持する。両方の特性が当業者に知られている。

【 実施例 】

【 0 2 2 9 】

実施例 1

実施例 1 - キシラナーゼの部位特異的変異誘発および発現

枯草菌キシラナーゼの特異的変異体を、シグナル配列なしの野生型キシラナーゼ遺伝子 (a t g g c t a g c a c a g a c t a c t g g c a a - - - - - t g g t a a) と融合した p E T 2 4 a 由来のリボソーム結合部位 (c t a g a a a t a a t t t t g t t t a a c t t t a a g a a g g a g a t a t a c a t) を含む構築物を使用して得て、それをベクター p C R B l u n t (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA) に移入した。これは、構築されたベクターで形質転換後、T O P 1 0 細胞 (I n V i t r o g e n) におけるキシラナーゼの構成的発現をもたらした (ただし、遺伝子の方向は「時計回り」方向である)。次に、遺伝子における部位特異的変異を、製造業者のプロトコールにしたがって、「クイックチェンジ(QuickChange)」変異誘発キット (Stratagene, La Jolla, CA, USA) の使用により得た。変異体は、シーケンシングにより立証した。立証された変異体の十分な生産を 1 L 規模における形質転換された T O P 1 0 細胞の増殖により得た。

【 0 2 3 0 】

実施例 2 - キシラナーゼ変異体のふすま可溶化試験

小麦ふすまは商業的適用において使用されているので、本発明者らは、キシラナーゼ変異体の比活性を評価するために、基質として小麦ふすまを使用した。

【 0 2 3 1 】

ふすま基質：

実施例において、ふすまは、小麦を小麦粉およびふすまに製粉するために、供給者により提供されるセッティングおよび条件を使用する研究室規模の C h o p i n C D A u t o M i l l (Chopin Technologies, France) を使用して、小麦の乾式製粉から得られた小麦ふすまである。得られたふすま画分を、ふすま可溶化アッセイにおける基質として使用し得る。本実施例において、小麦を穀物供給源として使用した。

【 0 2 3 2 】

ふすま可溶化アッセイ：

(0 . 1 M) - リン酸水素二ナトリウム (0 . 2 M) バッファー、p H 5 . 0 中の小麦ふすまの懸濁液を、1 , 3 3 % のふすまの濃度 (w / w) に調製する。この懸濁液から、7 5 0 1 のアリコートを手動でエッペンドルフチューブに移す。それぞれの基質チューブを 4 0 で 5 分間予め加熱する。そこに、2 5 0 μ l の酵素溶液を加え、基質 1 % の最終濃度を作る。各測定時間 (0 , 3 0 , 6 0 および 2 4 0 分) に対し、酵素濃度を増加させて (0 , 3 3 ; 1 , 0 および 3 , 0 μ g のキシラナーゼ / グラムふすま) 、各キシラナ

ーゼから3つの希釈物(デュプリケート)を作る。ブランクとして、キシラナーゼの熱変性した溶液を使用する。反応は、95℃でチューブをインキュベーターセットに移すことにより、所定の時間に終了する。全酵素反応が終了するまで、熱変性したサンプルを4℃で維持する。全酵素反応が終了したとき、エッペンドルフチューブを遠心し、透明な上清を得る。ふすまを可溶性にする酵素能力は、PAHBAH試薬を使用して末端基の還元増加により測定されるOD₄₁₀増加として示される(Lever, 1972)。

【0233】

要するに、還元末端基がPAHBAHと反応し、OD₄₁₀で定量することができる着色反応産物を形成する。

【0234】

上記ふすま可溶化アッセイは、ふすま基質中の残存デンプンに対して活性な酵素の副活性(side activity)に対して感知する。

【0235】

枯草菌キシラナーゼの精製プロトコール:

キシラナーゼを発現している大腸菌TOP10細胞を、遠心分離(20分、3500×g、20℃)により回収し、50mMのTris、2mMのEDTA、pH7.4に再懸濁した。細胞を1mg/mlのリゾチーム(ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, US, cat. No. 100831)の添加により開き、スラリーを環境温度で2時間攪拌し、凍結および解凍、次に超音波処理した。pHを1MのHClを使用して4.0に調節し、次に遠心分離(20分、3500×g、20℃)した。キシラナーゼを含む上清を、50mMの酢酸ナトリウム、pH4.5中で平衡化し、溶離される使い捨てPD-10脱塩カラム(Amersham Bioscience, Sweden)を使用して脱塩した。脱塩サンプルを、50mMの酢酸ナトリウム、pH4.5であらかじめ平衡にした10mlのSOURCE15Sカラム(Amersham Bioscience, Sweden)上に負荷した。次に、カラムを平衡バッファーで洗浄し、直線NaCl勾配(50mMの酢酸ナトリウム、0-0.35MのNaCl、pH4.5)で溶離した。キシラナーゼ活性を含む画分をプールし、さらなる分析のために使用した。

【0236】

同様のプロトコールを、枯草菌XynAと有意に異なるpIを有する非枯草菌XynA由来のキシラナーゼ変異体に適応させてもよい。

表1. キシラナーゼ変異体の最大光学濃度、スローブインデックス、キシラナーゼBS1(配列番号1として示される枯草菌酵素)およびキシラナーゼBS3(配列番号23として示される枯草菌変異体)と比較しての相対光学濃度およびスローブとして示されるキシラナーゼのふすま可溶化活性

10

20

30

【表 1 - 1】

配列番号 1 に作られた修飾	スロープ OD/時	最大 OD	BS1 に対する 相対スロープ	BS1 に対する 相対最大 OD	BS3 に対する 相対スロープ	BS3 に対する 相対最大 OD
なし (BS1)	0,23	0,68	100	100	140	140
D11F/R122D(BS3)	0,16	0,49	72	72	100	100
G13Y/T110A/Y113D/R122D/ K154R/N159D/Q175L	0,40	1,19	173	173	242	242
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/R122F/K154R/N159D /Y166F/Q175L	0,39	1,18	172	172	241	241
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/N114F/R122F/K154R /N159D/Q175L	0,38	1,15	169	169	235	235
G13Y/T110A/Y113D/R122F/ Q175L	0,37	1,12	164	164	229	229
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/R122F/K154R/N159D /Q175L	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/R122F/K154R/N159D /Q175K	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/N114D/R122F/K154R /N159D/L175K	0,35	1,05	153	153	214	214
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/N114Y/R122F/K154R /N159D/Q175L	0,35	1,04	152	152	212	212
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/N114D/R122F/K154R /N159D/Q175L	0,34	1,02	149	149	208	208

10

20

30

【表 1 - 2】

G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/N114Y/R122F/K154R /N159D/L175K	0,33	0,98	144	144	201	201
G13Y/I77L/K99Y/T104W/T1 10A/Y113D/R122F/K154R/N 159D/Q175L	0,31	0,93	136	136	190	190
G13Y/Y113D/R122D/Q175L	0,30	0,91	133	133	186	186
G13Y/V81I/K99Y/T104W/T1 10A/Y113D/R122F/K154R/N 159D/Q175L	0,29	0,87	128	128	178	178
G13Y/T110A/Y113D/R122D/ W164F/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/T110A/Y113D/R122D/ S162D/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/T110A/Y113D/R122D/ Q175L	0,27	0,82	119	119	167	167
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T1 10A/Y113D/R122F/K154R/N 159D/Q175L	0,27	0,80	117	117	163	163
G13F/Y113D/R122D/Q175L	0,26	0,78	114	114	160	160
G12F/Y113D/R122D/Q175L	0,26	0,78	114	114	160	160
G13Y/Y113D/R122F/Q175L	0,25	0,74	109	109	152	152
G13Y/G34K/T110A/Y113D/ R122D/Q175L	0,25	0,74	108	108	150	150
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T1 10A/Y113D/R122F/K154R/N 159D/Q175L	0,23	0,69	101	101	141	141
G13Y/K99Y/T104W/Y113D/ R122D/Q175L	0,22	0,67	98	98	138	138
G13Y/I77M/K99Y/T104W/T 110A/Y113D/R122F/K154R/ N159D/Q175L	0,22	0,67	98	98	137	137
G13Y/K99Y/T104W/T110A/ Y113D/I118V/R122F/K154R /N159D/Q175L	0,21	0,63	92	92	128	128
G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q 175L	0,20	0,60	87	87	122	122
G13Y/T110A/Y113D/R122D/ S162E/Q175L	0,18	0,53	78	78	109	109

10

20

30

40

【 0 2 3 7 】

実施例 3 - キシラナーゼ活性および穀物キシラナーゼ阻害剤による相対阻害の試験

実施例 2 の変異体を、以下に示されているプロトコールおよび以下の教示にしたがって、キシラナーゼ活性およびキシラナーゼ阻害剤に対する相対感度について試験した。

【 0 2 3 8 】

キシラナーゼアッセイ (エンド - - 1 , 4 - キシラナーゼ活性)

このアッセイにおいて $OD_{590} = \text{約 } 0.7$ を得るように、サンプルをクエン酸 (0 .

50

1 M) - リン酸水素二ナトリウム (0.2 M) バッファー、pH 5.0 に希釈した。サンプルの3つの異なる希釈物を5分40秒でプレインキュベートした。時間 = 5分、1つのXylazyme 錠剤 (架橋され、染色されたキシラン基質、Megazyme, Bray, Ireland) を、1 ml の反応容量の酵素溶液に加えた。時間 = 15分、10 ml の2%のTRIS / NaOH、pH 12を加えることにより反応を終了した。ブランクは、酵素溶液の代わりに1000 µl のバッファーを使用して調製した。反応混合物を遠心し (1500 × g、10分、20℃)、上清のODを590 nmで測定した。1つのキシラナーゼユニット (XU) は、1分あたりOD₅₉₀が0.025増加するキシラナーゼ活性として定義される。

【0239】

比活性決定:

精製されたサンプルの280 nmでの光学濃度を、キシラナーゼタンパク質濃度を決定するために測定した。理論的に計算される、0.25ユニット/mg × mlの特異的OD₂₈₀ (Gasteigerら., 2003) を、枯草菌XynA由来変異体の比活性計算のために使用した。キシラナーゼ活性は上記のように測定した。

【0240】

キシラナーゼ阻害剤アッセイ

100 µl の阻害剤調製物 (種々の濃度のキシラナーゼ阻害剤を含む (定量化のために、以下のキシラナーゼ阻害剤定量化を参照))、250 µl のキシラナーゼ溶液 (12 XU キシラナーゼ/mlを含む) および650 µl のバッファー (0.1 Mのクエン酸 - 0.2 Mのリン酸水素二ナトリウムバッファー、1%のBSA (Sigma - Aldrich、USA)、pH 5.0) を混合した。混合物を40.0℃で5分間調温した。時間 = 5分に、1つのXylazyme 錠剤 (架橋され、染色されたキシラン基質、Megazyme, Bray, Ireland) を加えた。時間 = 15分に、10 ml の2% TRIS / NaOH、pH 12を加えることにより、反応を終了させた。反応混合物を遠心し (1500 × g、10分、20℃)、上清を590 nmで測定した。キシラナーゼ阻害を、ブランクと比較して、%で残存活性として計算した。阻害剤溶液を水と置き換えたが、ブランクを同じ方法で調製した。

【0241】

キシラナーゼ阻害剤定量化:

1 XIU (キシラナーゼ阻害剤ユニット) を、以下に記載される条件下で枯草菌XynAキシラナーゼ (配列番号 1) の1 XUを0.5 XUに減少させる阻害剤の量として定義する。

【0242】

12 XU/mlを含む250 µl のキシラナーゼ溶液、約100 µl のキシラナーゼ阻害剤溶液および1000 µl の反応容量に達するためのMcIlvaine バッファー、pH 5を、40℃で5分間プレインキュベートする。t = 5分で、1個のXylazyme 錠剤を反応混合物に加える。t = 15分で、10 ml の2%のTRIS / NaOH、pH 12を加えることにより反応を終了させる。溶液を濾過し、上清の吸光度を590 nmで測定する。上記アッセイにおいていくつかの異なる濃度の阻害剤を選択することにより、OD 対 阻害剤濃度のプロットを作成することが可能である。このプロットからの傾き (a) および切片 (b) ならびにキシラナーゼの濃度を使用して、与えられた阻害剤溶液中のXIUの量を計算することが可能である (方程式1)。

方程式1 $XIU = ((b/2) / -a) / x$

X = アッセイにおけるキシラナーゼユニット (XU)

【0243】

阻害剤調製:

粗阻害剤調製物 (TAXI およびXIPの両方を含む、以下、阻害剤製造物と称する) を1 kgの小麦 (Triticum aestivum) 穀粉から調製した。阻害剤調製物は、1:3比 (w/w) の水を使用して穀粉から抽出し、次に遠心分離した (3500 × g、20分、4

10

20

30

40

50

)。抽出物を65 で40分間維持し、遠心し(3500×g、20分、4)、20 mMのリン酸ナトリウムバッファー、pH7で予め平衡にした使い捨てPD-10脱塩カラム(Amersham Bioscience, Sweden)を使用して脱塩した。阻害剤調製物中のTAXI濃度を上記のように測定した。TAXIの精製および定量化のためのプロトコールは、ほかにも記載されている(Sibbesen and Soerensen, 2001)。一例として、調製物中のTAXIは、配列番号24またはそれと90%同一性を有する配列であることができた。

【0244】

表2 - キシラナーゼ活性(XU/mg)およびキシラナーゼ阻害剤濃度増加時の残存キシラナーゼ活性として示される変異体のキシラナーゼ阻害剤感度(XIU/mlアッセイ)

10

【表2 - 1】

配列番号1に作られた修飾

	比活性 XU/mg	5.6での%活性 XIU/ml	33.5での%活性 XIU/ml	50での%活性 XIU/ml	
なし(BS1)	23.000	29			
G12F/Y113D/R122D/Q175L	19.077	100			
G13F/Y113D/R122D/Q175L	32.425	100	90		20
G13Y/Y113D/R122D/Q175L	34.058		86		
G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L	59.571		50		
G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L	35.883		80		
G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q175L	37.773		76		
G13Y/Y113D/R122F/Q175L	33.566			90	
G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L	53.855			65	
G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L	15.876			97	
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K	47.975			72	30
G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	41.791			46	
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L	53.331			68	
G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L	54.924			32	
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	54.811			64	
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L	55.249			44	40
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L	52.735			40	
G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L	51.884			29	
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L	47.445			79	

【表 2 - 2】

G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N1	46.263	78	
14Y/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N1	42.077	79	
14F/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I11	27.363	79	
8V/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N1	35.906	84	
14Y/R122F/K154R/N159D/L175K			
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N1	46.939	79	10
14D/R122F/K154R/N159D/L175K			
G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113	48.177	75	
D/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y11	28.412	46	
3D/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113	12.003	20	
D/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113	35.907	45	
D/R122F/K154R/N159D/Q175L			
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113	33.236	37	20
D/R122F/K154R/N159D/Q175L			

【 0 2 4 5】

実施例 4 - 変異体のベーキング性能

ベーキングを、小麦粉または全粒小麦穀粉のいずれかを使用して、縮小したデニッシュロール(Danish Roll)のレシピ(表 3)を使用して行った。

表 3 - パンの生産のために使用されるレシピ。

【表 3】

成分	ミニスケール(Mini skala)
	ml または g
穀粉	50
乾燥酵母	1
塩	0.8
糖	0.8
	400 BU
水	2%

注意：水は、穀粉の Farinograph 分析により測定される 400 BU での水分吸収である(すなわち、400 ベーカー吸収度(bakers absorbance) - Brabender Farinograph, Brabender, Germany を使用する水分吸収測定にしたがって加えられた水)。酵素をドーに加えるとき、それらは同量の水の代わりに液体溶液として加える。

【 0 2 4 6】

ドー作りおよびベーキング

穀粉および乾燥成分を 50 グラムの Farinograph (Brabender, Duisburg, Germany) 中で 1 分間混合し、その後、水を加え、混合をさらに 5 分間続けた。

【 0 2 4 7】

混合後、それぞれ 10 グラムの穀粉を含む 4 つのドーの塊を計量した。手動成形機を使用して、これらをパンに成形した。ローフ(Loaves)を焼き型に入れ、密閉した容器(ふたを有する)に置き、室温で 10 分間置いた。その後、パンを 34 で 85% の相対湿度(

R H) で 4 5 分間発酵させ、最後に B a g o オープン (Bago-line, Faaborg, Denmark) で 2 3 0 で 5 分間焼いた。

【 0 2 4 8 】

パンを、評価 (重量、体積測定、身および皮の評価) の前に 2 0 分間冷やした。

表 4 - 変異体のベーキング性能 - パン体積 (m l / g) ならびに対照 (酵素無添加) および枯草菌 X y n A 野生型キシラナーゼ (配列番号 1) と比較して優れたベーキング性能を示す B S 3 (修飾 D 1 1 F および R 1 2 2 D を有する配列番号 1) と比較しての相対体積増加。

【表 4】

配列番号 1 に作られた修飾	0,04mg/kg 穀粉でのハ ン体積	対照に対す る相対体積 増加、%	BS3に対す る相対体 積増加、%
G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L	4,22	41,89	20
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K	2,90	21,93	7,54
G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,80	18,02	4,09
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L	2,82	18,86	4,83
G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L	2,81	18,08	4,15
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,89	21,74	7,24
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L	2,75	13,55	1,99
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L	2,82	15,54	4,48
G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L	2,78	14,02	3,10
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,81	16,44	4,11
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,73	13,26	1,26
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,80	16,22	3,74
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,83	17,58	4,95
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K	2,89	20,65	7,34
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K	2,77	14,73	2,63
G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,81	15,08	4,32
G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,70	12,43	0,17
G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,53	5,40	(6,09)
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,60	8,19	(3,63)
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	2,73	13,81	1,38

10

20

30

40

【 0 2 4 9 】

実施例 5 水不溶性基質 対 不溶性基質に対するキシラナーゼ変異体の活性

50

B A C S U _ X y n A および T R I R E _ X y n 2 のキシラナーゼ変異体を、キシラナーゼの部位特異的変異誘発および大腸菌における発現を使用して産生した。

【0250】

水で抽出不可能な基質における活性である W U - A X a c t (不溶性基質)を測定するためのアッセイ:

このアッセイにおいて OD_{590} = 約 0.7 を得るように、サンプルをクエン酸 (0.1 M) - リン酸水素二ナトリウム (0.2 M) バッファー、pH 5.0 に希釈した。サンプルの 3 つの異なる希釈物を 5 分 40 でプレインキュベートした。時間 = 5 分で、1 つの X y l a z y m e 錠剤 (架橋され、染色されたキシラン基質、Megazyme, Bray, Ireland) を、1 ml の反応容量の酵素溶液に加えた。時間 = 15 分で、10 ml の 2% の T R I S / N a O H 、 pH 12 を加えることにより反応を終了した。ブランクは、酵素溶液の代わりに 1000 μ l のバッファーを使用して調製した。反応混合物を遠心し (1500 \times g、10 分、20)、上清の OD を 590 nm で測定した。1 つのキシラナーゼユニット (W U - A X a c t) は、1 分あたり OD_{590} が 0.025 増加するキシラナーゼ活性として定義される。

10

【0251】

上記アッセイにおいて使用される基質 (小麦から抽出される架橋され、染色されたアラビノキシラン) は、商業的適用における対応する基質に非常に近い。

【0252】

以下のアッセイを水で抽出可能な基質における活性である W E - A X a c t (可溶性基質)を測定するために使用した。

20

使用される方法は、L e v e r (Lever, M. Analytical Biochemistry. 47, 273-279, 1972) により記載されている方法の修飾されたバージョンである。可溶性小麦アラビノキシラン (平均粘度、Megazyme, Bray, Ireland から得られる) を、50 mM の N a O A c 、 pH 5 を含むバッファー系中で基質として使用した。基質濃度は 0.5% であった。キシラナーゼ活性を、P A H B A H 試薬を使用して還元末端の形成を定量することにより測定した。形成された還元末端の量およびそれによるキシラナーゼ活性を、キシロース標準曲線から決定した。本明細書において W E - A X a c t と称する。

【0253】

新規変異体を開発するために使用した骨格:

30

表 5 は使用されるキシラナーゼ変異体骨格を示す。Y 5 は配列番号 2 に相当する。

【表 5】

ID	変異体
#154	BACSU_XynA- G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175 L
#160	BACSU_XynA- G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159 D/Q175L
Y5	TRIRE_Xyn2-T2C/T28C/K58R/+191D
Y5- T120A	TRIRE_Xyn2-T2C/T28C/K58R/T120A/+191D

40

【0254】

導入された変異および得られた結果を表 6 において説明する。

表 6 . 導入された変異および得られた結果。使用された骨格は太字である。

【表 6】

変異体	WU-AX act	WE-AX act	WU-AX/WE-AX
#154/N141Q	1.965	13	146
#154/N54Q/N141Q	1.611	10	159
#160/N54Q	1.203	7	161
#160/N141Q	1.785	10	175
#154/N54W/N141Q	824	7	118
#160/N54W/N141Q	1.005	6	169
Y5/S63W	918	25	36
Y5	35.550	1.487	24
#154	10.350	106	98
#160	5.400	34	157

10

【 0 2 5 5 】

上記明細書において記載されている全ての刊行物を、出典明示により本明細書に包含させる。記載されている方法および本発明の系の種々の修飾および変化は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に明らかである。本発明は特定の好ましい態様に関連して記載されているが、本発明が過度にこのような特定の態様に制限されないと理解すべきである。実際に、生化学および生物工学または関連分野における当業者に明らかである本発明を実施するために記載されている様式の種々の修飾が、以下の特許請求の範囲内であると意図する。

20

【 0 2 5 6 】

配列表（太字のアミノ酸は、配列番号 1 の T 1 1 0 に対応するアミノ酸である）：
成熟体枯草菌野生型キシラナーゼのアミノ酸配列（配列番号 1）：

【表 7】

ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT
 INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTT
 TRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQV
 MA TEGYQSSGSSNVTWV

30

【 0 2 5 7 】

本明細書において Y 5 とも称される、成熟体トリコデルマ・リーゼイ キシラナーゼのアミノ酸配列（配列番号 2）：

【表 8】

QCIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKN
 RVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIY
 RTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTM DYQIVAVE
 GYFSSGSASITVSD

40

【 0 2 5 8 】

成熟体サーモミセス・ラヌギノサス X y n A 野生型キシラナーゼのアミノ酸配列（配列番号 3）：

【表 9】

QTPNSEGWHDGYYYSWWSDGGAQATYTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNA
RAIHFEQVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLG
KTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVA
TEGYFSSGYARITVADV

【0259】

成熟体ストレプトマイセス・ビリドスポラス(*Streptomyces viridosporus*)キシラナーゼ
のアミノ酸配列(配列番号4):

10

【表 10】

WTDAQGTVMMDLGSGGTYSTQWRNTGNFVAGKGWSTGGRKTVNYSGTFFNPNGNAYLT
LYGWTTGLPIEYYIVDNWGTYRPTGKYKGTVTSDGGTYDIYKTTRYNAPSIEGKTFDQYW
SVRQSKRTGGTITSGNHFDAWARNGMNLGNHNYMIMATEGYQSSGSSTITV

【0260】

配列番号5 (gi | 139868 | sp | P18429.1 | XYNABACSU Re
cName : 完全 = エンド - 1, 4 - ベータ - キシラナーゼ A ; Short = キシラ
ナーゼ A ; AltName : 完全 = 1, 4 - ベータ - D - キシラン キシラノヒドロラーゼ
A) :

20

【表 11】

MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWQNWDGGGIVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYR
PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTRYNAPSIDGDRFTTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW

【0261】

配列番号6 (gi | 2302074 | emb | CAA03092.1 | 名前のないタンパ
ク質産物 [同定されていない]) :

30

【表 12】

MRQKKLTLLAFLVCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDP
LYYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRAWENLGMNMGMKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
ESITLDKNN

【0262】

配列番号7 (gi | 167246404 | gb | ABZ24364.1 | 特許US731
4743の配列5) :

40

【表 13】

MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYT
NGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIE
YYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIYRTQRVNQPSSIIGTATFYQYWSVRRNHRSS
GSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS

【0263】

50

配列番号 8 (g i | 5 9 6 9 5 5 1 | g b | A A E 1 0 8 8 9 . 1 | 特許 U S 5 8 1 7 5
0 0 の配列 2) :

【表 1 4】

MVGFTPVALAALAATGALAFPAGNATELEKRQTPNSEGWHDGYYYSWWSDGGAQATYT
NLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEY
YIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTS
GTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADV

【0 2 6 4】

配列番号 9 (g i | 7 6 0 5 9 0 7 0 | e m b | C A J 3 0 7 5 3 . 1 | 名前のないタン
パク質産物 [パエニバチルス・パブリ]) :

【表 1 5】

MFKFGKLLTVVLAASMSFGVFAATTGATDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWQ
NTGNFVVGKGWTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTIFYGWTRNALIEYYVDNWGTYRP
TGTYKGTVTSDDGGTYDIYTTMRYNQPSIDGYSTFPQYWSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVN
AWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSSGSSNVTW

【0 2 6 5】

配列番号 1 0 (g i | 7 4 1 9 7 7 6 1 | e m b | C A J 2 9 6 6 6 . 1 | 名前のないタン
パク質産物 [バチルス・ハロデュランス (bacillus halodurans)]) :

【表 1 6】

MFKFVTKVLTVVIAATISFCLSAVPASANTYWQYWTDGGGTVNATNGPGGNYSVTWRDT
GNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSPNGYLTLYGWTRNQLIEYYVDNWGTYRPTG
THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNA
WRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGRSNVTW

【0 2 6 6】

配列番号 1 1 (g i | 4 7 5 6 8 1 1 | e m b | C A B 4 2 3 0 5 . 1 | 名前のないタン
パク質産物 [同定されていない]) :

【表 1 7】

MRQKKLTFILAFVLCFALTLP AEIIQAOIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDP
EYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRWENLGMNMGKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
KSITLDKNN

【0 2 6 7】

配列番号 1 2 (g i | 2 2 9 3 9 5 1 | e m b | C A A 0 2 2 4 6 . 1 | 名前のないタン
パク質産物 [枯草菌] 枯草菌 : (U S 5 3 0 6 6 3 3)) :

【表 1 8】

MFKFKKKFLVGLTAAFMSSMFSATASAAGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYR
PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW

10

20

30

40

50

【 0 2 6 8 】

配列番号 1 3 (g i | 4 2 6 8 8 9 1 7 | g b | A A S 3 1 7 3 5 . 1 | 特許 U S 6 6 8 2 9 2 3 の配列 1 4) :

【 表 1 9 】

MNLRKLRLLFVMCIGLTLILTAVPAHARTITNNEMGNHSGYDYELWKDYGNTSMTLNNGG
AFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHHQLGNISINYNASFNPGGNSYLCVYGWTSPLAE
YYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGT
VSVSAHFRKWESLGMPMGKMYETAFTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

10

【 0 2 6 9 】

配列番号 1 4 (g i | 1 0 0 4 0 2 0 4 | e m b | C A C 0 7 7 9 8 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [ペニシリウムフニコロスム (Penicillium funiculosum)]) :

【 表 2 0 】

MKLFLAAIVLCATAATAFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNNGGGEVTY
TNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGKWNPNANAQTVTYSGEFNPSGNAYLAVYGWTTDPLVE
YYILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQRVNQPSTIEGTSTFNQYWSVRTEKRVG
GTVTTANHFAAWKALGLEMGTYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS

20

【 0 2 7 0 】

配列番号 1 5 (g i | 2 3 0 2 0 7 4 | e m b | C A A 0 3 0 9 2 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [同定されていない]) :

【 表 2 1 】

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPPLVEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISNDESITLDKNN

30

【 0 2 7 1 】

配列番号 1 6 (g i | 1 6 7 2 4 6 4 0 4 | g b | A B Z 2 4 3 6 4 . 1 | 特許 U S 7 3 1 4 7 4 3 の配列 5) :

【 表 2 2 】

QTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVITYTNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKN
KVINFGSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDDGSVYDIY
RTQRVNQPSTIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAAWAQQGLTLGTMQYQIVAVE
GYFSSGSASITVS

40

【 0 2 7 2 】

配列番号 1 7 (g i | 7 6 0 5 9 0 7 0 | e m b | C A J 3 0 7 5 3 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [パエニパチルス・パブリ]) :

【 表 2 3 】

TDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKGWYGTGNRVVNNAGVF
SPSGNGYLTIFYGWTRNALIEYYVDNNGTYRPTGTYKGTVTSDDGGTYDIYTTMRYNQPSI
DGYSTFPQYWSVROSKRPIGVNSQITFQNHVNAWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSS
GSSNVTWVW

50

【 0 2 7 3 】

配列番号 1 8 (g i | 7 4 1 9 7 7 6 1 | e m b | C A J 2 9 6 6 6 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [パチルス・ハロデュランス]) :

【 表 2 4 】

NTYWQYWTDGGGTVNATNGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWE
PSGNGYLTLYGWTRNQLIEYYVVDNWGTYRPTGTHRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSID
GTQTFQQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSG
RSNVTVW

10

【 0 2 7 4 】

配列番号 1 9 (g i | 4 7 5 6 8 1 1 | e m b | C A B 4 2 3 0 5 . 1 | 名前のないタンパク質産物) :

【 表 2 5 】

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPLEVEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISNDKSITLDKNN

20

【 0 2 7 5 】

配列番号 2 0 (g i | 2 2 9 3 9 5 1 | e m b | C A A 0 2 2 4 6 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [枯草菌] 枯草菌 : (U S 5 3 0 6 6 3 3)) :

【 表 2 6 】

AGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFERTINYNAGV
WAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPS
IDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYK
SSGSSNVTVW

30

【 0 2 7 6 】

配列番号 2 1 (g i | 4 2 6 8 8 9 1 7 | g b | A A S 3 1 7 3 5 . 1 | 特許 U S 6 6 8 2 9 2 3 の配列 1 4) :

【 表 2 7 】

RTITNNEMGNHSGYDYELWKDYGNTSMTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRT
HHQLGNISINYNASFNPGGNSYLCVYGWTQSPLAEYYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGG
TYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGTVSVSAHFRKWESLGMPMGKMYETA
FTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

40

【 0 2 7 7 】

配列番号 2 2 (g i | 1 0 0 4 0 2 0 4 | e m b | C A C 0 7 7 9 8 . 1 | 名前のないタンパク質産物 [ペニシリウムフニコロスム]) :

【表 2 8】

AFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVITYTNGDNGEYSVTWVD
CGDFTSGKGWNPANAQTVTYSGEFNPSGNAYLAVYGWTTDPLVEYYILES YGTYNPSSGL
TSLGQVTS DGGTYDIYSTORVNQPSIEGTSTFNQYWSVRTEKRVGGTVTTANHFAAWKA
LGLEMGTYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS

【0 2 7 8】

配列番号 2 3 は成熟体の枯草菌キシラナーゼ変異体である B S 3 (D 1 1 F / R 1 2 2 D
変異を有する野生型) のアミノ酸配列を示す :

10

【表 2 9】

ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGV
 WAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTRYNAPS
 IDGDDTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQ
 SSGSSNVTWV

【0 2 7 9】

配列番号 2 4 は成熟体の小麦キシラナーゼ阻害剤の配列を示す :

20

【表 3 0】

MPPVLLLVLAAASLVALPSCQSLPVLAPVTKDPATSLYTIPFHDGASLVLDVAGPLVWSTCDG
 GQPPAEIPCSSPTCLLANAYPAPGCPAPSCGSDKHDKPCTAYPYNPVSGACAAGSLSHTRF
 VANTTDGSKPVSKVNVGVLAACAPSKLLASLPRGSTGVAGLANSGLALPAQVASAQKVAN
 RFLCLPTGGPGVAIFGGGPVPWPQFTQSMPYTPLVTKGGSPAHYISARSIVVGDTRVPVP
 EGALATGGVMLSTRLPYVLLRPDVYRPLMDAFTKALAAQHANGAPVARAVEAVAPFGVCY
 DTKTLGNNLGGYAVPNVQLGLDGGSDWTMTGKNSMVDVKQGTACVAFVEMKGVAAGD
 GRAPAVILGGAQMEDFVLDFDMEKKRLGFSRLPHFTGCGGL

30

【0 2 8 0】

配列番号 2 5 (U S 6 , 6 8 2 , 9 2 3 の配列 1 1) :

【表 3 1】

ASTDWWENWTIGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFDVAKGWTTGSPFRTINYNAGV
 WAPNGWGELELYGWTRSPLIEYLVVDSWGTYNRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTRYNYP
 SEDGDRTTMTQYSSVRQSKRPTGSNATITFTNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQDMATEGY
 QSSGSSNVTWV

40

【0 2 8 1】

発明の態様 :

1 . キシラナーゼ活性を有し、配列番号 1 - 2 2 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 7 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

i) 1 2 および 1 3 から選択される位置において 1 または 2 つのアミノ酸修飾、および
 i i) 1 5 、 3 4 、 5 4 、 7 7 、 8 1 、 8 2 、 9 9 、 1 0 4 、 1 1 0 、 1 1 3 、 1 1 4 、
 1 1 8 、 1 2 2 、 1 4 1 、 1 5 4 、 1 5 9 、 1 6 2 、 1 6 4 、 1 6 6 、 1 7 5 および 1 7
 9 から選択される位置において 1 つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾

を有し、該位置はアラインメントにより配列番号 1 に示される枯草菌キシラナーゼ配列の

50

位置に対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0282】

2. キシラナーゼ活性を有し、配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、

i i i) 12および13から選択される位置において1または2つのアミノ酸修飾、および

i v) 34、77、81、82、104、110、113、114、118、122、159、162、164、166および175から選択される位置において1つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾

を有し、該位置はアラインメントにより配列番号1に示される枯草菌キシラナーゼ配列の位置に対応する位置として決定されるポリペプチド。

10

【0283】

3. 12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179からなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1または2に記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0284】

4. 12F、13Y、15Y、34K、77V、77M、77Y、77L、77S、81I、82I、99Y、104W、110A、113D、113A、114F、114D、114Y、118V、122F、122D、154R、159D、162E、162D、164F、166F、175L、175K、175E、175Yおよび179Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1-2のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

20

【0285】

5. G12F、G13Y、I15Y、G34K、I77V、I77M、I77Y、I77L、I77S、V81I、V82I、K99Y、T104W、T110A、Y113D、Y113A、N114F、N114D、N114Y、I118V、R122F、R122D、K154R、N159D、S162E、S162D、164F、Y166F、Q175L、Q175K、Q175E、Q175YおよびS179Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1-3のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

30

【0286】

6. 配列番号1-22から選択される最も高い同一性パーセントを有する配列と少なくとも76、78、80、85、90、95、98または95%同一性を有する、態様1-4のいずれかに記載のポリペプチド。

【0287】

7. -ゼリーロール折り畳みを有する、態様1-5のいずれかに記載のポリペプチド。

40

【0288】

8. 12および13から選択される位置における1または2つのアミノ酸修飾がアミノ酸置換である、態様1-6のいずれかに記載のポリペプチド。

【0289】

9. 位置12におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換である、態様1-7のいずれかに記載のポリペプチド。

50

【0290】

10. 位置13におけるアミノ酸修飾が、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニン、グルタミン、トリプトファン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基へのアミノ酸置換である、態様1-8のいずれかに記載のポリペプチド。

【0291】

11. 位置12におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換である、態様1-9のいずれかに記載のポリペプチド。

10

【0292】

12. 位置13におけるアミノ酸修飾が、フェニルアラニンおよびチロシンからなる群から選択されるいずれか1つの異なるアミノ酸残基への置換である、態様1-10のいずれかに記載のポリペプチド。

【0293】

13. 全250未満のアミノ酸、例えば、240未満、例えば、230未満、例えば、220未満、例えば、210未満、例えば、200未満のアミノ酸、例えば、160から240の範囲、例えば、160から220の範囲のアミノ酸を有する、態様1-11のいずれかに記載のポリペプチド。

【0294】

14. アミノ酸位置12、13、34、77、81、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166および175のいずれか1つまたはそれ以上で1つまたはそれ以上の修飾を含む、態様1-12のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

20

【0295】

15. 12F、13Y、13F、110A、122D、113A、13Y、113D、175L、122F、34K、99Y、104W、154R、159D、175K、81I、166F、162E、162D、164F、114D、114Y、114F、118V、175K、77L、77M、77S、77Vおよび77Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1-13のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

30

【0296】

16. G12F、G13Y、G13F、T110A、R122D、Y113A、G13Y、Y113D、Q175L、R122F、G34K、K99Y、T104W、K154R、N159D、Q175K、V81I、Y166F、S162E、S162D、W164F、N114D、N114Y、N114F、I118V、I77L、I77M、I77S、I77VおよびI77Yからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1-14のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

40

【0297】

17. 12、13、99、104、110、113、122、141、154、159および175の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の修飾を含む、態様1-15のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0298】

18. 13および122のアミノ酸位置で置換を含む、態様1-16のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

50

【0299】

19. 114および166の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の修飾をさらに含む、態様16-17のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0300】

20. 114および166の1つまたはそれ以上のアミノ酸位置で1つまたはそれ以上の置換をさらに含む、態様16-17のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

10

【0301】

21. 以下のアミノ酸位置12、13、99、104、110、113、114、122、141、154、159、166および175の少なくとも4つで置換を含む、態様1-17のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0302】

22. 13、113および122のアミノ酸位置で置換を含む、態様1-20のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0303】

23. 12、113および122のアミノ酸位置で置換を含む、態様1-20のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

20

【0304】

24. 13、113、122および175のアミノ酸位置で置換を含む、態様1-21のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0305】

25. 12F、13Y、99Y、104W、110A、113D、114D、114F、122F、154R、159D、166F、175Kおよび175Lからなる群から選択される1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む、態様1-23のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

30

【0306】

26. アミノ酸配列が、最も高い同一性を有する配列番号1-22から選択される配列と比較して、少なくとも5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換を有する、態様1-24のいずれかに記載のポリペプチド。

【0307】

27. アミノ酸配列が、少なくとも9または10個のアミノ酸置換を有する、態様25に記載のポリペプチド。

40

【0308】

28. ふすま可溶化活性を有する、態様1-26のいずれかに記載のポリペプチド。

【0309】

29. 単離された形態における、態様1-27のいずれかに記載のポリペプチド。

【0310】

30. キシラナーゼ活性アッセイにおいて測定されるとき、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列と比較して、改善されたキシラナーゼ活性を有する、態様1-28のいずれかに記載のポリペプチド。

【0311】

31. 12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、1

50

13、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置の修飾の結果として改善されたキシラナーゼ活性を有する、態様1-29のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0312】

36. ふすま可溶化活性アッセイにおいて測定されるとき、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列と比較して、改善されたふすま可溶化活性を有する、態様1-30のいずれかに記載のポリペプチド。

【0313】

33. 12、13、15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置の修飾の結果として、改善されたふすま可溶化活性を有する態様1-31のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号1に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

【0314】

34. キシラナーゼ阻害剤に対する減少した感度を有する、態様1-32のいずれかに記載のポリペプチド。

【0315】

35. a) 13 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 b) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 166 / 175 ;
 c) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 d) 13 / 110 / 113 / 122 / 175 ;
 e) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 f) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 g) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 h) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 i) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 j) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 114 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 k) 13 / 77 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 l) 13 / 113 / 122 / 175 ;
 m) 13 / 81 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 n) 13 / 110 / 113 / 122 / 164 / 175 ;
 o) 13 / 110 / 113 / 122 / 162 / 175 ;
 p) 13 / 110 / 113 / 122 / 175 ;
 q) 13 / 77 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 r) 13 / 113 / 122 / 175 ;
 s) 12 / 113 / 122 / 175 ;
 t) 13 / 113 / 122 / 175 ;
 u) 13 / 34 / 110 / 113 / 122 / 175 ;
 v) 13 / 77 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 w) 13 / 99 / 104 / 113 / 122 / 175 ;
 x) 13 / 77 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 y) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 118 / 122 / 154 / 159 / 175 ;
 z) 13 / 15 / 113 / 122 / 175 ;
 aa) 13 / 110 / 113 / 122 / 162 / 175 ; および
 bb) 13 / 77 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 154 / 159 / 175
 cc) 13 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 141 / 154 / 159 / 175
 ;
 dd) 13 / 54 / 99 / 104 / 110 / 113 / 122 / 141 / 154 / 159 / 175 ;

10

20

30

40

50

e e) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;

f f) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;

g g) 1 3 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ; および

h h) 1 3 / 5 4 / 9 9 / 1 0 4 / 1 1 0 / 1 1 3 / 1 1 4 / 1 2 2 / 1 4 1 / 1 5 4 / 1 5 9 / 1 7 5 ;

からなる一覧から選択される位置の修飾を含むアミノ酸配列を有する態様 1 - 33 のいずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

10

【 0 3 1 6 】

3 6 . a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

b) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 6 6 F / 1 7 5 L ;

c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

d) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;

e) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

20

f) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 K ;

g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 K ;

h) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

i) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

j) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 K ;

30

k) 1 3 Y / 7 7 L / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

l) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

m) 1 3 Y / 8 1 I / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

n) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 4 F / 1 7 5 L ;

o) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 D / 1 7 5 L ;

p) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

q) 1 3 Y / 7 7 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

40

r) 1 3 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

s) 1 2 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

t) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;

u) 1 3 Y / 3 4 K / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

v) 1 3 Y / 7 7 V / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

w) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;

x) 1 3 Y / 7 7 M / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;

y) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 8 V / 1 2 2 F / 1 5 4 R /

50

1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 z) 1 3 Y / 1 5 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 a a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 E / 1 7 5 L ; および
 b b) 1 3 Y / 7 7 S / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L
 c c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q / 1 5 4 R
 / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 d d) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 e e) 1 3 Y / 5 4 W / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q / 10
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 g g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 4 1 Q
 / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ; および
 h h) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 4 1 Q / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L 、
 からなる一覧から選択されるアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有する態様 1 - 3 4 のい
 ずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミノ酸
 配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。 20
 【 0 3 1 7 】
 3 7 . a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 b) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 6 6 F / 1 7 5 L ;
 c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 d) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;
 e) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D /
 1 7 5 L ;
 f) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 30
 1 7 5 K ;
 g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 K ;
 h) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 i) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 j) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 Y / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 K ;
 k) 1 3 Y / 7 7 L / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1 40
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 l) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 m) 1 3 Y / 8 1 I / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 n) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 4 F / 1 7 5 L ;
 o) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 D / 1 7 5 L ;
 p) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 q) 1 3 Y / 7 7 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 r) 1 3 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ; 50

s) 1 2 F / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 t) 1 3 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 7 5 L ;
 u) 1 3 Y / 3 4 K / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 v) 1 3 Y / 7 7 V / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 w) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 x) 1 3 Y / 7 7 M / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R / 1
 5 9 D / 1 7 5 L ;
 y) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 8 V / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 z) 1 3 Y / 1 5 Y / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 7 5 L ;
 a a) 1 3 Y / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 D / 1 6 2 E / 1 7 5 L ; および
 b b) 1 3 Y / 7 7 S / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 5 4 R /
 1 5 9 D / 1 7 5 L
 c c) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q / 1 5 4 R
 / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 d d) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 e e) 1 3 Y / 5 4 W / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 2 2 F / 1 4 1 Q /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 g g) 1 3 Y / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F / 1 4 1 Q
 / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L ; および
 h h) 1 3 Y / 5 4 Q / 9 9 Y / 1 0 4 W / 1 1 0 A / 1 1 3 D / 1 1 4 F / 1 2 2 F /
 1 4 1 Q / 1 5 4 R / 1 5 9 D / 1 7 5 L、
 からなる一覧から選択されるアミノ酸置換からなるアミノ酸配列を有する態様 1 - 3 5 の
 いずれかに記載のポリペプチドであって、該位置は、配列番号 1 に示される枯草菌アミ
 ノ酸配列の対応する位置として決定されるポリペプチド。

10

20

30

【 0 3 1 8 】

3 8 . a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D
 / Q 1 7 5 L ;
 b) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4
 R / N 1 5 9 D / Y 1 6 6 F / Q 1 7 5 L ;
 c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 d) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
 e) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4
 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 f) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4
 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 h) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 i) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 j) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 k) G 1 3 Y / I 7 7 L / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F

40

50

/ K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 l) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 m) G 1 3 Y / V 8 1 I / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 n) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / W 1 6 4 F / Q 1 7 5 L ;
 o) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 D / Q 1 7 5 L ;
 p) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 q) G 1 3 Y / I 7 7 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 r) G 1 3 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 s) G 1 2 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 t) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
 u) G 1 3 Y / G 3 4 K / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 v) G 1 3 Y / I 7 7 V / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 w) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 x) G 1 3 Y / I 7 7 M / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 y) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / I 1 1 8 V / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 z) G 1 3 Y / I 1 5 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 a a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 E / Q 1 7 5 L ; およ
 び

10

20

30

40

50

b b) G 1 3 Y / I 7 7 S / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L
 c c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / N 1 4
 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 d d) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / N 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 e e) G 1 3 Y / N 5 4 W / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4
 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 g g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2
 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; および
 h h) G 1 3 Y / 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F
 / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L
 からなる一覧から選択されるアミノ酸置換を含む配列番号 1 のアミノ酸配列を有する態様
 1 - 3 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

【 0 3 1 9 】

3 9 . a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D
 / Q 1 7 5 L ;
 b) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4
 R / N 1 5 9 D / Y 1 6 6 F / Q 1 7 5 L ;
 c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 d) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
 e) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4
 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 f) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / K 1 5 4

R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 h) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 i) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 j) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 Y / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 K ;
 k) G 1 3 Y / I 7 7 L / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F 10
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 l) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 m) G 1 3 Y / V 8 1 I / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 n) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / W 1 6 4 F / Q 1 7 5 L ;
 o) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 D / Q 1 7 5 L ;
 p) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 q) G 1 3 Y / I 7 7 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 r) G 1 3 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ; 20
 s) G 1 2 F / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 t) G 1 3 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / Q 1 7 5 L ;
 u) G 1 3 Y / G 3 4 K / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 v) G 1 3 Y / I 7 7 V / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 w) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 x) G 1 3 Y / I 7 7 M / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F
 / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 y) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / I 1 1 8 V / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; 30
 z) G 1 3 Y / I 1 5 Y / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / Q 1 7 5 L ;
 a a) G 1 3 Y / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 D / S 1 6 2 E / Q 1 7 5 L ; およ
 び
 b b) G 1 3 Y / I 7 7 S / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5
 c c) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 F / N 1 4
 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 d d) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2
 F / N 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 e e) G 1 3 Y / N 5 4 W / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / R 1 2 2 40
 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / 1 7 5 L ;
 f f) G 1 3 Y / N 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4
 F / R 1 2 2 F / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ;
 g g) G 1 3 Y / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F / R 1 2
 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L ; および
 h h) G 1 3 Y / 5 4 Q / K 9 9 Y / T 1 0 4 W / T 1 1 0 A / Y 1 1 3 D / N 1 1 4 F
 / R 1 2 2 F / 1 4 1 Q / K 1 5 4 R / N 1 5 9 D / Q 1 7 5 L
 からなる一覧から選択されるアミノ酸置換からなる配列番号1のアミノ酸配列を有する態
 様1 - 37のいずれかに記載のポリペプチド。
 【 0 3 2 0 】

40. 態様1-38のいずれかに記載のポリペプチドを同定する方法であって、
(i) 配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%同一性を有するポリペプチドであって、12および13から選択される位置において1または2つのアミノ酸修飾、および15、34、54、77、81、82、99、104、110、113、114、118、122、141、154、159、162、164、166、175および179から選択される位置において1つまたはそれ以上のさらなるアミノ酸修飾のアミノ酸修飾を有し、該位置はアラインメントにより配列番号1に示される枯草菌キシラナーゼ配列の対応する位置として決定されるポリペプチドを製造し、
(ii) 該ポリペプチドのふすま可溶化および/またはキシラナーゼ活性を、最も高い同一性パーセントを有する配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列のふすま可溶化および/またはキシラナーゼ活性と比較し、
(iii) 最も高い同一性パーセントを有する配列番号1-22から選択されるアミノ酸配列と比較して、改良されたふすま可溶化、および/または改良されたキシラナーゼ活性を有する該ポリペプチドを選択することを含む方法。

10

【0321】

41. 態様1-38のいずれかに記載のポリペプチドを製造する方法であって、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現させ、所望により発現後のポリペプチドを単離および/または精製することを含む方法。

【0322】

42. ポリペプチドが、12および13から選択される位置のポリペプチドアミノ酸配列またはポリペプチドアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列における12および13から選択される位置のアミノ酸残基をコードするコドンのいずれかを修飾することにより製造される態様40に記載の方法であって、該位置12および13は配列番号1に示される枯草菌キシラナーゼ配列を基準に決定される方法。

20

【0323】

43. 態様1から38のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列。

【0324】

44. 態様42に記載のヌクレオチド配列を含むベクター。

30

【0325】

45. 態様42のヌクレオチド配列または態様43のベクターで形質転換されている細胞。

【0326】

46. 態様42に記載のヌクレオチド配列または態様43に記載のベクターで形質転換されている宿主生物。

【0327】

47. 態様1-38のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様39の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様40-41の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様42に記載のヌクレオチド配列または態様43に記載のベクターまたは態様44に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様45に記載の生物を含む組成物。

40

【0328】

48. 態様1-38のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様39の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様40-41の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様42に記載のヌクレオチド配列または態様43に記載のベクターまたは態様44に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様45に記載の生物または態様46に記載の組成物を含むドレー。

【0329】

49. 態様1-38のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様39の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様40-41の記載にしたがって製造されるポリペ

50

チドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物または態様 4 7 に記載のドーを含むベーカーリー産物。

【0330】

50. 態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物を含む動物飼料。

【0331】

51. 態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドを含む洗浄組成物。

【0332】

52. 植物細胞壁を分解または修飾する方法であって、該植物細胞壁を態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物と接触させることを含む方法。

【0333】

53. 植物原料を処理する方法であって、該植物原料を態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物と接触させることを含む方法。

【0334】

54. 植物原料を修飾する方法における、態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物の使用。

【0335】

55. ベーキング、穀類加工、デンプン液化、セルロース性原料からのバイオエタノールの生産、動物飼料、木材加工、木材パルプの漂白の強化から独立して選択されるいずれか 1 つまたはそれ以上における、または洗浄組成物としての、態様 1 - 38 のいずれかに記載のポリペプチドまたは態様 39 の記載にしたがって同定されるポリペプチドまたは態様 40 - 41 の記載にしたがって製造されるポリペプチドまたは態様 4 2 に記載のヌクレオチド配列または態様 4 3 に記載のベクターまたは態様 4 4 に記載の細胞または非毒性成分と混合された態様 4 5 に記載の生物または態様 4 6 に記載の組成物の使用。

【0336】

56. 実施例および図面を基準に実質的に上記のポリペプチドまたはそのフラグメント。

【0337】

57. 実施例および図面を基準に実質的に上記の方法。

【0338】

58. 実施例および図面を基準に実質的に上記の組成物。

【0339】

59. 実施例および図面を基準に実質的に上記の使用。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 0 】

参考文献

【表 3 2】

Collins,T., Gerday,C. and Feller,G. (2005) *FEMS Microbiol Rev.*, **29** (1), 3-23.

Courtin, C., Roelants, A. and Delcour, J. (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47. 1870-1877.

10

Coutinho, P.M. and Henrissat,B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.

D'Appolonia, B.L. and MacArthur, L.A. (1976). Comparison of bran and endosperm pentosans in immature and mature wheat. *Cereal Chem.* 53. 711 - 718.

20

【表 3 3】

Debyser, W. and Delcour, J. A. (1998). Inhibitors of cellolytic, xylanolytic and β -glucanolytic enzymes. WO 98/49278.

Hazlewood, G. P. and Gelbert, H. J. (1993). Recombinant xylanases. PCT application. WO 93/25693.

Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* **280**, 309-316.

10

Ingelbrecht, J. A., Verwimp, T. and Delcour, J. A. (1999). Endoxylanases in durum wheat semolina processing: solubilisation of arabinoxylans, action of endogenous inhibitors and effects on rheological properties. *J. Agri. Food Chem.*

Jacobsen, T. S., Heldt-Hansen, H. P., Kofod, L. V., Bagger, C. and Müllertz, A. (1995). Processing plant material with xylanase. PCT application. WO 95/23514.

20

Kormelink, F. J. M. (1992). Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holland (175 pp., English and Dutch summaries).

Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry.* 47, 273-279.

30

McLauchlan, R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P. and MacGregor, A. W. (1999a). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem.J.* 338. 441-446.

McLauchlan, R, Flatman, R et al (1999) Poster Presentation from meeting at University of Newcastle (1999) April 11th-April 17th. Xylanase inhibitors, a novel class of proteins from cereals.

40

【表 3 4】

Montgomery, R. and Smith, F. (1955). The Carbohydrates of the Gramineae. VIII. The constitution of a water soluble hemicellulose of the endosperm of wheat (*Triticum vulgare*). J. Am. Chem. Soc. 77. 3325 - 3328.

Paice, M.G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L. and Yaguchi, M. (1986) : A Xylanase Gene from *Bacillus subtilis*: Nucleotide Sequence and Comparison with *B. pumilus* Gene. Arch. Microbiol. **144**, 201-206.)

10

Rouau, X. (1993). Investigations into the effects of an enzyme preparation from baking on wheat flour dough pentosans. J. Cereal Science. 18. 145-157.

Rouau, X., El-Hayek, M-L. and Moreau, D. (1994). Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flour in relation to changes in pentosan properties. J. Cereal Science. 19. 259-272.

20

Slade, L., Levine, H., Craig, S., Arciszewski, H. and Saunders, S. (1993). Enzyme treated low moisture content comestible products. US 5200215 by Nabisco.

Soerensen, J.F. and Sibbesen, O. (1999). Bacterial xylanase. UK A 9828599.2.

【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 - 1 】

Figure 2

```

1
(1) -----HFEVTKLVVLAATLSPCLSAVPS-----ASTYRWQWTDGGGVN
10 (1) -----HFEVTKLVVLAATLSPCLSAVPS-----ASTYRWQWTDGGGVN
18 (1) -----NTYQWTDGGGVN
11 (1) -----MRQKILTFILAFVCFALTLPAITQIAQIVTDNSIGNHDGYDFPKDSGGSGT
6 (1) -----MRQKILTFILAFVCFALTLPAITQIAQIVTDNSIGNHDGYDFPKDSGGSGT
15 (1) -----QIVTDNSIGNHDGYDFPKDSGGSGT
19 (1) -----QIVTDNSIGNHDGYDFPKDSGGSGT
13 (1) -----MNLKRLRLFVVCIGLTLITAVPAHARTIENEMKNHSGDYELWKDVG-NTS
21 (1) -----RTITNWMGNHSGDYELWKDVG-NTS
14 (1) MKLELAIVLCATATAFPSELQAQRAAGDLSRQGITTSQGTNNGYTFPWNHGGGVN
22 (1) -----AFPSELQAQRAAGDLSRQGITTSQGTNNGYTFPWNHGGGVN
16 (1) -----Q-TIQPGTQYNNGYTFPWNHGGGVN
7 (1) -WVSTPTLLAASPSPASCRPAEVEVAVERRQ-TIQPGTQYNNGYTFPWNHGGGVN
2 (1) -----Q-TIQPGTQYNNGYTFPWNHGGGVN
3 (1) -----Q-TTPNSEGWHHDGYTFPWNHGGGVN
8 (1) -----MVGTFVVALAALATGALAPAGNATELERQ-TTPNSEGWHHDGYTFPWNHGGGVN
4 (1) -----RTUNQGVN
17 (1) -----TDYQWTDGGGVN
9 (1) -----HFEKGEKLLTVLAASMSFGVAATT--GATDYRWTDGGGVN
12 (1) -----HFEKKEKPLVGLTAAPMSISMPSATASAGDTWQWTDGGGVN
20 (1) -----AGTDYQWTDGGGVN
5 (1) -----HFEKKEKPLVGLSAALMSISLPSATASAASTDYQWTDGGGVN

61
1 (18) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG
10 (44) ATNGPGGYSVNRDTGNFVVGK-----WEIGSPRTIYNAGVAPNGNGVLTLYG
18 (16) ATNGPGGYSVNRDTGNFVVGK-----WEIGSPRTIYNAGVAPNGNGVLTLYG
11 (55) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
6 (55) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
15 (28) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
19 (28) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
13 (54) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
21 (27) MLIKHGGTFSAQNNVNNILFRKGGKFNRTQTHQQVNMISYNGANPQ-PNGNAVLCVYG
14 (61) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
22 (45) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
16 (27) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
7 (59) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
2 (27) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
13 (27) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
8 (58) YTNKGNGYSVTVWCCGDTSGK-----WNP-ANAQIVTYSQEPN-PNGNAVLCVYG
4 (10) MDLSSGGYTSQWRNTGNFVVGK-----WSTGG-RKTVNY-SQTFPSCHAVLTLYG
17 (16) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG
9 (44) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG
12 (46) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG
20 (18) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG
5 (46) AVNGSGGYSVNSMNTGNFVVGK-----WTTGSPRTINYNAGVAPNGNGVLTLYG

121
1 (71) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
10 (97) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
18 (69) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
11 (114) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY
6 (114) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY
15 (87) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY
19 (87) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY
13 (113) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
21 (86) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
14 (112) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY
22 (96) WTVDFLVEYIYVDSGWRNPPG-ATPAGTITVDGTYDIYELRVNPSIKG-IATFQY

```

【 図 2 - 2 】

```

16 (79) WSRNPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
7 (111) WSRNPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
2 (79) WSRNPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
3 (79) WSRNPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
8 (110) WSRNPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
4 (61) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
17 (69) WTRNALLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
9 (97) WTRNALLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
12 (99) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
20 (71) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
5 (99) WTRSPLEIYVVDMSGTYRPTG--TYKGVKSOGGYDIYITTRYNAPSIDGDRITFTQY
151
1 (129) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
10 (154) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
18 (126) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
11 (172) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
6 (172) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
15 (145) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
19 (145) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
13 (170) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
21 (143) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
14 (171) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
22 (155) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
16 (138) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
7 (170) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
2 (138) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
3 (138) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
8 (169) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
4 (118) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
17 (126) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
9 (154) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
12 (157) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
20 (129) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--
5 (157) WSVRQKRPTGSHAAITFENIVNARKSGHNLGSNNATQVLAETGYSGSGSNVTV--

```

```

141
1 (186) -----
10 (211) -----
18 (183) -----
11 (228) INGNPLSTISNDKSITLTKNN
6 (228) INGNPLSTISNDKSITLTKNN
15 (201) INGNPLSTISNDKSITLTKNN
19 (201) INGNPLSTISNDKSITLTKNN
13 (226) IGN-----
21 (199) IGN-----
14 (224) -----
22 (208) -----
16 (191) -----
7 (223) -----
2 (192) -----
3 (195) -----
8 (226) -----
4 (170) -----
17 (183) -----
9 (211) -----
12 (214) -----
20 (186) -----
5 (214) -----

```

【手続補正書】

【提出日】平成23年8月18日(2011.8.18)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012513207000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK2009/050352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/24 (2006.01)		
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)		
C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Genome Quest, Dgene (STN), EBI secureline		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US2006003433 A1 (STEER BRIAN [US] et al.) 5 January 2006 See especially SEQ ID NO. 378	1-9, 12-15
X	US2008248160 A1 (STEER BRIAN [US] et al.) 9 October 2008 See especially SEQ ID NO. 198, 378	1-9, 12-15
X	EP1989302 A2 (VERENIUM CORP [US]) 12 November 2008 See especially SEQ ID NO. 64, 66, 158, 302, 380, 578 and	1-9, 12-15
X	WO03106654 A2 (DIVERSA CORP [US]) 24 December 2003 See especially SEQ ID NO. 380	1-9, 12-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30/01/2010		02/03/2010
Name and mailing address of the ISA/ Nordic Patent Institute, Helgeshoj Allé 81, 2830 Taastrup, Denmark Facsimile No.		Authorized officer Rikke Louise Vinther Telephone No. +45 4350 8200

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/DK2009/050352

US2006003433 A1 20060105

US2009221051 A1 20090903 KR20080045764 A 20080523 US7547534 B2 20090616
MXPA04012614 A 20051214 WO03106654 A2 20031224 WO03106654 A3 20040826
US2008248160 A1 20081009 US7504120 B2 20090317 NZ537597 A 20080731
EP1516053 A2 20050323 EP1516053 A4 20060712 CN1675365 A 20050928
CA2488916 A1 20031224 BR0312121 A 20070403 AU2003251549 A1 20031231
AU2003251549B B2 20080313

US2008248160 A1 20081009

US2009221051 A1 20090903 KR20080045764 A 20080523 US2006003433 A1 20060105
US7547534 B2 20090616 MXPA04012614 A 20051214 WO03106654 A2 20031224
WO03106654 A3 20040826 US7504120 B2 20090317 NZ537597 A 20080731
EP1516053 A2 20050323 EP1516053 A4 20060712 CN1675365 A 20050928
CA2488916 A1 20031224 BR0312121 A 20070403 AU2003251549 A1 20031231
AU2003251549B B2 20080313

EP1989302 A2 20081112

WO2007095398 A2 20070823 WO2007095398 A3 20081002 WO2007095398 A8 20080410
US2009155238 A1 20090618 CA2638801 A1 20070823

WO03106654 A2 20031224

US2009221051 A1 20090903 KR20080045764 A 20080523 US2006003433 A1 20060105
US7547534 B2 20090616 MXPA04012614 A 20051214 WO03106654 A3 20040826
US2008248160 A1 20081009 US7504120 B2 20090317 NZ537597 A 20080731
EP1516053 A2 20050323 EP1516053 A4 20060712 CN1675365 A 20050928
CA2488916 A1 20031224 BR0312121 A 20070403 AU2003251549 A1 20031231
AU2003251549B B2 20080313

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(74)代理人 100140497

弁理士 野中 信宏

(72)発明者 オレ・シッベセン

デンマーク、デーコー - 2 8 8 0 バウスヴェア、ヴェレプロヴァイ 1 1 7 ペー番

(72)発明者 イェンス・フリスペク・セレンセン

デンマーク、デーコー - 8 2 0 0 オーフス・エン、ノルドヴェストパッサゲン 9 3 番

Fターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA12 CA05 DA06 EA04 FA08

4B050 CC04 DD02 LL02 LL05 LL10