

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4426307号
(P4426307)

(45) 発行日 平成22年3月3日(2010.3.3)

(24) 登録日 平成21年12月18日(2009.12.18)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A 2 3 K 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A O 1 H 5/00 A

A O 1 K 67/027

A 2 3 K 1/00 Z

C 1 2 N 1/15

請求項の数 17 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-566197 (P2003-566197)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月4日(2003.2.4)
 (65) 公表番号 特表2005-516619 (P2005-516619A)
 (43) 公表日 平成17年6月9日(2005.6.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2003/000067
 (87) 国際公開番号 W02003/066847
 (87) 国際公開日 平成15年8月14日(2003.8.14)
 審査請求日 平成17年12月1日(2005.12.1)
 (31) 優先権主張番号 PA 2002 00193
 (32) 優先日 平成14年2月8日(2002.2.8)
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)
 (31) 優先権主張番号 PA 2002 01449
 (32) 優先日 平成14年9月30日(2002.9.30)
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティージェルスカブ
 デンマーク国、デーコーー 2 8 8 0 バグ
 スバエルト、クロシェイバイ 3 6
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100108903
 弁理士 中村 和広

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィターゼ変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親フィターゼに比べて増強された熱安定性を有する、親フィターゼの変異体において、当該親フィターゼが、配列番号：2 に示すアミノ酸配列からなり、当該変異体が、D29C、D29N、D29T又はD29Sの修飾を含んでなり且つ配列番号：2 に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有することを特徴とするフィターゼ変異体。

【請求項 2】

次の置換及び置換の組合せ群：

(ii) 29N+102I ；

(iii) 29N+118A ；

(iv) 29N+163P+324S ；

(v) 29N+163P+324S+395G ；

(vi) 29N+234S；

(vii) 29N+324S；

(viii) 29S；

(ix) 29S+45A+69A+99D+110Y+125D+324A+334E+344S+350V ；

(x) 29S+63N+125D+183K+218T+324A+334E+350V+421S ；

(xi) 29S+95H+110W+183W+324A+350V ；

(xii) 29S+95M+110W+183W+324A+350V ；

(xiii) 29S+95N+110R+183W+324A+350V ；

10

20

- (xiv) 29S+95R+110W+183W+324A+350V ;
- (xv) 29S+95S+110R+183W+324A+350V ;
- (xvi) 29S+95S+110W+183W+324A+350V ;
- (xvii) 29S+95T+110R+183W+324A+350V ;
- (xviii) 29S+95T+110Y+125D+183W+286S+324A+350V ;
- (xix) 29S+95T+110Y+152A+156C+157Q+160R+183W+324A+350V ;
- (xx) 29S+95T+110Y+156R+157Q+183W+324A+350V ;
- (xxi) 29S+95T+110Y+157K+183W+185H+187R+190S+191R+248G+324A+350V ;
- (xxii) 29S+95T+110Y+183W+185A+248A+324A+350V ;
- (xxiii) 29S+95T+110Y+183W+185A+248C+324A+350V ;
- (xxiv) 29S+95T+110Y+183W+185A+248E+324A+350V ;
- (xxv) 29S+95T+110Y+183W+185A+248H+324A+350V ;
- (xxvi) 29S+95T+110Y+183W+185E+248S+324A+350V ;
- (xxvii) 29S+95T+110Y+183W+185H+248G+321A+323A+324A+350V ;
- (xxviii) 29S+95T+110Y+183W+185H+248G+324A+350V ;
- (xxix) 29S+95T+110Y+183W+185H+187S+190K+191S+210G+222I+248G+324A+350V ;
- (xxx) 29S+95T+110Y+183W+185K+248G+324A+349K+350L ;
- (xxxi) 29S+95T+110Y+183W+185K+248S+324A+350V ;
- (xxxii) 29S+95T+110Y+183W+185K+248T+324A+349A+350L ;
- (xxxiii) 29S+95T+110Y+183W+185K+248T+324A+349L+350I ;
- (xxxiv) 29S+95T+110Y+183W+185K+248T+324A+349L+350M ;
- (xxxv) 29S+95T+110Y+183W+185K+248T+324A+350V ;
- (xxxvi) 29S+95T+110Y+183W+185P+248G+324A+350V ;
- (xxxvii) 29S+95T+110Y+183W+185P+248S+324A+350V ;
- (xxxviii) 29S+95T+110Y+183W+191L+324A+350V ;
- (xxxix) 29S+95T+110Y+183W+248D+324A+350V ;
- (xl) 29S+95T+110Y+183W+324A ;
- (xli) 29S+95T+110Y+183W+324A+350V ;
- (xlii) 29S+99D+125D+324A+334E+350V ;
- (xliii) 29S+110Y+183W+185N+324A+350V ;
- (xliv) 29S+125D+218T+324A+344S+350V ;
- (xlv) 29S+125D+234K+324A+330R ;
- (xlvi) 29S+125D+234K+324A+330R+395G ;
- (xlvii) 29S+125D+324A ;
- (xlviii) 29S+125D+324A+330R+395G ;
- (xlix) 29S+125D+324A+350V ;
- (l) 29S+183A+324A+350V ;
- (li) 29S+183G+324A+334E+344S+350V ;
- (lii) 29S+183W+324A+350V ;
- (liii) 29S+205S ;
- (liv) 29S+324A+350V ; 及び
- (lv) 29T+324L ;

から選択された、置換又は置換の組合せを含んで成る請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載いずれか 1 項に記載の変異体をコードする核酸配列を含んで成る核酸。

【請求項 4】

適切な発現宿主におけるポリペプチドの生成を指図する 1 又は複数の制御配列に作用可能に連結される請求項 3 に記載の核酸を含んで成る核酸構造体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸構造体を含んで成る組換え発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の核酸構造体及び/又は請求項 5 に記載の発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の変異体の生成方法であって、

(a) 前記変異体を含んで成る上清液を生成するために請求項 5 記載の宿主細胞を栽培し；そして

(b) 前記変異体を回収する；

ことを含んで成る方法。

10

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載のフィターゼ変異体を発現できるトランスジェニック植物又はその一部。

【請求項 9】

請求項 1 又は 2 に記載のフィターゼ変異体を発現できるトランスジェニック非ヒト動物、又はその生成物又は要素。

【請求項 10】

請求項 1 又は 2 に 2 記載の少なくとも 1 つのフィターゼ変異体、及び

(a) 少なくとも 1 つの脂溶性ビタミン；

(b) 少なくとも 1 つの水溶性ビタミン；及び/又は

(c) 少なくとも 1 つの微量鉱物；

を含んで成る組成物。

20

【請求項 11】

次の酵素群：キシラナーゼ、エンドグルカナーゼ、エンド - 1, 3 (4) - β - グルカナーゼ及びプロテアーゼから選択された少なくとも 1 つの酵素をさらに含んで成る請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

動物飼料添加物である請求項 10 又は 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

50 ~ 800g/kg の含有率の粗タンパク質を有し、そして請求項 1 又は 2 に記載の変異体、又は請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の組成物を含んで成る動物用飼料組成物。

30

【請求項 14】

動物飼料の栄養価値を改良するための方法であって、請求項 1 又は 2 に記載の変異体、又は請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物が前記飼料に添加されることを特徴とする方法。

【請求項 15】

有効量の請求項 13 に記載の飼料を動物に供給することを含んで成る、動物性肥料におけるフィテートレベルを低めるための方法。

【請求項 16】

植物性タンパク質の処理方法であって、少なくとも 1 つの植物性タンパク質又はタンパク質源に、請求項 1 又は 2 に記載の変異体又は請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物を添加する段階を含んで成る方法。

40

【請求項 17】

動物飼料への；動物飼料の調製への；動物飼料の栄養価値の改良への；動物飼料におけるフィテートレベルを低めるための；植物性タンパク質の処理への；又はフィターゼ基質からのリンの遊離のためへの、請求項 1 又は 2 に記載の変異体、又は請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

発明の分野：

本発明は、親フィターゼの変異体、特に改良された熱安定性/又は比活性の変異体に関する。本発明はまた、そのような変異体をコードするDNA配列、組換え宿主細胞におけるそれらの生成、及び特に動物飼料の分野内への変異体の使用方法にも関する。好ましい親フィターゼは、配列番号2を含んで成るペニオフォラ（*Peniophora*）フィターゼである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

“修飾されたフィターゼ”の名称のEP897010号は、アスペルギラス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）フィターゼの一定の変異体を開示する。“コンセンサスフィターゼ”の名称のEP897985号又はいくつかの子囊菌フィターゼの複数一列整列に基づいて企画され得る菌類コンセンサスフィターゼを開示する。“飼料調製物及び植物発現における熱安定性フィターゼ”の名称WO99/48380号は、熱安定性フィターゼを用いる一定の観点に関する。熱安定性フィターゼの例は、30ページの太線下に列挙する種々のコンセンサスフィターゼである。“改良されたフィターゼ”の名称のWO00/43503号は、記載される方法に類似する方法により企画され得る、高められた熱安定性の一定のフィターゼ変異体に関する。熱安定性フィターゼの例は、54～55ページの太線下に示される。それらのフィターゼはすべて、配列番号2に対して75%以下の%同一性を有する。

【0003】

特に改良された熱安定性及び/又は高められた比活性の新規且つ改良されたフィターゼ変異体を提供することが、本発明の目的である。

【0004】

ペニオフォラ・リシ（*Peniophora lycii*）由来のフィターゼがWO98/28408号に開示され、そしてその変異体がWO00/49022号（例えば、76～77ページの請求項31を参照のこと）に開示されており、しかしながら、本発明の目的のための変異体は関係を否認されて来た。

【発明の開示】

【0005】

本発明は、20；26；28-31；37-48；55-69；73-83；91-119；123-126；135-142；152-163；169-199；204-222；229-238；248-266；284-289；300-308；321-335；343-350；384-398；407-412；及び419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして

(b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして

(c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；

【0006】

(d) 但し、前記変異体は、G26S；Y28N；D29S；F31Y；E42D，K，A；T45R；V461；W59F；S62D；A64K；R65Q，E，G，A；S66T；R67A，I，Q，K；Q68Y，V，I；K74R，A；A99N；D100S；L102V；P103E；F104L；N107T，Q；S109M；H110S，V；Q111E，N；T112A，S；M116F，I，L；A135S；D137Y；Q138D，S，G；D142A；()154fH；S155N；G156P；E157Q，S；E169S；E170A，P；G171A；()171aS；T174P，A；N177S；N178S，T；M179T，V，L；N182A，V；V184G；D185E；()185eT；G186S，A；D187R，K，S；()187aV，T；E188Q，S，A，V；S189E；V195L；N199A，P；L204N；A207D，H；S216T；D217E；L219Y，T；T220Y，N；L221F；M222L；L230V；()235eE，Q；V248R，I；S249Q，A；E251D；Y254A，L，G；D255N；D257K；Y259F；T262H；P264A；G286R，H；Q287K，S；A288P；T321Q，S，G；M3221；V3231；P324A；A327S，F，I，L；F332Y；N333P；E344R；R346P；W348F；V349L，A，S；D350S，V；G388A；V393R；E395K，T；及びL396Rから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ（*Peniophora lycii*）CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【0007】

本発明はまた、フィターゼ変異体をコードする単離された核酸配列、及び前記核酸配列を含んで成る核酸構造体、ベクター及び宿主細胞、並びにフィターゼ変異体の生成及び使

10

20

30

40

50

用方法にも関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

ペニオフォラ・リシのフィターゼの構造は、X-Ray Structure Determination, Stout, G. K. and Jensen, L. H., John Wiley & Sons, Inc. NY, 1989に与えられるようなX-線結晶学方法についての原理に従って解決された。同形置換方法を用いて、2.2 分解での結晶構造についての構造座標は、標準のPDB型で図1に与えられる(Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, Brookhaven, CT)。図1のPDBファイルは、このフィターゼの配列の一部のみ、すなわち配列番号2の残基22-422に対応する部分に関する。

10

【0009】

分子力学(MD)：

分子力学(MD)シミュレーションは、タンパク質構造におけるアミノ酸の移動度の表示である(McCammon, JA and Harvey, SC., (1987), "Dynamics of proteins and nucleic acids", Cambridge University Pressを参照のこと)。そのようなタンパク質力学はしばしば、結晶学的B-因子に比較される(Stout, GH and Jensen, LH, (1989), "X-ray structure determination", Wileyを参照のこと)。例えば、異なった温度でのMDを試験することによって、残基の温度関連移動度がシュミレートされる。最高の移動度又は柔軟性(ここにおいては、等方性変動)を有する領域が、ランダム突然変異誘発について示唆され得る。タンパク質の一定の領域に見出される高い移動度は、それらの残基を置換することによって熱的に改良され得ることが理解される。

20

【0010】

プログラムCHARMM(Molecular Simulations(MSI))を用いて、上記に記載されるペニオフォラフィターゼ構造体が、300、350、400、450及び500K及び600psでMDにゆだねられ、そして次に、0.001kcal/モルの許容度を伴って、300段階Steepest Descent, 600段階Conjugated Gradients及び3000段階ABNRを用いて最小化された。

【0011】

突然変異誘発についての次の示唆される領域は、MDシミュレーションに起因する：

水を伴わないで、300及び400KでのMD：37-48,91-119, 232-238,300-308, 325-335,343-348；

30

水を伴って、300及び400KでのMD：407 - 412；

水を伴わないで、300KでのMD：229 - 236；

期間境界を伴って立体水ボックスにおけるMD：123-126,154-157, 204-216,284-289, 419-423。

【0012】

突然変異誘発について次の示唆される領域はX-構造体におけるB-因子の評価に起因する：73-83、207-217。

上記領域は、次の通りに組み合わせられ得る：37-48；73-83；91-119；123-126；154-157；204-217；229-238；284-289；300-308；325-335；343-348；407-412；419-423。

MDシミュレーションに起因する他の領域は次の通りである：154-163；204-218；323-335；342-350。

40

【0013】

B-因子の評価に起因する他の領域は、次の通りである：1-29、好ましくは1-28；59-106；169-171；178-247；339-344；367-371；417前方。より好ましい領域は、1-24；69-94；182-188；199-220；229-241；368-370；420-423である。

活性部位及び基質結合シェル：

【0014】

当業界において知られているプログラム、例えばMolecular Simulations MSI, San Diego, CaliforniaからのINSIGHTIIが、触媒残基(H55, D319, R54)にきわめて接近して存在するそれらのアミノ酸残基を含んで成る活性シェルの定義するために使用され得る。基

50

質結合部位 (H55, R54, R139, N320) にきわめて接近して存在し、そして従って、基質と接近して存在することが予測されるそれらのアミノ酸残基を含んで成る基質結合シェルがまた定義され得る。密接した接近性とは、例えば適切な残基からの0, 15, 16又は20として定義され得る。基質結合についての情報は、フィチン酸又はその誘導体、例えばイノシトール - 1, 4, 5 - 三リン酸 (Brookhavenデータベースファイル1dix, イノシトール - 1, 4, 5三リン酸) を、活性部位裂け目 (活性部位の表面を補足する残基) 中に結合することによって推定され得る。

【0015】

変異体の調製のための方策:

図1及び配列番号2の3D構造に基づいて、及び活性部位及び基質結合シェル (16、好ましくは15、より好ましくは10) 及び分子力学の研究に従って、次の領域が、主に熱安定性を改良し、そして/又は比活性を高める観点を伴って、突然変異誘発のために示唆されている: アミノ酸26 - 31; 55 - 69; 99 - 104; 135 - 142; 169 - 193; 253 - 266; 又は配列番号2のアミノ酸321 - 323。

【0016】

配列番号2の上記領域の次の位置が好ましくは、突然変異誘発にゆだねられる: G26, P27, Y28, D29, P30, W59, P60, T61, S62, G63, A64, R65, S66, R67, Q68, V69, A99, D100, L102, P103, F104, A135, G136, D137, Q138, V141, D142, E169, E170, N177, N178, M179, P181, N182, D189, T191, W192, L193, Y253, Y254, D257, K258, Y259, Y260, T262, G265, N266, T321, 及び/又は V323。

【0017】

次の変異体が企画される: G26S, A; P27X, M; Y28F, N, Q; D29S, T, A; F30X; W59X, F, Y; P60S; T61S; S62A; G63A, S; A64G, K, R, S; R65A; S66K, T; R67X, K, A, L, V, S; Q68E, D, N, M; V69X; A99X, D, S, E, N; D100X, S, E, N; L102V; P103X, E; F104X, L; A135S, D; G136X, S, D; D137S; Q138X, D, N; V141X; D142X; E169A; E170X, A, T; N177D; N178A, G, L; M179V, T; P181X, T, V; N182X, A; D189X; T191X; W192X; L193T, 1; Y253N, G; Y254A, G; D257S; K258L; Y259X, F, P, W; Y260X, P, W; T262Y, V; G265X; N266Q; T321Q, L, N; 及び/又はV323I。

【0018】

主に基質に向いているアミノ酸残基又は位置は次の通りである: P27, Y28, R65, R67, Q68, A99, D100, L102, A135, G136, D137, E169, N177, T191, W192, Y253, Y254, T262, 及び T321。1又は複数のそれらの位置で変更される変異体、例えば少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個又は少なくとも10個のそれらの位での変更を含んで成る変異体が特に企画される。特定の態様においては、変異体は、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも13個、少なくとも14個、少なくとも15個、少なくとも16個、少なくとも17個、少なくとも18個又はすべての19個の位置における変更を含んで成る。

【0019】

そのような変異体の例は、次のものから選択された、少なくとも、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9又は少なくとも10個の突然変異を含んで成るそれらの変異体である: P27X, M; Y28F, N, Q; R65A; R67X, K, A, L, V, S; Q68E, D, N, M; A99X, D, S, E, N; D100X, S, E, N; L102V; A135S, D; G136X, S, D; D137S; E169A; N177D; T191X; W192X; Y253N, G; Y254A, G; T262Y, V; 及び/又は T321Q, L, N。特定の態様においては、変異体は、少なくとも11, 12, 13, 14, 15, 16, 17少なくとも18、又は19個のそれらの突然変異を含んで成る。

【0020】

フィターゼ活性を有するポリペプチド:

本発明においては、フィターゼ活性 (フィターゼ) を有するポリペプチドは、(1) myo - イノシトール及び/又は(2) その一、二、三、四及び/又は五リン酸、及び(3) の

10

20

30

40

50

無機リン酸へのフィテート (myo - イノシトール六リン酸) の加水分解を触媒する酵素である。

本明細書においては、用語フィターゼ基質とは、フィチン酸及びフィテート (フィチン酸の塩)、並びに上記 (2) 下に列挙されるホスフェートを包含する。

【0021】

インターネット (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) でのENZYMEサイトは、酵素の命名法に関する情報の貯蔵所である。それは主に、Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB)の推薦に基づかれており、そしてそれは、EC (Enzyme Commission) 番号が提供されている、個々のタイプの特徴づけられた酵素を記載する (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28: 304-305)。また、ハンドブック (Enzyme Nomenclature from NC-IUBMB, 1992) も参照のこと。

10

【0022】

酵素部位によれば、2種の異なった型のフィターゼが知られている：いわゆる3 - フィターゼ (myo - イノシトール六リン酸3 - ホスホヒドラーゼ、EC3.1.3.8) 及びいわゆる6 - フィターゼ (myo - イノシトール六リン酸6 - ホスホヒドラーゼ、EC3.1.3.26)。本発明に関しては、両タイプが、フィターゼの定義に包含される。

本発明に関しては、フィターゼ活性は、FYTの単位で決定され、1 FYTは次の条件下で、1分当たり1 μ モルの無機オルトホスフェートを遊離する酵素の量である：pH5.5；温度37；0.0050モル/lの濃度での基質、フィチン酸ナトリウム ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$)。適切なフィターゼアッセイは、W000/26569号の例1に記載されるFYT及びFTUアッセイである。FTUは飼料及びプレミックスにおけるフィターゼ活性を決定するためである。FYTアッセイはまた、本明細書の例2に記載される。

20

【0023】

親フィターゼ：

親フィターゼは、ペニオフォラ・リシCBS686.96由来のフィターゼに対して相同であるフィターゼである。本明細書においては、相同とは、配列番号2に対して少なくとも60%の同一性を有すること、すなわちペニオフォラ・リシCBS686.96 (W098/28408号の配列番号2) 由来のフィターゼの完全なアミノ酸配列のアミノ酸17 - 439 (シグナルペプチド部分を包含する) に対応することを意味する。相同性は、アミノ酸相同性の標題のセクションに一般的に記載される通りにして決定され得る。

30

【0024】

親フィターゼは、野生型又は天然に存在するポリペプチド、又はその対立遺伝子変異体、又はフィターゼ活性を有するそのフラグメント、特にその成熟部分であり得る。それはまた、その変体及び/又は遺伝子的に構築されたか又は合成ポリペプチドでもあり得る。

特定の態様においては、野生型親フィターゼの例は、アメリカ特許第5,830,732号に記載されるシワンニオマイセス・オキシデンタル (*Schwanniomyces occidentals*) フィターゼである。

もう1つの特定の態様においては、野生型菌類親フィターゼは、子囊菌門又は担子菌門の糸状菌から誘導される (それぞれ、子囊菌フィターゼ、又は担子菌フィターゼ)。

40

【0025】

子囊菌フィターゼの例は、アスペルギラスの株、例えばアスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) PHYA (SWISSPROT P34753, Gene 133: 55-62 (1993))、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger* (ficcum) PHYA (SWISSPROT P34752, EP 420358, Gene 127: 87-94 (1993))、アスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) PHYB (SWISSPROT P34755, Gene 133: 55-62 (1993))、アスペルギラス・ニガー-PHYB (SWISSPROT P34754, Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 53- 57 (1993))；又はエメリセラ (*Emericella*) の株、例えばエメリセラ・ニジュランス (*Emericella nidulans* PHYB (SWISSPROT 00093, Biochim. Biophys. Acta 1353: 217-223 (1997))；又はサーモミセス (*Thermomyces*) (ヒューミコラ (*Humicola*)) の株、例えばW097/35017号に記載されるサーモミセス

50

・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) フィターゼ由来のそれらのフィターゼである。

【0026】

子囊菌フィターゼの他の例は、EP684313号（例えば、アスペルギラス・フィミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギラス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 及びマイセリオフィトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) 由来のフィターゼ）；日本特許第11000164号（ペニシリウム (*Penicillium*) の株由来のフィターゼ）；アメリカ特許第6,139,902号（アスペルギラスの株由来のフィターゼ）；及びW098/13480号（モナスカス・アンカ (*Monascus anka*) 由来のフィターゼ）に開示されている。

担子菌フィターゼの例は、パキシラス・インボルトス (*Paxillus involutus*)、トラメテス・プベスセンス (*Trametes pubescens*)、アグロサイベ・ペジアデス (*Agrocybe ped iades*) 及びペニオフォラ・リシ由来のフィターゼである (W098/28409号を参照のこと)。

【0027】

好ましい親フィターゼは、ペニオフォラの種、好ましくはペルオフォラ・リシの株、最も好ましくはペニオフォラ・リシC13S686.96の株から誘導される。

前述の種の定義は、完全及び不完全状態の両者、及び他の分類学的同等物、例えばアナモルフを、それらが知られている種名称にもかかわらず、包含することが理解されるであろう。当業者は、適切な同等物の正体を容易に認識するであろう。

それらの種の株は、多くの培養物収集所、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 及び Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL)から公的容易に入手できる。

【0028】

さらに、そのようなポリペプチドは、他の源、例えば天然（例えば、土壌、培養土、水、等）から単離された微生物から、適切なプローブを用いて同定され、そして得られる。天然の環境から微生物を単離するための技法は、当業界において良く知られている。次に、核酸配列がもう1つの微生物のゲノム又はcDNAライブラリーを同様にスクリーニングすることによって誘導される。ポリペプチドをコードする核酸配列がプローブにより検出されると、配列が当業者に知られている技法を用いることによって単離されるか又はクローン化され得る（例えば、Sambrookなど., 1989, 前記を参照のこと）。

【0029】

さらにもう1つの特定の態様においては、親フィターゼは合成フィターゼである。合成フィターゼは、ヒトにより企画され、そして天然においてはたぶん存在しない。EP897985号及びW000/4350号は、そのような合成菌類フィターゼ、一般的には企画されたコンセンサスフィターゼの例を開示する。シャフリングされたフィターゼは、特定部位の突然変異誘発により、PCR (PCR反応におけるプライマーの1つとして、所望する突然変異を含むPCRフラグメントを用いての) により、又はランダム突然変異誘発により、一般的に当業界において知られているようにして調製され得る、合成又は遺伝子的に構築された親フィターゼの他の例である。いずれかのハイブリッド又はキメラフィターゼ、すなわち少なくとも2種のフィターゼに由来する部分アミノ酸配列の組合せを含んで成るフィターゼはまた、合成フィターゼの概念に包含される。

【0030】

親フィターゼは、特定されるアミノ酸配列を含んで成り、又はそれはその対立遺伝子変異体；又はフィターゼ活性を有するそのフラグメントであり得る。1つの態様においては、親フィターゼは、特定されるアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体；又はフィターゼ活性を有するフラグメントを含んで成る。もう1つの態様においては、親フィターゼは、特定されるアミノ酸配列又はその対立遺伝子変異体；又はフィターゼ活性を有するそのフラグメントから成る。

【0031】

特定されるアミノ酸配列のフラグメントは、このアミノ酸配列のアミノ及び/又はカルボキシル末端から欠失された1又は複数のアミノ酸を有するポリペプチドである。1つの態様においては、フラグメントは、少なくとも150個、又は少なくとも200個、又は少なくとも260個、又は少なくとも280個、又は少なくとも300個、又は少なくとも320個、又は少なくとも340個、又は少なくとも360個、又は少なくとも380個、又は少なくとも390個、又は少なくとも400個、又は少なくとも410個、又は少なくとも420個、又は少なくとも430個、又は少なくとも440個、又は少なくとも450個のアミノ酸残基を含む。

【0032】

対立遺伝子変異体は、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の複数の異なった形のいずれかを示す。対立遺伝子変異は、突然変異を通して天然においては発生し、そして集団内の多形現象をもたらすことができる。ポリペプチドの対立遺伝子変異体は、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるポリペプチドである。

親フィターゼはまた、上記に言及されるアミノ酸配列のいずれかの成熟部分でもあり得る。成熟部分とは、成熟アミノ酸配列を意味し、そして可能性あるシグナルペプチド部分が切除された後に残存するアミノ酸配列のその部分を言及する。

【0033】

さらにもう1つの態様においては、親フィターゼは、1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、及び/又は挿入を含んで成る、上記に言及されるフィターゼの変異体であり得る。変異体フィターゼのアミノ酸配列は、1又は複数のアミノ酸残基の挿入又は欠失、及び/又は異なったアミノ酸残基による1又は複数のアミノ酸残基の置換により特定されるアミノ酸配列とは異なる。好ましくは、アミノ酸変化はマイナーな自然のもの、すなわちタンパク質の折りたたみ及び/又は活性に有意に影響を及ぼさない保存性アミノ酸置換；典型的には1～約30個のアミノ酸の小さな欠失；小さなアミノ-又はカルボキシル-末端、例えばアミノ末端メチオニン残基の延長；約20～25個の残基の小さなリンカーペプチド；又は実行電荷又はもう1つの機能、例えばポリ-ヒスチジン系、抗原性エピトープ又は結合ドメインを変えることによって精製を促進する小さな延長である。

【0034】

保存性置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）、及び小さなアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、トレオニン及びメチオニン）の群内にある。一般的に比活性を変更しないアミノ酸置換は当業界において知られており、そして例えばH. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New Yorkにより記載されている。最も通常に存在する交換は、Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, AlaNaI, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, LeuNaI, Ala/Glu, 及び Asp/Gly、並びに逆でのそれらである。

【0035】

微生物分類学：

分類学に関連する問題は、分類学データベース、例えば次のインターネットサイト：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>で入手できるNCBI Taxonomy Browserを調べることにより、そして/又は分類学ハンドブックを調べることにより解決され得る。本発明のためには、菌類分類学に関連する好ましいハンドブックは、Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David & J. Aにより出版されたDictionary of the Fungi (9th edition)である。

【0036】

合成フィターゼ、例えばコンセンサスフィターゼ、シャフリングされたフィターゼ又はハイブリッドフィターゼは、少なくとも2種の子嚢菌フィターゼ、少なくとも2種の担子菌フィターゼ、又は少なくとも1種の子嚢菌及び少なくとも1種の担子菌のフィターゼ由

10

20

30

40

50

来の部分的アミノ酸配列の組合せを含んで成る。部分アミノ酸配列由来のそれらの子囊菌及び担子菌フィターゼは、本明細書に言及されるそれらの特定のフィターゼのいずれかであり得る。

【0037】

本明細書においては、少なくとも1つの菌類に由来する合成フィターゼは、菌類フィターゼである。さらに、子囊菌フィターゼ由来の合成フィターゼは単に子囊菌フィターゼであり；そして担子菌フィターゼ由来の合成フィターゼは担子菌フィターゼである。少なくとも1つの子囊菌フィターゼ及び少なくとも1つの担子菌に由来するいずれかの合成フィターゼは、子囊菌/担子菌フィターゼと命名され得る。

【0038】

ペニオフォラフィターゼとは、ペニオフォラ属の種に由来する野生型フィターゼ、例えば対立遺伝子変異体、そのフラグメント又は変異体、又は少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種のペニオフォラフィターゼに基づいて、より好ましくはペニオフォラフィターゼのみに基づいて調製された合成フィターゼを意味する。ペニオフォラ種の例は次のものである：P. アウランチアカ (P. aurantiaca)、P. シネレア (P. cinerea)、P. デコルチカンス (P. decorticans)、P. デュープレクス (P. duplex)、P. エリクソニ (P. ericsonii)、P. インカルネート (P. incarnate)、P. リン (P. lycii)、P. メリジオナリス (P. meridionalis)、P. ヌーグ (P. nuda)、P. ピセアエ (P. peceae)、P. ピニ (P. pini)、P. ピチャ (P. pithya)、P. ポリゴニア (P. polygonia)、P. プロキシマ (P. proxima)、P. シュード - ピニ (P. pseudo-pini)、P. ルファ (P. rufa)、P. ベルシコロル (P. versicolor)、及びペニオフォラ sp. として単離に分類される種、好ましい種は、ペニオフォラ・リシである。好ましい株は、ペニオフォラ・リシCBS686.96である。

【0039】

アミノ酸相同性：

本発明は、配列番号2に対して一定の程度の同一性を有するアミノ酸配列を有するフィターゼ（この後、“相同フィターゼ”と称する）を言及する。

本発明に関しては、2種のアミノ酸配列間の同一性の程度、及び2種のヌクレオチド配列間の同一性の程度は、Needleman-Wunsch 一列整列（すなわち、包括的な一列整列）であるプログラム“align”により決定される。このプログラムは、ポリペプチド及びヌクレオチド配列の一列整列のために使用される。デフォルト評点マトリックスBLOSUM50はポリペプチド一列整列のために使用され、そしてデフォルト一致マトリックスはヌクレオチド一列整列のために使用される。ギャップの最初の残基についてのペナルティーは、ポリペプチドに関して、-12及びヌクレオチドに関して、-16である。ギャップの追加の残基についてのペナルティーは、ポリペプチドに関して-2及びヌクレオチドに関して、-4である。

【0040】

“Align”は、FASTAパッケージバージョンv20u6の一部である（W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85 : 2444-2448, 及び W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA, "Methods in Enzymology 183: 63-98を参照のこと）。FASTAタンパク質一列整列は、ギャップサイズに対する制限を有さないSmith-Watermanアルゴリズムを使用する（"Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197を参照のこと）。

【0041】

特定の態様においては、親フィターゼは、配列番号2に対して、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約91%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約93%、又は少なくとも約94%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約96%、又は少なくとも約97%、又は少なくとも

約98%、又は少なくとも約99%の同一性の程度を有する。

もう1つの特定の態様においては、それらの相同親フィターゼは、特定されたアミノ酸配列とは、30, 25, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2個又はわずか1つのアミノ酸により異なるアミノ酸を有する。

【0042】

また、得られる変体フィターゼは、配列番号2に対して相同である。特定の態様においては、変異体フィターゼは、配列番号2に対して、少なくとも約55%、又は少なくとも約60%、又は少なくとも約65%、又は少なくとも約70%、又は少なくとも約71%、又は少なくとも約72%、又は少なくとも約73%、又は少なくとも約74%、又は少なくとも約75%、又は少なくとも約76%、又は少なくとも約77%、又は少なくとも約78%、又は少なくとも約79%、又は少なくとも約80%、又は少なくとも約82%、又は少なくとも約85%、又は少なくとも約87%、又は少なくとも約90%、又は少なくとも約92%、又は少なくとも約95%、又は少なくとも約97%の同一性の程度を有するアミノ酸配列を含んで成り、又は有する。

10

【0043】

核酸ハイブリダーゼーション：

他方では、相同親フィターゼ、及び変異体フィターゼは、非常に低い緊縮条件、好ましくは低い緊縮条件、より好ましくは中くらいの緊縮条件、より好ましくは中くらいの高い緊縮条件、さらにより好ましくは高い緊縮条件、及び最も好ましくは非常に高い緊縮条件下で、配列番号1のヌクレオチド49 - 1320、又はその副配列又は相補的鎖とハイブリダイズする核酸配列によりコードされるものとして定義され得る (J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York)。副配列は、少なくとも100個のヌクレオチド、又は少なくとも200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200又は少なくとも1300個のヌクレオチドであり得る。さらに、副配列は、適切な酵素活性を有するポリペプチドフラグメントをコードすることができる。

20

【0044】

少なくとも100個の長さのヌクレオチドの長いプローブに関しては、非常に低い～非常に高い緊縮条件は、5 × SSPE, 0.3%のSDS、200 µg/mlの剪断され、そして変性されたサケの精子DNA、及び25%のホルムアミド (非常に低い及び低い緊縮性に関する)、35%のホルムアミド (中位及び中位の高い緊縮性に関する)、又は50%ホルムアミド (高い及び非常に高い緊縮性に関する) のいずれかでの42 °Cでの標準のサザンブロット方法に従ってのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションとして定義される。

30

【0045】

少なくとも100個のヌクレオチドの長いプローブに関しては、キャリアー材料は最終的に、2 × SSC、0.2%のSDSにより、好ましくは少なくとも45 °C (非常に低い緊縮性)、より好ましくは少なくとも55 °C (中位の緊縮性)、より好ましくは少なくとも60 °C (中位の高い緊縮性)、さらにより好ましくは少なくとも65 °C (高い緊縮性) 及び最も好ましくは少なくとも70 °C (非常に高い緊縮性) で、それぞれ15分間、3度洗浄される。

【0046】

40

約15～約70 の長さのヌクレオチドである短いプローブに関しては、緊縮条件は、標準のサザンブロット方法に従って、0.9MのNaCl、0.09Mのトリス - HCl、pH7.6、6mMのEDTA、0.5%NP-40、1 × Denhardt 's溶液、1mMのピロリン酸ナトリウム、1mMの一塩基性リン酸ナトリウム、0.1mMのATP及びml当たり0.2mgの酵母RNAにおける、Bolton and McCarthy (1962, Proceeding of the National Academy of Sciences USA 48: 1390) に従っての計算を用いて計算されたTmよりも5 °C～10 °C低い温度でのプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション及び洗浄後 - ハイブリダイゼーションとして定義される。

約15～約70個の長さのヌクレオチドである短いプローブに関しては、キャリアー材料は、6 × SSC + 0.1% SDSにより15分間、1度、及び計算されたTmよりも5 °C～10 °C低い温度で6 × SSCを用いて、それぞれ2度、15分間、洗浄される。

50

【 0 0 4 7 】

位置の番号付け：

アミノ酸位置を定義するために本明細書において使用される命名法は、基本的には、ペニオフォラ・リシCBS686.96に由来するフィターゼのアミノ酸に関して、W099/49022号に記載される通りであるが、但し本明細書においては、W099/49022号の図 1 に示される配列 P_リシのS17で開示する。従って、本明細書において使用される位置番号は、W099/49022号の位置番号とは16異なる（W000/49022号の14ページ、26行及び図 1 を参照のこと）。従って、例えばS1は本明細書においては、W099/49022号のS17に等しく、そしてF8はW099/49022号のF24 に等しい。

【 0 0 4 8 】

10

配列番号 2 の配列は、W099/49022号の図 6 に示される配列のアミノ酸 - 14 - 409を含んで成り、これは、その図 1 に示されるP_リシ配列のアミノ酸16 - 439に対応する。

従って、本明細書においては、番号付け位置についての基礎は、S1で開始し、そしてE423で終結する配列番号 2 である。親フィターゼ及び変異体フィターゼは、N - 末端及び/又はそのC - 末端において、配列番号 2 に比較して、延長部を含んで成る。そのような延長部のアミノ酸は、存在するなら、C - 末端延長に関しては、424, 425, 426及び同様の数字で、及びN - 末端延長に関しては、-1, -2, -3及び同様の数字で、当業界において通常であるように番号付けされる。

【 0 0 4 9 】

変更、例えば置換、欠失、挿入：

20

本明細書においては、次のものは、フィターゼ変異体が、少なくとも理論的には、すなわち推定的には、親アミノ酸配列から誘導され得る種々の手段の例である：アミノ酸はもう1つのアミノ酸により置換され得；アミノ酸は欠失され得；アミノ酸は挿入され得；そしていずれかの数のそのような変更のいずれかの組合せ。

【 0 0 5 0 】

本発明に関しては、用語、置換とは、いずれかの数のいずれかのタイプのそのような変更を包含することを意図する。これは道理に合った定義である。なぜならば、例えば、欠失は所定の位置nnにおけるアミノ酸AAの置換として見なされるからであり、そして何もない場合、() である。そのような置換は、AAnn()で示され得る。同様に、所定の位置nnにおける、アミノ酸AAの下流のわずか1つのアミノ酸BBの挿入は、() nnaBBとして示され、そして2つのアミノ酸BB及びCCが位置nnでアミノ酸AAの下流に挿入される場合、この置換(2種の置換の組合せ)は、() nnaBB+()nnbCCとして示され、親配列においてアミノ酸nnとnn+1との間の創造されたギャップは、前の位置番号に下付き文字a, b, c等が付けられる。

30

【 0 0 5 1 】

例えば置換A327S, F, I, Lにおけるような置換基間のコマン(,)は、“いずれか”を意味し、すなわちA327がS又はF、又はI、又はLにより置換されることを意味する。例えば、置換29S+125D+324Aにおけるような置換間のプラスの印(+)は、“および”を意味し、すなわちそれらの3種の単一の置換が1つの及び同じフィターゼ変異体において組み合わせられることを意味する。アミノ酸変更を定義するこの命名法は又基本的には、W099/49022号(そのページ16を参照のこと)に記載される通りである。

40

【 0 0 5 2 】

用語、置換が異なって定義される場合、本発明は、本明細書に示される種々のグループの領域から選択された、少なくとも1つの位置における変更を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで変更は独立して、その位置を占有するアミノ酸の下流への少なくとも1つのアミノ酸の挿入；その位置を占有するアミノ酸の欠失；及び/又はその位置を占有するアミノ酸の異なったアミノ酸による位置であり；ここで変異体はフィターゼ活性を有し、そして個々の位置は配列番号2のアミノ酸配列を有する酵素のアミノ酸配列の位置に対応し、そして変異体は配列番号2に対して少なくとも75%の同一性に有し；そして但し、(d)は本明細書に定義される通りである。

50

【 0 0 5 3 】

本明細書においては、用語“置換”とは、少なくとも1の置換を意味する。少なくとも1つとは、原則的に、いずれかの数の置換を包含する。1又は複数、例えば1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 25, 28, 30及び同様の数を意味する。しかしながら、本発明の変異体は、配列番号2に対して少なくとも75%同一であるべきであり、この%は上記のプログラムにより決定される。置換は、請求項1に言及されるいずれかの領域により包含されるいずれかの位置に適用され、そしていずれかの数及びタイプのそのような置換の組合せを含んで成る変異体がまた包含される。用語、置換とは本明細書において使用される場合、また、欠失、及び配列番号2に対応する配列の長さに加付することができる、延長又は挿入も包含する。特定の態様においては、置換の数は、多くとも200, 175, 150, 125, 120, 110, 106, 105, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30又は25である。

10

【 0 0 5 4 】

さらに、用語“置換”とは、他の19種の天然のアミノ酸のいずれか1つ、又は他のアミノ酸、例えば非天然のアミンの酸中への置換を包含する。例えば、位置20でのアミノ酸Qの置換は、次の置換の個々を包含する：20A, 20C, 20D, 20E, 20F, 20G, 20H, 20I, 20K, 20L, 20M, 20N, 20P, 20R, 20S, 20T, 20V, 20W, 又は20Y。これは、20Xに等しく、ここでXはいずれかのアミノ酸を表す。それらの置換はまた、Q20A, Q20C, Q20X、等として表され得る。同じことが、そのような置換のいずれか1つを特異的に含むよう、本明細書において言及された個々の及びあらゆる位置への類似性により適用できる。

20

【 0 0 5 5 】

対応する位置番号の同定：

ペニオフィラ・リシCBS686.96の親フィターゼに関して、位置番号付けは、配列番号2の番号付けを言及する。もう1つのフィターゼ（親又は変異体フィターゼである）における所定の位置に関しては、配列番号2における対応する位置が常に見出され得る。または他方では、配列番号2のアミノ酸配列を含んで成る（又は有する）フィターゼのアミノ酸配列の位置に対応する位置が常に見出され得る。

【 0 0 5 6 】

ペニオフィラ・リシCBS686.96のフィターゼ以外の親フィターゼ、又は変異体フィターゼのアミノ酸配列は、SEQ - Xとして命名される。配列番号2の位置Nに対応する位置は次の通りである：親又は変異体フィターゼアミノ酸配列SEQ - Xは、アミノ酸相同性のセクションにおいて特定されるように、配列番号2と一列整列される。この一列整列から、配列番号2の位置Nに対応する配列SEQ - Xにおける位置が、下記原理を用いて、明確に且つ明白に誘導され得る。

30

【 0 0 5 7 】

配列A_ペジアデス、A_フミガタス又はT_ラヌギノサスが、本明細書に記載されるように配列番号2に対応する（本発明のためには、それらは配列番号2に対して一列整列されるべきである）、フィターゼP_リシに対して一列整列されている変異体フィターゼであることを、単純性のために仮定して、W099/49022号の図1に、単なる例として言及される。

問題番号1：A_ペジアデスにおけるどの位置がP_リシのS17に対応するか（前記位置は本発明のためには、S1と命名される）？その答えは、A15である。

40

問題番号2：A_フミガタスと命名されたフィターゼにおけるどの位置がP_リシの55b()に対応するか（前記位置は本発明のためには、39b()と命名される）？その答えは、S63である。

【 0 0 5 8 】

問題番号3：A_ペジアデスにおけるどの位置がP_リシのL31に対応するか（前記位置は本発明のためには、L15と命名される）？その答えは、()3()dである。

問題番号4：P_リシにおけるどの位置が、置換G3Lを有する、想像上のT_ラヌギノサフィターゼ変異体に対応するか？その答えは、()-6L（前記置換は、本発明のためには、()-22Lと命名される）

50

SEQ - Xは問題のフィターゼの成熟部分であり得るか、又はそれはまた、シグナルペプチド部分を含むことができるか、又はそれはフィターゼ活性を有する成熟フィターゼのフラグメント、例えば配列番号2と同じ長さのフラグメント、又は本明細書に記載されるように、配列番号2と共に一列整列される場合、S1からE423まで延長するフラグメントであり得る。

【0059】

領域及び位置：

本明細書においては、用語、領域とは、親フィターゼアミノ酸配列の少なくとも1つの位置を意味し、用語、位置は、そのようなアミノ酸配列のアミノ酸残基を示す。1つの態様においては、領域とは、親フィターゼアミノ酸配列の1又は複数の連続した位置、例えば1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8等～配列の連続的位置のいずれかの数までを意味する。従って、領域は1つの位置のみから成ることができ、又はそれはいずれかの数の連続的位置、例えば位置番号37, 38及び39；又は位置番号37, 38, 39, 40及び41；又は位置番号37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47及び48から成ることができる。本発明のためには、後者の3領域は、それぞれ37-39, 37-41及び37-48として示される。それらの領域又は範囲の境界は、前記領域に包含される。配列番号2は、好ましい親ペプチダーゼアミノ酸配列の1つの例である。

10

【0060】

領域は、それが包含する個々の及びあらゆる位置を特に包含する。例えば、領域37-48は、位置37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47及び48の個々を特に包含する。同じことが、本明細書に言及される他の領域について適用される。

20

【0061】

熱安定性：

本発明に関しては、用語、熱安定性とは、一定のポリペプチドに適用される場合、5.5のpHで示着走査熱量法(DSC)を用いて決定される場合、そのようなポリペプチドの溶融温度(T_m)を言及する。熱安定性ポリペプチドに関しては、T_mは少なくとも61 である。特定の態様においては、T_mは少なくとも62,63, 64,65, 66,67, 68, 69,70, 71,72, 73,74, 75,76, 77,77.5,78, 79,80, 81,82, 83,84, 85,86, 87,88, 89,90, 91, 92,93, 94,95, 96,97, 98,99又は100 である。

【0062】

30

他の態様においては、用語、熱安定性とは、7.0のpHでDSCを用いて決定される場合、少なくとも49 、好ましくは少なくとも50,51, 52,53, 54,55, 56,57, 58,59, 60,61, 62,63, 64,65, 66,67, 68,69, 70,71, 72,73, 74,75, 76,77, 77.5, 78,79, 80,81, 82,83, 84,85, 86,87, 88,89又は90 の溶融温度を言及する。

もう1つの態様においては、用語、熱安定性とは、3.0のpHでDSCを用いて決定される場合、少なくとも51 、好ましくは少なくとも52,53, 54,55, 56,57, 58,59, 60,61, 62,63, 64,65, 66,67, 68,69, 70,71, 72,73, 74,75, 76,77, 77.5, 78,79, 80,81, 82,83, 84,85, 86,87, 88,89又は90 の溶融温度を言及する。

【0063】

さらにもう1つの態様においては、用語、熱安定性とは、2.5のpHでDSCを用いて決定される場合、少なくとも37 、好ましくは少なくとも38,39, 40,41, 42,43, 44,45, 46,47, 48,49, 50,51, 52,53, 54,55, 56,57, 58,59, 60,61, 62,63, 64,65, 66,67, 68,69, 70,71, 72,73, 74,75, 76,77, 77.5, 78,79, 80,81, 82,83, 84,85, 86,87, 88,89又は90 の溶融温度を言及する。

40

【0064】

T_mの決定に関しては、SDS - PAGEにより決定される場合、少なくとも90%(又は91, 92, 93, 94, 95, 96, 97又は98%)の純度を有するポリペプチドのサンプルが使用され得る。さらに、酵素サンプルは、280nmでの吸光度から決定され、そして問題の酵素のアミノ酸配列から計算される消衰係数に基づかれる場合、0.5～2.5mg/ml (又は0.6～2.4、又は0.7～2.2、または0.8～2.0mg/ml)の濃度のタンパク質を有することができる。

50

【0065】

DSCは、所望するpH（例えば、5.5、7.0、3.0又は2.5のpH）で及び例えば1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9又は10 /分の一定加熱速度で行われる。適切な緩衝液の例は、実験部分に言及される。好ましい加熱速度の例は、本明細書における例2に記載されるような装置を用いる場合、1.0、1.5又は2.0 /分である。より小さなサンプル体積を伴っての他のタイプの装置に関しては、T_mの信頼できる評価が、例えば3、4、5、6、7、8、9又は10 /分の加熱速度を用いて得られる。

特定の態様においては、本発明のフィターゼ変異体は、親フィターゼよりも熱安定性である。この目的のための好ましい親フィターゼは、ペニオフォラ・リシCBS686.96フィターゼである。

10

【0066】

比活性：

用語、高い、高められた又は改良された比活性とは、同じ方法により決定される場合、親フィターゼの比活性に対して、少なくとも105%の比活性を言及する。特定の態様においては、相対的比活性は、同じ方法により決定される場合、親フィターゼの比活性に対して、少なくとも110,115, 120, 125,130, 140,145, 150,160, 170,180, 190,200, 220,240, 260, 280, 300,350又は400%である。

他の態様においては、用語、高い比活性とは、少なくとも200FYT/mg酵素タンパク質（EP）の比活性を言及する。特定の態様においては、比活性は少なくとも300,400, 500,600, 700,800, 900,1000, 1100,1200, 1300,1400, 1500,1600, 1700,1800, 1900,2000, 2100, 2200, 2300,2400, 2500,2600, 2700,2800, 2900又は3000FYT/mgEPである。

20

【0067】

比活性は、高く精製されたサンプルに対して測定される（SDSポリアクリルアミドゲルはわずか1種の成分の存在を示す）。酵素タンパク質濃度は、アミノ酸分析及びFYT単位でのフィターゼ活性により決定され得る。比活性は問題の特定のフィターゼ変異体の特徴であり、そしてそれは、mgフィターゼ変異体酵素タンパク質当たりFYT単位で測定されるフィターゼ活性として計算される。

【0068】

さらなる詳細については例3を参照のこと。

本発明のフィターゼ変異体は、熱安定性であり、そして/又は高い比活性のものである。特定の態様においては、それは高い比活性のものである。第3の特定の態様においては、それは熱安定性であり、そして高い比活性のものである。さらなる特定の態様においては、それは、（a）親フィターゼよりも熱安定性であり；（b）親フィターゼに比較して、高い比活性のものであり；又は（c）親フィターゼよりも熱安定性であり、そして親フィターゼに比較して、高い比活性のものである。

30

【0069】

低アレルギー性変異体：

特定の態様においては、本発明のフィターゼ変異体は、動物、たとえばヒトに暴露される場合、低い免疫原応答をもたらすよう企画された低アレルギー性変異体である。免疫学的応答は、フィターゼ変異体に暴露される動物の免疫系によるいずれかの応答として理解されるべきである。1つのタイプの免疫学的応答は、暴露された動物における高められたレベルのIgEを導くアレルギー応答である。低アレルギー性変異体は、当業界において知られている技法を用いて調製され得る。例えば、フィターゼ変異体は、免疫学的応答に関与するフィターゼ変異体の一部又はエピトープを保護するポリマー成分により接合され得る。ポリマーによる接合は、W096/17929号、W098/30682gou、W098/35026号及び/又はW099/00489号に記載のように、フィターゼ変異体へのポリマーのインビトロ化学的カップリングを包含する。接合は、さらに又は他方では、フィターゼ変異体へのポリマーのインビボカップリングを包含する。

40

【0070】

そのような接合は、フィターゼ変異体をコードするヌクレオチド配列を遺伝的に構築し

50

、フィターゼ変異体における追加のグリコシル化部位をコードするコンセンサス配列を挿入し、そしてフィターゼ変異体をグリコシル化できる宿主においてフィターゼ変異体を発現することによって達成され得る。例えば、W000/26354号を参照のこと。低アレルギー性変異体を供給するもう1つの手段は、フィターゼ変異体モノマーが他のフィターゼ変異体モノマーのエピトープを保護し、そしてそれにより、オリゴマーの抗原性を低める、フィターゼ変異体の自己オリゴマー化を引き起こすために、フィターゼ変異体をコードするヌクレオチド配列の遺伝的構築である。そのような生成物及びそれらの調製法は、例えばW096/16177号に記載されている。

【0071】

免疫学的応答に関与するエピトープは、種々の方法、例えばW000/26230号に記載されるファージ表示法、又はEP561907号に記載されるランダムアプローチにより同定され得る。エピトープが同定されると、そのアミノ酸配列は、既知の遺伝子操作技法、例えば特定部位の突然変異誘発によりフィターゼ変異体の変更された免疫学的性質を生成するために変更され得（例えば、W000/26230号、W000/26354号及び/又はW000/22103号を参照のこと）、そして/又はポリマーの接合がエピトープを保護するために、ポリマーのためのエピトープに十分に接近して行われ得る。

【0072】

核酸配列及び構造体：

本発明はまた、本発明のフィターゼ変異体をコードする核酸配列を含んで成る核酸配列にも関する。

用語“単離された核酸配列”とは、他の核酸配列を実質的に有さない、例えばアガロース電気泳動により決定される場合、少なくとも約20%純粋、好ましくは少なくとも約40%純粋、より好ましくは少なくとも約60%純粋、さらにより好ましくは少なくとも約80%純粋、及び最も好ましくは少なくとも約90%純粋である核酸配列を言及する。例えば、単離された核酸配列は、核酸配列を、その天然の位置から、それが再生されるであろう異なった部位に移転するために遺伝的構築に使用される標準のクローニング方法により得られる。

【0073】

クローニング方法は、ポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る所望する核酸フラグメントの切除及び単離、ベクター分子中への前記フラグメントの挿入、及び核酸配列の複数コピー又はクローンが複製されるであろう宿主細胞中への前記組換えベクターの組み込みを包含する。核酸配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成、合成起源、又はそれらのいずれかの組合せのものであり得る。

【0074】

本発明の核酸配列は、親フィターゼコード配列又はその副配列中に少なくとも1つの突然変異を導入することによって調製され得、ここで変異体核酸配列は変異体フィターゼをコードする。1つのヌクレオチドをもう1つのヌクレオチドにより交換するために核酸配列中への突然変異の導入は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発、ランダム突然変異誘発、又はドーピングされた、スパイキングされた又は位置決定されたランダム突然変異誘発により達成され得る。

【0075】

ランダム突然変異誘発は適切には、問題の示されるアミノ酸配列に翻訳する遺伝子の少なくとも3種の部位において、又は完全な遺伝子内での位置決定された又は領域特異的ランダム突然変異誘発として行われる。突然変異がオリゴヌクレオチドの使用により行われる場合、そのオリゴヌクレオチドは、変更される位置でのオリゴヌクレオチドの合成の間、3種の非親ヌクレオチドによりドーピングされるか又はスパイキングされ得る。このドーピング又はスパイキングは、所望しないアミノ酸のためのコドンが回避されるよう行われ得る。ドーピングされた又はスパイキングされたオリゴヌクレオチドは、例えばPCR、LCR又はいずれかのDNAポリメラーゼ及びリガーゼを用いて、いずれかの技法により、フィターゼ酵素をコードするDNA中に組み込まれ得る。

【0076】

好ましくは、ドーピングは、個々の位置における野生型及び突然変異の%が前もって定義されている“一定ランダムドーピング”を用いて行われる。さらに、ドーピングは、一定のヌクレオチドの導入のための選択に、及びそれにより、1又は複数の特定のアミノ酸残基の導入のための選択に指図され得る。ドーピングは、例えば個々の位置における90%の野生型及び10%の突然変異の導入を可能にするために行われ得る。ドーピングスキームの選択における追加の考慮は、遺伝的及びタンパク質 - 構造的強制に基づかれている。

【0077】

ランダム突然変異誘発は好都合には、問題の親フィターゼの一部に局在され得る。これは、例えば酵素の一定領域が酵素の所定の特性のために特に重要であることが同定されている場合、好都合であり得る。

10

本発明の変異体を供給するための他の方法は、W095/22625号又はW096/00343号に記載されるような遺伝子シャフリング、及びEP897985号に記載されるようなコンセンサス誘導方法を包含する。

【0078】

核酸構造体：

核酸構造体は、制御配列と適合できる条件下で適切な宿主細胞におけるコード配列の発現を指図する1又は複数の制御配列に操作可能に連結される本発明の核酸配列を含んで成る。発現は、転写、後翻訳修飾、翻訳、後転写修飾及び分泌（但し、それらだけには限定されない）を包含するポリペプチドの生成に關与するいずれかの段階を包含することが

20

【0079】

発現ベクター：

本発明のフィターゼ変異体をコードする核酸配列は、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル及び任意には、レプレッサー遺伝子又は種々の活性化因子遺伝子をコードする制御配列を典型的には含む発現ベクターを用いて発現され得る。

本発明のグルコアミラーゼ変異体をコードするDNA配列を担持する組換え発現ベクターは、組換えDNA方法に便利には、ゆだねられ得るいずれかのベクターであり得、そしてベクターの選択はしばしば、それが導入される宿主細胞に依存するであろう。ベクターは、宿主細胞中に導入される場合、宿主細胞ゲノム中に組込まれ、そしてそれが組込まれた染色体と共に複製されるベクターであり得る。

30

【0080】

フィターゼ変異体はまた、興味ある動物飼料の少なくとも1つの他の酵素、例えばキシラナーゼ、エンドグルカナーゼ、エンド-1,3(4)- β -グルカナーゼ及び/又はプロテアーゼと共に同時発現され得る。酵素は、異なったベクターから、1つのベクターから、又は両技法の混合物を用いて、同時発現され得る。異なったベクターを用いる場合、ベクターは、異なった選択マーカー、及び複数の異なった起点を有することができる。わずか1つのベクターを用いる場合、遺伝子は、1又は複数のプロモーターから発現され得る。1つのプロモーター（二又は多-シストロン性）の調節下でクローン化される場合、遺伝子がクローン化される順序はタンパク質の発現レベルに影響を及ぼすことができる。フィターゼ変異体はまた、フィターゼ変異体をコードする遺伝子がもう1つのタンパク質をコードする遺伝子に整合して融合されている融合タンパク質として発現され得る。このタンパク質は、もう1つの酵素、又はもう1つの酵素からの機能的ドメインであり得る。

40

【0081】

宿主細胞：

本発明はまた、ポリペプチドの組み換え生成に都合良く使用される、本発明の核酸配列を含んで成る組み換え宿主細胞にも関する。本発明の核酸配列を含んで成るベクターが宿主細胞中に導入され、その結果、ベクターは染色体組み込み体として、又は自己複製染色体外ベクターとして維持される。用語“宿主細胞”とは、複製の間に生じる突然変異のた

50

めに、親細胞と同一でない親細胞のいずれかの子孫を包含する。宿主細胞の選択は、ポリペプチド及びその源をコードする遺伝子に、かなりの程度、依存するであろう。

宿主細胞は、単細胞微生物、例えば原核生物、又は非単細胞微生物、例えば真核細胞、例えば動物細胞、哺乳類、昆虫、植物又は菌類細胞であり得る。好ましい動物細胞は、非ヒト動物細胞である。

【0082】

好ましい態様においては、宿主細胞は、菌類細胞、又は酵母細胞、例えばカンジダ (*Candida*)、ハンセンラ (*Hansenula*)、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*)、ピチア (*Pichia*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 又はヤロワイヤ (*Yarrowia*) 細胞である。菌類宿主細胞は、糸状菌細胞、例えば次の種 (但し、これらだけには限定されない) の細胞であり得る: アクレモニウム (*Acremonium*)、アスペルギラス (*Aspergillus*)、フサリウム (*Fusarium*)、ヒューミコラ (*Humicola*)、ムコル (*Mucor*)、マイセリオプソリア (*Myceliophthora*)、ネウロスプラ (*Neurospora*)、ペニシウム (*Penicillium*)、チセラビア (*Thielavia*)、トリボクラジウム (*Tolyposcladium*) 又はトリコダーマ (*Trichoderma*)。

10

【0083】

有用な単細胞は、細菌細胞、例えばグラム陽性細菌、例えばバチルス細胞又はストレプトミセス細胞、又は乳酸菌の細胞; 又はグラム陰性細菌、例えば *E. コリ* 及び *シュードモナス* sp. である。乳酸菌は、ラクトコーカス (*Lactococcus*)、ラクトバシラス (*Lactobacillus*)、リュコノストック (*Leuconostoc*)、ストレプトコーカス (*Streptococcus*)、ペジオコーカス (*Pediococcus*) 及びエンテロコーカス (*Enterococcus*) を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

20

【0084】

生成方法:

本発明はまた、(a) フィターゼ変異体の生成の助けとなる条件下で宿主細胞を培養し; そして (b) 前記フィターゼ変体を回収することを含んで成る、本発明のフィターゼの生成方法にも関する。

【0085】

本発明の生成方法においては、細胞は、当業界において知られている方法を用いて、ポリペプチドの生成のために適切な栄養培地において培養される。例えば、細胞は、ポリペプチドの発現及び/又は単離を可能にする適切な培地において、及び条件下で行われる実験用又は産業用発酵器において、振盪フラスコ培養、小規模又は大規模発酵 (連続、バッチ、供給バッチ又は固体状態発酵を包含する) により培養され得る。培養は、炭素及び窒素源、及び無機塩を含んで成る適切な栄養培地において、当業界において知られている方法を用いて行われる。適切な培地は、市販の供給者から入手でき、又は公開された組成 (例えば、American Type Culture Collection のカタログにおける) に従って調製され得る。フィターゼが栄養培地中に分泌される場合、それは培地から直接的に回収され得る。それが分泌されない場合、それは細胞溶解物から回収され得る。

30

【0086】

得られるフィターゼは、当業界において知られている方法により回収され得る。例えば、それは、従来の方法、例えば遠心分離、濾過、抽出、噴霧乾燥、蒸発又は沈殿 (但し、それらだけには限定されない) により、栄養培地から回収され得る。

40

本発明のフィターゼは、当業界において知られている種々の方法、例えばクロマトグラフィー (例えば、イオン交換、親和性、疎水性、クロマトフォーカシング及びサイズ排除)、電気泳動方法 (例えば、分離用等電点電気泳動)、示差溶解性 (例えば、硫酸アンモニウム沈殿)、SDS-PAGE 又は抽出 (但し、それらだけには限定されない) により精製され得る (Protein Purification, J. -C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989 を参照のこと)。

【0087】

植物:

50

本発明はまた、ポリペプチドを、回収できる量で発現し、そして生成するために、本発明のフィターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列により形質転換されているトランスジェニック植物、その植物部分又は植物細胞にも関する。ポリペプチドは、植物又は植物部分から回収され得る。他方では、組換えポリペプチドを含む植物又は植物部分は、食物又は飼料の品質を改良し、例えば栄養価値、嗜好性及び流動性質を改良するために、又は抗栄養因子を破壊するために使用され得る。

特定の態様においては、ポリペプチドは、種子の内生精子貯蔵液胞にも標的化される。これは、適切なシグナルペプチドにより前駆体としてそれを合成することによって行われる。Horvath など .、PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, no. 4, p. 1914-1919を参照のこと。

10

【0088】

トランスジェニック植物は、双子葉植物又は単子葉植物又は構築されたその変異体であり得る。単子葉植物の例は、草、例えば湿潤地の草本（ブルーグラス、イチゴツナギ属）、飼草、例えばウシノケグサ、ドクムギ、温帯性草本、例えばヌカボ、及び穀類、例えば小麦、オート麦、ライ麦、イネ、モロコシ及びトウモロコシ（サトウモロコシ）である。

【0089】

双子葉植物の例は、タバコ、マメ科植物、ルピナス、ジャガイモ、砂糖大根、エンドウ、インゲン豆及び大豆、及びアブラナ科植物（ブラシカセアエ科（Brassicaceae））、例えばカリフラワー、ナタネ種子及び密接に関連するモデル生物アラビドプシス・タリアナ（*Arabidopsis thaliana*）である。例えば、アメリカ特許第5,689,054号及び第6,111,168号に記載されるような低-フィテート植物は、構築された植物の例である。植物部分の例は、茎、カルス、葉、根、果物、種子及び塊茎である。また特定の植物組織、例えばクロロプラスト、アポプラスト、ミトコンドリア、液胞、ペルオキシソーム及び細胞質が、植物部分であると思われる。さらに、組織起源が何であろうと、いずれの植物細胞でも、植物部分であると思われる。

20

【0090】

そのような植物、植物部分及び植物細胞の子孫はまた、本発明の範囲内に包含される。

本発明のポリペプチドを発現するトランスジェニック植物又は植物細胞は、当業界において知られている方法に従って構成され得る。手短には、植物又は植物細胞は、本発明のポリペプチドをコードする、1又は複数の発現構造体を、植物宿主ゲノム中に導入し、そして得られる修飾された植物又は植物細胞をトランスジェニック植物又は植物細胞中に成長せしめることによって構成される。

30

【0091】

便利には、発現構造体は、選択の植物又は植物における核酸配列の発現のために必要とされる適切な調節配列により操作可能的に連結される本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含んで成る核酸構造体である。さらに、発現構造体は、発現構造体が組み込まれている宿主細胞を同定するために有用な選択マーカー、及び問題の植物中への構造体の導入のために必要なDNA配列を含んで成る（後者は、使用されるDBA導入方法に依存する）。

【0092】

調節配列、例えばプロモーター及びターミネーター配列、及び任意には、シグナル又はトランスジット配列の選択は、例えばポリペプチドがいつ、どこで及びいかにして発現されることを所望するかに基づかれる。例えば、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、構成的又は誘発的であり、又は進行的、段階又は組織特異的であり、そして遺伝子生成物は、特定組織又は植物部分、例えば種子又は葉に標的化され得る。調節配列は、Taqueなど., 1988, Plant Physiology 86: 506により記載される。

40

【0093】

構成的発現に関しては、35S - CaMVプロモーターが使用され得る（Franckなど., 1980, Cell 21:285-294）。器官特異的プロモーターは例えば、貯蔵吸込み組織、例えば種子、ジャガイモ塊茎及び果物（Edwards & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303）

50

、又は代謝吸込み組織、例えば分裂組織 (Ito など., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878) からのプロモーター、種子特異的プロモーター、例えばイネからのグルテリン、プロラミン、グロブリン又はアルブミンプロモーター (Wu など., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885- 889)、*Vicia faba*からのレグニンB4及び未知の種子タンパク質遺伝子からの*Vicia faba*プロモーター (Conrad など., 1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711)、種子油体タンパク質からのプロモーター (Chen など., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 935-941)、ブラシカ・ナパス (*Brassica napus*) からの貯蔵タンパク質napAプロモーター又は当業界において知られている、例えばW091/14772号に記載されるようないずれか他の種子特異的プロモーターであり得る。

【 0 0 9 4 】

10

さらに、プロモーターは、葉特異的プロモーター、例えばイネ又はトマトからのrbcsプロモーター (Kyoizuka など., 1993, Plant Physiology 102: 991-1000)、クロレラウィルスアデニンメチルトランスフェラーゼ遺伝子プロモーター (Mitra and Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93)、又はイネからのaldP遺伝子プロモーター (Kagaya など., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674)、又は創傷誘発性プロモーター、例えばジャガイモpin2プロモーター (Xu など., 1993, Plant Molecular Biology 22 : 573-588) であり得る。

【 0 0 9 5 】

プロモーターエンハンサー要素がまた、植物における酵素のより高い発現を達成するために使用され得る。例えば、プロモーターエンハンサー要素は、プロモーターと、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列との間に位置するイントロンであり得る。例えば、Xuなど., 1993 (前記) は、発現を増強するためへのイネアクチン 1 遺伝子の最初のイントロンの使用を開示する。

20

さらに、コドン使用法は、発現を改良するために、問題の植物種のために最適化され得る (上記に言及されるHorvathなどを参照のこと)。

発現構造体の選択マーカー遺伝子及びいずれか他の部分は、当業界において入手できるそれらから選択され得る。

【 0 0 9 6 】

核酸構造体は、当業界において知られている従来の技法、例えばアグロバクテリウム介在性形質転換、ウィルス介在性形質転換、マイクロインジェクション、粒子衝撃、バイオリステック形質転換及びエレクトロポレーションに従って、植物ゲノム中に組込まれる (Gasserなど., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Biotechnology 8 : 535; Shimamoto など., 1989, Nature 338: 274)。

30

【 0 0 9 7 】

現在、アグロバクテリウム・ツメファシエンス介在性遺伝子トランスファーは、トランスジェニック双子葉類を生成するための選択方法である (再考のためには、Hooykas and Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38を参照のこと)。しかしながら、それはまた、単子葉類を形質転換するためにも使用され得るが、しかし他の形質転換方法が一般的にそれらの植物のために好ましい。現在、トランスジェニック単子葉類を生成するための選択方法は、胚細胞又は成長胚の粒子衝撃である (形質転換DNAにより被覆された微小金又はタングステン粒子) (Christou, 1992, Plant Journal 2 : 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil など., 1992, Biotechnology 10: 667-674)。単子葉類の形質転換のための他の方法は、Omirulלהなど., 1993, Plant Molecular Biology21: 415-428により記載されるようにプロトプラスト形質転換に基づかれる。

40

【 0 0 9 8 】

形質転換に続いて、そこに組込まれた発現構造体を有する形質転換体が選択され、そして当業界において良く知られていた方法に従って、完全な植物に再生される。

本発明はまた、(a) 本発明のフィターゼ変異体をコードする核酸配列を含んで成るトランスジェニック植物又は植物細胞を、フィターゼ変異体の生成の助けとなる条件下で栽

50

培し、そして (b) フィターゼ変異体を回収することを含んで成る、本発明のポリペプチドを生成するための方法にも関する。

【0099】

発現宿主としての動物：

本発明はまた、トランスジェニック非ヒト動物及びその生成物又は要素にも関し、その例は体液、例えば乳汁及び血液、器官、肉及び動物細胞である。例えば、哺乳類細胞においてタンパク質を発現するための技法は当業界において知られている。例えば、ハンドブック Protein Expression: A Practical Approach, Higgins and Hames (eds), Oxford University Press (1999), 及び Gene Transcription, RNA processing, and Post-translational Processing に関するこのシリーズの他の3種のハンドブックを参照のこと。一般的には、トランスジェニック動物を調製するために、選択された動物の選択された細胞が、本発明のフィターゼ変異体をコードする核酸配列により形質転換され、フィターゼ変異体が発現され、そして生成される。フィターゼ変異体が、動物から、例えば雌動物の乳汁から回収され、又はそれは動物自体の有益性のために、例えば動物の消化を助けるために発現され得る。動物の例は、下記の動物飼料及び動物飼料添加物のセクションに言及されている。

10

【0100】

動物の乳汁からフィターゼ変異体を回収する観点から、トランスジェニック動物を生成するためには、フィターゼ変異体をコードする遺伝子が問題の動物の受精卵中に、例えば適切な乳汁タンパク質プロモーター及びフィターゼ変異体をコードする遺伝子を含んで成るトランスジーン発現ベクターの使用により挿入され得る。トランスジーン発現ベクターは、受精卵中にマイクロインジェクションされ、そして好ましくは、染色体中に永久的に組込まれる。卵が成長し、そして分裂し始めると、可能性ある胚が代理母中に移植され、そしてトランスジーンを担持する動物が同定される。次に、その得られる動物は、従来の飼育により繁殖される。

20

【0101】

フィターゼ変異体が動物の乳汁から精製される。例えば、Meade, H. M. など(1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression. J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler (eds.), Academic Pressを参照のこと。

30

他方では、その体細胞及び/又は生殖細胞のゲノムに、フィターゼ変異体をコードするトランスジーンを含む異種トランスジーン構造体を包含する核酸配列を担持するトランスジェニック非ヒト動物を生成するために、トランスジーンが、WO2000064247号に開示されるように、フィターゼ変異体の唾液腺特異的発現のための第1の調節配列に操作可能に連結され得る。

【0102】

動物飼料及び動物飼料添加物：

本発明に関しては、用語、動物とは、ヒトを包含するすべての動物を包含する。特定の態様においては、本発明のフィターゼ変異体及び組成物が、非ヒト動物のための飼料添加物として使用され得る。動物の例は、非反芻動物、及び反芻動物、例えば牛、羊及び馬である。特定の態様においては、動物は非反芻動物である。非反芻動物は、単一の胃を有する動物、例えばブタ又はイノシシ（子ブタ、成長しているブタ及び雌ブタを包含するが、但しそれらだけには限定されない）；家禽類、例えば七面鳥及び鶏（ブロイラー鶏、産卵鶏を包含するが、但しそれらだけには限定されない）；子牛；及び魚（サケを包含するが、但しそれらだけには限定されない）を包含する。

40

【0103】

用語、飼料又は飼料組成物とは、動物のために適切な、又は動物による摂取のために意図された、いずれかの化合物、調製物、混合物又は組成物を意味する。飼料は、日常の規定食の前、後又は同時に、動物に供給され得る。後者が好ましい。

本発明の組成物は、動物飼料への添加のために意図される場合、動物飼料添加物として

50

命名され得る。そのような添加剤は常に、問題のフィターゼ変異体を、好ましくは安定化された液体又は乾燥組成物の形で含んで成る。添加剤は、動物飼料の他の成分又は構成成分を含むことができる。いわゆる、動物飼料のためのプレミックスは、そのような動物飼料添加物の特定の例である。プレミックスは、問題の酵素、及びさらに、少なくとも1つのビタミン及び/又は少なくとも1つの鉱物を含むことができる。

【0104】

従って、特定の態様においては、成分ポリペプチドの他に、本発明の組成物は、少なくとも1つの脂溶性ビタミン、及び/又は少なくとも1つの水溶性ビタミン、及び/又は少なくとも1つの微量鉱物を含んで成るか又は含むことができる。また少なくとも1つのマクロ鉱物が包含され得る。

10

脂溶性ビタミンの例は、ビタミンA、ビタミンD3、ビタミンE及びビタミンK、例えばビタミンK3である。

【0105】

水溶性ビタミンの例は、B12、ビオチン及びコリン、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ナイアシン、葉酸及びパントテネート、例えばCa-D-パントテネートである。

微量鉱物の例は、マンガン、亜鉛、鉄、銅、ヨウ素、セレンウム及びコバルトである。

マクロ鉱物の例は、カルシウム、リン及びナトリウムである。

さらに、任意の飼料添加剤成分は、着色剤、芳香化合物、安定剤、添加用酵素及び抗菌ペプチドである。

【0106】

20

本発明の組成物の追加の酵素成分は、キシラナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド；及び/又はエンドグルカナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド；及び/又はエンド-1,3(4)-β-グルカナーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチド；及び/又はプロテアーゼ活性を有する少なくとも1つのポリペプチドを含む。

キシラナーゼ活性はいずれかのアッセイを用いて測定され得、ここでキシラン中、1,4-β-D-キシロシドエント-連鎖を含む基質が使用される。異なったタイプの基質、例えばXylazyme架橋されたアラビノキシラン錠剤(MegaZymeからの)又はアゾ染色されたアラビノキシランの不溶性粉末分散液及び溶液が、キシラナーゼ活性の決定のために利用できる。

【0107】

30

エンドグルカナーゼ活性は、当業界において知られているいずれかのエンドヌクレアーゼアッセイを用いて決定され得る。例えば、種々のセルロース-又はβ-グルカン-含有基質が適用され得る。エンドグルカナーゼアッセイは、AZCL-大麦β-グルカン、又は好ましくは(1)AZCL-HE-セルロース、又は(2)アゾ-CM-セルロースを基質として使用することができる。両者の場合、基質の分解に続いて、OD₅₉₅で分光光度計測される(<http://www.megazyme.com/booklets/AZCLPOL.pdf>でのエンド-ヒドロラーゼのアッセイのためのAZCL-ポリサッカリドについてのMegazyme方法を参照のこと)。

【0108】

エンド-1,3(4)-β-グルカナーゼ活性は、当業界において知られているいずれかのエンド-1,3(4)-β-グルカナーゼアッセイを用いて決定され得る。エンド-1,3(4)-β-グルカナーゼ活性測定のための好ましい基質は、架橋されたアゾ-着色されたβ-グルカン大麦基質であり、ここで測定は分光光度決定原理に基づかれる。

40

【0109】

プロテアーゼ活性は、いずれかのアッセイを用いて測定され得、ここで問題のプロテアーゼの特異性のために適切なペプチド結合を含む基質が使用される。プロテアーゼ基質の例は、カゼイン、及びpNA-基質、例えばSuc-AAPF-pNA(例えば、Sigma S-7388から入手できる)である。もう1つの例は、Protazyme AK(Megazyme T-PRAKにより錠剤として調製された、アズリン染色された架橋カゼイン)である。W001/58276号の例2は、適切なプロテアーゼアッセイを記載する。好ましいアッセイは、例2DのProtazymeアッセイである(pH及び温度は、前に一般的に記載されたように、問題のプロテアーゼに調節されるべ

50

きである。

【 0 1 1 0 】

キシラーゼ、エンドグルカナーゼ、 β - 1 , 3 (4) - グルカナーゼ及びプロテアーゼ活性をアッセイするために、アッセイ - pH及びアッセイ - 温度は、問題の酵素に適合されるべきである(好ましくは、最適pHに近いpH、及び最適温度に近い温度)。好ましいアッセイpHは、2~10、好ましくは3~9、より好ましくは3, 4, 5, 6, 7又は8、例えば3又は7である。好ましいアッセイ温度は、20~80、好ましくは30~80、より好ましくは40~75、さらにより好ましくは40~60、好ましくは40、45又は50である。酵素活性は、適切なブラインド、例えば緩衝液ブラインドとの参照により定義される。

【 0 1 1 1 】

抗菌ペプチド (AMP) の例は、CAP18, Leucocin A, Tritrpticin, Protegrin-1, Thanatin, Lactoferrin, Lactoferricin, 及び Ovispirin、例えば Novispirin (Robert Lehrer, 2000)、及び抗菌活性を保持するそれらの変異体又はフラグメントである。他の例は、W 094/01459号及びPCT/DK02/00289号に記載のように、抗真菌ポリペプチド (AFP)、例えばアスペルギラス・ギガンテウス (*Aspergillus giganteus*) 及びアスペルギラス・ニガーから誘導されたそれら、及び抗真菌活性を保持する、それらの変異体及びフラグメントである。

【 0 1 1 2 】

特定の態様においては、本発明の動物用飼料添加剤は、動物用規定食又は飼料に、0.0010-12.0%、又は0.0050-11.0%、又は0.0100-10.0%、より特定には0.05-5.0% ; 又は0.2-1.0% (100gの飼料当たりg添加剤を測定する%) のレベルで包含されるために意図される。これは特に、プレミックスに関して、そのようである。

従って、動物用飼料添加剤、例えばプレミックス中の個々の成分の濃度は、同じ成分の最終飼料中濃度にそれぞれ10-10000 ; 20-2000 ; 又は100-500 (上記3% 包含間隔を言及する) を掛け算することによって見出され得る。

【 0 1 1 3 】

重要な飼料成分の最終飼料中濃度は、一般的に栄養学者により知られており、そして次の出版物に提供される、動物の栄養必要条件に影響を及ぼすことができる: NRC, Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D. C. 1988; 及び NRC, Nutrient requirements of poultry, ninth revised edition 1994, subcommittee on poultry nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council, National Academy Press, Washington, D. C. , 1994。

【 0 1 1 4 】

フィターゼ変異体は、もちろん、動物用飼料に、有効量で、すなわち飼料の栄養価値を改良するために適切な量で適用され得る。それは、次の用量範囲で投与されることが、現在、企画されている: 0.01-200 ; 又は0.01-100 ; 又は0.05-100 ; 又は0.05-50 ; 又は0.10-10 (すべてのそれらの範囲はKg 飼料当たりmg酵素タンパク質 (ppm) で存在する)。

Kg飼料又は飼料添加物当たりmgフィターゼタンパク質を決定するために、酵素は、飼料組成物又は飼料添加物から精製され、そして精製された酵素の比活性が適切なアッセイを用いて決定される。飼料組成物又は飼料添加物のフィターゼ活性がまた、同じアッセイを用いて、及びそれらの2種の測定値 (kg飼料当たりmgフィターゼタンパク質での用量が計算される) に基づいて、決定される。

【 0 1 1 5 】

もちろん、サンプルが飼料添加物又は飼料を調製するために使用されるフィターゼ変異体から入手される場合、比活性はこのサンプルから決定される (飼料組成物又は添加物から酵素を生成する必要はない)。

本発明の組成物は、当業界において知られている方法に従って、例えばフィターゼ変異体を、追加の成分 (もし存在するなら) と共に混合することによって調製され得る。

10

20

30

40

50

動物用飼料組成物又は規定食は、比較的高いタンパク質含有率を有する。本発明の動物用飼料組成物は、50-800、又は75-700、又はd 100-600、又は110-500、又は120-490g/kgの粗タンパク質含有率を有し、そしてさらに、本発明の組成物を含んで成る。

【0116】

さらに、又は他方では（上記に示される粗タンパク質含有率に対して）、本発明の動物用飼料組成物は、10-30、又は11-28、又は11-26、又は12-25MJ/kgの含有率の代謝可能エネルギー；及び/又は0.1-200、又は0.5-150、又は1-100、又は4-50g/kgの含有率のカルシウム；及び/又は0.1-200、又は0.5-150、又は1-100、又は1-50、又は1-25g/kgの含有率の利用できるリン；及び/又は0.1-100、又は0.5-75、又は1-50、又は1-30g/kgの含有率のメチオニン；及び/又は0.1-150、又は0.5-125、又は1-80g/kgの含有率のメチオニン + シス

10

【0117】

粗タンパク質はAnimal Nutrition, 4th edition, Chapter 13 (Eds. P. McDonald, R. A. Edwards and J. F. D. Greenhalgh, Longman Scientific and Technical, 1988, ISBN 0-582-40903-9)に言及されるように、係数6.25により掛け算される窒素(N)、すなわち粗タンパク質(g/kg) = N(g/kg) × 6.25として計算される。窒素含有率は、Kjeldahl方法(A. O. A. C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC)により決定され得る。しかしまた、他の方法、例えばサンプル酵素中で燃焼され、そして形成される窒素ガスの量が分析され、そして窒素として再計算されるDumas方法が使用され得る。

20

【0118】

代謝可能エネルギーは、NRC publication Nutrient Requirements of Swine (1988) pp. 2-6、及び the European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5に基づいて計算され得る。

【0119】

特定の態様においては、本発明の動物用飼料組成物は、少なくとも1つの植物性タンパク質又はタンパク質源を含む。植物性タンパク質又はタンパク質源の例は、大豆、エンドウ豆、及び豆科植物及びアブラナ科からの採種、及び穀物、例えば大麦、トウモロコシ(サトウモロコシ)、オート麦、イネ、ライ麦、モロコシ及び小麦である。

30

さらなる特定の態様においては、本発明の動物用飼料組成物は、0-80%のトウモロコシ；及び/又は0-80%のモロコシ；及び/又は0-70%の小麦；及び/又は0-70%の大麦；及び/又は0-30%のオート麦；及び/及び0-40%の大豆ミール；及び/又は0-10%の魚ミール；及び/又は0-20%ホエーを含む。

【0120】

動物用規定食は、マッシュ飼料(ペレット化されていない)又はペレット化された飼料として製造され得る。典型的には、微粉碎された飼料材料が混合され、そして十分な量の必須ビタミン及び鉱物が、問題の種についての規定に従って添加される。

本発明のフィターゼ変異体は、固体又は液体酵素配合物の形で、又は飼料添加物、例えばプレミックスの形で添加され得る。固体組成物は典型的には、混合段階の前又は間、添加され；そして液体組成物は典型的には、ペレット段階の後、添加される。

40

【0121】

本発明のフィターゼ変異体は、動物飼料に添加される場合、飼料の改良された栄養価値、例えば動物の成長速度及び/又は体重の増加及び/又は飼料転換率(すなわち、体重増加に対する摂取される飼料の重量)が改良される。それらの結果は、次の1又は複数の効果によることができる：フィチン酸のリン酸成分が、二価及び三価のカチオン、例えば金属イオン、すなわちカルシウム、鉄、亜鉛及びマグネシウムの栄養的に必須のイオン、及び微量鉱物マンガン、銅及びモリブデンとキレート化する。さらに、フィチン酸は一定の程度、静電相互作用によりタンパク質を結合する。タンパク質の等電点(pI)以下のpHで、

50

正に荷電されたタンパク質はフィテートと直接的に結合する。pI以上のpHで、負に荷電されたタンパク質はフィテートに、金属イオンを通して結合する。フィチン酸及びその塩フィチン酸塩はしばしば、代謝されない。

【0122】

なぜならば、それらは胃腸系から吸収できず、すなわちそのリンも、キレート化された金属イオンも、結合されたタンパク質も栄養的に利用できないからである。従って、リンはすべての生物の生長のための必須要素であるので、食物及び飼料調製物は、無機リン酸により補充される必要がある。非常に希であるが、栄養的に必須のイオン、例えば鉄及びカルシウムもまた、補充されるべきである。さらに、所定の規定食の栄養価値は、フィチン酸によるタンパク質の結合のために、低下する。

10

【0123】

特定の態様においては、体重の増加は、対照（酵素が添加されていない）の少なくとも101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109又は少なくとも110%である。

さらなる特定の態様においては、飼料転換率は、対照（酵素が添加されていない）に比較して、多くとも99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91又は多くとも90%である。

【0124】

本発明の組成物はまた、例えば植物性タンパク質を処理するためにインビトロで使用され得る。用語、植物性タンパク質とは、本明細書において使用される場合、いずれかの化合物、植物由来の又は植物起源の少なくとも1つのタンパク質、例えば修飾されたタンパク質及びタンパク質誘導体を含む、組成物、調製物又は混合物を言及する。特定の態様においては、植物性タンパク質のタンパク質含有率は、少なくとも10, 20, 30, 40, 50又は60% (w/w) である。

20

【0125】

植物性タンパク質又はタンパク質源の例は、穀物、例えば大麦、小麦、ライ麦、オート麦、トウモロコシ（サトウモロコシ）、イネ及びモロコシである。他の例は、大豆ミール、エンドウ豆、及びマメ科植物及びアブラナ科からの菜種ミールである。

植物性タンパク質又はタンパク質源は典型的には、溶媒、例えば水性溶媒、例えば水に懸濁され、そしてpH及び温度値が、フィターゼ変異体及び追加の酵素（存在するなら）の特性のために調節される。酵素反応は、所望する結果が達成されるまで、続けられ、これに続いて、それは例えば熱処理段階により酵素を不活性化することによって停止されても又はされなくても良い。

30

【0126】

本発明の処理方法のもう1つの特定の態様においては、酵素作用は維持され、このことは、酵素組成物が植物性タンパク質源に添加されるが、しかしいわゆる酵素活性は、所望される場合、後に、適切な反応条件が確立され、又はいずれかの酵素インビトロ - が不活性化されるまで、又はたとえ他の手段が酵素の作用を延長するために適用されたとしても、スイッチオンされないことを意味する。

【0127】

フィターゼ変異体の生成方法：

さらなる観点においては、本発明は、親フィターゼよりもより熱安定性であり、そして/又はより高い比活性を有する。親フィターゼの変異体を生成するための方法に関し、ここで前記方法は、

40

(d) 親フィターゼをコードするDNA配列をランダム突然変異誘発にゆだね、

(e) 段階(d)において得られた、突然変異誘発されたDNA配列を宿主細胞において発現し、そして

(f) 親フィターゼよりも熱安定性であり、そして/又はより高い比活性を有するフィターゼ変異体を発現する宿主細胞についてスクリーンすることを含んで成る。

【0128】

上記の本発明の段階(d)は好ましくは、実験部分に記載されるように、ドーピングされたプライマーを用いて行われる。

50

好ましい態様においては、上記方法は、上記段階 (d) ~ (f) の前に、次の追加の段階を包含する：

- (a) 親フィターゼの3D構造を確立し；
- (b) (a) の3Dの構造体を、高められた温度でのMDシミュレーションにゆだね；
- (c) 高い移動度 (等方性機能) の親フィターゼのアミノ酸配列における領域を同定し、そしてそれらをランダム突然変異誘発のために提供する。

(a) の構造は、相同モデリングにより確立され得る。好ましいモデルは図 1 の構造である。

【 0 1 2 9 】

高められた温度の例は、1 又は複数の次の温度である：300K, 350K, 400K, 450K, 500K 及び550K。

【 0 1 3 0 】

本発明のこの観点に関しては、親フィターゼは、野生型親フィターゼ、又はフィターゼ活性を有する、その対立遺伝子変異体又はそのフラグメント、又はその成熟部分、又はその変異体、又はそれに基づいて企画された遺伝的に構築された又は合成のポリペプチドであり得る。次のものは、好ましい野生型親フィターゼの例である：菌類フィターゼ、例えば糸状菌フィターゼ、又は酵母フィターゼ。酵母フィターゼの例は、アメリカ特許第5,830,732号に記載されるシワンニオマイセス・オキシデンタルフィターゼである。糸状菌フィターゼの例は、子囊菌門又は担子菌門の糸状菌から誘導される (それぞれ、子囊菌フィターゼ、又は担子菌フィターゼ) 。

【 0 1 3 1 】

子囊菌フィターゼの例は、アスペルギラスの株、例えばアスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) PHYA (SWISSPROT P34753, Gene 133: 55-62 (1993)) 、アスペルギラス・ニガー (*Aspergillus niger* (*ficuum*) PHYA (SWISSPROT P34752, EP 420358, Gene 127: 87-94 (1993)) 、アスペルギラス・アワモリ (*Aspergillus awamori*) PHYB (SWISSPROT P34755, Gene 133: 55-62 (1993)) 、アスペルギラス・ニガーPHYB (SWISSPROT P34754, Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 53- 57 (1993)) ；又はエメリセラ (*Emericella*) の株、例えばエメリセラ・ニジュランス (*Emericella nidulans* PHYB (SWISSPROT 000093, Biochim. Biophys. Acta 1353: 217-223 (1997)) ；又はサーモミセス (*Thermomyces*) (ヒューミコラ (*Humicola*)) の株、例えばW097/35017号に記載されるサーモミセス・ランギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) フィターゼ由来のそれらのフィターゼである。

【 0 1 3 2 】

子囊菌フィターゼの他の例は、EP684313号 (例えば、アスペルギラス・フィミガタス (*Aspergillus fumigatus*) 、アスペルギラス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 及びマイセリオフィトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) 由来のフィターゼ) ；日本特許第11000164号 (ペニシリウム (*Penicillium*) の株由来のフィターゼ) ；アメリカ特許第6,139,902号 (アスペルギラスの株由来のフィターゼ) ；及びW098/13480号 (モナスカス・アンカ (*Monascus anka*) 由来のフィターゼ) に開示されている。担子菌フィターゼの例は、パキシラス・インボルタス (*Paxillus involutus*) 、トラメテス・プベセンス (*Trametes pubescens*) 、アグロサイベ・ペジアデス (*Agrocybe pediades*) 及びペニオフォラ・リシ由来のフィターゼである (W098/28409号を参照のこと) 。

【 0 1 3 3 】

さらに、本発明のこの観点のためには、担子菌フィターゼが最も好ましく、そして非常に好ましい親フィターゼは、ペニオフォラ・リシCBS686.96由来のフィターゼ (及び、上記に一般的に記載されるような、その対立遺伝子変異体、フラグメント、等、及び相同フィターゼ) である。

【 0 1 3 4 】

さらに、本発明のこの観点のためには、W000/43503号の次のフィターゼ及びフィターゼ配列が、好ましい合成親フィターゼの例である：配列番号22 (担子菌コンセンサス) 、配

列番号24(コンセンサスフィターゼ-10の成熟部分);配列番号26(コンセンサスフィターゼ-10);配列番号27(コンセンサスフィターゼ-11);配列番号31(コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)-Q50T-K91A);配列番号36(コンセンサスフィターゼ-12);配列番号91(コンセンサスフィターゼ-3-サーモ(11)-Q51T);配列番号93(コンセンサスフィターゼ-3-サーモ(11)-Q50T-K91A);配列番号95(コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(5)-Q50T);及び配列番号97(コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(5)-Q50T-K91A);コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3);コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)-Q50T;コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)-K91A;コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)のアミノ酸27-467;コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)-Q50Tのアミノ酸27-467;コンセンサスフィターゼ-10-サーモ(3)-K91Aのアミノ酸27-467。

10

【0135】

好ましい合成親フィターゼの他の例は次の通りである:EP897010号に開示されるアスペルギラス・フミガタスフィターゼの変異体、EP897985号に開示される菌類コンセンサスフィターゼ及びその変異体、アスペルギラス・フミガタスフィターゼ変異体及びフィターゼ企画されたコンセンサスフィターゼ-7、並びにW000/43503号に開示されるコンセンサスフィターゼ-1の変異体。

【0136】

熱安定性フィターゼ変異体についての好ましいスクリーニング方法は、例1に記載される次の一次スクリーニングである:適切な固体培地(例えば、SC-グルコースプレート)上での適切な時間(例えば、30で3日間)、候補体コロニー(例えば、酵母ライブラリー)の培養、ニトレートフィターゼによる新規プレートのレプリカプレート、適切な時間のインキュベーション(例えば、30で1日間)、適切なpH(例えば、pH5.5及び5.3)での予備加熱されたフィチン酸ナトリウムプレートへのフィルターのトランスファー、適切な時間、高温でのインキュベーション(例えば、53での一晩)、フィルターの除去、及びCaイオンを含む溶液(例えば、0.5MのCaCl₂溶液)上への添加、親フィターゼよりも大きな透明な領域を有するコロニーの選択。

20

【0137】

もう1つの好ましいスクリーニング方法は、例1に記載される二次スクリーニングである(上清液上でのフィターゼ活性対温度プロフィールを確立し、親フィターゼよりも良好に作動する候補体を選択する(より高い温度でより高い活性が得られる)、沈水栽培)。それらの試験に関しては、他の温度は、熱安定性セクションにおいて示されるそれらの温度である。2種の方法が、例1に記載のようにして、組合せて/連続して使用され得る。

30

好ましいランダム突然変異誘発方法は、ドーピング、及びスパイクキングされたオリゴシヤフリングである。

【0138】

フィターゼ変異体を生成するための上記方法のさらにより好ましい態様においては、前記方法は反復性にされ、このことは、第1段階において、親フィターゼは、上記で言及されたフィターゼ、例えばペニオフォラフィターゼの1つであり、第2段階においては、親フィターゼはより熱安定性のその変異体Xであり、第3段階においては、親フィターゼは、Xよりも高い熱安定性のもう1つの変異体Yであり、そして同様であることを意味する。

40

改良された比活性についての好ましいスクリーニング方法は、例1に言及される一次スクリーニング方法である。改良された比活性についてのもう1つの好ましいスクリーニング方法は、例1に言及される二次スクリーニング方法である。

【0139】

本発明はまた、上記フィターゼ変異体を生成する方法により得ることができるか又は得られるフィターゼ変異体を生成するための方法にも関し、ここで前記方法は、(a)変異体を含んで成る上清液を生成するために宿主細胞を培養し、そして(b)変異体を回収することを含んで成る。

さらに、本発明は、次の例により記載されるが、それらは本発明の範囲を制限するもの

50

ではない。

【 0 1 4 0 】

特定の態様：

本発明の観点、他の主鎖、好ましくは相同主鎖に対する相同一列整列を通して、ペニオフォラフィターゼ主鎖における選択された（陽性、例えば改良された熱安定性及び/又は比活性）突然変異のトランスファーである。この概念は次の通りに記載され得る：請求項及び追加の特定の態様、例えば下記に列挙されるそれらの個々において、“親フィターゼ”を、ペルオフォラ・リシCBS686.96由来のフィターゼ“により置換し、そして次の請求項を付加する：上記のように配列番号2に対して相同フィターゼを同一列整列することによって推定される、請求され、そして追加の態様に列挙されるそれらの位置に対応する少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、ペニオフォラ・リシCBS686.96由来のフィターゼに対して相同であるフィターゼの変異体。

10

【 0 1 4 1 】

本発明のフィターゼ変異体の種々の特定の態様が請求され、そして追加の特定の態様が下記に示されている。本発明はまた、下記態様の次の観点にも関する：単離された核酸配列；核酸構造体；組換え発現ベクター；組換え宿主細胞；生成方法；トランスジェニック植物又はその一部；トランスジェニック非ヒト動物、又はその生成物又は要素；組成物、例えば飼料添加物及び動物用飼料；使用方法；及び用途（請求項におけるような）。いずれかの請求項記載の少なくとも1つのフィターゼ変異体又は上記態様のいずれかを含んで成る組成物が特に本明細書に包含される。動物用飼料は好ましくは、少なくとも1つの植物性タンパク質又はタンパク質源を含んで成る。

20

【 0 1 4 2 】

20; 26; 28; 29; 30; 31; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 123; 124; 125; 126; 135; 136; 137; 138; 139; 140; 141; 142; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 169; 170; 171; 172; 173; 174; 175; 176; 177; 178; 179; 180; 181; 182; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198; 199; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211; 212; 213; 214; 215; 216; 217; 218; 219; 220; 221; 222; 229; 230; 231; 232; 233; 234; 235; 236; 237; 238; 248; 249; 250; 251; 252; 253; 254; 255; 256; 257; 258; 259; 260; 261; 262; 263; 264; 265; 266; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 321; 322; 323; 324; 325; 326; 327; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350; 384; 385; 386; 387; 388; 389; 390; 391; 392; 393; 394; 395; 396; 397; 398; 407; 408; 409; 410; 411; 412; 419; 420; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

30

【 0 1 4 3 】

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして
(b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして
(c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；
(d) 但し、前記変異体は、G26S; Y28N; D29S; F31Y; E42D, K, A; T45R; V461 ; W59F; S62D; A64K; R65Q, E, G, A; S66T; R67A, I, Q, K; Q68Y, V, 1 ; K74R, A; A99N; D100S ; L102V; P103E; F104L; N107T, Q; S109M; H110S, V; Q111E, N; T112A, S; M116F, I, L; A135S; D137Y; Q138D, S, G; D142A; () 154fH; S155N; G156P; E157Q, S; E169S; E170A, P; G171A; () 171aS ; T174P, A; N177S; N178S, T ; M179T, V, L; N182A, V ; V184G; D185E; () 185eT; G186S, A; D187R, K, S; () 187aV, T; E188Q, S, A, V; S189E; V195L; N199A, P; L204N; A207D, H; S216T; D217E; L219Y, T ; T220Y, N; L221F;

40

50

M222L; L230V; () 235eE, Q; V248R, I ; S249Q, A; E251D; Y254A, L, G; D255N; D257 K; Y259F; T262H; P264A; G286R, H; Q287K, S; A288P; T321Q, S, G; M3221 ; V3231 ; P324A; A327S, F, I, L; F332Y; N333P; E344R; R346P; W348F; V349L, A, S; D350S, V; G388A; V393R; E395K, T ;及び L396Rから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ (*P eniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【 0 1 4 4 】

20; 26; 28-31; 37-48; 55- 69; 73-83; 91-119; 123-126; 135-142; 152-163; 169-19 9; 204-222; 229-238; 248-266; 284- 289; 300-308; 321-335; 343-350; 384-398; 407- 412; 及び419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つ の位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして

(b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し ; そして

(c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し ; そしてここで

【 0 1 4 5 】

位置26; 28; 29; 31; 42; 45; 46; 59; 62; 64; 65; 66; 67; 68; 74; 99; 100; 102; 103; 104; 107; 109; 110; 111; 112; 116; 135; 137; 138; 142; 154f; 155; 156; 157; 169; 170; 171; 171 a ; 174; 177; 178; 179; 182; 184; 185; 185e; 186; 187; 187a; 188; 189; 195; 199; 204; 207; 216; 217; 219; 220; 221; 222; 230; 235e; 248; 249 ; 251; 254; 255; 257; 259; 262; 264; 286; 287; 288; 321 322; 323; 324; 327; 332; 333; 344; 346; 348; 349; 350; 388; 393; 395; 及び 396における変異体が、次のもの から成る群から選択される :

【 0 1 4 6 】

26A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
28A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W;
29A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
31A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;
42C, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
45A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y;
46A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
59A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y;
62A, C, E, F, G, H, i, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
64C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 4 7 】

65C, D, F, H, I, K, L, M, N, P, S, T, V, W, Y;
66A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y;
67C, D, E, F, G, H, L, M, N, P, S, T, V, W, Y;
68A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, R, S, T, W;
74C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
99C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
100A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
102A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
103A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
104A, C, D, E, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 4 8 】

107A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, V, W, Y;
109A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
110A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
111A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, T, V, W, Y;
112C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y;

10

20

30

40

50

116A, C, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
135C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
137A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;
138A, C, E, F, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
142C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 4 9 】

154fA, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
155A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, T, V, W, Y;
156A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
157A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
169A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
170C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
171C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
171aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
174C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, V, W, Y;
177A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, T, V, W, Y;

10

【 0 1 5 0 】

178A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, V, W, Y;
179A, C, D, E, F, G, H, I, K, N, P, Q, R, S, W, Y;
182C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, W, Y;
184A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
185A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
185eA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y;
186C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
187A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, T, V, W, Y;
187aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W, Y;
188C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, W, Y;

20

【 0 1 5 1 】

189A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
195 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
199C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;
204A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
207C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
216A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y;
217A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
219A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, V, W;
220A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, V, W;
221A, C, D, E, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
222A, C, D, E, F, G, H, I, K, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

30

【 0 1 5 2 】

230A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
235eA, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y;
248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;
249C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
251A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
254C, D, E, F, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;
255A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
257A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
259A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;
262A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y;

40

50

264C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 5 3 】

286A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

287A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;

288C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

321A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, R, V, W, Y;

322A, C, D, E, F, G, H, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

327C, D, E, G, H, K, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;

10

332A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;

333A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 5 4 】

344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

346A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y;

348A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y;

349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;

350A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y;

388C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

393A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;

20

395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y; 及び

396A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y。

【 0 1 5 5 】

20; 28-31; 37-48; 55-69; 91-119; 123-126; 152-163; 169-199; 204-222; 229-238;
248-266; 284-289; 321-335; 343- 350; 384-398; 407-412; 及び 419-430から成る領域群
から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フ
ィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして

(b) 個々の位置が配列番号 2 の位置に対応し ; そして

(c) 前記変異体が配列番号 2 に対して少なくとも75%の同一性を有し ;

30

【 0 1 5 6 】

(d) 但し、前記変異体は、Y28N; D29S; F31Y; E42D, K, A; T45R; V461 ; W59F; S62
D; A64K; R65Q, E, G, A; S66T; R67A, I, Q, K; Q68Y, V, 1 ; A99N; D100S ; L102V; P
103E; F104L; N107T, Q; S109M; H110S, V; Q111E, N; T112A, S ; M116F, I, L ; () 15
4fH; S155N; G156P; E157Q, S; E169S; E170A, P; G171A; () 171aS ; T174P, A; N177S;
N178S, T; M179T, V, L; N182A, V; V184G; D185E ; () 185eT ; G186S, A; D187R, K,
S; () 187aV, T; E188Q, S, A, V; S189E; V195L; N199A, P; L204N; A207D, H; S216T;
D217E; L219Y, T; T220Y, N; L221 F ; M222L; L230V; () 235eE, Q; V248R, I ; S249Q,
A; E251 D ; Y254A, L, G; D255N; D257K; Y259F; T262H; P264A; G286R, H; Q287K, S;
A288P; T321Q, S, G; M3221 ; V3231 ; P324A; A327S, F, I, L; F332Y; N333P; E344R;
R346P; W348F; V349L, A, S; D350S, V; G388A; V393R; E395K, T; 及び L396Rから成る
群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異
体ではないことを特徴とする。

40

【 0 1 5 7 】

20; 29; 45; 63; 69; 92; 93; 95; 97; 98; 99; 102; 110; 114; 118; 125; 152; 156;
157; 160; 163; 183; 185; 187; 190; 191; 194; 199; 205; 210; 218; 222; 234; 248;
286; 321; 323; 324; 328; 330; 334; 343; 344; 345; 347; 349; 350; 384; 395; 398;
409; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択され
た少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変
異体に関し、ここで

50

【 0 1 5 8 】

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして
 (b) 個々の位置が配列番号 2 の位置に対応し ; そして
 (c) 前記変異体が配列番号 2 に対して少なくとも 75 % の同一性を有し ;
 (d) 但し、前記変異体は、D29S; T45R; A99N; L102V; H110S, V; G156P; E157Q, S;
 D185E; () 185eT; D187R, K, S; () 187aV, T; N199A, P; M222L; V248R, I ; G286R, H;
 T321Q, S, G; V3231 ; P324A; E344R; V349L, A, S; D350S, V; 及び E395K, Tから成る
 群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96 フィターゼの変異
 体ではないことを特徴とする。

【 0 1 5 9 】

10

20; 29; 45; 63; 69; 92; 93; 95; 97; 98; 99; 102; 110; 114; 118; 125; 152; 156;
 157; 160; 163; 183; 185; 187; 190; 191; 194; 199; 205; 210; 218; 222; 234; 248;
 286; 321; 323; 324; 328; 330; 334; 343; 344; 345; 347; 349; 350; 384; 395; 398;
 409; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択され
 た少なくとも 1 つの領域の少なくとも 1 つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異
 体に関し、ここで

【 0 1 6 0 】

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして
 (b) 個々の位置が配列番号 2 の位置に対応し ; そして
 (c) 前記変異体が配列番号 2 に対して少なくとも 75 % の同一性を有し ;
 (d) 但し、前記変異体は、

20

【 0 1 6 1 】

29A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 45A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y;
 99C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 102A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 110A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 156A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 157A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
 185A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 185eA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y;

30

【 0 1 6 2 】

187A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, T, V, W, Y;
 187aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W, Y;
 199C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;
 222A, C, D, E, F, G, H, I, K, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;
 286A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
 321A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, R, V, W, Y;
 323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

40

【 0 1 6 3 】

349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 350A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y; and
 395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Yから成る群から選択されたペ
 ニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96 フィターゼの変異体ではないことを特
 徴とする。

【 0 1 6 4 】

請求項又は上記態様のいずれかの変異体は、次のものから成る群から選択された、少な

50

くとも1つの置換を含んで成る：20R；29N，C，T；45A；63N；69A；92L；931；95R，H，M，N，S，T；97V；98G；99D；1021；110Y，R，W；114A；118A；125D；152A；156C，R；157K；160R；163P；183K，A，W，G；185A，H，N，P，K；187G；190S，K；191L，R，S；194R；199S；205S；210G；218T；2221；234K，S；248A，C，D，E，G，H，S，T；286S；321A；323A；324S，L；328T；330R；334E，D，G；343N；344A，V，S；345D，H；347Q，P；349M，K；D350T，M，I，L；384S，A；395G；398T；409S；421R，S；422R；423N；424S；425L；426E；427G；428R；4291；及び430M。

【0165】

請求項又は上記及び下記態様のいずれかの変異体において、親フィターゼは、i)配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも約60%、好ましくは少なくとも60%の程度の同一性を有するアミノ酸配列を有し；ii)配列番号1のヌクレオチド49-1320又はその相補的鎖と、低い緊縮条件下でハイブリダイズする核酸配列によりコードされ；iii)菌類フィターゼ、好ましくは担子菌フィターゼ又は混合された子囊菌/担子菌フィターゼ、例えばペニオフォラフィターゼ、例えばペニオフォラ・リシ、例えばペニオフォラ・リシCBS686.96由来のフィターゼである。

【0166】

請求項又は上記及び下記態様のフィターゼ変異体は、熱安定性にあり、そして/又は高い比活性のものであり、好ましくは親フィターゼに比較して、より熱安定性であり、そして/又はより高い比活性のものである。

【0167】

20；29；37-48；63；69；73-83；91-119；123-126；154-157；163；183；187；194；199；204-218；229-238；248；284-289；300-308；323-335；343-350；384；395；398；407-412；及び419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、

(a)前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして

(b)個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして

(c)前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；

【0168】

(d)但し、前記変異体は、D29S；E42D，K，A；T45R；V461；K74R，A；A99N；D100S；L102V；P103E；F104L；N107T，Q；S109M；H110S，V；Q111E，N；T112A，S；M116F，I，L；S155N；()154fH；G156P；E157Q，S；D187R，K，S；()187aV，T；N199A，P；L204N；A207D，H；S216T；D217E；L230V；()235eE，Q；V248R，I；G286R，H；Q287K，S；A288P；V3231；P324A；A327S，F，I，L；F332Y；N333P；E344R；R346P；W348F；V349L，A，S；D350K，A；及びE395K，Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ(Peniophora lycii)CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【0169】

20；29；37；38；39；40；41；42；43；44；45；46；47；48；63；69；73；74；75；76；77；78；79；80；81；82；83；91；92；93；94；95；96；97；98；99；100；101；102；103；104；105；106；107；108；109；110；111；112；113；114；115；116；117；118；119；123；124；125；126；154；155；156；157；163；183；187；194；199；204；205；206；207；208；209；210；211，212；213；214；215；216；217；218；229；230；231；232；233；234；235；236；237；238；248；300；301；302；303；304；305；306；307；308；323；324；325；326；327；328；329；330；331；332；333；334；335；343；344；345；346；347；348；349；350；384；395；398；407；408；409；410；411；412；419；420；421；422；423；424；425；426；427；428；429；430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、

【0170】

(a)前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして(b)個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして(c)前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有

し；(d)但し、前記変異体は、D29S；E42D，K，A；T45R；V461；K74R，A；A99N；D100S；L102V；P103E；F104L；N107T，Q；S109M；H110S，V；Q111E，N；T112A，S；M116F，I，L；S155N；()154fH；G156P；E157Q，S；D187R，K，S；()187aV，T；N199A，P；L204N；A207D，H；S216T；D217E；L230V；()235eE，Q；V248R，I；G286R，H；Q287K，S；A288P；V3231；P324A；A327S，F，I，L；F332Y；N333P；E344R；R346P；W348F；V349L，A，S；D350K，A；及びE395K，Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ(Peniophora lycii)CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【0171】

20；29；37-48；63；69；73-83；91-119；123-126；154-157；163；183；187；194；199；204-218；229-238；248；284-289；300-308；323-335；343-350；384；395；398；407-412；及び419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、(a)前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして(b)個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして(c)前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；そしてここで次の位置：29,42,45,46,74,99,100,102,103,104,107,109,110,111,112,116,155,154,156,157,187,187a,199,204,207,216,217,230,235e,248,286,287,288,323,324,327,332,333,344,346,348,349,350,395での変異体が、次のものから成る群から選択される：

【0172】

29A，C，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，T，V，W，Y；
42C，F，G，H，I，L，M，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
45A，C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，S，V，W，Y；
46A，C，D，E，F，G，H，K，L，M，N，P，Q，R，S，T，W，Y；
74C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，S，T，V，W，Y；
99C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
100A，C，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，T，V，W，Y；
102A，C，D，E，F，G，H，I，K，M，N，P，Q，R，S，T，W，Y；
103A，C，D，F，G，H，I，K，L，M，N，Q，R，S，T，V，W，Y；
104A，C，D，E，G，H，I，K，M，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；

【0173】

107A，C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，P，R，S，V，W，Y；
109A，C，D，E，F，G，H，I，K，L，N，P，Q，R，T，V，W，Y；
110A，C，D，E，F，G，I，K，L，M，N，P，Q，R，T，W，Y；
111A，C，D，F，G，H，I，K，L，M，P，R，S，T，V，W，Y；
112C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，V，W，Y；
116A，C，D，E，G，H，K，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
155C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，P，Q，R，T，V，W，Y；
154fA，C，D，E，F，G，I，K，L，M，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
156A，C，D，E，F，H，I，K，L，M，N，Q，R，S，T，V，W，Y；
157A，C，D，F，G，H，I，K，L，M，N，P，R，T，V，W，Y；

【0174】

187A，C，E，F，G，H，I，L，M，N，P，Q，T，V，W，Y；
187aA，C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，S，W，Y；
199C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，Q，R，S，T，V，W，Y；
204A，C，D，E，F，G，H，I，K，M，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
207C，E，F，G，I，K，L，M，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
216A，C，D，E，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，V，W，Y；
217A，C，F，G，H，I，K，L，M，N，P，Q，R，S，T，V，W，Y；
230A，C，D，E，F，G，H，I，K，M，N，P，Q，R，S，T，W，Y；
235eA，C，D，F，G，H，I，K，L，M，N，P，R，S，T，V，W，Y；

248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;

【 0 1 7 5 】

286A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

287A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;

288C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

327C, D, E, G, H, K, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;

332A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;

333A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;

344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

346A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y;

348A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y;

349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;

350C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; 及び

395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y。

【 0 1 7 6 】

20; 29; 45; 63; 69; 95; 97; 98; 99; 102; 114; 118; 125; 163; 183; 187; 194; 199; 205; 218; 234; 248; 323; 324; 328; 330; 334; 343; 344; 345; 347; 349; 350; 384; 395; 398; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、(a)前記変異体がフィターゼ活性を有し;そして(b)個々の位置が配列番号2の位置に対応し;そして(c)前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し;(d)但し、前記変異体は、D29S; T45R; A99N; L102V; D187R, K, S; () 187aV, T; N199A, P; V248R, I; V3231; P324A; E344R; V349L, A, S; D350K, A; 及び E395K, Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ(*Peniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【 0 1 7 7 】

20; 29; 37-48; 63; 69; 73-83; 91-119; 123-126; 154-157; 163; 183; 187; 194; 199; 204-218; 229-238; 248; 284-289; 300-308; 323-335; 343-350; 384; 395; 398; 407-412; 及び 419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、

(a)前記変異体がフィターゼ活性を有し;そして

(b)個々の位置が配列番号2の位置に対応し;そして

(c)前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し;そしてここで次の位置: 29, 45, 99, 102, 187, 187a, 199, 248, 323, 324, 344, 349, 350, 及び395での変異体が、次のものから成る群から選択される:

【 0 1 7 8 】

29A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;

45A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y;

99C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

102A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

187A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, T, V, W, Y;

187aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W, Y;

199C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;

248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;

323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;

10

20

30

40

50

350C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y; and
395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y.

【 0 1 7 9 】

上記態様のいずれかの変異体は、次のものから成る群から選択された少なくとも1つの置換を含んで成る：20R; 29N, C, T; 45A; 63N; 69A; 92L; 931 ; 95R; 97V; 98G; 99D; 1021 ; 110Y ; 114A; 118A; 125D; 163P; 183K; 187G; 194R; 199S; 205S; 218T ; 234K, S; 248A; 323A; 324S, L; 328T; 330R; 334E, D, G; 343N; 344A, V, S; 345D, H; 347Q, P; V349M; D350V, T; 384S, A; 395G; 398T; 409S; 421 R, S; 422R; 423N; 424S; 425 L; 426E; 427G; 428R; 4291 ; 及び 430M。

【 0 1 8 0 】

上記態様のいずれかの変異体は、次の置換及び置換の組合せ群から選択された置換及び置換の組合せを含んで成る：

20R+95R+97V+98G; 29N+1021 ; 29N+118A ; 29N+234S; 29N+324S; 29N+163P+324S ; 29N+163P+324S+395G; 29S; 29S + 205S; 29S+125D+324A; 29S+324A+350V ; 29S+125D+324A+350V ; 29S+125D+324A+234K+330R ; 29S+125D+324A+330R+395G ; 29S+99D+125D+324A+334E+350V ; 29S+125D+324A+218T+344S+350V ; 29S+125D+324A+234K+330R+395G ; 29S+324A+125D+350V+63N+218T+334E+183K+421 S; 29S+324A+125D+350V+45A+69A+99D+110Y+334E+344S ; 29T+324L; 45A+350V+421 R+422R+423N+424S+425L+426E+427G+428R+4291+430M ; 69A+34E; 99D+398T; 114A+187G+194R+324S ; 114A+187G+194R+324S; 218T+334G; 323A+324S; 324S; 324S+328T; 324S+395G; 324S+345D+347Q; 330R ; 334E+344A; 334D+343N+344V; 345H+347P+350V ; and 350V。

【 0 1 8 1 】

20; 29; 37-40; 45; 47-48; 63; 69; 73-83; 91-98; 99; 102; 103; 110; 113-119; 123-125; 154-157; 163; 183; 187; 194; 199; 204-218; 229-238; 248; 284-289; 300-308 ; 323-324; 328-335; 343-347; 349; 350; 384; 395; 398; 407-412; 及び 419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして

(b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして

(c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；

【 0 1 8 2 】

(d) 但し、前記変異体は、D29S; T45R; K74R, A; A99N; L102V; P103E; H110S, V; M116F, I, L; S155N; () 154fH; G156P; E157Q, S; D187R, K, S; () 187aV, T; N199A, P ; L204N; A207D, H; S216T; D217E; L230V; () 235eE, Q; V248R, I ; G286R, H; Q287K, S; A288P; V3231 ; P324A; F332Y; N333P; E344R; R346P; V349L, A, S; D350K, A; 及び E395K, Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686. 96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【 0 1 8 3 】

20; 29; 37-48; 63; 69; 73- 83; 91-119; 123-126; 152-163; 183-199; 204-218; 229-238; 248; 284-289; 300-308; 323- 335; 343-350; 384; 395; 398; 407-412; 及び 419-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し；そして

(b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し；そして

(c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し；

【 0 1 8 4 】

(d) 但し、前記変異体は、D29S; E42D, K, A; T45R; V461 ; K74R, A; A99N; D100S ; L102V; P103E; F104L; N107T, Q; S109M; H110S, V; Q111 E, N; T112A, S; M116F, I, L; () 154fH; S155N; G156P; E157Q, S; V184G; D185E; () 185eT; G186S, A; D187R, K, S; () 187aV, T; E188Q, S, A, V; S189E; V195L; N199A, P; L204N; A207D, H; S216T

10

20

30

40

50

; D217E; L230V; () 235eE, Q; V248R, I ; G286R, H; Q287K, S; A288P ; V3231 ; P324 A; A327S, F, I, L; F332Y; N333P; E344R; R346P; W348F; V349L, A, S; D350S, V; 及び E395K, Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【 0 1 8 5 】

20; 29; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 63; 69; 73; 74; 75; 76 ; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108; 109; 110; 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 123; 124; 125; 126; 152; 153; 154; 155; 156; 157; 158; 159; 160; 161; 162; 163; 183; 184; 185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193; 194; 195; 196; 197; 198 ; 199; 204; 205; 206; 207; 208; 209; 210; 211, 212 ; 213; 214; 215; 216; 217 ; 218; 229; 230; 231; 232; 233; 234; 235; 236; 237; 238; 248; 284; 285; 286; 287 ; 288; 289; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 323; 324; 325; 326; 327 ; 328; 329; 330; 331; 332; 333; 334; 335; 343; 344; 345; 346; 347; 348; 349; 350 ; 384; 395; 398 ; 407; 408; 409; 410; 411; 412; 419; 420; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

【 0 1 8 6 】

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして

(b) 個々の位置が配列番号 2 の位置に対応し ; そして

(c) 前記変異体が配列番号 2 に対して少なくとも75%の同一性を有し ;

【 0 1 8 7 】

(d) 但し、前記変異体は、D29S; E42D, K, A; T45R; V461 ; K74R, A; A99N; D100S ; L102V; P103E; F104L; N107T, Q; S109M; H110S, V; Q111E, N; T112A, S; M116F, I, L; () 154fH; S155N; G156P; E157Q, S; V184G; D185E ; () 185eT; G186S, A; D187R, K , S; () 187aV, T; E188QSAV; S189E; V195L; N199A, P; L204N; A207D, H; S216T; D217 E; L230V; () 235eE, Q; V248R, I ; G286R, H; Q287K, S; A288P; V3231 ; P324A; A327 S, F, I, L; F332Y; N333P; E344R; R346P; W348F; V349L, A, S; D350S, V; 及び E395K , Tから成る群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。

【 0 1 8 8 】

20; 29; 37-48; 63; 69; 73- 83; 91-119; 123-126; 152-163; 183-199; 204-218; 229 -238 ; 248; 284-289; 300-308; 323- 335; 343-350; 384; 395; 398; 407-412; 及び 41 9-430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し ; そして

(b) 個々の位置が配列番号 2 の位置に対応し ; そして

(c) 前記変異体が配列番号 2 に対して少なくとも75%の同一性を有し ;

【 0 1 8 9 】

そしてここで、位置 : 29, 42, 45, 46, 74, 99, 100, 102, 103, 104, 107, 109, 110, 111, 12, 116, 154, 155, 156, 157, 184, 185, 185e, 186, 187, 187a, 188, 189, 195, 199, 204, 207, 216, 217, 230, 235e, 248, 286, 287, 288, 323, 324, 327, 332, 333, 344, 346, 348, 349, 350, 395での変異体が、次のものから成る群から選択される :

【 0 1 9 0 】

29A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;

42C, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

45A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y;

46A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

74C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;

99C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;

100A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 102A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 103A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

【 0 1 9 1 】

104A, C, D, E, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 107A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, V, W, Y;
 109A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 110A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 111A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, T, V, W, Y;
 112C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y;
 116A, C, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 154fA, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 155A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, T, V, W, Y;
 156A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;

10

【 0 1 9 2 】

157A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
 184A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 185A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 185eA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y;
 186C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 187A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, T, V, W, Y;
 187aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W, Y;
 188C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, W, Y;
 189A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 195 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;

20

【 0 1 9 3 】

199C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;
 204A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 207C, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 216A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y;
 217A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 230A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 235eA, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y;
 248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y;
 286A, C, D, E, F, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
 287A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;

30

【 0 1 9 4 】

288C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 327C, D, E, G, H, K, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 332A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W;
 333A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;
 344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
 346A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y;
 348A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y;
 349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 350A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y; 及び
 395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y。

40

【 0 1 9 5 】

50

20; 29; 45; 63; 69; 92; 93; 95; 97; 98; 99; 102; 110; 114; 118; 125; 152; 156; 157; 160; 163; 183; 185; 187; 194; 199; 205; 218; 234; 248; 286; 323; 324; 328; 330; 334; 343; 344; 345; 347; 349; 350; 384; 395; 398; 409; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで

【0196】

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し;そして
 (b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し;そして
 (c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し;
 (d) 但し、前記変異体は、D29S; T45R; A99N; L102V ; H110S, V; G156P ; E157Q, S ; D185E; () 185eT; D187R, K, S; () 187aV, T; N199A, P; V248R, I ; G286R, H; V3231 ; P324A; E344R; V349L, A, S; D350S, V; 及び E395K, から成る群から選択されたペニオフォラ・リシ (*Peniophora lycii*) CBS686.96フィターゼの変異体ではないことを特徴とする。 10

【0197】

20; 29; 45; 63; 69; 92; 93; 95; 97; 98; 99; 102; 110; 114; 118; 125; 152; 156; 157; 160; 163; 183; 185; 187; 194; 199; 205; 218; 234; 248; 286; 323; 324; 328; 330; 334; 343; 344; 345; 347; 349; 350; 384; 395; 398; 409; 421; 422; 423; 424; 425; 426; 427; 428; 429; 430から成る領域群から選択された少なくとも1つの領域の少なくとも1つの位置に置換を含んで成る、親フィターゼの変異体に関し、ここで 20

(a) 前記変異体がフィターゼ活性を有し;そして
 (b) 個々の位置が配列番号2の位置に対応し;そして
 (c) 前記変異体が配列番号2に対して少なくとも75%の同一性を有し;そしてここで、位置: 29,45, 99,102, 110; 156; 157; 185; 185e; 187,187a, 199, 248,286 ; 323,324, 344,349, 350, 及び395での変異体が、次のものから成る群から選択される:

【0198】

29A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y;
 45A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y;
 99C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 102A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y; 30
 110A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 156A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 157A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, T, V, W, Y;
 185A, C, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y;
 185eA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y;
 187A, C, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, T, V, W, Y;

【0199】

187aA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, W, Y;
 199C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, R, S, T, V, W, Y;
 248A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y; 40
 286A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
 323A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y;
 324C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y;
 344A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, Y;
 349C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, T, W, Y;
 350A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, Y; and
 395A, C, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y。

【0200】

上記態様のいずれか1つの変異体は、次のものから成る群から選択された少なくとも1つの置換を含んで成る: 20R; 29N, C, T; 45A; 63N; 69A; 92L; 931 ; 95R, H, M, N, S, 50

T; 97V; 98G; 99D; 1021 ; 110Y, R, W; 114A; 118A; 125D; 152A; 156C, R; 160R; 163 P; 183K, A, W, G; 185A, H, N, P; 187G; 191L ; 194R; 199S; 205S; 218T; 234K, S; 2 48A, C, D, E, G, H, S; 286S; 323A; 324S, L; 328T; 330R; 334E, D, G; 343N; 344A, V, S; 345D, H; 347Q, P; V349M; D350T; 384S, A; 395G; 398T; 409S; 421 R, S; 422R; 423N; 424S; 425L; 426E; 427G; 428R; 4291 ; 及び 430M。

【 0 2 0 1 】

上記態様のいずれかの変異体は、次の置換及び置換の組合せ群から選択された置換及び置換の組合せを含んで成る：

20R+95R+97V+98G; 29N+1021 ; 29N+118A ; 29N+163P+324S ; 29N+163P+324S+395G ; 29 N+234S; 29N+324S; 29S; 29S+45A+69A+99D+110Y+125D+324A+334E+344S+350V ; 29S+63N + 125D+183K+218T+324A+334E+350V+421 S ; 29S+95H+110W+183W+324A+350V ; 29S+95M+110W +183W+324A+350V ; 29S+95N+110R+183W+324A+350V ; 29S+95R+110W+183W+324A+350V ; 29 S+95S+110R+183W+324A+350V ; 29S+95S+110W+183W+324A+350V ; 29S+95T+110R+183W+324A +350V ; 29S+95T+110Y+125D+183W+286S+324A+350V ; 29S+95T+ 11 OY+152A+ 156C+157Q+1 60R+183W+324A+350V ; 29S+95T+11 OY+156R+157Q+183W+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+ 185A+248A+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+185A+248C+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+ 185A+248E+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+185A+248H+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+ 185H+248G+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+185P+248G+324A+350V ;

【 0 2 0 2 】

29S+95T+110Y+183W+185P+248S+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+191L+324A+350V ; 29S +95T+110Y+183W+248D+324A+350V ; 29S+95T+110Y+183W+324A ; 29S+95T+110Y+183W+324A+ 350V ; 29S+99D+125D+324A+334E+350V ; 29S+110Y+183W+185N+324A+350V ; 29S+125D+218 T+324A+344S+350V ; 29S+125D+234K+324A+330R ; 29S+125D+234K+324A+330R+395G ; 29S+ 125D+324A ; 29S+125D+324A+330R+395G; 29S+125D+324A+350V ; 29S+183A+324A+350V ; 2 9S+183G+324A+334E+344S+350V ; 29S+183W+324A+350V ; 29S+205S; 29S+324A+350V ; 29T +324L; 45A+350V+421R+422R+423N+424S+425L+426E+427G+428R+4291+430M ; 69A+334E; 99 D+398T; 114A+187G+194R+324S; 218T+334G; 323A+324S; 324S; 324S+328T; 324S+345D+34 7Q; 324S+395G; 330R; 334D+343N+344V; 334E+344A; 345H+347P+350V ; and 350V。

【 実施例 】

【 0 2 0 3 】

使用される化学薬品は、少なくとも試薬品種の市販の製品であった。

例 1 . PE - 変異体の調製、改良された熱安定性及び/又は比活性の変異体のスクリーニン グ及び単離：

一般原理：

親フィターゼとしてのペニオフォラ・リシCBS686.96のフィターゼを用いて、及び本明 細書に記載される興味ある領域に基づいて、種々のフィターゼ変異体ライブラリーを構成 し、そして酵母において発現した（ドーピングライブラリー、及びスパイクキングされたオ リゴシャフリングライブラリー、それらの例は下記に記載される）。

【 0 2 0 4 】

改良された熱安定性についてのスクリーニング：酵母ライブラリーを、下記に記載のよ うにして一次スクリーニングにゆだね（レプリカ、単一フィルター）、53 で活性を示す それらのコロニーを選択した。

53 で活性を示すコロニーを、下記にまた記載のようにして二次スクリーニングに移し （24ウェルプレート培養）、個々のコロニーについての温度プロファイル（適用できる場 合、37 、60 、62 、64 、66 、68 、70 、72 、等）を確立した。

【 0 2 0 5 】

野生型親ペニオフォラフィターゼよりも良好に作用するコロニーのために、プラスミド を単離し、そして酵母を再形質転換し、そして温度プロファイル実験を再反復した。温度 プロファイル実験から、次の数値を計算する：“60 /37 での相対活性”、及び/又は “ 62 /37 で相対活性”、及び/又は “ 64 /37 での相対活性”、及び/又は “ 68 /37

10

20

30

40

50

での相対活性”、及び/又は“70 /37 での相対活性”、及び/又は“72 /37での相対活性”、及び同様。

【0206】

それらの比においては、最初に言及される温度は、“選択の高められた温度”と呼ばれる。それらの用語は、二次スクリーニング方法（温度プロフィール測定）における上清液について得られるフィターゼ活性値に基づいて、低い温度（37）でのフィターゼ活性に対する、高められた温度（例えば、60又は62）でのフィターゼ活性の比として定義される。1又は複数のそれらの相対活性が親フィターゼに比較して、改良されているコロニーを選択し、問題のプラスミドを配列決定し、そしてその対応する変異体を、本発明の改良されたフィターゼ変異体として同定する。

10

【0207】

二次スクリーニング段階においては、熱安定性フィターゼ変異体を新規の親フィターゼ（主鎖）として選択し、そして上記を反復し（温度は、この新規主鎖の性能に基づいて、適切のように調節される）。

さらに、組合せ変異体を構成し、そしていくつかの可能性あるホットスポットをランダム化し、そして変異体を試験した。

三次スクリーニング段階においては、さらなる改良された新規熱安定性フィターゼ変異体を新規主鎖として選択し、そして上記を反復した（温度を再び、上方に調節し、例えば一次スクリーニング段階の温度は現在、63 に上昇した）。さらに、いくつかの新規組合せ変異体を構成し、そして他の明らかに興味ある部分をランダム化し、最適な対の置換を見出した。

20

【0208】

さらなる変異体を、上記のようにして調製した。

改良された比活性についてのスクリーニング：一次スクリーニングにおいて、酵母ライブラリーを、Ca - フィテートを含むSC - グルコースプレート上に広げ、そして30 で3日間、培養した。大きな円光を有するクローンを選抜し、YPD培地を含む24ウェルプレートにおいて培養した。二次スクリーニングにおいては、ウェル中の上清液の活性を相対的に調べ、そして高い活性を有するクローンを選択した。選択されたクローンを、80、pH4での30分間インキュベーションの後、プレート上の残る活性を調べ、低い熱安定性を有する変異体を破棄した。

30

【0209】

高い熱安定性を有するクローンを選択し、そして半 - 精製のために、24ウェルプレートにおいて再び培養した。半 - 精製を、conA - セファロース4B (Amersham bioscienceからのセファロース4B Gelマトリックス中、コンカナバリンA；カタログ番号17 - 0440 - 01)にフィターゼを結合し、そしてそれを、PBS + 0.1% Tween20 (PBSは、8g/lのNaCl、0.2g/lのKCl、2.68g/lのNa₂HPO₄ · 7H₂O、0.24g/lのKH₂PO₄ (pH7.4)であり；そしてTween20はBio-Radから市販されている、カタログ番号170 - 6531号)により溶離することによって、行った。

【0210】

次に、半 - 精製された上清液を、活性を30FYT/mlに調節した後、ロケット免疫電気泳動分析にゆだねた。ロケット免疫電気泳動に関しては、精製されたペニオフィラフィターゼに対してウサギにおいて生ぜしめられたポリクローナル抗体を使用した。小さなシグナルを有するクローンを、高い比活性を有する変異体として選択した（前記ロケット下の領域は、抗原（フィターゼ）の温度に比例し、すなわち領域が小さいほど、フィターゼタンパク質は少なく、そして比活性は高い）。

40

【0211】

改良された変異体の例が下記表1～5に示される。それらの変異体は、高い比活性を示し、そして/又はペニオフィラ親フィターゼよりも熱安定性である。特に、熱安定性に関しては、変異体は、“60 /37 での相対活性”、及び/又は“62 /37 で相対活性”、及び/又は“64 /37 での相対活性”、及び/又は“68 /37 での相対活性”、及び/又

50

は“70 /37 での相対活性”、及び/又は“72 /37、での相対活性”、及び/又は“74 /37 での相対活性”及び同様について高い値を示す(表6 - 1 ~ 6 - 3 に示されるそれらの結果を参照のこと)。比活性酢スクリーニング方法に起因する、選択された変異体は、下記表6 - 4 に示される。それらの変異体のすべては、表15において“N”として示される変異体よりも高い比活性のものであることが予測される。

【0212】

選択された変異体を、WO97/35956に開示されるアスペルギラス・オリザエIF0417712において発現し、そして形質転換された細胞を、培地MDU - 2 Bpにおいて25 で220rpmで培養した。フィターゼ変異体を、発酵ブイヨンから精製し、そして例2に記載され、そして表14 ~ 15 に示されるように、熱安定性及び/又は比活性について、さらに特徴づけた。

10

【0213】

【表 1】

表 1 :

フィタージェ変異体	置換
1	D29N+L163P+D187G+G194R+P324S
2	A99D+A398T
3	A334D+D343N+E344V
4	T114A+D187G+G194R+P324S
5	D29N
6	D29N+L102I
7	D29N+N234S
8	P324S+A328T
9	D29S+N205S
10	D29S+P324A+D350V+E183W+K95R+H110W
11	N234K
12	V323A+P324S
13	Q20R+K95R+G97V+V98G
14	T45A+D350V+欠失 (P421-E423) +挿入体 (P421RRNSLEGRI M)
15	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185K+V248T+V349L+D350M
16	D29N+T118A
17	P324S+N345D+L347Q
18	N199S+V248A
19	D29T+P324L
20	D350V
21	A218T+A334G
22	L163P
23	V93I+N409S+P324S
24	A334E+E344A
25	P324S+A328T
26	G330R
27	V248A
28	V69A+A334E
29	T45A+A218T

【表 2】

表 2 :

フィターゼ変異体	置換
30	D29N+ L163P+P324S+E395G
31	D29S+E125D+P324A+A334E+E344S+P421S
32	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185K+V248T+V349L+ D350I
33	D29S+K95T+H110Y+E183W+D185K+V248S+P324A+D350V
34	D29S+E125D+P324A+N234K+G330R
35	D29N+P324S
36	D29S+E125D+P324A+G330R+E395G
37	D29S+E125D+P324A+N234K+E395G
38	D29S+P324A+E125D+D350V
39	D29S+P324A+E125D+D350V+T45A+V69A+A99D+H110Y+A334E+ E344S
40	D29N+L163P+P324S
41	D29S+K95T+D350V+E183W+H110Y+D185E+V248S+P324A
42	P324S+E395G
43	D29S+P324A+E125D

10

20

【 0 2 1 5 】

【表 3】

表 3 :

フィターゼ変異体	置換
44	D29S+E125D+P324A+N234K+G330R+E395G
45	D29S+P324A+E125D
46	D29T
47	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185K+V248T+V349A+350L
48	D29S+P324A+E125D+D350V+A99D+A334E
49	P324S
50	D29S+T45A+V248A+P324A+V349M+D350V+E395G
51	D29S+K95T+H110Y+E183W+D185H+D187S+T190K+T191S+S210G+M222I +V248G+P324A+D350V
52	D29S
53	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185P+V248G

30

40

【 0 2 1 6 】

【表 4】

表 4 :

フィターゼ変異体	置換
54	D29S+P324A+D350V+E183W+K95M+H110W
55	D29C
56	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185K+V248G+V349K+D350L
57	D29S+P324A+D350V+E183W+H110Y+D185N
58	D29S+P324A+E125D+D350V+A99D+A334E
59	N345H+L347P+D350V
60	D29S+P324A+E125D+D350T
61	D29S+P324A+E125D+D350V+N345H+L347P
62	P324A
63	D29S+K95R+D350V
64	D29S+K95T+H110Y+E157K+E183W+D185H+D187R+T190S+T191R+ V248G+P324A+D350V
65	D29S+P324A+E125D+D350V+E344S+A218T
66	F92L
67	D29S+P324A+D350V

10

20

【 0 2 1 7 】

【表 5】

表 5 :

フィタージェ変異体	置換
68	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+T191L
69	D29S+P324A+D350V+E183W
70	D29S+P324A+E183W+K95T+H110Y
71	D29S+P324A+E125D+D350V+G63N+A218T+A334E+E183K+P421S
72	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185P+V248S
73	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+E125D+G286S
74	D29S+P324A+E125D+D350V
75	D29S+P324A+D350V+E183G+A334E+E344S
76	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110R
77	D29S+K95T+H110Y+E183W+D185H+V248G+T321A+V323A+P324A+ D350V
78	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185H+V248G
79	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+G152A+G156C+E157Q+ L160R
80	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185A+V248A
81	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y
82	D29S+P324A+D350V+E183W+K95H+H110W
83	D29S+P324A+D350V+E183A
84	D29S+P324A+D350V+E183W+K95N+H110R
85	D29S+K95T+H110Y+E183W+D185K+V248T+ P324A+D350V
86	D29S+P324A+D350V+E183W+K95S+H110W
87	D29S+P324A+D350V+E183W+K95S+H110Y+D185A+V248E
88	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+G156R+E157Q
89	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185A+V248H
90	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+D185A+V248C
91	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110R
92	D29S+P324A+D350V+E183W+K95T+H110Y+V248D

10

20

30

【 0 2 1 8 】

【表 6】

表 6-1 :

フィターゼ変異体	相対活性 60°C /37°C	相対活性 62°C /37°C	相対活性 65°C /37°C	相対活性 68°C /37°C	相対活性 70°C /37°C	相対活性 72°C /37°C	相対活性 74°C /37°C
ペニオフォラ親フィターゼ	70	30	15	—	—	—	—
1	104	55	—	—	—	—	—
2	95	50	—	—	—	—	—
3	120	70	—	—	—	—	—
4	120	70	—	—	—	—	—
5	195	175	—	—	—	—	—
6	105	40	—	—	—	—	—
7	94	47	—	—	—	—	—
8	115	65	—	—	—	—	—
9	118	69	—	—	—	—	—
10	106	60	—	—	—	—	—
11	140	107	—	—	—	—	—
12	150	130	80	—	—	—	—
13	104	45	—	—	—	—	—
14	130	75	—	—	—	—	—
15	141	123	—	—	—	—	—
16	179	130	—	—	—	—	—
17	127	59	—	—	—	—	—
18	104	42	—	—	—	—	—
19	115	52	—	—	—	—	—
20	126	65	—	—	—	—	—
21	115	54	—	—	—	—	—
22	102	53	—	—	—	—	—
23	95	44	—	—	—	—	—
24	71	40	—	—	—	—	—
25	62	33	—	—	—	—	—
26	155	124	—	—	—	—	—
27	—	—	—	170, 183	73, 136	69	32

【表 7】

表 6 - 2 :

フィター ゼ変異体	相対活性 60℃ /37℃	相対活性 62℃ /37℃	相対活性 65℃ /37℃	相対活性 68℃ /37℃	相対活性 70℃ /37℃	相対活性 72℃ /37℃	相対活性 74℃ /37℃
28	147	126	61	—	—	—	—
29	—	—	—	176	105	69	32
30	—	—	—	109	約95	—	—
31	—	—	—	154	102	—	—
32	—	—	—	—	—	102	22
33	—	—	—	—	186	125	49
34	150	30	—	—	—	—	—
35	80	40	—	—	—	—	—
36	—	137	63	—	—	—	—
37	—	156	81	—	—	—	—
38	—	125	46	—	—	—	—
39	—	130	52	24	—	—	—
40	—	169	165	119	—	—	—
41	—	145	126	72	—	—	—
42	115	84	35	—	—	—	—
43	145	112	54	—	—	—	—
44	—	—	—	90	約70	—	—
45	—	—	—	105	約80	—	—
46	—	—	—	96	約70	—	—
47	—	—	—	104	42	—	—
48	—	—	—	120	57	—	—
49	—	—	—	147	102	53	—
50	—	—	—	152	105	51	—
51	—	—	—	184	101	48	—
52	—	—	—	—	115	88	31
53	—	—	—	—	118	74	25
54	118	69	—	—	—	—	—

【表 8】

表 6－3：

フィ ター ゼ変 異体	相対 活性 68℃ /37℃	相対 活性 70℃ /37℃	相対 活性 72℃ /37℃	相対 活性 74℃ /37℃	相対 活性 75℃ /37℃	相対 活性 76℃ /37℃	相対 活性 78℃ /37℃	相対 活性 80℃ /37℃	相対 活性 81℃ /37℃	相対 活性 82℃ /37℃
55	－	－	－	－	－	－	－	92	66	－
56	－	－	－	－	－	－	－	83	54	－
57	－	－	－	－	－	－	71	23	－	－
58	172	122	－	－	－	－	－	－	－	－
59	－	－	－	－	－	90	34	－	－	－
60	－	－	－	－	－	－	－	126	100	51
61	－	－	－	－	95	51	－	－	－	－
62	－	－	－	－	－	－	99	49	－	－
63	－	－	113	101	23	－	－	－	－	－
64	－	－	－	－	－	－	－	110	94	45
65	－	－	－	－	－	－	－	74	38	－
66	－	－	178	72	36	－	－	－	－	－
67	－	－	－	－	－	－	36	8	－	－
68	－	－	－	－	－	－	－	61	32	－
69	－	－	－	－	－	96	40	－	－	－
70	－	－	－	－	－	－	－	69	38	－
71	－	－	－	－	－	102	52	－	－	－
72	－	－	－	－	－	－	104	50	－	－
73	－	－	－	－	－	－	－	88	61	－
74	－	－	－	－	－	98	36	－	－	－
75	－	－	－	－	－	71	27	－	－	－
76	－	－	131	110	60	42/56	16	－	－	－
77	－	－	－	－	－	－	59	17	－	－
78	－	－	－	－	－	81	28	－	－	－
79	－	－	－	－	－	91	32	－	－	－
80	－	－	－	－	－	76	24	－	－	－
81	147	102	53	－	－	－	－	－	－	－
82	－	－	－	－	－	－	－	85	45	－
83	－	－	－	－	－	－	91	31	－	－
84	－	－	－	－	－	－	－	85	67	－
85	－	－	－	－	－	－	－	60	－	－
86	－	－	－	－	－	－	－	122	105	58
87	－	－	－	－	－	－	－	102	62	－

【 0 2 2 0 】

【表 9】

表 6 - 4 :

フィターゼ変異体	比活性 (%)
N	100
Q	144
R	122
S	189
T	200
U	167
V	167
W	156
X	167
Y	133
Z	122

【 0 2 2 1 】

菌株及びプラスミド :

E. コリDH12S (Gibco BRLから入手できる) を、酵母プラスミド救援のために使用する

pTMPP2ver2は、W000/10038号に記載されるpJC039から構成された、TPIプロモーターの制御下でのS. セレビシアエ及びE. コリシャトルベクターである。それを、ライブラリー構成、酵母発現、スクリーニング及び配列決定のために使用する。

サッカロミセス・セレビシアエYNG318: MATa Dpep4 [cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539を、酵母ライブラリーの構成及びフィターゼ変異体の発現のために使用する。それは、J. Biol. Chem. 272 (15), 9720-9727, 1997に記載される。

【 0 2 2 2 】

培地及び基質 :

10 × 基本溶液 :

66.8g/l 酵母窒素塩基性w/oアミノ酸 (DIFCO)
 100g/l スクシネート
 60g/l NaOH

【 0 2 2 3 】

SC - グルコース :

100ml/l 20% グルコース (すなわち、2% の最終濃度 = 2g/100ml)
 4ml/l 5% トレオニン
 10ml/l 1% トリプトファン
 25ml/l 20% カザミノ酸
 100ml/l 10 × 基本溶液

上記溶液を、0.20 μmの孔サイズのフィルターを用いて殺菌する。寒天及び水 (約761ml) を一緒にオートクレープし、そして別々に殺菌されたSC - グルコース溶液を、寒天溶液に添加する。

【 0 2 2 4 】

YPD:

20g/l バクトペプトン
 10g/l 酵母抽出物

100m/l 20% グルコース (別々に殺菌された)

【 0 2 2 5 】

フィチン酸ナトリウムレート :

100m/l 1 M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)
5g/l フィチン酸ナトリウム
30g/l 寒天

【 0 2 2 6 】

PEG/LiAc溶液 :

50ml 40% のPEG4000(オートクレーブにより殺菌された)
1ml 5 Mの酢酸リチウム(オートクレーブにより殺菌された)

10

【 0 2 2 7 】

微量金属溶液 :

FeSO₄ × 7H₂O 13.90g/l
MnSO₄ × 5H₂O 13.60g/l
ZnCl₂ 6.80g/l
CuSO₄ × 5H₂O 2.50g/l
NiCl₂ × 6H₂O 0.24g/l
クエン酸 × H₂O 3.00g/l

【 0 2 2 8 】

MDU-2B p :

マルトース × H₂O 45g/l
酵母抽出物 7g/l
MgSO₄ × 7H₂O 1g/l
NaCl 1g/l
K₂SO₄ 2g/l
KH₂PO₄ 12g/l
微量金属溶液 0.5ml/l

20

【 0 2 2 9 】

方法 :

フィターゼ活性、一次スクリーニング方法 :

30

SC - グルコースプレート上に酵母ライブラリーを広げ、そして30 で3日間インキュベートする。ベルベット布を用いることによってニトレートフィルターにより新規SC - グルコースプレートにレプリカ培養する。30 で1日(又は20 で週末)、プレートをインキュベートする。予備加熱された0.5%フィチン酸ナトリウム (pH5.5) にフィルターを移す、規定された温度、例えば53 で一晚 (O/N)、プレートをインキュベートする。フィルターを除き、そして0.5MのCaCl₂溶液を注ぐ。透明な領域を有する酵母クローンを見つける。マスタープレートからの候補体クローンを単離し、そして新規SC - グルコースプレート、及び24ウェルプレート中の1mlのYPD培地に接種する。

【 0 2 3 0 】

二次スクリーニング方法 :

40

25 で180rpmで3日間、24ウェルプレート中のYPD培地を培養する。プレートを遠心分離し、又はそれらを1時間、放置する。5μl及び10μlの上清液を、フィチン酸ナトリウムプレートに適用する。プレートを37 及び53 で一晚インキュベートする。透明な領域の直径を調べる。下記例2に記載されるフィターゼアッセイ (規定されるようなアッセイ温度) を用いて、53 で活性を保持するそれらのクローンの上清液の温度プロフィールを調べる。

【 0 2 3 1 】

酵母ライブラリーの構成方法 :

0.5μlのベクター (EcoRI-NotI消化された) 及び1μlのPCRフラグメントを混合する。氷上のYNG318コンピテント細胞を融解する。12mlのポリプロピレン管 (Falcon2059) にお

50

いて100 μ lの細胞、DNA混合物及び10 μ lのキャリアーDNA (Clontech) を混合する。0.6mlのPEG/LiAc溶液を添加し、そして軽く混合する。30 及び200rpmで30分間インキュベートする。42 (熱ショック) で30分間インキュベートする。エペンドーフ管に移し、そして5秒間、遠心分離する。上清液を除去し、そして3mlのYPDに溶解する。細胞懸濁液を、30で45分間、200rpmでインキュベートする。その懸濁液をSC - グルコースプレートに注ぎ、約300クローン/プレートを得る。

【 0 2 3 2 】

ライブラリー構成：

ドーピングライブラリーを、SOE方法 (オーバーラップ延長によるスプライシング ; "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University press, eds. McPherson, Q 10
uirke, Taylorを参照のこと) により構成し、続いて酵母組換えを行う。

【 0 2 3 3 】

他の方法：

ライブラリーを構成し、そしてサブクロニングするためのE. コリ形質転換を、エレクトロポレーション (BIO - RAD Gene Pulser) により行う。DNAプラスミドを、アルカリ方法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) 又はQiagen (商標) Plasmidキットにより調製する。DNAフラグメントを、Qiagenゲル抽出キットによりアガロースゲルから回収する。PCRを、PTC - 200 DNA Engineにより行う。ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzerを、すべてのDNA配列の決定のために使用する。酵母形質転換を、酢酸リチウム方法により行う。酵母の全DNAを、Nucleic acids research vol. 20, No. 14 (1992) 3790に記載され 20
るRobzyk and Kassirの方法により抽出する。

【 0 2 3 4 】

増幅及び配列決定のための一般的プライマー：

下記プライマーを用いてSOE方法によりいずれかの突然変異誘発されたフラグメントを含むDNAフラグメントを製造するか、又は完全なフィーターゼ遺伝子を増幅する。

配列番号 3：

620AM34 GAGTACTATCTTGCATTTGTACTAGGAGTTTAGTGAACCTTGC

配列番号 4：

680AM35 ATGGTTATGGATTTTCGGGGATTCTTCGAGCGTCCCAAACCC

【 0 2 3 5 】

配列番号 5：

AM34 TAGGAGTTTAGTGAACCTTGC

配列番号 6：

AM35 TTCGAGCGTCCCAAACCC

配列番号 7：

620 GAGTACTATCTTGCATTTGTAC

配列番号 8：

680 ATGGTTATGGATTTTCGGGGAT

【 0 2 3 6 】

ドーピングライブラリーの構成のためのプライマーの例：

領域229 - 236：

確立された実施に従って、下記に特定されるヌクレオチド配列において、ヌクレオチドのための特定のコードを使用する。それらは、例えば<http://www.cs-pitt.edu/~vanathi/na.html>から明らかである。例えば、KはG又はTを表し；YはC又はTを表し；RはA又はGを表し；そしてNはA又はC又はG又はTを表す。

【 0 2 3 7 】

T229 VNN ヌクレオチド

L230 INMKR アミノ酸

S231 TVN アミノ酸

S232 VNN ヌクレオチド

10

20

30

40

50

G233 VNN ヌクレオチド

N234 VNN ヌクレオチド

A235 VNN ヌクレオチド

S236 AMK アミノ酸又はA (M 及び Kを得るのは困難である)。

【 0 2 3 8 】

L230INMKR のためのヌクレオチドの分布：

ヌクレオチド	塩基 1	塩基 3	塩基 3
G	0.0	3.0	46.6
A	12.5	6.5	7.7
T	0.0	90.4	45.7
C	87.5	0.0	0.0

10

下記プライマーを、領域T229-S236で標的化する。

【 0 2 3 9 】

配列番号 9：

Dope1 (62マー)： GAT ATG TGC CCG TTC GAC 12K (11) (12) (13) (14) (15) T 42K 33K 1
15 32K 5CC CCC TTC TGT GAC CTA TTT AC

【 0 2 4 0 】

配列番号10：

Dope1 R (18マー)： GTCGAACGGGCACATATC

1: A91 G3 T3 C3

2: C91 G3 A3 T3

3: G91 C3 A3 T3

4: T91 G3 A3 C3

5: T95 G5

11: C88 A12

12: T90 G3 A7

13: G47 A8 T45

14: G9 A91

15: G83 A4 T9 C4

20

【 0 2 4 1 】

スパイクキングされたオリゴシャフリングライブラリーの構成のためのプライマー：

配列番号11：

L102TI (43マー)：

AGTTCGGCGTCGCCGATCTGAYCCCGTTCGGGGCTAACCAATC

配列番号12：

VE248+251X (53マー)：

TATTTACCGCGGAGGAGTATVNNTCGTACVNNTACTACTATGACCTCGACAAG

【 0 2 4 2 】

配列番号13：

V271AI (45マー)：

CCGGGAACGCTCTCGGTCCTRYCCAGGGCGTCGGATACGTCAATG

配列番号14：

G286X (42マー)：

ATGAGCTGCTTGACGCTTGACCVNNCAAGCCGTTGAGACG

【 0 2 4 3 】

ドーピングによるフィターゼ変異体の構成：

第1のPCR反応を、次のPCR反応システム及び条件を用いて、2つのプライマー対、すなわち620AN34及びDope1R、及び上記に記載されているヌクレオチド混合物に関するDope1及び680AM35により行った：

【 0 2 4 4 】

50

【表 10】

表10

PCR反応システム：		条件：		
38.9 μ l	水	1	98°C	10秒
5 μ l	10× 反応緩衝液	2	68°C	90秒
1 μ l	Klen Taq LA (CLONTECH)	1-2	30サイクル	
4 μ l	10mMのdNTPs	3	68°C	10分
0.3 μ l × 2	100pモル/ μ l のプライマー			
0.5 μ l	pTMPP2 ver2			

10

【 0 2 4 5 】

得られるフラグメントをゲル精製し、そして第 2 PCR反応のための鋳型として使用した。第 2 PCRを、次のPCR反応システム及び条件に従って、プライマーとして620及び680を用いて行った：

【 0 2 4 6 】

【表 11】

20

表11

PCR反応システム：		条件：		
38.4 μ l	水	1	98°C	10秒
5 μ l	10× 反応緩衝液	2	66°C	90秒
1 μ l	Klen Taq LA (CLONTECH)	1-2	30サイクル	
4 μ l	10mMのdNTPs	3	66°C	10分
0.3 μ l × 2	100pモル/ μ l のプライマー			
0.5 μ l × 2	PCRフラグメント			

30

【 0 2 4 7 】

スパイキングされたオリゴシャフリングライブラリー：

スパイキングされたライブラリーを次の通りに構成した：変異体の遺伝子フラグメントを調製するためのPCR反応を、上記のようにKlen Tgqポリメラーゼ及びプライマーとしてAM34及びAM35を用いて行い、フラグメントをゲル精製した。約10 μ gのDNA/250 μ lを、0.8 μ lのDNaseI (Gibco BRL 18068-015)及び30 μ lの10× 緩衝液と共に、25 で7～10分間インキュベートした。EDTAを添加し、10mMの最終濃度にし、これにより反応停止した。正しいサイズ(50 - 150bp)のDNAフラグメントを、Whatmanガラスフィルターにより精製した。次にDNアーゼ処理されたフラグメントを、次のPCR反応システム及び条件を用いて再アセンブリーした：

40

【 0 2 4 8 】

【表 1 2】

表12

PCR反応システム：	条件：		
0. 2, 0. 5及び1pモルのDNアーゼ処理された鋳型	1	94℃	2分
3, 6, 12×モル過剰の突然変異誘発性	2	94℃	30秒
オリゴ	3	45℃	30秒
1ビーズReady-to-go	4	72℃	1分
0. 1 μ lのPwoポリメラーゼ	2-4	30サイクル	
最終体積25 μ l	5	72℃	5分

10

【 0 2 4 9】

鋳型として上記PCR混合物を用いて、第2 PCR反応を、次のPCR反応システム及び条件に従って行った：

【表 1 3】

表13

PCR反応システム：	条件：		
0. 2, 0. 5, 1及び2 μ lの1st PCR反応	1	94℃	2分
2ビーズReady-to-go	2	94℃	30秒
0. 3 μ l 100pモルのプライマー 1 (AM34)	3	55℃	30秒
0. 3 μ l 100pモルのプライマー 2 (AM35)	4	72℃	90秒
0. 1 μ lのPwoポリメラーゼ	2-4	25サイクル	
	5	72℃	10分

20

30

【 0 2 5 0】

例 2 . フィターゼ変異体の精製及び特徴化

フィターゼ変異体の精製：

上記表 1 - 5 (上付き文字A-Mにより示される) から選択された多くの変異体を発現するアスペルギラス・オリザエの発酵からの培養物ブイヨンを、まず、Milliporeからの一連のGF - フィルター及び次に0.45 μ mのHA - フィルター (Millipore) を用いて濾過した。次に、硫酸アンモニウム (AMS) を濾液に添加し、1.35Mの最終濃度にし、そしてpHを 6 に調節した。サンプルを再び濾過し (上記のように0.45 μ mのHA - フィルター) 、そして1.35MのAMS、20mMのスクシネート溶液 (pH6) により平衡化された70ml (体積は負荷に依存する) のフェニルセファロースカラム (XK26, Pharmacia) 上に負荷した。

40

【 0 2 5 1】

カラムを1.35MのAMS、10カラム体積の20mMのスクシネート溶液 (pH6) により洗浄し、その後、20mMのスクシネート (pH6) 中、1.35 - 0MのAMSの線性グラジエントにより溶離した。流速は6ml / 分で設定され、そして10mの画分が集められた。十分な純度 (SDS - PAGEにより評価される場合) の及び活性を有する画分をプールし、そして50mMの酢酸ナトリウム (pH5.5) に対して一晩、透析した。

【 0 2 5 2】

次に、フィターゼ含有プールを、20mMのトリス - 酢酸 (pH7.5) に添加し、そして20mMのトリス - 酢酸 (pH7.5) により平衡化された、8mlのMonoQ又はより大きなQ - セファロー

50

スカラム (Pharmacia) 上でのアニオン交換クロマトグラフィーにゆだねた。フィターゼを、20mMのトリス - 酢酸 (pH7.5) 中、0 - 0.5MのNaClの線状グラジエントにより溶離した。流速及び画分サイズはカラム規模に従って調節された。フィターゼ活性を含み、そして十分な純度の画分をプールし、そしてAmecon YM10膜上で濃縮し、その後、50mMの酢酸ナトリウム (pH5.5) に対して透析した。

【 0 2 5 3 】

SDS - PAGE :

SDS - PAGEを、Novex 40-20 Tris-Glycineを用いて、その製造業者の説明書に従って行った。A. オリザエから精製されるようなフィターゼ変異体は、約25%の炭水化物に対応する、約65kDa分子量 (MW) を有した。

10

【 0 2 5 4 】

フィターゼ活性アッセイ、pH及び温度プロフィール、温度安定性試験 :

10 μ lの希釈された酵素サンプル (0.1Mの酢酸ナトリウム、0.01%のTween20、pH5.5中に希釈される) を、0.1Mの酢酸ナトリウム、0.01%のTween20、pH5.5 (pHは、フィチン酸ナトリウム溶解した後、調節され; 基質は予備加熱された) 中、5mMのフィチン酸ナトリウム (Sigma) 250 μ lに添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。反応を、10% TCA 250 μ lの添加により停止し、そして遊離ホスフェートを、100mlのモリブデート試薬 (250mlに希釈された、8mlの硫酸中、2.5gの $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 中、500 μ lの7.3gの7.3gの FeSO_4 を添加することによって測定した。750nmでの吸光度を、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて200 μ lのサンプルに対して測定した。基質及び酵素ブランクが包含された。ホスフェート標準曲線がまた包含された (0-2mMのホスフェート)。1 FYTは、所定の条件下で1 μ モルのホスフェート/分で開放する酵素の量に等しい。

20

【 0 2 5 5 】

pH - プロフィールを、50mMの緩衝液、pH3 (グリシン - HCl)、pH4 - 5.5 (酢酸ナトリウム、pH6 (MES)、pH7 - 8 (トリス - HCl) 中、種々のpH値で上記アッセイを行うことにより得た。

温度プロフィールを、種々の温度でアッセイを行うことによって得た (基質を予備加熱する)。

温度安定性を、残留活性を測定する前、種々の温度で、0.1Mのリン酸ナトリウム (pH5.5) においてフィターゼをプレインキュベーションすることにより調べた。

30

精製された変異体は、P. リシ親フィターゼと類似するpH - プロフィールを示す (すべてはpH4 - 5近く最適pHを有する)。

【 0 2 5 6 】

示差走査熱量法 (DSC) :

DSCを、Micro CalからのVP-DSCを用いて、種々のpH値で行った。走査を、20 - 90 $^{\circ}$ Cで1.5 $^{\circ}$ C/分の一定走査速度で行った。DSCを行う前、フィターゼを、適切な緩衝液 (例えば、0.1Mのグリシン - HCl、pH2.5又は3.0; 0.1Mの酢酸ナトリウム、pH5.5; 0.1Mのトリス - HCl、pH7.0) により平衡化されたNAP-5カラム (Pharmacia) を用いて脱塩した。データ処理は、Microcal Origin ソフトウェアを用いて行った。

得られる溶融温度 (T_m) は、下記 14 に示される。変異体の熱安定性が、ペルオフォラ親フィターゼに比較して、有意に改良される。熱安定性は、pH - 依存性であることが見出される。

40

【 0 2 5 7 】

【表 1 4】

表14:

フィターゼ 変異体	pH2.5でのT _m (°C)	pH3.0でのT _m (°C)	pH5.5でのT _m (°C)	pH7.0でのT _m (°C)
ペニオフォラ 親フィターゼ	36.4	50.5	59.6	48.8
A	—	—	62.7	—
B	—	—	62.4	—
C	—	—	65.0	—
D	—	52.2	70.5	69.6
E	43.5	58.5	72.6	—
F	42.2	—	73.5	—
G	44.5	—	73.1	—
H	48.1	—	78.0	—
I	49.9	—	79.8	—
J	—	49.0	75.6	—
K	52.1	—	80.6	—
L	59.6	—	82.0	—
M	53.1	—	80.5	—

【0258】

例3．比活性

表1 - 5から選択された変異体の比活性（本明細書においては、N、O及びPで示される）を、20mMの酢酸ナトリウム（pH5.5）に対して透析された、高く精製されたサンプルに対して決定した。純度を、わずか1つの成分の存在を示すSDSポリアクリルアミドゲル上であらかじめ調べた。

【0259】

タンパク質濃度を、次の通りにアミノ酸分析により決定した：サンプルのアリコート、排気されたガラス管において110℃で16時間、6NのHCl、0.1%のフェノールにおいて加水分解した。得られるアミノ酸を、製造業者の説明書に従って作動されるApplied Biosystems 420Aアミノ酸分析システムを用いて定量化した。アミノ酸の量から、合計の質量、及び従ってまた、加水分解されたアリコートにおけるタンパク質の濃度が計算され得る。

【0260】

フィターゼ活性を、FYTの単位で決定し、そして比活性を、フィターゼ変異体酵素タンパク質1mg当たりのFYT単位で測定されるフィターゼ活性として計算した。

結果は、下記表15に示される。比活性数値は、100%に設定されたペニオフォラ親フィターゼの比活性に対してである。

【0261】

【表 15】

表15:

フィターゼ変異体	比活性 (%)
ペニオフォラ親フィターゼ	100
N	147
O	117
P	114

10

【 0 2 6 2 】

例 4 . フィターゼ変異体を含んで成る動物用飼料及び動物飼料添加物

動物用飼料添加物:

10gのフィターゼ変異体番号1938 (フィターゼ酵素タンパク質として計算された) を、次のプレミックスに添加する (プレミックスkg当たり) :

5000000	IE	ビタミンA
1000000	IE	ビタミンD3
13333	mg	ビタミンE
1000	mg	ビタミンK3
750	mg	ビタミンB1
2500	mg	ビタミンB2
1500	mg	ビタミンB6
7666	mcg	ビタミンB12
12333	mg	Niacin
33333	mcg	Biotin
300	mg	葉酸
3000	mg	Ca-D-Panthenate
1666	mg	Cu
16666	mg	Fe
16666	mg	Zn
23333	mg	Mn
133	mg	Co
66	mg	I
66	mg	Se
5.8	%	カルシウム
25	%	ナトリウム

20

30

【 0 2 6 3 】

40

動物用飼料:

これは、0.03g/kg (30ppm) のフィターゼ変異体Eを含んで成る動物用飼料の例である (フィターゼ酵素タンパク質として計算された) :

74.0%の小麦

20.7%のローストされた大豆ケーキ

5.0%の大豆油

0.3%の上記プレミックス

前記成分を混合し、そして飼料を所望する温度、例えば65, 75, 80又は85 でペレット化する。

【 0 2 6 4 】

50

本明細書及び請求項に記載される発明は、それらの態様は本発明を単に例示するものであるので、本明細書に開示される特定の態様によりその範囲を制限されない。いずれかの同等の態様は、本発明の範囲内に包含される。実際、本明細書に示され、そして記載されるそれらの他に、本発明の種々の修飾は、当業者に明らかになるであろう。そのような修飾は本発明の範囲内にある。

種々の引例が本明細書に引用され、それらの開示は引用により本明細書に組込まれる。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 6 5 】

【図 1】図 1 は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含んで成る、ペニオフォラ・リシからのフィターゼの 3D 構造についての座標を提供する。

10

【図 1】

```
REMARK 4
REMARK 4 AYOR COMPLIES WITH FORMAT V. 2.0, 30-JUL-2001
ATOM 1 N THR 1 -7.303 8.486 -36.673 0.00 83.02 N
ATOM 2 CA THR 1 -6.435 7.844 -35.696 0.00 82.43 C
ATOM 3 CB THR 1 -5.024 8.354 -36.002 0.00 83.38 C
ATOM 4 OG1 THR 1 -5.096 9.705 -36.417 0.00 83.85 O
ATOM 5 OG2 THR 1 -4.407 7.467 -37.087 0.00 80.74 O
ATOM 6 THR 1 -6.862 8.103 -34.242 0.00 81.65 C
ATOM 7 O THR 1 -7.916 8.667 -33.981 0.00 82.05 O
ATOM 8 N SER 2 -5.993 7.615 -33.345 0.00 80.26 N
ATOM 9 CA SER 2 -6.195 7.450 -31.921 0.00 77.85 C
ATOM 10 CB SER 2 -6.823 6.080 -31.684 0.00 82.16 C
ATOM 11 OG SER 2 -6.355 5.191 -32.670 0.00 80.38 O
ATOM 12 C SER 2 -4.836 7.733 -31.241 0.00 75.71 C
ATOM 13 O SER 2 -4.660 8.684 -30.974 0.00 75.84 O
ATOM 14 N ASN 3 -3.867 6.774 -31.113 0.00 73.07 N
ATOM 15 CA ASN 3 -2.515 7.136 -30.609 0.00 69.62 C
ATOM 16 CB ASN 3 -1.905 8.315 -31.361 0.00 69.35 C
ATOM 17 CG ASN 3 -0.986 7.957 -32.614 0.00 68.97 C
ATOM 18 OD1 ASN 3 -1.473 7.339 -33.558 0.00 63.41 O
ATOM 19 ND2 ASN 3 0.278 8.423 -32.601 0.00 70.05 N
ATOM 20 C ASN 3 -2.624 7.498 -29.110 0.00 67.05 C
ATOM 21 O ASN 3 -2.029 8.449 -28.618 0.00 67.06 O
ATOM 22 N TRP 4 -3.493 6.731 -28.427 0.00 64.41 N
ATOM 23 CA TRP 4 -3.920 7.118 -27.063 0.00 60.50 C
ATOM 24 CB TRP 4 -5.341 7.202 -26.929 0.00 49.41 C
ATOM 25 CG TRP 4 -5.907 8.474 -27.543 0.00 42.61 C
ATOM 26 CD2 TRP 4 -7.298 8.703 -27.684 0.00 38.25 C
ATOM 27 CE2 TRP 4 -7.375 10.016 -28.391 0.00 35.44 C
ATOM 28 CE3 TRP 4 -8.412 7.929 -27.794 0.00 37.41 C
ATOM 29 CD1 TRP 4 -5.229 9.664 -27.862 0.00 38.22 C
ATOM 30 NE1 TRP 4 -6.108 10.569 -28.357 0.00 37.47 N
ATOM 31 CE2 TRP 4 -8.573 10.506 -28.807 0.00 34.96 C
ATOM 32 CE3 TRP 4 -9.643 8.430 -28.214 0.00 37.29 C
ATOM 33 CH2 TRP 4 -9.722 9.723 -28.731 0.00 36.77 C
ATOM 34 C TRP 4 -3.149 6.180 -26.065 0.00 58.85 C
ATOM 35 O TRP 4 -3.769 5.638 -25.158 0.00 58.27 O
ATOM 36 N GLY 5 -1.899 6.106 -26.244 0.00 57.78 N
ATOM 37 CA GLY 5 -0.937 5.352 -25.340 0.00 56.39 C
ATOM 38 C GLY 5 -1.571 4.026 -24.844 0.00 55.55 C
ATOM 39 O GLY 5 -2.169 3.279 -25.614 0.00 55.37 O
ATOM 40 N PRO 6 -1.404 3.762 -23.513 0.00 54.66 N
ATOM 41 CD PRO 6 -0.837 4.597 -22.501 0.00 54.80 C
ATOM 42 CA PRO 6 -2.022 2.514 -22.989 0.00 54.11 C
ATOM 43 CB PRO 6 -1.339 2.370 -21.621 0.00 54.40 C
ATOM 44 CG PRO 6 -0.943 3.790 -21.200 0.00 54.15 C
ATOM 45 C PRO 6 -3.558 2.527 -22.878 0.00 53.58 C
ATOM 46 O PRO 6 -4.153 1.513 -22.524 0.00 53.95 O
ATOM 47 N TYR 7 -4.136 3.702 -23.211 0.00 52.47 N
ATOM 48 CA TYR 7 -5.554 3.974 -23.010 0.00 50.94 C
ATOM 49 CB TYR 7 -5.777 5.449 -22.614 0.00 51.76 C
ATOM 50 CS TYR 7 -5.069 5.958 -21.376 0.00 52.28 C
ATOM 51 CD1 TYR 7 -4.495 5.126 -20.413 0.00 51.64 C
ATOM 52 CE1 TYR 7 -3.865 5.675 -19.297 0.00 51.90 C
ATOM 53 OD2 TYR 7 -3.226 7.352 -17.178 0.00 52.76 O
ATOM 54 CE2 TYR 7 -4.387 7.875 -20.060 0.00 52.83 C
ATOM 55 CZ TYR 7 -3.815 7.051 -19.110 0.00 52.69 C
ATOM 56 OH TYR 7 -3.226 7.603 -17.981 0.00 54.02 O
ATOM 57 C TYR 7 -6.411 3.699 -24.268 0.00 49.21 C
ATOM 58 O TYR 7 -7.634 3.659 -24.212 0.00 48.73 O
ATOM 59 N ASP 8 -5.694 3.573 -25.394 0.00 47.71 N
ATOM 60 CA ASP 8 -6.266 3.528 -26.745 0.00 46.54 C
ATOM 61 CB ASP 8 -5.035 3.108 -27.640 0.00 43.70 C
ATOM 62 CG ASP 8 -5.429 3.319 -29.105 0.00 45.90 C
```

Fig. 1

```
ATOM 63 OD1 ASP 8 -6.091 2.476 -29.710 0.00 48.38 O
ATOM 64 OD2 ASP 8 -5.037 4.345 -29.635 0.00 53.01 O
ATOM 65 C ASP 8 -7.448 2.530 -26.920 0.00 45.20 C
ATOM 66 O ASP 8 -7.245 1.336 -26.780 0.00 44.32 O
ATOM 67 N PRO 9 -8.700 2.989 -27.200 0.00 44.57 N
ATOM 68 CD PRO 9 -9.045 4.372 -27.502 0.00 44.52 C
ATOM 69 CA PRO 9 -9.859 2.080 -27.180 0.00 44.21 C
ATOM 70 CS PRO 9 -11.046 3.059 -27.191 0.00 44.04 C
ATOM 71 CG PRO 9 -10.516 4.296 -27.922 0.00 44.13 C
ATOM 72 C PRO 9 -9.940 1.134 -28.406 0.00 43.55 C
ATOM 73 O PRO 9 -10.539 1.448 -28.431 0.00 43.72 O
ATOM 74 N PHE 10 -9.331 -0.055 -28.223 0.00 42.15 N
ATOM 75 CA PHE 10 -9.091 -1.053 -29.255 0.00 40.33 C
ATOM 76 CB PHE 10 -9.719 -2.422 -28.916 0.00 36.00 C
ATOM 77 CG PHE 10 -9.167 -3.416 -29.894 0.00 34.61 C
ATOM 78 CD1 PHE 10 -7.834 -3.772 -29.775 0.00 36.58 C
ATOM 79 CD2 PHE 10 -9.915 -3.908 -30.960 0.00 34.27 C
ATOM 80 CE1 PHE 10 -7.219 -4.538 -30.743 0.00 34.77 C
ATOM 81 CE2 PHE 10 -9.302 -4.687 -31.931 0.00 29.22 C
ATOM 82 CE PHE 10 -7.947 -4.979 -31.836 0.00 33.06 C
ATOM 83 C PHE 10 -9.423 -0.667 -30.721 0.00 38.41 C
ATOM 84 O PHE 10 -10.537 -0.836 -31.224 0.00 39.09 O
ATOM 85 N PHE 11 -8.325 -0.182 -31.366 0.00 35.05 N
ATOM 86 CA PHE 11 -9.262 -0.135 -32.626 0.00 38.73 C
ATOM 87 CB PHE 11 -7.519 1.120 -33.308 0.00 45.02 C
ATOM 88 CG PHE 11 -7.472 1.197 -34.813 0.00 52.73 C
ATOM 89 CD1 PHE 11 -6.299 0.945 -35.505 0.00 57.49 C
ATOM 90 CD2 PHE 11 -8.609 1.519 -35.539 0.00 57.14 C
ATOM 91 CE1 PHE 11 -6.254 1.019 -36.892 0.00 60.78 C
ATOM 92 CE2 PHE 11 -8.577 1.584 -36.926 0.00 60.79 C
ATOM 93 CE PHE 11 -7.400 1.329 -37.608 0.00 62.76 C
ATOM 94 C PHE 11 -7.491 -1.374 -33.336 0.00 37.84 C
ATOM 95 O PHE 11 -6.366 -1.626 -32.885 0.00 38.11 O
ATOM 96 N PRO 12 -9.094 -2.126 -34.287 0.00 37.27 N
ATOM 97 CD PRO 12 -9.510 -2.047 -34.633 0.00 36.62 C
ATOM 98 CA PRO 12 -7.356 -3.130 -35.040 0.00 36.70 C
ATOM 99 CB PRO 12 -8.424 -3.755 -35.947 0.00 36.10 C
ATOM 100 CG PRO 12 -9.782 -3.338 -35.385 0.00 36.84 C
ATOM 101 C PRO 12 -6.234 -2.518 -35.901 0.00 36.05 C
ATOM 102 O PRO 12 -6.494 -1.870 -36.913 0.00 35.96 O
ATOM 103 N VAL 13 -4.987 -2.793 -35.467 0.00 35.66 N
ATOM 104 CA VAL 13 -3.868 -2.043 -36.039 0.00 36.32 C
ATOM 105 CB VAL 13 -2.704 -2.100 -35.036 0.00 32.00 C
ATOM 106 CG VAL 13 -3.183 -1.571 -33.681 0.00 26.12 C
ATOM 107 CE VAL 13 -2.102 -3.497 -34.058 0.00 25.87 C
ATOM 108 C VAL 13 -3.539 -2.504 -37.477 0.00 37.28 C
ATOM 109 O VAL 13 -3.269 -1.711 -39.385 0.00 38.12 O
ATOM 110 N GLU 14 -3.631 -3.839 -37.603 0.00 37.38 N
ATOM 111 CA GLU 14 -3.449 -4.485 -38.892 0.00 36.96 C
ATOM 112 CB GLU 14 -2.105 -5.262 -38.916 0.00 41.02 C
ATOM 113 CG GLU 14 -0.814 -4.344 -38.715 0.00 47.70 C
ATOM 114 CD GLU 14 0.467 -5.009 -39.076 0.00 50.53 C
ATOM 115 OE1 GLU 14 1.127 -4.576 -40.023 0.00 52.49 O
ATOM 116 OE2 GLU 14 0.893 -5.940 -39.397 0.00 52.04 O
ATOM 117 GUA 14 -4.688 -5.370 -39.052 0.00 36.45 C
ATOM 118 O GUA 14 -5.344 -5.706 -38.063 0.00 36.75 O
ATOM 119 N PRO 15 -5.050 -5.718 -40.322 0.00 35.98 N
ATOM 120 CD PRO 15 -4.421 -5.202 -41.538 0.00 35.50 C
ATOM 121 CA PRO 15 -6.185 -6.603 -40.578 0.00 35.03 C
ATOM 122 CB PRO 15 -6.346 -6.610 -42.108 0.00 35.21 C
ATOM 123 CG PRO 15 -5.094 -5.962 -42.690 0.00 33.20 C
ATOM 124 C PRO 15 -5.970 -8.030 -39.981 0.00 34.43 C
ATOM 125 O PRO 15 -5.040 -8.719 -40.378 0.00 34.32 O
ATOM 126 N TYR 16 -6.855 -8.417 -39.013 0.00 33.41 N
ATOM 127 CA TYR 16 -6.758 -9.702 -38.239 0.00 31.11 C
```

Fig. 1

ATOM	128	CB	TYR	16	-7.965	-9.964	-37.362	0.00	30.79	C
ATOM	129	OC	TYR	16	-7.485	-11.362	-36.764	0.00	32.17	C
ATOM	130	OD1	TYR	16	-7.480	-11.609	-35.484	0.00	32.55	C
ATOM	131	OE1	TYR	16	-7.470	-12.903	-34.971	0.00	33.54	C
ATOM	132	CD2	TYR	16	-8.436	-12.449	-37.497	0.00	32.42	C
ATOM	133	OE2	TYR	16	-8.384	-13.740	-37.002	0.00	34.81	C
ATOM	134	CE	TYR	16	-7.917	-13.970	-35.728	0.00	34.70	C
ATOM	135	OH	TYR	16	-7.923	-13.252	-35.218	0.00	35.68	C
ATOM	136	C	TYR	16	-6.608	-10.970	-39.778	0.00	29.77	C
ATOM	137	O	TYR	16	-7.537	-11.256	-39.989	0.00	30.08	C
ATOM	138	N	ALA	17	-5.384	-11.418	-39.220	0.00	27.72	N
ATOM	139	CS	ALA	17	-5.018	-12.568	-39.997	0.00	25.33	C
ATOM	140	CB	ALA	17	-3.433	-12.536	-40.386	0.00	24.81	C
ATOM	141	C	ALA	17	-5.434	-13.900	-39.278	0.00	24.31	C
ATOM	142	O	ALA	17	-4.844	-14.359	-38.300	0.00	23.45	C
ATOM	143	N	PRO	18	-6.490	-14.469	-39.899	0.00	23.56	C
ATOM	144	CA	ALA	18	-6.949	-15.805	-39.561	0.00	20.62	C
ATOM	145	CB	ALA	18	-8.203	-16.090	-40.402	0.00	6.45	C
ATOM	146	C	ALA	18	-5.828	-16.856	-39.764	0.00	19.00	C
ATOM	147	O	ALA	18	-4.786	-16.610	-40.378	0.00	19.25	C
ATOM	148	N	PRO	19	-6.061	-18.050	-39.131	0.00	17.82	N
ATOM	149	CD	PRO	19	-7.177	-18.370	-38.249	0.00	16.76	C
ATOM	150	CA	PRO	19	-5.031	-18.114	-39.230	0.00	17.90	C
ATOM	151	CB	PRO	19	-5.714	-20.328	-38.527	0.00	17.81	C
ATOM	152	CG	PRO	19	-7.759	-13.883	-38.028	0.00	17.55	C
ATOM	153	C	PRO	19	-4.759	-18.368	-40.711	0.00	17.13	C
ATOM	154	O	PRO	19	-5.656	-19.392	-41.556	0.00	19.03	C
ATOM	155	N	PRO	20	-3.428	-19.535	-40.970	0.00	15.21	N
ATOM	156	CD	PRO	20	-2.323	-19.328	-40.022	0.00	14.44	C
ATOM	157	CA	PRO	20	-2.828	-18.508	-42.080	0.00	23.94	C
ATOM	158	CB	PRO	20	-1.463	-20.264	-42.053	0.00	13.93	C
ATOM	159	CG	PRO	20	-1.058	-19.393	-40.883	0.00	13.58	C
ATOM	160	C	PRO	20	-3.573	-21.108	-42.937	0.00	16.55	C
ATOM	161	O	PRO	20	-4.277	-21.897	-42.313	0.00	17.62	C
ATOM	162	N	GLU	21	-3.228	-21.218	-44.237	0.00	17.46	N
ATOM	163	CA	GLU	21	-3.706	-22.361	-45.096	0.00	18.93	C
ATOM	164	CB	GLU	21	-3.788	-21.974	-46.488	0.00	15.69	C
ATOM	165	CG	GLU	21	-4.644	-22.937	-47.325	0.00	27.50	C
ATOM	166	CD	GLU	21	-6.135	-22.855	-46.969	0.00	35.09	C
ATOM	167	OE1	GLU	21	-6.645	-21.749	-46.789	0.00	40.28	C
ATOM	168	OE2	GLU	21	-6.786	-23.898	-46.500	0.00	34.58	C
ATOM	169	CB	GLU	21	-7.741	-23.545	-44.767	0.00	20.52	C
ATOM	170	C	GLU	21	-1.572	-23.475	-42.142	0.00	20.37	C
ATOM	171	N	GLY	22	-3.313	-24.577	-44.110	0.00	21.84	N
ATOM	172	CA	GLY	22	-2.592	-25.695	-43.528	0.00	22.04	C
ATOM	173	C	GLY	22	-2.601	-25.597	-41.984	0.00	22.91	C
ATOM	174	O	GLY	22	-2.117	-26.451	-41.288	0.00	23.94	C
ATOM	175	N	CYS	23	-3.200	-24.476	-41.521	0.00	23.61	N
ATOM	176	CA	CYS	23	-3.429	-24.283	-40.098	0.00	24.28	C
ATOM	177	CB	CYS	23	-2.813	-22.864	-39.626	0.00	18.16	C
ATOM	178	SG	CYS	23	-1.010	-23.051	-39.573	0.00	26.23	S
ATOM	179	C	CYS	23	-4.928	-24.355	-39.827	0.00	24.23	C
ATOM	180	CA	THR	24	-5.763	-24.254	-40.712	0.00	33.33	C
ATOM	181	N	THR	24	-5.215	-24.548	-38.539	0.00	23.66	N
ATOM	182	CA	THR	24	-6.494	-24.193	-37.957	0.00	24.24	C
ATOM	183	CB	THR	24	-7.351	-25.444	-37.958	0.00	25.31	C
ATOM	184	OG1	THR	24	-7.703	-25.801	-38.279	0.00	16.02	C
ATOM	185	CG2	THR	24	-8.722	-25.305	-37.226	0.00	25.27	C
ATOM	186	C	THR	24	-6.125	-23.793	-36.544	0.00	24.40	C
ATOM	187	O	THR	24	-5.375	-24.466	-36.858	0.00	24.20	C
ATOM	188	N	VAL	25	-6.661	-22.599	-36.090	0.00	24.48	N
ATOM	189	CA	VAL	25	-6.587	-22.355	-34.652	0.00	24.27	C
ATOM	190	CB	VAL	25	-7.030	-20.934	-34.253	0.00	14.30	C
ATOM	191	CG1	VAL	25	-8.501	-20.639	-34.651	0.00	24.71	C
ATOM	192	CD2	VAL	25	-6.727	-20.674	-32.762	0.00	10.25	C

Fig. 1

ATOM	193	C	VAL	25	-7.435	-23.439	-34.001	0.00	24.62	C
ATOM	194	O	VAL	25	-8.399	-23.913	-34.890	0.00	25.18	C
ATOM	195	CB	VAL	25	-6.999	-23.858	-35.811	0.00	25.35	N
ATOM	196	CA	THR	26	-7.750	-24.896	-32.103	0.00	20.49	C
ATOM	197	CB	THR	26	-7.366	-26.316	-32.561	0.00	20.75	C
ATOM	198	OG1	THR	26	-7.541	-26.469	-31.943	0.00	24.54	C
ATOM	199	CG2	THR	26	-8.224	-27.443	-31.951	0.00	19.08	C
ATOM	200	C	THR	26	-7.601	-24.711	-30.592	0.00	26.24	C
ATOM	201	O	THR	26	-8.234	-25.414	-29.817	0.00	26.20	C
ATOM	202	N	GLN	27	-6.795	-23.715	-30.178	0.00	27.08	N
ATOM	203	CA	GLN	27	-6.844	-23.308	-28.784	0.00	27.22	C
ATOM	204	CB	GLN	27	-5.961	-24.249	-27.940	0.00	25.39	C
ATOM	205	CG	GLN	27	-6.951	-24.253	-26.592	0.00	17.96	C
ATOM	206	C	GLN	27	-4.608	-24.658	-25.848	0.00	22.18	C
ATOM	207	OE1	GLN	27	-3.387	-24.540	-25.798	0.00	23.12	C
ATOM	208	ME2	GLN	27	-5.297	-25.629	-25.926	0.00	23.42	C
ATOM	209	C	GLN	27	-6.337	-22.879	-28.772	0.00	27.24	C
ATOM	210	O	GLN	27	-5.459	-21.538	-29.552	0.00	26.97	C
ATOM	211	N	VAL	28	-6.913	-21.070	-27.866	0.00	27.42	N
ATOM	212	CA	VAL	28	-6.345	-19.752	-27.665	0.00	26.61	C
ATOM	213	CB	VAL	28	-7.249	-18.587	-28.065	0.00	29.54	C
ATOM	214	OG1	VAL	28	-7.312	-18.469	-25.586	0.00	24.57	C
ATOM	215	CG2	VAL	28	-6.644	-18.610	-27.424	0.00	33.11	C
ATOM	216	C	VAL	28	-6.047	-19.825	-26.140	0.00	29.53	C
ATOM	217	O	VAL	28	-6.897	-19.768	-25.278	0.00	29.34	C
ATOM	218	N	ASN	29	-4.794	-19.266	-25.926	0.00	30.42	N
ATOM	219	CA	ASN	29	-4.353	-18.742	-24.648	0.00	31.34	C
ATOM	220	CB	ASN	29	-2.888	-19.197	-24.485	0.00	30.77	C
ATOM	221	CG	ASN	29	-2.812	-20.733	-24.597	0.00	34.34	C
ATOM	222	OD1	ASN	29	-3.588	-21.847	-25.669	0.00	39.70	C
ATOM	223	ND2	ASN	29	-2.460	-21.224	-25.794	0.00	29.44	M
ATOM	224	C	ASN	29	-4.581	-17.222	-24.761	0.00	32.11	C
ATOM	225	O	ASN	29	-3.691	-16.479	-25.145	0.00	32.48	C
ATOM	226	N	ARG	30	-5.855	-16.808	-24.504	0.00	33.15	N
ATOM	227	CA	LEU	30	-6.313	-15.468	-24.910	0.00	34.39	C
ATOM	228	CB	LEU	30	-7.685	-16.218	-26.623	0.00	26.21	C
ATOM	229	CG	LEU	30	-8.762	-14.493	-27.748	0.00	21.19	C
ATOM	230	CD1	LEU	30	-8.476	-13.046	-25.741	0.00	25.71	C
ATOM	231	CD2	LEU	30	-6.322	-14.518	-22.711	0.00	35.35	C
ATOM	232	C	LEU	30	-7.291	-14.343	-22.973	0.00	35.07	C
ATOM	233	N	ILE	31	-5.141	-13.892	-23.596	0.00	35.89	N
ATOM	234	N	ILE	31	-4.942	-12.988	-22.451	0.00	37.47	C
ATOM	235	CA	ILE	31	-3.469	-13.135	-21.948	0.00	39.18	C
ATOM	236	CB	ILE	31	-2.416	-13.523	-23.010	0.00	45.24	C
ATOM	237	CG2	ILE	31	-3.048	-11.923	-21.099	0.00	33.67	C
ATOM	238	OG1	ILE	31	-1.833	-12.174	-20.139	0.00	31.37	C
ATOM	239	C	ILE	31	-5.382	-11.581	-22.919	0.00	38.22	C
ATOM	240	C	ILE	31	-4.715	-10.820	-23.811	0.00	38.78	C
ATOM	241	O	ILE	31	-6.626	-11.325	-22.478	0.00	36.66	C
ATOM	242	CB	GLN	32	-7.335	-10.104	-22.803	0.00	39.54	C
ATOM	243	CA	GLN	32	-8.857	-10.338	-22.726	0.00	29.25	C
ATOM	244	CB	GLN	32	-5.332	-10.485	-21.103	0.00	20.29	C
ATOM	245	CG	GLN	32	-10.374	-9.498	-24.604	0.00	30.75	C
ATOM	246	C	GLN	32	-11.205	-9.483	-25.487	0.00	38.54	C
ATOM	247	OE1	GLN	32	-10.117	-8.086	-24.088	0.00	25.17	C
ATOM	248	ME2	GLN	32	-6.869	-8.893	-21.824	0.00	41.05	N
ATOM	249	C	GLN	32	-7.195	-8.045	-20.627	0.00	41.15	N
ATOM	250	O	GLN	32	-6.476	-7.897	-22.410	0.00	41.56	N
ATOM	251	N	ARG	33	-6.519	-6.111	-21.585	0.00	41.97	C
ATOM	252	CA	ARG	33	-5.713	-5.626	-22.256	0.00	37.98	C
ATOM	253	CB	ARG	33	-5.461	-4.451	-21.327	0.00	39.14	C
ATOM	254	CG	ARG	33	-4.256	-3.598	-21.836	0.00	41.77	C
ATOM	255	CD	ARG	33	-4.124	-2.460	-21.100	0.00	43.63	C
ATOM	256	C	ARG	33	-3.502	-1.405	-21.639	0.00	45.72	C

Fig. 1

ATOM	388	O	ALA	50	-3.007	21.518	-14.780	0.00	72.42	O
ATOM	389	N	VAL	51	-4.760	20.121	-14.241	0.00	71.59	N
ATOM	390	CA	VAL	51	-5.792	21.047	-16.277	0.00	70.95	C
ATOM	391	CB	VAL	51	-7.153	20.353	-14.922	0.00	71.84	C
ATOM	392	CG1	VAL	51	-7.806	19.826	-13.638	0.00	72.20	C
ATOM	393	CG2	VAL	51	-8.127	21.263	-15.492	0.00	72.97	C
ATOM	394	C	VAL	51	-5.864	22.231	-13.791	0.00	71.98	C
ATOM	395	O	VAL	51	-6.092	23.399	-14.273	0.00	72.58	O
ATOM	396	N	ALA	52	-5.610	22.076	-12.478	0.00	71.50	N
ATOM	397	CA	ALA	52	-5.587	23.168	-11.496	0.00	70.36	C
ATOM	398	CB	ALA	52	-4.824	22.676	-10.257	0.00	75.30	C
ATOM	399	C	ALA	52	-5.005	24.522	-12.028	0.00	69.08	C
ATOM	400	O	ALA	52	-5.729	25.486	-12.272	0.00	69.47	O
ATOM	401	N	LVS	53	-3.664	24.560	-12.198	0.00	67.33	N
ATOM	402	CA	LVS	53	-2.990	25.786	-12.585	0.00	65.33	C
ATOM	403	CB	LVS	53	-1.463	26.599	-11.587	0.00	52.42	C
ATOM	404	CG	LVS	53	-0.974	24.496	-13.611	0.00	43.64	C
ATOM	405	CD	LVS	53	-0.961	23.093	-13.005	0.00	40.72	C
ATOM	406	CE	LVS	53	-0.152	23.041	-11.721	0.00	38.03	C
ATOM	407	CE1	LVS	53	-0.028	21.679	-11.050	0.00	42.41	N
ATOM	408	C	LVS	53	-3.541	26.400	-13.879	0.00	65.20	C
ATOM	409	O	LVS	53	-3.529	27.611	-14.013	0.00	65.66	O
ATOM	410	N	LVS	54	-4.046	25.555	-14.805	0.00	64.58	N
ATOM	411	CA	LVS	54	-4.596	26.110	-16.039	0.00	63.62	C
ATOM	412	CB	LVS	54	-4.353	25.079	-17.165	0.00	60.45	C
ATOM	413	CG1	LVS	54	-5.015	23.721	-16.918	0.00	56.79	C
ATOM	414	CG2	LVS	54	-4.648	25.625	-18.565	0.00	59.02	C
ATOM	415	CD1	LVS	54	-3.724	26.789	-18.910	0.00	56.44	C
ATOM	416	C	LVS	54	-6.057	26.619	-15.839	0.00	63.44	C
ATOM	417	O	LVS	54	-6.581	27.359	-16.650	0.00	63.17	O
ATOM	418	N	GLN	55	-6.622	26.208	-14.494	0.00	63.61	N
ATOM	419	CA	GLN	55	-7.929	26.645	-14.218	0.00	63.59	C
ATOM	420	CB	GLN	55	-9.363	25.443	-13.498	0.00	60.05	C
ATOM	421	CG	GLN	55	-9.594	24.713	-14.359	0.00	52.95	C
ATOM	422	CD	GLN	55	-10.906	25.491	-14.288	0.00	49.82	C
ATOM	423	CE1	GLN	55	-10.970	26.540	-13.479	0.00	47.57	O
ATOM	424	CE2	GLN	55	-11.952	24.892	-14.873	0.00	44.88	C
ATOM	425	C	GLN	55	-7.816	27.926	-13.343	0.00	63.75	C
ATOM	426	O	GLN	55	-8.789	28.645	-13.119	0.00	63.46	O
ATOM	427	N	MET	56	-6.557	28.214	-12.924	0.00	63.92	N
ATOM	428	CA	MET	56	-6.214	29.565	-12.458	0.00	64.11	C
ATOM	429	CB	MET	56	-4.870	29.602	-11.699	0.00	51.74	C
ATOM	430	CG	MET	56	-4.911	29.093	-12.264	0.00	51.60	C
ATOM	431	CD	MET	56	-5.198	27.282	-10.190	0.00	39.11	S
ATOM	432	CE	MET	56	-4.921	26.994	-8.435	0.00	41.61	C
ATOM	433	C	MET	56	-6.183	30.548	-13.651	0.00	65.33	C
ATOM	434	O	MET	56	-6.268	31.765	-13.498	0.00	65.85	O
ATOM	435	N	ALA	57	-6.123	29.948	-14.860	0.00	65.73	N
ATOM	436	CA	ALA	57	-6.262	30.718	-16.098	0.00	66.72	C
ATOM	437	CB	ALA	57	-5.029	30.403	-16.963	0.00	67.72	C
ATOM	438	C	ALA	57	-7.522	30.301	-16.885	0.00	67.72	C
ATOM	439	O	ALA	57	-7.463	30.122	-18.093	0.00	67.93	O
ATOM	440	N	ARG	58	-10.131	29.131	-16.885	0.00	66.85	N
ATOM	441	CA	ARG	58	-9.839	29.459	-16.722	0.00	70.15	C
ATOM	442	CB	ARG	58	-10.819	29.072	-15.590	0.00	62.10	C
ATOM	443	CG	ARG	58	-11.449	30.229	-14.796	0.00	54.54	C
ATOM	444	CD	ARG	58	-12.124	29.770	-13.953	0.00	51.60	C
ATOM	445	CE	ARG	58	-13.192	28.823	-13.773	0.00	55.14	N
ATOM	446	C	ARG	58	-13.447	27.757	-12.975	0.00	58.91	C
ATOM	447	OH	ARG	58	-12.954	27.650	-13.734	0.00	60.81	O
ATOM	448	NH2	ARG	58	-14.192	26.786	-13.483	0.00	59.46	N
ATOM	449	C	ARG	58	-10.571	30.098	-17.962	0.00	71.97	C
ATOM	450	O	ARG	58	-10.952	29.369	-18.875	0.00	72.73	O
ATOM	451	N	PRO	59	-11.800	45.451	-18.002	0.00	72.85	N
ATOM	452	CD	PRO	59	-10.218	32.452	-17.103	0.00	72.85	C

Fig. 1

ATOM	453	CA	PRO	59	-11.768	32.067	-18.938	0.00	73.19	C
ATOM	454	CB	PRO	59	-12.055	33.411	-18.258	0.00	72.83	O
ATOM	455	CG	PRO	59	-10.702	33.783	-17.473	0.00	72.89	C
ATOM	456	C	PRO	59	-11.269	32.406	-20.355	0.00	73.41	C
ATOM	457	O	PRO	59	-11.487	33.522	-20.840	0.00	73.70	O
ATOM	458	N	PRO	60	-10.989	31.441	-21.010	0.00	73.17	C
ATOM	459	CA	PRO	60	-9.500	31.757	-22.267	0.00	72.43	C
ATOM	460	CB	PRO	60	-9.417	30.486	-22.979	0.00	57.87	C
ATOM	461	CG	PRO	60	-10.420	29.740	-22.152	0.00	45.70	C
ATOM	462	CD1	PRO	60	-8.850	28.876	-21.156	0.00	37.12	C
ATOM	463	CD2	PRO	60	-7.059	29.900	-22.376	0.00	40.86	C
ATOM	464	CE1	PRO	60	-7.932	28.197	-20.377	0.00	36.08	C
ATOM	465	CE2	PRO	60	-6.134	29.188	-21.625	0.00	49.97	C
ATOM	466	CZ	PRO	60	-6.581	28.342	-20.623	0.00	39.94	C
ATOM	467	C	PRO	60	-10.765	32.558	-23.267	0.00	73.07	C
ATOM	468	O	PRO	60	-11.924	32.309	-23.033	0.00	72.91	O
ATOM	469	N	THR	61	-10.068	33.492	-23.945	0.00	73.88	N
ATOM	470	CA	THR	61	-10.586	34.180	-25.121	0.00	74.70	C
ATOM	471	CB	THR	61	-8.839	35.528	-25.297	0.00	73.28	C
ATOM	472	CG1	THR	61	-8.436	35.383	-25.309	0.00	73.70	C
ATOM	473	CG2	THR	61	-10.130	36.532	-24.179	0.00	69.38	C
ATOM	474	C	THR	61	-10.464	35.297	-26.381	0.00	75.31	C
ATOM	475	O	THR	61	-11.219	35.259	-27.304	0.00	75.48	O
ATOM	476	N	ASP	62	-9.223	32.636	-26.385	0.00	76.00	N
ATOM	477	CA	ASP	62	-8.828	31.812	-27.514	0.00	76.85	C
ATOM	478	CB	ASP	62	-11.404	31.305	-27.274	0.00	74.31	C
ATOM	479	CG	ASP	62	-6.919	30.560	-29.509	0.00	20.00	C
ATOM	480	OD1	ASP	62	-6.804	31.157	-29.571	0.00	20.00	C
ATOM	481	OD2	ASP	62	-6.642	29.381	-28.440	0.00	20.00	O
ATOM	482	C	ASP	62	-9.769	30.593	-27.687	0.00	71.54	C
ATOM	483	O	ASP	62	-9.970	29.811	-26.756	0.00	77.41	O
ATOM	484	N	PRO	63	-10.331	30.417	-28.917	0.00	77.91	N
ATOM	485	CD	PRO	63	-10.287	31.967	-29.915	0.00	71.30	C
ATOM	486	CA	PRO	63	-11.135	29.226	-28.206	0.00	76.00	C
ATOM	487	CB	PRO	63	-11.509	29.389	-30.691	0.00	78.27	C
ATOM	488	CG	PRO	63	-11.398	30.690	-30.966	0.00	78.35	C
ATOM	489	C	PRO	63	-10.450	27.861	-28.980	0.00	71.74	C
ATOM	490	O	PRO	63	-11.100	26.823	-28.836	0.00	77.56	O
ATOM	491	N	LVS	64	-8.094	27.886	-28.973	0.00	77.16	N
ATOM	492	N	LVS	64	-8.405	26.595	-28.935	0.00	76.05	C
ATOM	493	CB	LVS	64	-6.997	26.651	-29.537	0.00	76.43	C
ATOM	494	CG	LVS	64	-6.340	25.291	-29.754	0.00	77.64	C
ATOM	495	CD1	LVS	64	-4.991	25.434	-30.479	0.00	78.64	C
ATOM	496	CE	LVS	64	-4.139	24.166	-30.383	0.00	80.21	C
ATOM	497	NE	LVS	64	-4.416	23.156	-31.398	0.00	78.04	C
ATOM	498	C	LVS	64	-8.437	26.055	-27.512	0.00	75.40	C
ATOM	499	O	LVS	64	-8.946	24.968	-27.283	0.00	75.18	O
ATOM	500	N	TYR	65	-7.947	26.863	-26.557	0.00	74.20	N
ATOM	501	CA	TYR	65	-7.821	26.381	-25.168	0.00	72.61	C
ATOM	502	CB	TYR	65	-6.510	26.915	-24.529	0.00	71.30	C
ATOM	503	CG	TYR	65	-5.319	26.804	-25.470	0.00	69.05	C
ATOM	504	CD1	TYR	65	-5.110	27.799	-26.412	0.00	67.80	C
ATOM	505	CD2	TYR	65	-4.100	27.713	-27.359	0.00	66.39	C
ATOM	506	CE	TYR	65	-4.420	25.736	-25.456	0.00	67.50	C
ATOM	507	CE2	TYR	65	-3.400	25.642	-26.402	0.00	66.72	C
ATOM	508	C	TYR	65	-3.246	26.625	-27.372	0.00	66.70	C
ATOM	509	O	TYR	65	-2.242	26.537	-28.358	0.00	66.50	O
ATOM	510	C	TYR	65	-9.129	26.615	-24.346	0.00	72.05	C
ATOM	511	O	TYR	65	-9.132	26.838	-23.145	0.00	71.39	C
ATOM	512	N	GLU	66	-7.247	26.538	-25.092	0.00	0.00	C
ATOM	513	CA	GLU	66	-11.532	27.075	-24.685	0.00	0.00	C
ATOM	514	CB	GLU	66	-12.455	27.023	-25.911	0.00	0.00	C
ATOM	515	CG	GLU	66	-13.696	27.457	-25.660	0.00	0.00	C
ATOM	516	CD	GLU	66	-14.215	27.851	-26.890	0.00	0.00	C
ATOM	517	CE1	GLU	66	-15.498	27.321	-27.447	0.00	0.00	C

ATOM	648	CA	PRO	82	-19.056	1.773	-19.840	0.00	52.68	C
ATOM	649	CB	PRO	82	-20.345	2.547	-19.541	0.00	52.47	C
ATOM	650	CD	PRO	82	-20.193	3.121	-18.412	0.00	52.59	C
ATOM	651	C	PRO	82	-18.766	1.731	-21.360	0.00	52.13	C
ATOM	652	O	PRO	82	-19.220	0.834	-22.080	0.00	52.69	C
ATOM	653	CH	PHE	83	-17.189	2.705	-21.913	0.00	51.76	C
ATOM	654	CD	PHE	83	-17.495	2.681	-23.201	0.00	50.44	C
ATOM	655	CB	PHE	83	-16.548	3.869	-23.433	0.00	38.14	C
ATOM	656	CG	PHE	83	-16.410	4.207	-24.093	0.00	29.91	C
ATOM	657	CD	PHE	83	-17.124	4.271	-26.430	0.00	27.30	C
ATOM	658	CD2	PHE	83	-15.572	3.472	-25.724	0.00	31.62	C
ATOM	659	CD1	PHE	83	-17.004	5.602	-26.772	0.00	25.71	C
ATOM	660	CE2	PHE	83	-15.448	1.795	-27.059	0.00	29.76	C
ATOM	661	CD	PHE	83	-16.168	4.862	-27.593	0.00	30.95	C
ATOM	662	C	PHE	83	-16.826	1.325	-23.512	0.00	51.12	C
ATOM	663	O	PHE	83	-17.176	0.079	-24.919	0.00	51.01	C
ATOM	664	N	GLY	84	-15.882	1.074	-22.881	0.00	51.55	N
ATOM	665	CA	GLY	84	-14.984	-0.076	-22.541	0.00	51.79	C
ATOM	666	C	GLY	84	-15.627	-1.366	-22.014	0.00	51.66	C
ATOM	667	CG	GLY	84	-15.055	-2.447	-22.130	0.00	52.35	C
ATOM	668	N	ALA	85	-16.843	-1.167	-21.460	0.00	51.13	N
ATOM	669	CA	ALA	85	-17.694	-2.277	-21.089	0.00	50.57	C
ATOM	670	CB	ALA	85	-18.955	-1.762	-20.238	0.00	37.47	C
ATOM	671	C	ALA	85	-18.217	-2.902	-22.369	0.00	50.42	C
ATOM	672	O	ALA	85	-18.046	-4.091	-22.626	0.00	50.85	C
ATOM	673	N	ASN	86	-18.809	-2.022	-23.174	0.00	49.61	N
ATOM	674	CA	ASN	86	-18.307	-2.412	-24.451	0.00	49.43	C
ATOM	675	CB	ASN	86	-20.213	-1.381	-25.009	0.00	53.75	C
ATOM	676	CG	ASN	86	-21.018	-1.879	-26.207	0.00	61.94	C
ATOM	677	CD1	ASN	86	-21.652	-1.978	-26.186	0.00	65.17	C
ATOM	678	CD2	ASN	86	-21.086	-0.977	-27.159	0.00	63.60	N
ATOM	679	C	ASN	86	-18.146	-2.932	-25.394	0.00	49.03	C
ATOM	680	O	ASN	86	-19.321	-3.666	-26.274	0.00	49.64	C
ATOM	681	N	GLN	87	-16.958	-2.218	-25.182	0.00	47.85	N
ATOM	682	CA	GLN	87	-15.790	-2.691	-25.930	0.00	45.79	C
ATOM	683	CB	GLN	87	-14.609	-1.712	-25.843	0.00	42.86	C
ATOM	684	CG	GLN	87	-13.543	-2.024	-26.904	0.00	40.47	C
ATOM	685	CD	GLN	87	-12.480	-0.927	-26.999	0.00	43.99	C
ATOM	686	CD1	GLN	87	-12.550	-0.048	-27.943	0.00	44.74	O
ATOM	687	NE2	GLN	87	-11.453	-1.067	-26.159	0.00	48.12	N
ATOM	688	C	GLN	87	-15.344	-4.101	-25.487	0.00	44.52	C
ATOM	689	O	GLN	87	-14.890	-4.900	-26.308	0.00	44.61	C
ATOM	690	N	SER	88	-15.472	-4.164	-24.165	0.00	33.66	N
ATOM	691	CA	SER	88	-15.208	-5.792	-23.812	0.00	42.07	C
ATOM	692	CB	SER	88	-15.093	-6.001	-22.290	0.00	41.43	C
ATOM	693	CG	SER	88	-15.913	-5.216	-21.461	0.00	43.74	C
ATOM	694	C	SER	88	-16.212	-6.726	-24.529	0.00	43.71	C
ATOM	695	O	SER	88	-15.826	-7.778	-25.030	0.00	42.88	C
ATOM	696	N	HIS	89	-17.490	-6.267	-24.609	0.00	39.86	N
ATOM	697	CA	HIS	89	-18.104	-7.025	-26.159	0.00	37.54	C
ATOM	698	CB	HIS	89	-18.860	-6.450	-25.484	0.00	31.63	C
ATOM	699	CG	HIS	89	-20.653	-6.311	-24.212	0.00	31.30	C
ATOM	700	MD1	HIS	89	-20.224	-5.722	-23.084	0.00	33.66	N
ATOM	701	CD1	HIS	89	-21.998	-6.669	-24.023	0.00	29.66	C
ATOM	702	NE2	HIS	89	-22.368	-6.275	-22.790	0.00	29.19	N
ATOM	703	CD1	HIS	89	-21.272	-5.711	-22.247	0.00	30.30	C
ATOM	704	C	HIS	89	-17.900	-7.301	-26.793	0.00	37.24	C
ATOM	705	O	HIS	89	-18.110	-8.388	-27.339	0.00	37.50	C
ATOM	706	N	GLN	90	-17.495	-6.171	-27.392	0.00	36.58	N
ATOM	707	CA	GLN	90	-17.189	-6.096	-28.816	0.00	35.50	C
ATOM	708	CB	GLN	90	-17.113	-4.644	-29.316	0.00	35.89	C
ATOM	709	CG	GLN	90	-17.916	-4.421	-30.616	0.00	40.24	C
ATOM	710	TD	GLN	90	-17.287	-5.111	-31.633	0.00	43.53	C
ATOM	711	CD1	GLN	90	-17.500	-6.284	-32.000	0.00	59.13	C
ATOM	712	NE2	GLN	90	-16.529	-4.186	-32.555	0.00	40.08	N

Fig. 1

ATOM	713	C	GLN	90	-15.981	-6.953	-29.195	0.00	34.37	C
ATOM	714	O	GLN	90	-16.092	-7.871	-29.998	0.00	35.60	C
ATOM	715	CD	THR	91	-14.850	-6.647	-28.534	0.00	34.10	C
ATOM	716	CA	THR	91	-13.676	-7.510	-28.667	0.00	33.93	C
ATOM	717	CB	THR	91	-12.472	-7.021	-27.833	0.00	33.11	C
ATOM	718	CG1	THR	91	-12.821	-6.696	-26.512	0.00	35.72	C
ATOM	719	CD2	THR	91	-11.789	-5.789	-28.437	0.00	30.50	C
ATOM	720	C	THR	91	-14.056	-8.975	-28.367	0.00	34.01	C
ATOM	721	O	THR	91	-13.713	-9.880	-29.119	0.00	34.46	C
ATOM	722	N	GLY	92	-14.858	-9.162	-27.304	0.00	32.97	C
ATOM	723	CA	GLY	92	-15.435	-10.480	-27.075	0.00	32.42	C
ATOM	724	C	GLY	92	-16.173	-11.073	-28.302	0.00	32.92	C
ATOM	725	O	GLY	92	-16.010	-12.238	-28.643	0.00	32.49	C
ATOM	726	N	THR	93	-17.023	-10.240	-28.934	0.00	35.18	C
ATOM	727	CA	THR	93	-17.899	-10.767	-29.983	0.00	32.81	C
ATOM	728	CB	THR	93	-18.041	-9.808	-30.570	0.00	32.66	C
ATOM	729	CG1	THR	93	-18.679	-9.448	-30.367	0.00	34.10	C
ATOM	730	CG2	THR	93	-20.229	-9.928	-29.412	0.00	37.31	C
ATOM	731	C	THR	93	-17.079	-11.146	-31.205	0.00	32.77	C
ATOM	732	CD	THR	93	-17.246	-12.152	-31.858	0.00	34.06	C
ATOM	733	N	ASP	94	-16.038	-10.310	-31.433	0.00	31.62	N
ATOM	734	CA	ASP	94	-14.937	-10.619	-32.327	0.00	31.49	C
ATOM	735	CB	ASP	94	-13.830	-9.548	-32.122	0.00	31.34	C
ATOM	736	CG	ASP	94	-13.510	-8.744	-33.402	0.00	36.59	C
ATOM	737	OD1	ASP	94	-13.505	-7.520	-33.362	0.00	34.76	C
ATOM	738	OD2	ASP	94	-13.215	-9.224	-34.453	0.00	30.68	C
ATOM	739	C	ASP	94	-14.455	-12.059	-32.050	0.00	32.53	C
ATOM	740	O	ASP	94	-14.514	-12.922	-32.917	0.00	31.71	C
ATOM	741	N	MET	95	-14.018	-12.306	-30.795	0.00	30.82	C
ATOM	742	CB	MET	95	-16.871	-15.867	-33.399	0.00	28.87	C
ATOM	743	CG	MET	95	-13.151	-13.727	-28.965	0.00	23.82	C
ATOM	744	CG	MET	95	-12.161	-12.674	-28.465	0.00	23.53	C
ATOM	745	SD	MET	95	-10.764	-12.452	-29.578	0.00	21.39	C
ATOM	746	CR	MET	95	-10.301	-10.811	-29.154	0.00	14.71	C
ATOM	747	C	MET	95	-14.520	-14.800	-30.768	0.00	30.17	C
ATOM	748	O	MET	95	-14.153	-15.920	-33.128	0.00	30.55	C
ATOM	749	CD	MET	95	-16.812	-14.435	-30.616	0.00	30.03	C
ATOM	750	CA	TYR	96	-16.841	-15.427	-30.912	0.00	29.37	C
ATOM	751	CB	TYR	96	-18.214	-14.947	-30.404	0.00	29.52	C
ATOM	752	CG	TYR	96	-18.920	-16.154	-32.801	0.00	31.53	C
ATOM	753	CD1	TYR	96	-18.586	-16.598	-28.596	0.00	31.67	C
ATOM	754	CD2	TYR	96	-19.036	-17.815	-28.117	0.00	31.58	C
ATOM	755	CE	TYR	96	-19.215	-16.891	-30.618	0.00	32.80	C
ATOM	756	CE2	TYR	96	-20.277	-18.115	-30.151	0.00	33.10	C
ATOM	757	CE	TYR	96	-19.849	-18.593	-28.921	0.00	33.69	C
ATOM	758	CH	TYR	96	-20.201	-18.859	-28.552	0.00	36.25	C
ATOM	759	C	TYR	96	-16.871	-15.867	-33.399	0.00	28.87	C
ATOM	760	O	TYR	96	-17.223	-16.999	-32.731	0.00	29.15	C
ATOM	761	N	THR	97	-16.477	-14.896	-33.249	0.00	28.98	N
ATOM	762	CA	THR	97	-16.402	-15.003	-34.708	0.00	28.74	C
ATOM	763	CB	THR	97	-16.804	-13.621	-35.264	0.00	23.57	C
ATOM	764	CD1	THR	97	-18.014	-13.141	-34.700	0.00	26.97	C
ATOM	765	CD2	THR	97	-17.007	-13.614	-36.779	0.00	14.78	C
ATOM	766	C	THR	97	-14.979	-15.414	-35.225	0.00	29.49	C
ATOM	767	O	THR	97	-14.607	-15.915	-36.340	0.00	30.41	C
ATOM	768	N	ARG	98	-13.991	-15.168	-34.351	0.00	29.30	C
ATOM	769	CA	ARG	98	-16.607	-15.587	-34.703	0.00	28.88	C
ATOM	770	CB	ARG	98	-11.611	-14.707	-33.859	0.00	25.94	C
ATOM	771	CG	ARG	98	-11.568	-13.245	-34.311	0.00	24.43	C
ATOM	772	CD	ARG	98	-12.762	-12.337	-35.353	0.00	24.77	C
ATOM	773	NE	ARG	98	-11.045	-10.948	-33.707	0.00	26.81	N
ATOM	774	CE	ARG	98	-10.208	-9.895	-33.560	0.00	25.85	C
ATOM	775	NH1	ARG	98	-9.021	-10.011	-32.988	0.00	22.02	C
ATOM	776	NH2	ARG	98	-10.586	-10.586	-32.988	0.00	28.12	N
ATOM	777	C	ARG	98	-12.379	-17.054	-34.224	0.00	29.06	C

ATOM	908	CG	ASP	116	-8.181	-3.016	-9.747	0.00	43.68	C
ATOM	909	ODI	ASP	116	-8.368	-2.673	-10.308	0.00	48.61	C
ATOM	910	GD	ASP	116	-8.187	-2.198	-8.825	0.00	41.77	C
ATOM	911	C	ASP	116	-10.260	-4.833	-10.611	0.00	36.50	C
ATOM	912	O	ASP	116	-10.381	-5.344	-11.713	0.00	36.57	C
ATOM	913	N	GLN	117	-11.085	-3.869	-9.728	0.00	37.10	N
ATOM	914	CA	GLN	117	-12.446	-3.664	-10.540	0.00	37.04	C
ATOM	915	CB	GLN	117	-13.120	-2.524	-9.747	0.00	33.82	C
ATOM	916	CG	GLN	117	-14.600	-2.559	-9.728	0.00	32.46	C
ATOM	917	CD	GLN	117	-15.148	-3.792	-8.959	0.00	34.36	C
ATOM	918	OE1	GLN	117	-14.648	-4.122	-7.981	0.00	37.01	C
ATOM	919	NE2	GLN	117	-16.068	-4.455	-9.628	0.00	33.77	N
ATOM	920	C	GLN	117	-12.584	-3.403	-12.045	0.00	37.10	C
ATOM	921	O	GLN	117	-13.572	-3.778	-12.670	0.00	36.72	C
ATOM	922	N	ARG	118	-11.546	-2.748	-12.610	0.00	37.49	N
ATOM	923	CA	ARG	118	-11.619	-2.502	-14.053	0.00	38.33	C
ATOM	924	CB	ARG	118	-10.777	-1.367	-14.528	0.00	36.63	C
ATOM	925	CG	ARG	118	-9.343	-1.691	-14.963	0.00	39.31	C
ATOM	926	CD	ARG	118	-8.364	-1.814	-13.802	0.00	42.79	C
ATOM	927	NE	ARG	118	-6.935	-1.630	-14.290	0.00	41.71	N
ATOM	928	CZ	ARG	118	-5.935	-1.824	-13.474	0.00	43.29	C
ATOM	929	NH1	ARG	118	-6.098	-2.139	-12.201	0.00	39.75	N
ATOM	930	NH2	ARG	118	-4.707	-1.400	-13.941	0.00	42.53	N
ATOM	931	C	ARG	118	-11.530	-3.819	-14.798	0.00	39.23	C
ATOM	932	O	ARG	118	-12.287	-4.079	-15.739	0.00	38.71	C
ATOM	933	N	VAL	119	-10.604	-1.645	-14.295	0.00	40.02	N
ATOM	934	CA	VAL	119	-10.391	-5.944	-14.907	0.00	40.15	C
ATOM	935	CB	VAL	119	-9.070	-6.590	-14.459	0.00	37.76	C
ATOM	936	CG1	VAL	119	-8.776	-7.832	-15.310	0.00	40.52	C
ATOM	937	CG2	VAL	119	-7.902	-5.612	-14.046	0.00	39.75	C
ATOM	938	C	VAL	119	-11.583	-6.853	-14.630	0.00	40.40	C
ATOM	939	O	VAL	119	-12.130	-7.379	-15.561	0.00	40.59	C
ATOM	940	N	VAL	120	-11.834	-6.892	-13.338	0.00	39.52	N
ATOM	941	CA	VAL	120	-13.079	-7.843	-13.018	0.00	39.60	C
ATOM	942	CB	VAL	120	-13.300	-7.958	-11.494	0.00	35.91	C
ATOM	943	CG1	VAL	120	-14.356	-9.025	-11.155	0.00	31.19	C
ATOM	944	CG2	VAL	120	-11.896	-8.314	-10.763	0.00	35.60	C
ATOM	945	C	VAL	120	-14.342	-7.400	-13.797	0.00	40.21	C
ATOM	946	O	VAL	120	-14.972	-8.223	-14.454	0.00	40.76	C
ATOM	947	N	ASP	121	-14.614	-6.091	-13.766	0.00	40.37	N
ATOM	948	CA	ASP	121	-15.860	-5.673	-14.521	0.00	40.32	C
ATOM	949	CB	ASP	121	-16.312	-4.224	-14.209	0.00	43.45	C
ATOM	950	CG	ASP	121	-17.119	-3.988	-12.914	0.00	45.43	C
ATOM	951	OD1	ASP	121	-17.920	-4.833	-12.511	0.00	45.83	C
ATOM	952	OD2	ASP	121	-16.979	-2.919	-12.323	0.00	52.60	C
ATOM	953	C	ASP	121	-15.651	-5.837	-16.052	0.00	39.84	C
ATOM	954	O	ASP	121	-16.612	-6.049	-16.778	0.00	39.75	C
ATOM	955	N	SER	122	-14.398	-5.730	-16.550	0.00	39.73	N
ATOM	956	CA	SER	122	-14.184	-5.956	-17.579	0.00	39.08	C
ATOM	957	CB	SER	122	-12.771	-5.604	-16.435	0.00	35.11	C
ATOM	958	CG	SER	122	-12.515	-4.226	-18.384	0.00	35.95	C
ATOM	959	C	SER	122	-14.374	-7.423	-18.310	0.00	38.55	C
ATOM	960	O	SER	122	-14.753	-7.776	-19.414	0.00	37.84	C
ATOM	961	N	SER	123	-14.091	-6.249	-17.292	0.00	38.31	N
ATOM	962	CA	SER	123	-14.344	-6.661	-17.415	0.00	38.10	C
ATOM	963	CB	SER	123	-13.955	-10.460	-16.233	0.00	39.15	C
ATOM	964	CG	SER	123	-12.121	-10.091	-16.064	0.00	39.23	C
ATOM	965	C	SER	123	-15.870	-9.889	-17.515	0.00	37.83	C
ATOM	966	O	SER	123	-16.333	-10.607	-18.390	0.00	37.88	C
ATOM	967	N	THR	124	-16.642	-9.237	-16.656	0.00	31.31	N
ATOM	968	CA	THR	124	-18.084	-9.498	-16.617	0.00	37.62	C
ATOM	969	CB	THR	124	-18.681	-8.945	-15.303	0.00	39.02	C
ATOM	970	CG1	THR	124	-18.346	-7.581	-13.114	0.00	33.71	C
ATOM	971	CG2	THR	124	-18.577	-5.623	-13.070	0.00	33.19	C
ATOM	972	C	THR	124	-18.767	-8.866	-17.850	0.00	37.91	C

Fig. 1

ATOM	973	O	THR	124	-19.737	-9.364	-18.408	0.00	37.62	O
ATOM	974	N	ASN	125	-18.188	-7.749	-18.275	0.00	38.18	N
ATOM	975	O	ASN	125	-18.681	-7.079	-19.459	0.00	38.71	C
ATOM	976	CB	ASN	125	-18.277	-5.608	-19.421	0.00	43.22	C
ATOM	977	CG	ASN	125	-19.296	-4.895	-18.537	0.00	49.50	C
ATOM	978	OD1	ASN	125	-20.297	-4.400	-19.032	0.00	44.96	C
ATOM	979	OD2	ASN	125	-19.101	-4.947	-17.223	0.00	56.15	C
ATOM	980	C	ASN	125	-18.233	-7.807	-20.716	0.00	38.69	C
ATOM	981	O	ASN	125	-18.920	-7.832	-21.726	0.00	38.53	C
ATOM	982	N	TRP	126	-17.080	-8.479	-20.646	0.00	38.39	N
ATOM	983	CA	TRP	126	-16.635	-9.261	-21.806	0.00	38.34	C
ATOM	984	CB	TRP	126	-15.206	-9.738	-21.561	0.00	34.59	C
ATOM	985	CG	TRP	126	-14.602	-10.505	-22.713	0.00	32.80	C
ATOM	986	CD2	TRP	126	-14.424	-11.935	-22.803	0.00	29.98	C
ATOM	987	CD3	TRP	126	-13.615	-12.176	-23.938	0.00	30.33	C
ATOM	988	CD1	TRP	126	-14.958	-12.974	-22.029	0.00	27.93	C
ATOM	989	C	TRP	126	-13.933	-9.958	-23.808	0.00	30.56	C
ATOM	990	NH1	TRP	126	-13.343	-10.943	-24.520	0.00	25.84	C
ATOM	991	CD2	TRP	126	-13.249	-12.458	-24.247	0.00	33.03	C
ATOM	992	C21	TRP	126	-14.504	-14.281	-22.349	0.00	30.89	C
ATOM	993	CH2	TRP	126	-13.695	-14.322	-23.458	0.00	34.31	C
ATOM	994	C	TRP	126	-17.545	-10.462	-22.009	0.00	39.16	C
ATOM	995	O	TRP	126	-18.141	-10.667	-23.066	0.00	38.55	C
ATOM	996	N	THR	127	-17.609	-11.222	-20.891	0.00	39.46	N
ATOM	997	CA	THR	127	-18.407	-12.432	-20.893	0.00	40.01	C
ATOM	998	CB	THR	127	-18.258	-13.157	-19.435	0.00	39.39	C
ATOM	999	CG1	THR	127	-18.778	-12.411	-18.359	0.00	42.14	C
ATOM	1000	CG2	THR	127	-16.838	-13.620	-19.098	0.00	43.12	C
ATOM	1001	C	THR	127	-19.865	-12.095	-21.164	0.00	40.31	C
ATOM	1002	O	THR	127	-20.560	-12.890	-21.196	0.00	40.83	C
ATOM	1003	N	ALA	128	-20.272	-10.845	-20.833	0.00	40.33	N
ATOM	1004	CA	ALA	128	-21.540	-10.343	-21.343	0.00	35.71	C
ATOM	1005	CB	ALA	128	-21.759	-9.890	-20.947	0.00	41.57	C
ATOM	1006	C	ALA	128	-21.648	-10.549	-22.865	0.00	39.02	C
ATOM	1007	O	ALA	128	-22.516	-11.284	-23.311	0.00	38.71	C
ATOM	1008	N	GLY	129	-20.733	-9.903	-23.622	0.00	38.26	N
ATOM	1009	CA	GLY	129	-20.812	-13.908	-25.093	0.00	37.61	C
ATOM	1010	C	GLY	129	-20.656	-11.334	-25.695	0.00	37.96	C
ATOM	1011	O	GLY	129	-21.219	-11.692	-26.725	0.00	39.27	C
ATOM	1012	N	PHE	130	-19.893	-12.160	-24.973	0.00	36.98	N
ATOM	1013	CA	PHE	130	-19.917	-13.579	-25.322	0.00	35.21	C
ATOM	1014	CB	PHE	130	-18.942	-14.343	-24.430	0.00	35.38	C
ATOM	1015	CG	PHE	130	-17.668	-15.474	-25.183	0.00	36.04	C
ATOM	1016	CD1	PHE	130	-17.398	-15.992	-25.516	0.00	39.27	C
ATOM	1017	CD2	PHE	130	-16.803	-13.672	-25.551	0.00	32.77	C
ATOM	1018	CH1	PHE	130	-16.223	-16.312	-26.179	0.00	39.06	C
ATOM	1019	CH2	PHE	130	-15.463	-13.894	-26.263	0.00	32.12	C
ATOM	1020	C2	PHE	130	-15.345	-15.309	-26.551	0.00	36.33	C
ATOM	1021	C	PHE	130	-21.358	-14.171	-25.175	0.00	35.23	C
ATOM	1022	O	PHE	130	-21.438	-14.864	-26.053	0.00	34.57	C
ATOM	1023	N	GLY	131	-21.952	-13.882	-24.029	0.00	35.32	N
ATOM	1024	CA	GLY	131	-23.326	-14.310	-23.846	0.00	36.05	C
ATOM	1025	C	GLY	131	-24.234	-13.745	-24.954	0.00	37.28	C
ATOM	1026	O	GLY	131	-25.057	-14.460	-25.520	0.00	37.86	C
ATOM	1027	N	ASP	132	-24.006	-12.460	-25.303	0.00	38.02	N
ATOM	1028	CA	ASP	132	-24.771	-11.510	-26.421	0.00	38.83	C
ATOM	1029	CB	ASP	132	-24.482	-10.417	-26.619	0.00	41.32	C
ATOM	1030	CG	ASP	132	-25.619	-9.773	-27.429	0.00	49.07	C
ATOM	1031	OD1	ASP	132	-25.326	-9.066	-28.384	0.00	56.82	C
ATOM	1032	OD2	ASP	132	-24.954	-9.343	-27.089	0.00	54.33	C
ATOM	1033	C	ASP	132	-24.575	-12.719	-27.727	0.00	39.38	C
ATOM	1034	O	ASP	132	-25.521	-13.214	-28.316	0.00	39.70	C
ATOM	1035	N	ALA	133	-23.296	-12.303	-29.116	0.00	39.49	N
ATOM	1036	CA	ALA	133	-24.381	-12.631	-29.311	0.00	39.07	C
ATOM	1037	CB	ALA	133	-21.445	-13.869	-29.400	0.00	32.65	C

ATOM	1168	OG	ASN	151	0.785	-15.133	-4.761	0.00	49.16	C
ATOM	1169	OG1	ASN	151	0.819	-16.348	-4.874	0.00	57.86	O
ATOM	1170	NH	ASN	151	1.853	-14.366	-4.807	0.00	50.55	N
ATOM	1171	C	ASN	151	-1.481	-13.606	-6.960	0.00	47.53	C
ATOM	1172	O	ASN	151	-2.815	-14.273	-6.844	0.00	48.05	O
ATOM	1173	N	ASN	152	-0.940	-11.167	-8.137	0.00	43.24	N
ATOM	1174	CA	CYS	152	-1.537	-13.427	-9.408	0.00	44.85	C
ATOM	1175	CB	CYS	152	-2.597	-12.337	-9.564	0.00	40.75	C
ATOM	1176	SG	CYS	152	-3.238	-12.028	-11.215	0.00	40.32	S
ATOM	1177	O	CYS	152	-0.434	-13.353	-10.498	0.00	44.66	C
ATOM	1178	O	CYS	152	0.597	-12.708	-10.317	0.00	44.71	C
ATOM	1179	N	THR	153	-0.736	-14.052	-11.624	0.00	44.49	N
ATOM	1180	CA	THR	153	0.007	-13.987	-12.857	0.00	43.41	C
ATOM	1181	CB	THR	153	-0.059	-15.301	-13.628	0.00	36.56	C
ATOM	1182	OG1	THR	153	-1.383	-15.540	-14.047	0.00	39.90	O
ATOM	1183	CD	THR	153	-0.409	-16.550	-12.923	0.00	33.43	C
ATOM	1184	C	THR	153	-0.409	-12.789	-13.652	0.00	43.81	C
ATOM	1185	O	THR	153	0.352	-11.940	-14.104	0.00	43.85	O
ATOM	1186	N	LEU	154	-1.741	-12.753	-13.800	0.00	44.59	N
ATOM	1187	CA	LEU	154	-2.375	-11.763	-14.667	0.00	44.59	C
ATOM	1188	CB	LEU	154	-3.797	-12.233	-15.016	0.00	42.96	C
ATOM	1189	CG	LEU	154	-3.915	-13.661	-15.560	0.00	43.95	C
ATOM	1190	CD	LEU	154	-5.386	-12.943	-15.858	0.00	42.67	C
ATOM	1191	CD2	LEU	154	-3.047	-13.904	-16.801	0.00	45.97	C
ATOM	1192	C	LEU	154	-2.516	-10.359	-14.039	0.00	45.45	C
ATOM	1193	O	LEU	154	-3.367	-9.597	-14.481	0.00	49.25	O
ATOM	1194	N	CYS	155	-1.707	-10.045	-12.996	0.00	45.68	N
ATOM	1195	CA	CYS	155	-1.955	-8.846	-12.190	0.00	46.23	C
ATOM	1196	CB	CYS	155	-2.509	-9.228	-10.820	0.00	40.36	C
ATOM	1197	CG	CYS	155	-2.968	-6.715	-7.934	0.00	50.11	C
ATOM	1198	C	CYS	155	-0.635	-8.124	-11.923	0.00	47.11	C
ATOM	1199	O	CYS	155	0.376	-8.746	-11.662	0.00	46.43	O
ATOM	1200	N	ASN	156	-0.687	-6.769	-11.973	0.00	48.51	N
ATOM	1201	CA	ASN	156	0.528	-5.973	-12.050	0.00	49.46	C
ATOM	1202	CB	ASN	156	0.192	-4.510	-12.380	0.00	49.15	C
ATOM	1203	CG	ASN	156	-0.602	-3.754	-11.305	0.00	47.93	C
ATOM	1204	CD	ASN	156	-0.015	-2.809	-10.598	0.00	51.21	C
ATOM	1205	ND2	ASN	156	-1.929	-4.028	-11.300	0.00	47.84	N
ATOM	1206	C	ASN	156	1.405	-5.937	-10.811	0.00	50.10	C
ATOM	1207	O	ASN	156	2.459	-5.305	-10.838	0.00	51.23	O
ATOM	1208	N	ASN	157	0.889	-6.492	-9.704	0.00	50.15	N
ATOM	1209	CA	ASN	157	1.365	-5.956	-8.434	0.00	49.74	C
ATOM	1210	CB	ASN	157	2.102	-6.208	-6.398	0.00	42.26	C
ATOM	1211	CG	ASN	157	-0.824	-5.046	-7.721	0.00	20.00	C
ATOM	1212	OD1	ASN	157	-0.722	-3.839	-7.526	0.00	20.00	C
ATOM	1213	ND2	ASN	157	-1.823	-5.653	-6.345	0.00	20.00	N
ATOM	1214	C	ASN	157	-1.968	-6.715	-7.934	0.00	50.11	C
ATOM	1215	O	ASN	157	2.576	-7.215	-6.843	0.00	50.10	O
ATOM	1216	N	MET	158	3.576	-6.682	-6.799	0.00	50.64	N
ATOM	1217	CA	MET	158	4.790	-7.511	-6.613	0.00	51.39	C
ATOM	1218	CB	MET	158	4.755	-8.524	-9.760	0.00	47.01	C
ATOM	1219	CG	MET	158	3.457	-9.340	-9.891	0.00	44.89	C
ATOM	1220	SD	MET	158	3.102	-10.289	-9.398	0.00	42.36	S
ATOM	1221	CE	MET	158	1.308	-10.114	-8.381	0.00	34.26	C
ATOM	1222	C	MET	158	5.970	-6.616	-8.570	0.00	52.23	C
ATOM	1223	O	MET	158	6.001	-5.488	-9.069	0.00	52.94	O
ATOM	1224	N	CYS	159	6.966	-7.263	-7.939	0.00	52.52	N
ATOM	1225	CA	CYS	159	8.320	-6.766	-7.790	0.00	52.23	C
ATOM	1226	CB	CYS	159	9.103	-7.116	-9.047	0.00	42.09	C
ATOM	1227	CG	CYS	159	8.107	-5.968	-8.143	0.00	46.41	C
ATOM	1228	C	CYS	159	8.411	-5.265	-7.550	0.00	54.30	C
ATOM	1229	O	CYS	159	8.495	-4.496	-8.498	0.00	54.48	O
ATOM	1230	N	PRO	160	8.455	-4.857	-6.257	0.00	55.03	N
ATOM	1231	CA	PRO	160	8.116	-5.650	-5.075	0.00	54.95	C
ATOM	1232	CB	PRO	160	8.929	-3.530	-5.947	0.00	55.67	C

Fig. 1

ATOM	1233	CB	PRO	160	8.468	-3.316	-4.503	0.00	55.61	C
ATOM	1234	CG	PRO	160	8.281	-4.709	-3.894	0.00	55.23	C
ATOM	1235	C	PRO	160	10.457	-3.549	-6.089	0.00	55.88	C
ATOM	1236	O	PRO	160	11.219	-3.621	-5.120	0.00	55.86	O
ATOM	1237	N	ASN	161	10.850	-3.416	-7.388	0.00	56.12	N
ATOM	1238	CA	ASN	161	12.233	-3.313	-7.833	0.00	57.12	C
ATOM	1239	CB	ASN	161	13.157	-4.399	-7.243	0.00	49.59	C
ATOM	1240	CG	ASN	161	13.955	-3.899	-6.033	0.00	49.33	C
ATOM	1241	CD	ASN	161	14.436	-2.731	-6.027	0.00	36.34	C
ATOM	1242	ND2	ASN	161	14.022	-4.806	-5.038	0.00	41.76	N
ATOM	1243	C	ASN	161	12.381	-3.343	-9.371	0.00	58.76	C
ATOM	1244	O	ASN	161	13.523	-3.371	-9.817	0.00	59.20	O
ATOM	1245	N	GLU	162	11.285	-3.312	-10.183	0.00	55.91	N
ATOM	1246	CA	GLU	162	11.537	-3.053	-11.610	0.00	61.69	C
ATOM	1247	CB	GLU	162	10.309	-3.340	-12.506	0.00	60.88	C
ATOM	1248	CG	GLU	162	9.027	-3.819	-11.800	0.00	59.54	C
ATOM	1249	CD	GLU	162	8.225	-2.703	-11.126	0.00	59.92	C
ATOM	1250	OE1	GLU	162	7.039	-2.579	-11.400	0.00	57.89	O
ATOM	1251	OE2	GLU	162	8.751	-1.980	-10.285	0.00	59.66	O
ATOM	1252	GLU	162	12.042	-1.597	-11.795	0.00	62.98	C	
ATOM	1253	O	GLU	162	11.295	-0.630	-11.644	0.00	63.91	O
ATOM	1254	N	VAL	163	13.346	-1.484	-12.094	0.00	63.63	N
ATOM	1255	CA	VAL	163	13.838	-0.136	-12.137	0.00	64.19	C
ATOM	1256	CB	VAL	163	15.448	-0.245	-11.870	0.00	65.29	C
ATOM	1257	CG1	VAL	163	16.137	-1.326	-12.721	0.00	65.65	C
ATOM	1258	CG2	VAL	163	16.113	1.138	-11.980	0.00	65.03	C
ATOM	1259	C	VAL	163	13.605	0.498	-13.488	0.00	64.51	C
ATOM	1260	O	VAL	163	14.146	0.136	-14.527	0.00	64.74	O
ATOM	1261	N	ASP	164	12.672	1.468	-13.425	0.00	65.31	N
ATOM	1262	CA	ASP	164	14.372	-3.339	-14.064	0.00	66.33	C
ATOM	1263	CB	ASP	164	12.724	19.231	-14.592	0.00	66.40	C
ATOM	1264	CG	ASP	164	10.928	2.902	-14.247	0.00	72.73	C
ATOM	1265	OD1	ASP	164	10.507	3.959	-15.260	0.00	75.87	O
ATOM	1266	OD2	ASP	164	10.089	5.627	-16.367	0.00	75.36	O
ATOM	1267	C	ASP	164	10.596	5.118	-14.810	0.00	77.49	C
ATOM	1268	O	ASP	164	13.424	3.113	-15.018	0.00	66.30	O
ATOM	1269	N	ASP	164	14.372	-3.339	-14.064	0.00	66.33	N
ATOM	1270	CA	GLY	165	13.348	3.548	-15.289	0.00	65.91	C
ATOM	1271	C	GLY	165	14.276	5.771	-16.268	0.00	64.62	C
ATOM	1272	O	GLY	165	15.156	6.241	-15.104	0.00	64.65	O
ATOM	1273	N	ASP	166	15.425	6.423	-16.012	0.00	64.00	N
ATOM	1274	CA	ASP	166	15.331	7.850	-16.681	0.00	62.60	C
ATOM	1275	CB	ASP	166	16.595	6.343	-14.963	0.00	62.77	C
ATOM	1276	CG	ASP	166	17.759	8.582	-15.930	0.00	20.00	C
ATOM	1277	OD1	ASP	166	18.206	7.614	-16.531	0.00	20.00	O
ATOM	1278	OD2	ASP	166	18.212	9.708	-16.095	0.00	20.00	O
ATOM	1279	OD2	ASP	166	14.962	8.700	-15.882	0.00	61.75	O
ATOM	1280	O	ASP	166	14.267	9.706	-16.818	0.00	61.89	O
ATOM	1281	N	GLU	167	15.418	8.229	-16.109	0.00	60.86	N
ATOM	1282	CA	GLU	167	15.303	9.921	-19.391	0.00	55.56	C
ATOM	1283	CB	GLU	167	16.123	8.137	-20.447	0.00	52.68	C
ATOM	1284	CG	GLU	167	15.862	6.619	-20.441	0.00	51.63	C
ATOM	1285	OD	GLU	167	16.392	6.463	-19.717	0.00	55.63	O
ATOM	1286	OD1	GLU	167	16.837	5.558	-19.531	0.00	56.63	O
ATOM	1287	OD2	GLU	167	18.006	5.602	-20.348	0.00	53.65	C
ATOM	1288	C	GLU	167	13.911	9.228	-19.325	0.00	59.47	C
ATOM	1289	N	SRP	168	13.761	8.830	-20.977	0.00	58.49	N
ATOM	1290	N	SRP	168	12.860	8.789	-19.178	0.00	59.62	C
ATOM	1291	CA	SRP	168	11.528	9.251	-19.376	0.00	59.85	C
ATOM	1292	CB	SRP	168	10.457	8.457	-18.434	0.00	59.28	C
ATOM	1293	CG	SRP	168	10.930	8.130	-17.519	0.00	60.00	C
ATOM	1294	C	SRP	168	11.447	10.772	-19.340	0.00	59.87	O
ATOM	1295	O	SRP	168	10.773	11.519	-20.046	0.00	59.85	O
ATOM	1296	N	THR	169	12.563	11.663	-20.219	0.00	59.59	N
ATOM	1297	CA	THR	169	12.547	12.258	-18.032	0.00	55.28	C

ATOM	1428	CB	ALA	186	-2.328	28.665	-24.470	0.00	54.07	C
ATOM	1429	C	ALA	186	-2.647	30.598	-22.854	0.00	56.60	C
ATOM	1430	C	ALA	186	-3.571	31.387	-22.880	0.00	57.99	C
ATOM	1431	N	ALA	187	-2.113	30.113	-21.735	0.00	58.92	O
ATOM	1432	CA	ALA	187	-2.359	30.734	-20.456	0.00	63.89	C
ATOM	1433	CA	ALA	187	-2.897	29.570	-19.513	0.00	69.15	C
ATOM	1434	C	ALA	187	-1.008	31.261	-19.964	0.00	67.67	C
ATOM	1435	O	ALA	187	-0.233	30.531	-19.361	0.00	71.19	O
ATOM	1436	N	PRO	188	-0.729	32.570	-20.205	0.00	69.15	N
ATOM	1437	CD	PRO	188	-1.539	33.480	-20.999	0.00	20.00	C
ATOM	1438	CA	PRO	188	0.448	33.212	-19.631	0.00	67.73	C
ATOM	1439	CB	PRO	188	0.437	34.629	-20.213	0.00	69.97	C
ATOM	1440	CD	PRO	188	-0.340	34.586	-21.365	0.00	20.00	C
ATOM	1441	C	PRO	188	0.419	33.303	-18.093	0.00	64.31	C
ATOM	1442	O	PRO	188	1.313	33.850	-17.465	0.00	63.85	O
ATOM	1443	CA	SER	189	-0.677	32.806	-17.506	0.00	60.37	C
ATOM	1444	CA	SER	189	-1.067	33.249	-16.189	0.00	62.46	C
ATOM	1445	CB	SER	189	-2.599	33.309	-16.171	0.00	64.76	C
ATOM	1446	CG	SER	189	-3.059	33.448	-17.451	0.00	66.03	C
ATOM	1447	CD	SER	189	-0.459	32.351	-15.057	0.00	62.94	C
ATOM	1448	O	SER	189	-0.322	32.894	-13.960	0.00	66.46	O
ATOM	1449	N	ALA	190	-0.317	31.074	-15.329	0.00	61.51	N
ATOM	1450	CA	ALA	190	-0.046	30.151	-14.278	0.00	61.64	C
ATOM	1451	CB	ALA	190	-1.335	29.315	-14.062	0.00	63.90	C
ATOM	1452	C	ALA	190	1.079	29.200	-14.774	0.00	60.36	C
ATOM	1453	O	ALA	190	1.406	29.226	-15.949	0.00	60.14	O
ATOM	1454	N	ASN	191	1.689	28.400	-13.899	0.00	59.40	N
ATOM	1455	CA	ASN	191	2.805	27.613	-14.421	0.00	58.24	C
ATOM	1456	CB	ASN	191	4.097	28.047	-13.735	0.00	60.20	C
ATOM	1457	CG	ASN	191	5.286	27.940	-14.685	0.00	58.63	C
ATOM	1458	CD	ASN	191	5.600	28.909	-13.371	0.00	59.05	C
ATOM	1459	ND	ASN	191	5.893	26.748	-14.731	0.00	59.60	N
ATOM	1460	C	ASN	191	2.484	26.136	-14.304	0.00	55.79	C
ATOM	1461	O	ASN	191	2.717	25.502	-13.281	0.00	52.03	O
ATOM	1462	N	LEU	192	1.964	25.645	-15.457	0.00	54.99	N
ATOM	1463	CA	LEU	192	2.007	24.221	-15.779	0.00	54.42	C
ATOM	1464	CB	LEU	192	1.416	24.004	-17.178	0.00	54.26	C
ATOM	1465	CG	LEU	192	-0.114	24.120	-17.203	0.00	41.30	C
ATOM	1466	CD	LEU	192	-0.582	24.524	-18.593	0.00	41.31	C
ATOM	1467	C	LEU	192	-0.765	22.791	-16.807	0.00	42.62	C
ATOM	1468	O	LEU	192	3.463	23.756	-15.764	0.00	54.57	O
ATOM	1469	O	LEU	192	4.274	24.164	-16.589	0.00	55.96	O
ATOM	1470	N	SER	193	1.740	22.908	-14.717	0.00	52.45	N
ATOM	1471	CA	SER	193	5.072	22.498	-14.384	0.00	52.67	C
ATOM	1472	CB	SER	193	5.056	22.192	-12.880	0.00	52.83	C
ATOM	1473	CG	SER	193	4.033	22.944	-12.251	0.00	39.38	C
ATOM	1474	C	SER	193	5.539	21.358	-15.277	0.00	52.66	C
ATOM	1475	O	SER	193	5.689	20.172	-14.885	0.00	51.25	O
ATOM	1476	N	ASP	194	5.756	21.770	-16.510	0.00	71.75	N
ATOM	1477	CA	ASP	194	6.439	20.994	-17.541	0.00	72.77	C
ATOM	1478	CB	ASP	194	7.960	22.027	-17.434	0.00	71.48	C
ATOM	1479	CG	ASP	194	8.559	20.822	-18.829	0.00	69.71	C
ATOM	1480	CD	ASP	194	8.645	21.798	-19.550	0.00	61.16	C
ATOM	1481	ND	ASP	194	8.823	19.687	-19.140	0.00	65.57	C
ATOM	1482	C	ASP	194	5.806	19.593	-17.757	0.00	72.77	C
ATOM	1483	O	ASP	194	4.889	19.391	-18.533	0.00	72.44	O
ATOM	1484	N	THR	208	6.292	16.617	-16.891	0.00	72.69	N
ATOM	1485	CA	SER	195	5.675	17.288	-17.063	0.00	72.93	C
ATOM	1486	CB	SER	195	6.590	16.374	-16.256	0.00	73.11	C
ATOM	1487	CG	SER	195	7.904	16.766	-16.656	0.00	80.31	C
ATOM	1488	CD	SER	195	4.169	17.253	-16.630	0.00	73.22	C
ATOM	1489	O	SER	195	3.410	16.374	-17.032	0.00	74.02	O
ATOM	1490	N	ASP	196	3.780	18.292	-15.641	0.00	73.17	N
ATOM	1491	CA	ASP	196	2.378	18.585	-15.514	0.00	73.21	C
ATOM	1492	CB	ASP	196	2.180	19.941	-14.783	0.00	74.75	C

Fig. 1

ATOM	1493	CG	ASP	196	2.590	20.000	-13.304	0.00	75.36	C
ATOM	1494	OD1	ASP	196	2.139	20.907	-12.592	0.00	74.45	C
ATOM	1495	OD2	ASP	196	3.346	19.150	-12.840	0.00	76.56	C
ATOM	1496	C	ASP	196	1.550	18.697	-16.802	0.00	72.97	C
ATOM	1497	O	ASP	196	0.459	18.153	-16.909	0.00	73.30	O
ATOM	1498	N	ALA	197	2.153	19.448	-17.749	0.00	72.38	N
ATOM	1499	CA	ALA	197	1.555	19.749	-19.050	0.00	71.53	C
ATOM	1500	CB	ALA	197	2.561	20.526	-19.913	0.00	70.94	C
ATOM	1501	C	ALA	197	1.145	18.464	-19.783	0.00	70.93	C
ATOM	1502	CA	ALA	197	0.043	18.320	-20.300	0.00	71.03	C
ATOM	1503	N	LEU	198	2.091	17.504	-19.761	0.00	0.00	N
ATOM	1504	CA	LEU	198	1.796	16.154	-20.264	0.00	0.00	C
ATOM	1505	CB	LEU	198	3.010	15.205	-20.154	0.00	0.00	C
ATOM	1506	CG	LEU	198	2.692	13.685	-20.035	0.00	0.00	C
ATOM	1507	CD1	LEU	198	2.053	13.124	-21.315	0.00	0.00	C
ATOM	1508	CD2	LEU	198	3.528	12.862	-19.687	0.00	0.00	C
ATOM	1509	C	LEU	198	0.541	15.564	-19.594	0.00	0.00	C
ATOM	1510	O	LEU	198	-0.259	14.905	-20.246	0.00	0.00	O
ATOM	1511	N	THR	199	0.375	15.799	-18.283	0.00	64.70	N
ATOM	1512	CA	THR	199	0.755	15.133	-17.619	0.00	62.08	C
ATOM	1513	CB	THR	199	-0.596	15.230	-16.091	0.00	55.83	C
ATOM	1514	OG1	THR	199	0.640	15.828	-15.760	0.00	54.45	C
ATOM	1515	OG2	THR	199	-0.677	13.865	-15.404	0.00	52.98	C
ATOM	1516	C	THR	199	-2.154	15.632	-18.102	0.00	61.61	C
ATOM	1517	O	THR	199	-3.165	14.992	-17.838	0.00	61.20	O
ATOM	1518	N	LEU	200	-2.192	16.765	-18.841	0.00	61.46	N
ATOM	1519	CA	LEU	200	-3.445	17.165	-19.478	0.00	60.93	C
ATOM	1520	CB	LEU	200	-3.368	18.636	-19.912	0.00	61.08	C
ATOM	1521	CG	LEU	200	-3.143	19.678	-18.008	0.00	62.89	C
ATOM	1522	CD1	LEU	200	-2.098	19.087	-17.609	0.00	61.63	C
ATOM	1523	CD2	LEU	200	-4.162	19.573	-17.679	0.00	63.41	C
ATOM	1524	C	LEU	200	-3.690	16.306	-20.740	0.00	60.41	C
ATOM	1525	O	LEU	200	-4.775	15.637	-21.069	0.00	60.11	O
ATOM	1526	N	MET	201	-2.562	16.153	-21.455	0.00	59.93	N
ATOM	1527	CA	MET	201	-2.536	15.376	-22.687	0.00	58.98	C
ATOM	1528	CB	MET	201	-1.097	15.430	-23.223	0.00	52.98	C
ATOM	1529	CG	MET	201	-0.943	16.951	-24.666	0.00	51.18	C
ATOM	1530	SD	MET	201	0.801	14.819	-25.096	0.00	51.18	S
ATOM	1531	CE	MET	201	1.276	16.548	-24.988	0.00	51.51	C
ATOM	1532	C	MET	201	-3.023	13.926	-22.419	0.00	58.64	C
ATOM	1533	O	MET	201	-3.642	13.278	-23.251	0.00	58.74	O
ATOM	1534	N	ASP	202	-2.742	13.524	-21.162	0.00	57.41	N
ATOM	1535	CA	ASP	202	-3.151	12.240	-20.574	0.00	56.51	C
ATOM	1536	CB	ASP	202	-2.265	12.006	-19.334	0.00	55.99	C
ATOM	1537	CG	ASP	202	-2.374	10.570	-18.815	0.00	61.05	C
ATOM	1538	OD1	ASP	202	-1.906	9.667	-19.501	0.00	60.81	C
ATOM	1539	OD2	ASP	202	-2.944	10.341	-17.752	0.00	60.09	C
ATOM	1540	C	ASP	202	-4.663	12.147	-20.250	0.00	56.13	C
ATOM	1541	O	ASP	202	-5.121	11.184	-19.634	0.00	56.41	O
ATOM	1542	N	MET	203	-1.443	12.129	-20.727	0.00	65.64	N
ATOM	1543	CA	MET	203	-6.885	12.995	-20.552	0.00	54.17	C
ATOM	1544	CB	MET	203	-7.381	13.737	-19.304	0.00	51.09	C
ATOM	1545	CG	MET	203	-6.752	15.108	-19.030	0.00	47.28	C
ATOM	1546	CD	MET	203	-7.577	14.888	-17.625	0.00	47.89	C
ATOM	1547	CE	MET	203	-6.251	16.893	-16.961	0.00	50.16	C
ATOM	1548	C	MET	203	-7.871	13.307	-21.829	0.00	53.68	C
ATOM	1549	O	MET	203	-8.877	12.111	-21.913	0.00	53.40	O
ATOM	1550	N	CYS	204	-6.933	13.708	-22.887	0.00	52.15	N
ATOM	1551	CA	CYS	204	-7.547	13.726	-24.209	0.00	63.55	C
ATOM	1552	CB	CYS	204	-6.571	14.252	-25.281	0.00	59.00	C
ATOM	1553	CG	CYS	204	-7.073	13.948	-27.000	0.00	48.92	C
ATOM	1554	C	CYS	204	-8.191	12.351	-24.526	0.00	52.20	C
ATOM	1555	O	CYS	204	-9.349	12.209	-24.939	0.00	52.05	O
ATOM	1556	N	PRO	205	-6.747	14.211	-23.131	0.00	61.43	N
ATOM	1557	CD	PRO	205	-6.045	11.120	-23.961	0.00	51.11	C

ATOM	1688	C	THR	222	-1.803	17.530	-32.362	0.00	59.70	C
ATOM	1689	O	THR	222	-1.102	16.978	-31.521	0.00	59.78	O
ATOM	1690	N	ALA	223	-2.113	17.049	-33.359	0.00	59.37	N
ATOM	1691	CA	ALA	223	-1.824	15.689	-34.045	0.00	59.42	C
ATOM	1692	CB	ALA	223	-1.905	15.667	-35.576	0.00	58.25	C
ATOM	1693	O	ALA	223	-0.467	15.171	-33.392	0.00	58.47	O
ATOM	1694	O	ALA	223	-0.341	14.137	-32.866	0.00	60.11	O
ATOM	1695	N	GLU	224	0.537	16.009	-33.814	0.00	59.21	N
ATOM	1696	CA	GLU	224	1.914	15.450	-33.509	0.00	59.91	C
ATOM	1697	CB	GLU	224	2.834	16.765	-34.007	0.00	65.47	C
ATOM	1698	CG	GLU	224	4.207	16.207	-34.363	0.00	71.27	C
ATOM	1699	CD	GLU	224	4.040	15.282	-35.559	0.00	74.03	C
ATOM	1700	CE	GLU	224	4.090	14.056	-35.392	0.00	75.47	C
ATOM	1701	CE2	GLU	224	3.851	15.816	-36.650	0.00	71.18	C
ATOM	1702	N	GLU	224	2.189	15.438	-32.017	0.00	58.04	N
ATOM	1703	O	GLU	224	4.077	14.710	-31.395	0.00	67.59	O
ATOM	1704	N	GLU	225	1.359	16.104	-31.225	0.00	57.76	N
ATOM	1705	CA	GLU	225	1.468	16.060	-29.774	0.00	56.94	C
ATOM	1706	CB	GLU	225	0.927	17.390	-29.242	0.00	54.91	C
ATOM	1707	CG	GLU	225	1.596	18.530	-30.034	0.00	55.24	C
ATOM	1708	CD	GLU	225	1.255	19.933	-29.585	0.00	53.77	C
ATOM	1709	CE1	GLU	225	2.170	20.752	-29.553	0.00	48.46	C
ATOM	1710	CE2	GLU	225	0.089	20.221	-29.311	0.00	50.05	C
ATOM	1711	O	GLU	225	0.776	14.802	-29.213	0.00	55.93	O
ATOM	1712	O	GLU	225	1.071	14.337	-28.123	0.00	56.98	O
ATOM	1713	N	TYR	226	-0.076	14.231	-30.093	0.00	54.66	N
ATOM	1714	CA	TYR	226	-0.554	12.855	-29.939	0.00	52.73	C
ATOM	1715	CB	TYR	226	-1.986	12.687	-30.491	0.00	52.12	C
ATOM	1716	CG	TYR	226	-2.898	13.824	-30.001	0.00	50.35	C
ATOM	1717	CH	TYR	226	-2.580	14.085	-28.640	0.00	48.57	C
ATOM	1718	CH1	TYR	226	-3.609	15.218	-28.191	0.00	46.67	C
ATOM	1719	CH2	TYR	226	-3.526	14.643	-30.897	0.00	49.40	C
ATOM	1720	CH3	TYR	226	-4.177	15.787	-30.448	0.00	47.51	C
ATOM	1721	CH4	TYR	226	-4.138	16.085	-29.097	0.00	48.25	C
ATOM	1722	OH	TYR	226	-4.778	17.248	-28.626	0.00	47.15	C
ATOM	1723	C	TYR	226	0.439	11.813	-30.316	0.00	51.03	C
ATOM	1724	O	TYR	226	0.367	10.637	-30.177	0.00	51.23	O
ATOM	1725	N	VAL	227	1.437	12.241	-31.325	0.00	48.84	N
ATOM	1726	CA	VAL	227	2.544	11.299	-31.521	0.00	47.44	C
ATOM	1727	CB	VAL	227	3.381	11.653	-32.760	0.00	47.46	C
ATOM	1728	CG1	VAL	227	4.749	10.946	-32.748	0.00	34.40	C
ATOM	1729	CG2	VAL	227	2.591	11.293	-34.024	0.00	38.52	C
ATOM	1730	CH	VAL	227	3.211	11.796	-30.233	0.00	47.58	C
ATOM	1731	O	VAL	227	3.808	10.252	-29.740	0.00	47.47	O
ATOM	1732	N	SER	228	3.550	12.522	-29.715	0.00	47.93	N
ATOM	1733	CA	SER	228	4.276	12.705	-28.462	0.00	47.71	C
ATOM	1734	CB	SER	228	4.436	14.192	-28.108	0.00	51.52	C
ATOM	1735	CG	SER	228	5.062	14.966	-29.110	0.00	58.86	C
ATOM	1736	C	SER	228	3.006	11.935	-27.238	0.00	46.92	C
ATOM	1737	O	SER	228	4.270	11.598	-26.375	0.00	46.19	O
ATOM	1738	N	THR	229	2.260	12.109	-27.173	0.00	46.65	N
ATOM	1739	CA	THR	229	1.498	11.417	-26.137	0.00	46.23	C
ATOM	1740	CB	THR	229	-0.011	11.718	-26.188	0.00	46.18	C
ATOM	1741	CG	THR	229	-0.719	10.993	-25.059	0.00	47.19	C
ATOM	1742	CH1	THR	229	-1.530	9.896	-25.332	0.00	47.95	C
ATOM	1743	CH2	THR	229	-2.054	9.120	-24.308	0.00	48.33	C
ATOM	1744	CH3	THR	229	-0.514	11.993	-23.729	0.00	47.46	C
ATOM	1745	CH4	THR	229	-1.049	10.575	-22.707	0.00	48.73	C
ATOM	1746	CH5	THR	229	-1.784	9.432	-22.989	0.00	49.11	C
ATOM	1747	CH6	THR	229	-2.925	9.585	-22.966	0.00	47.73	C
ATOM	1748	C	THR	229	1.680	9.906	-25.261	0.00	45.98	C
ATOM	1749	O	THR	229	1.891	9.216	-25.267	0.00	45.66	O
ATOM	1750	N	GLY	230	1.581	9.465	-27.545	0.00	45.77	N
ATOM	1751	CA	GLY	230	1.525	8.063	-27.324	0.00	45.30	C
ATOM	1752	CB	GLY	230	1.775	7.773	-29.344	0.00	50.95	C

Fig. 1

ATOM	1753	CG	GLU	230	1.546	6.282	-29.630	0.00	59.59	C
ATOM	1754	CD	GLU	230	1.686	5.907	-31.121	0.00	66.60	C
ATOM	1755	CE1	GLU	230	2.768	6.044	-31.647	0.00	71.04	C
ATOM	1756	CE2	GLU	230	0.730	5.437	-31.757	0.00	68.37	C
ATOM	1757	C	GLU	230	3.232	7.647	-27.263	0.00	44.72	C
ATOM	1758	O	GLU	230	1.347	6.640	-26.572	0.00	44.03	O
ATOM	1759	N	TYR	231	4.258	8.475	-27.560	0.00	44.03	N
ATOM	1760	CA	TYR	231	5.601	7.977	-27.304	0.00	43.85	C
ATOM	1761	CB	TYR	231	6.591	8.088	-26.227	0.00	43.85	C
ATOM	1762	CG	TYR	231	7.887	7.928	-28.331	0.00	44.09	C
ATOM	1763	CH1	TYR	231	7.881	6.574	-28.646	0.00	44.29	C
ATOM	1764	CH2	TYR	231	9.058	5.854	-28.720	0.00	45.37	C
ATOM	1765	CH3	TYR	231	8.105	6.355	-28.108	0.00	44.13	C
ATOM	1766	CH4	TYR	231	10.291	7.842	-28.196	0.00	45.45	C
ATOM	1767	CH5	TYR	231	10.259	6.495	-28.503	0.00	45.93	C
ATOM	1768	CH6	TYR	231	11.437	5.831	-28.615	0.00	46.21	C
ATOM	1769	C	TYR	231	6.055	8.043	-25.835	0.00	44.20	C
ATOM	1770	O	TYR	231	6.788	7.169	-25.383	0.00	43.32	O
ATOM	1771	N	TYR	232	5.629	9.082	-25.086	0.00	45.34	N
ATOM	1772	CA	TYR	232	6.100	8.153	-25.686	0.00	46.45	C
ATOM	1773	CB	TYR	232	5.506	10.394	-22.966	0.00	47.21	C
ATOM	1774	CG	TYR	232	5.770	10.332	-21.479	0.00	49.07	C
ATOM	1775	CH1	TYR	232	4.890	9.621	-20.577	0.00	49.72	C
ATOM	1776	CH2	TYR	232	5.176	9.373	-19.350	0.00	49.97	C
ATOM	1777	CH3	TYR	232	6.904	10.887	-20.892	0.00	49.10	C
ATOM	1778	CH4	TYR	232	7.187	10.657	-19.547	0.00	49.22	C
ATOM	1779	CH5	TYR	232	6.339	9.860	-18.780	0.00	49.65	C
ATOM	1780	CH6	TYR	232	6.632	9.498	-17.475	0.00	49.83	C
ATOM	1781	C	TYR	232	5.831	7.859	-22.890	0.00	46.60	C
ATOM	1782	O	TYR	232	6.586	7.408	-22.036	0.00	45.03	O
ATOM	1783	N	TYR	233	4.647	7.309	-23.227	0.00	46.77	N
ATOM	1784	CA	TYR	233	4.169	6.116	-22.556	0.00	46.07	C
ATOM	1785	CB	TYR	233	5.642	6.056	-22.535	0.00	47.00	C
ATOM	1786	CG	TYR	233	2.128	6.532	-21.430	0.00	48.87	C
ATOM	1787	CH1	TYR	233	2.208	6.508	-20.104	0.00	50.11	C
ATOM	1788	CH2	TYR	233	1.747	7.317	-19.073	0.00	51.80	C
ATOM	1789	CH3	TYR	233	1.586	8.188	-21.705	0.00	50.07	C
ATOM	1790	CH4	TYR	233	1.151	8.990	-20.669	0.00	51.27	C
ATOM	1791	CH5	TYR	233	1.203	8.553	-19.362	0.00	52.77	C
ATOM	1792	CH6	TYR	233	8.690	9.339	-18.351	0.00	54.03	C
ATOM	1793	C	TYR	233	4.817	4.859	-23.114	0.00	45.10	C
ATOM	1794	O	TYR	233	4.863	3.857	-22.407	0.00	44.60	O
ATOM	1795	N	ASP	234	3.530	4.976	-24.344	0.00	43.48	N
ATOM	1796	CA	ASP	234	6.256	3.955	-24.797	0.00	42.13	C
ATOM	1797	CB	ASP	234	6.722	4.234	-26.226	0.00	35.52	C
ATOM	1798	CG	ASP	234	5.820	3.479	-27.143	0.00	36.96	C
ATOM	1799	CH1	ASP	234	6.013	4.283	-27.272	0.00	43.26	C
ATOM	1800	CH2	ASP	234	4.973	4.074	-27.796	0.00	39.81	C
ATOM	1801	C	ASP	234	7.469	3.892	-23.885	0.00	41.80	C
ATOM	1802	O	ASP	234	7.779	3.844	-22.335	0.00	40.96	O
ATOM	1803	N	LEU	235	8.147	5.054	-23.735	0.00	41.73	N
ATOM	1804	CA	LEU	235	9.305	5.042	-22.830	0.00	41.72	C
ATOM	1805	CB	LEU	235	9.940	4.422	-22.626	0.00	40.68	C
ATOM	1806	CG	LEU	235	10.798	6.885	-23.819	0.00	40.39	C
ATOM	1807	CH1	LEU	235	9.923	7.557	-24.886	0.00	38.70	C
ATOM	1808	CH2	LEU	235	11.902	7.819	-23.336	0.00	42.74	C
ATOM	1809	CH3	LEU	235	8.937	4.434	-21.469	0.00	41.66	C
ATOM	1810	O	LEU	235	9.523	3.447	-21.043	0.00	42.37	O
ATOM	1811	N	LEU	236	7.877	5.022	-20.866	0.00	41.17	N
ATOM	1812	CA	LEU	236	7.299	4.589	-19.975	0.00	41.42	C
ATOM	1813	CB	LEU	236	6.098	5.520	-19.213	0.00	42.01	C
ATOM	1814	CG	LEU	236	6.312	6.255	-18.073	0.00	38.33	C
ATOM	1815	CH1	LEU	236	7.440	6.973	-17.878	0.00	41.32	C
ATOM	1816	CH2	LEU	236	5.243	7.217	-17.000	0.00	41.24	C
ATOM	1817	C	ASP	236	6.859	3.103	-19.512	0.00	41.56	C

ATOM	1948	CE2	TYR	255	-0.391	-15.894	-21.073	0.00	31.22	C
ATOM	1949	CH	TYR	255	-1.402	-16.586	-20.115	0.00	29.92	C
ATOM	1950	OH	TYR	255	-2.300	-17.379	-21.106	0.00	29.03	C
ATOM	1951	C	TYR	255	3.300	-16.279	-16.696	0.00	33.90	O
ATOM	1952	O	TYR	255	2.851	-17.223	-19.330	0.00	33.95	N
ATOM	1953	N	VAL	256	4.523	-15.781	-19.930	0.00	19.24	C
ATOM	1954	CA	VAL	256	5.272	-16.340	-20.073	0.00	33.25	C
ATOM	1955	CB	VAL	256	6.418	-15.400	-20.508	0.00	26.04	C
ATOM	1956	CG	VAL	256	7.456	-15.176	-21.408	0.00	19.24	C
ATOM	1957	CG2	VAL	256	7.095	-15.857	-21.815	0.00	18.32	C
ATOM	1958	C	VAL	256	5.754	-17.787	-19.786	0.00	34.07	C
ATOM	1959	O	VAL	256	6.097	-18.553	-20.080	0.00	35.39	C
ATOM	1960	N	ASN	257	4.706	-15.104	-18.482	0.00	33.67	N
ATOM	1961	CA	ASN	257	6.080	-19.451	-18.045	0.00	33.56	C
ATOM	1962	CB	ASN	257	6.933	-19.364	-16.775	0.00	31.79	C
ATOM	1963	CG	ASN	257	7.132	-20.657	-16.500	0.00	30.83	C
ATOM	1964	OD1	ASN	257	7.185	-21.737	-16.401	0.00	40.61	C
ATOM	1965	ND2	ASN	257	9.051	-20.519	-16.522	0.00	30.54	N
ATOM	1966	C	ASN	257	4.779	-20.256	-17.878	0.00	33.90	C
ATOM	1967	O	ASN	257	4.782	-21.481	-17.917	0.00	34.76	C
ATOM	1968	N	GLU	258	3.660	-19.528	-17.752	0.00	33.75	N
ATOM	1969	CA	GLU	258	2.345	-20.153	-17.730	0.00	33.84	C
ATOM	1970	CB	GLU	258	1.295	-19.161	-17.733	0.00	32.17	C
ATOM	1971	CG	GLU	258	0.020	-19.862	-16.727	0.00	29.90	C
ATOM	1972	CD	GLU	258	-1.151	-18.882	-16.579	0.00	31.66	C
ATOM	1973	OE1	GLU	258	-2.145	-19.065	-17.270	0.00	27.26	C
ATOM	1974	OE2	GLU	258	-1.089	-17.936	-15.785	0.00	33.00	C
ATOM	1975	C	GLU	258	2.006	-20.694	-19.131	0.00	33.43	C
ATOM	1976	O	GLU	258	1.545	-21.816	-19.271	0.00	33.95	C
ATOM	1977	N	LEU	259	2.584	-19.693	-20.164	0.00	31.86	C
ATOM	1978	CA	LEU	259	2.205	-20.290	-21.571	0.00	32.61	C
ATOM	1979	CB	LEU	259	2.916	-19.269	-20.478	0.00	28.21	C
ATOM	1980	CG	LEU	259	4.158	-17.955	-22.724	0.00	26.28	C
ATOM	1981	CD1	LEU	259	3.068	-16.979	-23.472	0.00	23.23	C
ATOM	1982	OE2	LEU	259	0.853	-18.193	-23.498	0.00	20.43	C
ATOM	1983	C	LEU	259	2.823	-21.676	-21.913	0.00	32.66	C
ATOM	1984	O	LEU	259	2.247	-22.567	-22.418	0.00	33.23	C
ATOM	1985	N	LEU	260	4.016	-21.828	-21.240	0.00	32.63	N
ATOM	1986	CA	LEU	260	4.790	-23.059	-21.333	0.00	31.93	C
ATOM	1987	CB	LEU	260	5.173	-22.701	-20.767	0.00	27.56	C
ATOM	1988	CG	LEU	260	7.087	-21.923	-21.745	0.00	24.68	C
ATOM	1989	CH1	LEU	260	6.392	-20.999	-22.760	0.00	24.55	C
ATOM	1990	CD1	LEU	260	5.158	-21.143	-20.184	0.00	31.21	C
ATOM	1991	C	LEU	260	4.108	-24.268	-20.628	0.00	32.12	C
ATOM	1992	O	LEU	260	4.493	-25.421	-20.835	0.00	32.59	C
ATOM	1993	N	ALA	261	3.063	-23.954	-19.843	0.00	32.03	N
ATOM	1994	CA	ALA	261	5.132	-24.953	-19.356	0.00	31.86	C
ATOM	1995	CB	ALA	261	1.680	-24.608	-17.929	0.00	22.63	C
ATOM	1996	C	ALA	261	0.933	-25.112	-20.315	0.00	32.75	C
ATOM	1997	O	ALA	261	0.411	-26.010	-20.453	0.00	32.60	C
ATOM	1998	N	ARG	262	0.475	-24.034	-20.975	0.00	33.24	C
ATOM	1999	CA	ARG	262	-0.802	-24.145	-21.681	0.00	33.14	C
ATOM	2000	CB	ARG	262	-1.511	-22.778	-21.736	0.00	31.21	C
ATOM	2001	CG	ARG	262	-1.278	-21.519	-20.487	0.00	30.68	C
ATOM	2002	CD	ARG	262	-2.159	-20.705	-20.370	0.00	29.12	C
ATOM	2003	NE	ARG	262	-3.443	-21.062	-19.593	0.00	29.72	C
ATOM	2004	CZ	ARG	262	-4.348	-20.103	-19.393	0.00	32.40	C
ATOM	2005	NH1	ARG	262	-4.136	-18.853	-19.772	0.00	30.25	N
ATOM	2006	NH2	ARG	262	-3.459	-20.389	-18.729	0.00	30.45	N
ATOM	2007	C	ARG	262	-0.656	-24.621	-23.662	0.00	34.48	C
ATOM	2008	O	ARG	262	-1.109	-25.950	-23.279	0.00	34.27	C
ATOM	2009	N	LEU	263	-0.017	-24.067	-23.970	0.00	33.45	C
ATOM	2010	CA	LEU	263	0.087	-24.386	-25.401	0.00	32.53	C
ATOM	2011	CB	LEU	263	0.603	-23.136	-25.183	0.00	25.16	C
ATOM	2012	CG	LEU	263	1.789	-22.389	-25.452	0.00	19.78	C

Fig. 1

ATOM	2013	OD1	LEU	263	3.041	-23.221	-25.155	0.00	17.36	C
ATOM	2014	OD2	LEU	263	2.181	-21.138	-26.233	0.00	20.79	C
ATOM	2015	CD1	LEU	263	0.802	-25.734	-25.675	0.00	33.60	C
ATOM	2016	O	LEU	263	0.603	-26.386	-26.695	0.00	34.48	C
ATOM	2017	N	THR	264	1.582	-26.151	-24.668	0.00	33.08	N
ATOM	2018	CA	THR	264	2.122	-27.487	-24.622	0.00	32.33	C
ATOM	2019	CB	THR	264	3.312	-27.355	-23.667	0.00	29.02	C
ATOM	2020	CG1	THR	264	2.872	-26.560	-22.579	0.00	26.73	C
ATOM	2021	CG2	THR	264	4.518	-26.514	-24.282	0.00	33.85	C
ATOM	2022	C	THR	264	1.049	-26.474	-24.034	0.00	32.47	C
ATOM	2023	O	THR	264	0.556	-29.407	-24.694	0.00	32.11	C
ATOM	2024	N	GLY	265	0.751	-26.182	-22.769	0.00	32.10	N
ATOM	2025	CA	GLY	265	-0.207	-28.903	-21.941	0.00	31.58	C
ATOM	2026	C	GLY	265	0.502	-29.660	-20.900	0.00	31.07	C
ATOM	2027	O	GLY	265	0.291	-30.861	-20.637	0.00	31.73	C
ATOM	2028	N	GLN	266	1.355	-28.899	-20.073	0.00	0.00	C
ATOM	2029	CA	GLN	266	2.177	-29.476	-19.004	0.00	0.00	C
ATOM	2030	CB	GLN	266	3.607	-28.905	-19.126	0.00	0.00	C
ATOM	2031	CG	GLN	266	4.198	-29.236	-20.501	0.00	0.00	C
ATOM	2032	CD	GLN	266	5.086	-28.659	-20.707	0.00	0.00	C
ATOM	2033	OE1	GLN	266	6.120	-27.896	-19.911	0.00	0.00	C
ATOM	2034	NH2	GLN	266	6.144	-29.076	-18.836	0.00	0.00	C
ATOM	2035	C	GLN	266	1.519	-29.236	-17.615	0.00	0.00	C
ATOM	2036	O	GLN	266	0.315	-29.375	-17.446	0.00	0.00	C
ATOM	2037	N	ALA	267	2.371	-29.872	-16.633	0.00	31.53	N
ATOM	2038	CA	ALA	267	1.980	-28.403	-15.510	0.00	31.00	C
ATOM	2039	CB	ALA	267	2.528	-29.400	-14.287	0.00	26.15	C
ATOM	2040	C	ALA	267	2.573	-26.991	-15.111	0.00	31.09	C
ATOM	2041	O	ALA	267	3.444	-26.556	-15.870	0.00	31.38	C
ATOM	2042	N	VAL	268	0.149	-26.037	-12.948	0.00	32.30	N
ATOM	2043	CA	VAL	268	2.386	-24.852	-13.967	0.00	28.70	C
ATOM	2044	CB	VAL	268	1.184	-24.087	-13.373	0.00	19.31	C
ATOM	2045	CG1	VAL	268	1.299	-24.592	-13.708	0.00	13.11	C
ATOM	2046	CG2	VAL	268	-0.170	-24.638	-13.845	0.00	13.68	C
ATOM	2047	C	VAL	268	3.662	-24.603	-13.134	0.00	28.78	C
ATOM	2048	O	VAL	268	3.647	-23.850	-12.165	0.00	28.11	C
ATOM	2049	N	ARG	269	4.775	-25.211	-16.613	0.00	29.92	N
ATOM	2050	CA	ARG	269	6.073	-25.309	-12.937	0.00	30.63	C
ATOM	2051	CB	ARG	269	6.924	-26.466	-13.542	0.00	22.36	C
ATOM	2052	CG	ARG	269	6.319	-27.436	-14.574	0.00	35.47	C
ATOM	2053	CD	ARG	269	6.749	-27.128	-16.021	0.00	39.34	C
ATOM	2054	NE	ARG	269	6.081	-29.938	-16.514	0.00	47.16	N
ATOM	2055	C	ARG	269	6.641	-28.969	-16.542	0.00	51.35	C
ATOM	2056	NH1	ARG	269	7.827	-24.365	-16.189	0.00	49.30	N
ATOM	2057	NH2	ARG	269	5.715	-23.728	-16.914	0.00	48.88	N
ATOM	2058	C	ARG	269	6.921	-23.990	-12.897	0.00	32.38	C
ATOM	2059	O	ARG	269	6.149	-24.037	-12.948	0.00	32.30	C
ATOM	2060	N	ASP	270	6.200	-22.848	-12.793	0.00	34.48	N
ATOM	2061	CA	ASP	270	6.714	-21.503	-12.515	0.00	35.58	C
ATOM	2062	CB	ASP	270	6.576	-20.514	-13.101	0.00	37.39	C
ATOM	2063	CG	ASP	270	5.910	-19.052	-12.477	0.00	40.82	C
ATOM	2064	OD1	ASP	270	5.192	-18.533	-11.840	0.00	42.55	C
ATOM	2065	OD2	ASP	270	6.716	-18.425	-13.144	0.00	42.59	C
ATOM	2066	C	ASP	270	6.872	-21.302	-10.377	0.00	36.90	C
ATOM	2067	O	ASP	270	6.225	-21.968	-10.173	0.00	36.89	C
ATOM	2068	N	GLU	271	7.754	-20.363	-10.514	0.00	39.22	N
ATOM	2069	CA	GLU	271	6.002	-19.373	-10.242	0.00	41.06	C
ATOM	2070	CB	GLU	271	8.881	-21.603	-8.501	0.00	39.65	C
ATOM	2071	CG	GLU	271	8.266	-21.499	-7.172	0.00	48.54	C
ATOM	2072	CD	GLU	271	6.280	-20.481	-6.031	0.00	55.43	C
ATOM	2073	OE1	GLU	271	9.148	-19.540	-6.113	0.00	57.23	C
ATOM	2074	OE2	GLU	271	7.692	-20.610	-8.029	0.00	62.24	C
ATOM	2075	C	GLU	271	8.616	-18.568	-9.291	0.00	41.61	C
ATOM	2076	O	GLU	271	9.565	-18.239	-8.888	0.00	41.75	C
ATOM	2077	N	THR	272	7.907	-17.767	-10.251	0.00	41.61	N

ATOM	2208	O	ASN	288	-7.877	-28.430	-24.011	0.00	30.29	O
ATOM	2209	H	ARG	289	-8.058	-26.949	-22.287	0.00	29.02	N
ATOM	2210	CA	ARG	289	-9.288	-26.341	-22.730	0.00	28.68	C
ATOM	2211	CB	ARG	289	-9.779	-25.363	-21.645	0.00	25.11	C
ATOM	2212	CG	ARG	289	-9.693	-25.880	-20.163	0.00	24.11	C
ATOM	2213	CD	ARG	289	-10.012	-27.100	-19.878	0.00	18.50	C
ATOM	2214	NE	ARG	289	-11.848	-26.916	-20.544	0.00	16.42	N
ATOM	2215	CE	ARG	289	-12.772	-26.055	-20.121	0.00	16.75	C
ATOM	2216	NH1	ARG	289	-12.969	-25.851	-18.810	0.00	10.60	N
ATOM	2217	NH2	ARG	289	-13.448	-25.395	-21.034	0.00	17.40	C
ATOM	2218	C	ARG	289	-9.034	-25.599	-24.055	0.00	29.87	C
ATOM	2219	O	ARG	289	-7.891	-25.455	-24.480	0.00	31.33	C
ATOM	2220	O	ARG	289	-10.112	-22.135	-24.703	0.00	30.25	N
ATOM	2221	CA	THR	290	-9.937	-24.494	-25.995	0.00	29.85	C
ATOM	2222	CB	THR	290	-11.250	-24.690	-26.772	0.00	28.56	C
ATOM	2223	CG	THR	290	-12.353	-24.323	-25.956	0.00	18.25	C
ATOM	2224	CG2	THR	290	-11.418	-26.131	-27.256	0.00	21.55	C
ATOM	2225	C	THR	290	-9.597	-23.019	-25.757	0.00	29.75	C
ATOM	2226	O	THR	290	-8.553	-22.515	-26.073	0.00	30.48	C
ATOM	2227	N	THR	291	-10.654	-22.359	-25.212	0.00	30.15	N
ATOM	2228	CA	PRO	291	-10.512	-20.924	-25.064	0.00	30.03	C
ATOM	2229	CB	PRO	291	-11.860	-20.323	-25.456	0.00	24.13	C
ATOM	2230	CG	PRO	291	-11.768	-18.672	-25.630	0.00	23.71	C
ATOM	2231	CD1	PRO	291	-12.074	-18.488	-27.123	0.00	19.16	C
ATOM	2232	CD2	PRO	291	-11.398	-17.902	-24.905	0.00	19.04	C
ATOM	2233	CE1	PRO	291	-12.046	-17.152	-27.495	0.00	18.25	C
ATOM	2234	CE2	PRO	291	-11.351	-16.568	-25.272	0.00	15.99	C
ATOM	2235	CZ	PRO	291	-11.697	-16.191	-26.559	0.00	15.89	C
ATOM	2236	O	THR	292	-10.112	-20.616	-23.621	0.00	31.14	C
ATOM	2237	O	THR	292	-10.802	-20.587	-23.673	0.00	34.79	C
ATOM	2238	N	TYR	292	-8.991	-19.884	-23.500	0.00	32.48	N
ATOM	2239	CA	TYR	292	-8.642	-19.282	-22.216	0.00	32.45	C
ATOM	2240	CB	TYR	292	-7.207	-19.524	-21.812	0.00	32.27	C
ATOM	2241	CG	TYR	292	-6.962	-21.106	-21.757	0.00	32.70	C
ATOM	2242	CD1	TYR	292	-7.451	-21.850	-20.692	0.00	33.42	C
ATOM	2243	CD2	TYR	292	-7.212	-23.211	-20.590	0.00	34.06	C
ATOM	2244	CD3	TYR	292	-6.235	-21.751	-22.748	0.00	33.21	C
ATOM	2245	CE2	TYR	292	-5.991	-23.110	-22.664	0.00	34.04	C
ATOM	2246	CE	TYR	292	-6.479	-23.838	-21.591	0.00	33.73	C
ATOM	2247	CH	TYR	292	-6.223	-25.188	-21.907	0.00	32.69	C
ATOM	2248	C	TYR	292	-8.816	-17.765	-22.355	0.00	32.40	C
ATOM	2249	O	TYR	292	-8.383	-17.173	-23.335	0.00	32.48	C
ATOM	2250	H	ALA	293	-8.108	-17.105	-21.351	0.00	26.97	C
ATOM	2251	CA	ALA	293	-9.818	-15.795	-21.354	0.00	32.49	C
ATOM	2252	CB	ALA	293	-11.359	-15.655	-21.484	0.00	31.07	C
ATOM	2253	C	ALA	293	-8.333	-15.197	-20.052	0.00	32.76	C
ATOM	2254	O	ALA	293	-10.022	-15.153	-19.037	0.00	33.41	C
ATOM	2255	N	ASP	294	-8.065	-14.774	-20.184	0.00	32.76	N
ATOM	2256	CA	ASP	294	-7.266	-14.332	-19.051	0.00	32.52	C
ATOM	2257	CB	ASP	294	-5.853	-14.927	-19.172	0.00	32.03	C
ATOM	2258	CG	ASP	294	-5.895	-16.447	-19.232	0.00	32.03	C
ATOM	2259	CG1	ASP	294	-5.741	-17.111	-18.212	0.00	36.85	C
ATOM	2260	CG2	ASP	294	-6.026	-16.981	-20.235	0.00	26.97	C
ATOM	2261	C	ASP	294	-7.221	-12.801	-19.070	0.00	33.56	C
ATOM	2262	O	ASP	294	-6.481	-12.186	-19.835	0.00	34.01	C
ATOM	2263	N	PRO	295	-6.086	-12.236	-18.198	0.00	34.53	C
ATOM	2264	CA	PRO	295	-6.249	-10.785	-18.116	0.00	34.46	C
ATOM	2265	CB	PRO	295	-9.681	-10.426	-17.712	0.00	34.84	C
ATOM	2266	CG	PRO	295	-10.473	-10.033	-18.924	0.00	33.58	C
ATOM	2267	CD1	PRO	295	-11.155	-10.924	-19.645	0.00	32.51	C
ATOM	2268	CD2	PRO	295	-10.483	-8.710	-19.354	0.00	28.69	C
ATOM	2269	CE1	PRO	295	-11.814	-10.637	-20.819	0.00	29.13	C
ATOM	2270	CE2	PRO	295	-11.147	-8.351	-20.518	0.00	26.88	C
ATOM	2271	CH	PRO	295	-11.611	-9.316	-21.616	0.00	26.49	C
ATOM	2272	C	PRO	295	-7.175	-10.130	-17.258	0.00	34.41	C

Fig. 1

ATOM	2273	O	PHE	295	-6.958	-10.538	-16.123	0.00	34.74	O
ATOM	2274	N	SER	296	-6.515	-9.115	-17.867	0.00	34.74	N
ATOM	2275	CA	SER	296	-7.244	-8.587	-17.376	0.00	35.23	C
ATOM	2276	CB	SER	296	-4.198	-9.466	-18.071	0.00	32.33	C
ATOM	2277	CG	SER	296	-4.386	-9.390	-19.469	0.00	29.63	C
ATOM	2278	CD	SER	296	-5.053	-7.083	-17.700	0.00	35.77	C
ATOM	2279	O	SER	296	-5.914	-6.466	-18.379	0.00	36.08	C
ATOM	2280	N	HIS	297	-3.836	-6.963	-17.369	0.00	35.81	N
ATOM	2281	CA	HIS	297	-3.432	-5.166	-17.636	0.00	35.93	C
ATOM	2282	CB	HIS	297	-3.781	-4.201	-16.484	0.00	30.97	C
ATOM	2283	CG	HIS	297	-3.759	-4.863	-15.134	0.00	29.10	C
ATOM	2284	ND1	HIS	297	-4.857	-4.974	-14.364	0.00	30.32	C
ATOM	2285	CD2	HIS	297	-2.666	-5.400	-14.446	0.00	30.33	C
ATOM	2286	NE2	HIS	297	-3.131	-5.822	-13.249	0.00	27.62	N
ATOM	2287	CE1	HIS	297	-4.449	-5.552	-13.226	0.00	31.20	C
ATOM	2288	CE2	HIS	297	-1.924	-4.793	-17.970	0.00	36.86	C
ATOM	2289	O	HIS	297	-1.027	-5.728	-17.590	0.00	37.22	C
ATOM	2290	N	ASP	298	-1.739	-3.820	-18.679	0.00	37.48	N
ATOM	2291	CA	ASP	298	-0.497	-3.378	-19.325	0.00	37.70	C
ATOM	2292	CB	ASP	298	-0.448	-1.904	-19.813	0.00	40.22	C
ATOM	2293	CG	ASP	298	-1.170	-0.869	-18.849	0.00	43.04	C
ATOM	2294	OD1	ASP	298	-2.343	-1.026	-18.487	0.00	42.12	C
ATOM	2295	OD2	ASP	298	-0.517	0.108	-18.478	0.00	46.35	C
ATOM	2296	C	ASP	298	0.726	-3.559	-18.437	0.00	38.09	C
ATOM	2297	O	ASP	298	1.738	-4.118	-18.846	0.00	38.60	C
ATOM	2298	N	ASN	299	0.538	-3.037	-17.197	0.00	38.09	N
ATOM	2299	CA	ASN	299	1.637	-2.917	-16.256	0.00	38.83	C
ATOM	2300	CB	ASN	299	1.156	-2.300	-14.921	0.00	41.95	C
ATOM	2301	CG	ASN	299	1.899	-1.010	-14.553	0.00	40.97	C
ATOM	2302	OD1	ASN	299	1.489	0.065	-15.059	0.00	38.54	C
ATOM	2303	ND2	ASN	299	2.962	-1.150	-13.759	0.00	40.43	N
ATOM	2304	C	ASN	299	2.350	-4.256	-15.990	0.00	39.25	C
ATOM	2305	O	ASN	299	3.548	-4.266	-15.754	0.00	39.29	C
ATOM	2306	N	THR	300	1.551	-5.362	-16.023	0.00	39.50	N
ATOM	2307	CA	THR	300	2.081	-6.727	-15.905	0.00	38.65	C
ATOM	2308	CB	THR	300	1.103	-7.647	-15.116	0.00	37.46	C
ATOM	2309	CG	THR	300	1.766	-6.493	-14.194	0.00	40.31	C
ATOM	2310	CG2	THR	300	0.192	-8.548	-15.967	0.00	36.50	C
ATOM	2311	C	THR	300	2.369	-7.302	-17.299	0.00	37.95	C
ATOM	2312	O	THR	300	3.182	-8.203	-17.446	0.00	38.04	C
ATOM	2313	N	MET	301	1.654	-6.782	-18.317	0.00	37.29	N
ATOM	2314	CA	MET	301	1.844	-7.341	-19.653	0.00	36.92	C
ATOM	2315	CB	MET	301	1.937	-6.881	-20.672	0.00	34.53	C
ATOM	2316	CG	MET	301	-0.576	-7.348	-20.484	0.00	30.68	C
ATOM	2317	CD	MET	301	-1.742	-6.622	-21.655	0.00	31.17	C
ATOM	2318	CE	MET	301	-2.998	-7.914	-21.673	0.00	28.96	C
ATOM	2319	C	MET	301	3.287	-1.148	-20.150	0.00	36.54	C
ATOM	2320	O	MET	301	3.863	-6.037	-20.768	0.00	36.55	C
ATOM	2321	N	VAL	302	3.848	-9.956	-19.871	0.00	36.45	N
ATOM	2322	CA	VAL	302	5.010	-10.612	-20.474	0.00	36.07	C
ATOM	2323	CB	VAL	302	5.560	-4.154	-20.072	0.00	31.27	C
ATOM	2324	CG1	VAL	302	5.162	-3.204	-21.208	0.00	33.35	C
ATOM	2325	CG2	VAL	302	4.930	-3.651	-19.778	0.00	25.22	C
ATOM	2326	C	VAL	302	6.295	-6.690	-20.252	0.00	35.66	C
ATOM	2327	O	VAL	302	6.947	-7.042	-21.237	0.00	35.93	C
ATOM	2328	N	PRO	303	6.512	-7.249	-19.026	0.00	35.27	N
ATOM	2329	CA	PRO	303	6.003	-6.746	-17.736	0.00	35.46	C
ATOM	2330	CB	PRO	303	7.395	-8.405	-18.860	0.00	35.46	C
ATOM	2331	CG	PRO	303	6.931	-8.979	-17.512	0.00	35.79	C
ATOM	2332	CD	PRO	303	6.473	-7.763	-16.712	0.00	35.92	C
ATOM	2333	C	PRO	303	7.290	-9.503	-19.925	0.00	35.42	C
ATOM	2334	O	PRO	303	8.278	-10.051	-20.394	0.00	34.46	C
ATOM	2335	N	ILE	304	6.005	-9.171	-20.245	0.00	35.17	N
ATOM	2336	CA	ILE	304	6.511	-10.387	-20.210	0.00	35.54	C
ATOM	2337	CB	ILE	304	4.073	-11.285	-20.959	0.00	29.17	C

ATCM	2468	CA	ASP	322	9.290	6.611	-35.090	0.00	38.43	C
ATCM	2469	CB	ASP	322	10.272	5.426	-35.055	0.00	33.54	C
ATCM	2470	CD	ASP	322	11.257	5.445	-36.000	0.00	35.75	C
ATCM	2471	OD1	ASP	322	12.251	5.986	-36.255	0.00	40.44	C
ATCM	2472	OD2	ASP	322	10.716	4.943	-37.337	0.00	29.40	C
ATCM	2473	OD	ASP	322	7.473	5.535	-39.000	0.00	30.24	C
ATCM	2474	O	ASP	322	7.076	5.591	-35.081	0.00	39.28	C
ATCM	2475	N	GLU	323	7.958	6.384	-37.037	0.00	51.70	N
ATCM	2476	CA	GLU	323	6.866	5.776	-37.789	0.00	50.24	C
ATCM	2477	CB	GLU	323	6.573	6.453	-39.146	0.00	41.27	C
ATCM	2478	CG	GLU	323	7.724	6.507	-40.161	0.00	20.00	C
ATCM	2479	CD	GLU	323	8.471	7.858	-40.054	0.00	20.00	C
ATCM	2480	OD1	GLU	323	8.188	8.766	-40.837	0.00	20.00	C
ATCM	2481	OD2	GLU	323	9.329	8.001	-39.191	0.00	20.00	C
ATCM	2482	C	GLU	323	7.068	4.254	-38.003	0.00	49.81	C
ATCM	2483	C	GLU	323	6.057	3.500	-39.000	0.00	48.03	C
ATCM	2484	N	ASN	324	8.336	3.842	-38.188	0.00	65.41	N
ATCM	2485	CA	ASN	324	8.699	2.447	-39.421	0.00	64.00	C
ATCM	2486	CB	ASN	324	9.538	2.355	-39.715	0.00	48.82	C
ATCM	2487	CD	ASN	324	10.236	1.037	-39.250	0.00	20.00	C
ATCM	2488	OD1	ASN	324	9.684	-0.019	-39.668	0.00	20.00	C
ATCM	2489	OD2	ASN	324	11.483	1.128	-40.432	0.00	20.00	C
ATCM	2490	C	ASN	324	9.400	1.895	-37.161	0.00	53.53	C
ATCM	2491	O	ASN	324	10.625	1.831	-37.056	0.00	63.68	C
ATCM	2492	N	ARG	325	8.531	1.516	-36.211	0.00	62.57	N
ATCM	2493	CA	ARG	325	9.005	0.970	-34.948	0.00	61.62	C
ATCM	2494	CB	ARG	325	8.969	-0.000	-33.813	0.00	60.62	C
ATCM	2495	CG	ARG	325	7.575	2.605	-33.572	0.00	20.00	C
ATCM	2496	CD	ARG	325	7.641	3.734	-32.545	0.00	20.00	C
ATCM	2497	NE	ARG	325	6.513	4.562	-36.086	0.00	20.00	C
ATCM	2498	CZ	ARG	325	5.999	4.207	-30.758	0.00	20.00	C
ATCM	2499	NEH	ARG	325	6.751	3.577	-29.867	0.00	20.00	C
ATCM	2500	NEZ	ARG	325	4.920	4.867	-30.353	0.00	20.00	C
ATCM	2501	C	ARG	325	8.105	-0.199	-34.625	0.00	60.58	C
ATCM	2502	O	ARG	325	7.049	-0.376	-35.226	0.00	60.13	C
ATCM	2503	N	LEU	326	8.610	-0.976	-36.645	0.00	60.00	N
ATCM	2504	CA	LEU	326	8.047	-0.505	-33.338	0.00	59.20	C
ATCM	2505	CB	LEU	326	9.131	-3.350	-33.523	0.00	49.64	C
ATCM	2506	CG	LEU	326	9.637	-3.391	-34.984	0.00	20.00	C
ATCM	2507	CD1	LEU	326	10.732	-4.435	-35.211	0.00	20.00	C
ATCM	2508	CD2	LEU	326	8.479	-3.635	-35.951	0.00	20.00	C
ATCM	2509	C	LEU	326	7.409	-2.248	-31.953	0.00	59.72	C
ATCM	2510	O	LEU	326	7.293	-2.719	-31.788	0.00	50.44	C
ATCM	2511	N	TRP	327	8.099	-1.633	-30.976	0.00	32.82	N
ATCM	2512	CA	TRP	327	7.502	-1.388	-29.665	0.00	34.18	C
ATCM	2513	CB	TRP	327	8.639	-1.448	-28.615	0.00	28.86	C
ATCM	2514	CG	TRP	327	8.119	-1.957	-27.193	0.00	20.00	C
ATCM	2515	CD1	TRP	327	8.245	-2.653	-26.257	0.00	29.45	C
ATCM	2516	CD2	TRP	327	7.605	-2.245	-25.062	0.00	33.42	C
ATCM	2517	NE	TRP	327	7.025	-2.952	-26.318	0.00	31.29	C
ATCM	2518	OD1	TRP	327	7.420	-0.561	-26.515	0.00	37.17	C
ATCM	2519	NEH	TRP	327	7.115	-0.969	-25.262	0.00	37.00	C
ATCM	2520	CZ1	TRP	327	7.561	-3.075	-23.983	0.00	35.53	C
ATCM	2521	CZ2	TRP	327	8.772	-4.748	-25.218	0.00	36.85	C
ATCM	2522	CH2	TRP	327	8.138	-4.339	-24.045	0.00	44.37	C
ATCM	2523	C	TRP	327	6.781	-0.016	-29.757	0.00	34.62	C
ATCM	2524	O	TRP	327	7.418	-1.026	-28.856	0.00	34.09	C
ATCM	2525	N	VAL	328	5.439	-0.079	-29.780	0.00	34.18	N
ATCM	2526	CA	VAL	328	4.596	1.103	-29.958	0.00	35.29	C
ATCM	2527	CB	VAL	328	4.269	1.303	-31.463	0.00	31.51	C
ATCM	2528	CG1	VAL	328	4.189	-0.026	-32.218	0.00	27.30	C
ATCM	2529	CG2	VAL	328	3.014	2.155	-31.740	0.00	29.52	C
ATCM	2530	C	VAL	328	3.349	0.529	-29.101	0.00	35.92	C
ATCM	2531	O	VAL	328	4.508	0.114	-34.431	0.00	35.67	C
ATCM	2532	N	ASP	329	3.264	1.708	-28.000	0.00	37.39	N

Fig. 1

ATCM	2533	CA	ASP	329	2.278	1.483	-26.932	0.00	39.78	C
ATCM	2534	CB	ASP	329	2.183	2.717	-26.017	0.00	32.64	C
ATCM	2535	CD	ASP	329	2.236	2.307	-24.540	0.00	34.06	C
ATCM	2536	OD1	ASP	329	3.206	1.673	-24.129	0.00	29.53	C
ATCM	2537	OD2	ASP	329	1.340	2.644	-23.769	0.00	35.26	C
ATCM	2538	C	ASP	329	0.880	1.007	-27.453	0.00	40.15	C
ATCM	2539	O	ASP	329	0.209	0.106	-27.051	0.00	41.15	C
ATCM	2540	N	SER	330	0.440	1.890	-28.430	0.00	40.61	N
ATCM	2541	CA	SER	330	-0.818	1.500	-28.127	0.00	41.23	C
ATCM	2542	CB	SER	330	-0.846	2.834	-30.141	0.00	42.29	C
ATCM	2543	CG	SER	330	-0.233	3.948	-29.601	0.00	45.49	C
ATCM	2544	C	SER	330	-0.967	0.295	-29.801	0.00	41.86	C
ATCM	2545	O	SER	330	-2.008	-0.346	-29.692	0.00	42.30	C
ATCM	2546	N	LVS	331	0.083	-0.157	-30.513	0.00	41.26	N
ATCM	2547	CA	LVS	331	0.025	-1.470	-31.163	0.00	40.70	C
ATCM	2548	CB	LVS	331	0.704	-1.428	-32.543	0.00	33.66	C
ATCM	2549	CG	LVS	331	0.247	-0.230	-33.494	0.00	30.18	C
ATCM	2550	CD	LVS	331	0.813	-0.202	-34.825	0.00	33.56	C
ATCM	2551	C	LVS	331	0.367	1.055	-35.580	0.00	38.12	C
ATCM	2552	N	LVS	331	1.097	1.229	-36.839	0.00	39.69	N
ATCM	2553	C	LVS	331	0.581	-2.600	-30.255	0.00	41.18	C
ATCM	2554	O	LVS	331	0.337	-3.766	-30.538	0.00	41.72	C
ATCM	2555	N	LEU	332	1.285	-2.198	-29.179	0.00	40.24	N
ATCM	2556	CA	LEU	332	1.869	-3.049	-28.153	0.00	39.62	C
ATCM	2557	CB	LEU	332	2.790	-2.162	-27.282	0.00	41.08	C
ATCM	2558	CG	LEU	332	3.943	-2.743	-25.962	0.00	44.19	C
ATCM	2559	CD1	LEU	332	4.486	-3.728	-26.185	0.00	42.24	C
ATCM	2560	CD2	LEU	332	3.800	-1.608	-25.032	0.00	42.70	C
ATCM	2561	C	LEU	332	0.721	-1.657	-27.356	0.00	39.38	C
ATCM	2562	O	LEU	332	0.466	-4.855	-27.411	0.00	38.45	C
ATCM	2563	N	VAL	333	0.026	-2.731	-26.660	0.00	39.66	N
ATCM	2564	CA	VAL	333	-1.188	-3.019	-25.916	0.00	39.61	C
ATCM	2565	CB	VAL	333	-0.808	-3.544	-24.463	0.00	34.55	C
ATCM	2566	CG1	VAL	333	-0.331	-4.981	-24.500	0.00	39.35	C
ATCM	2567	CG2	VAL	333	0.090	-2.634	-23.667	0.00	27.40	C
ATCM	2568	C	VAL	333	-2.060	-1.727	-25.857	0.00	38.42	C
ATCM	2569	O	VAL	333	-1.842	-0.878	-24.997	0.00	39.24	C
ATCM	2570	N	PRO	334	-3.108	-1.610	-26.722	0.00	38.06	N
ATCM	2571	CD	PRO	334	-3.393	-2.498	-27.846	0.00	37.37	C
ATCM	2572	CA	PRO	334	-4.163	-0.601	-26.503	0.00	37.82	C
ATCM	2573	CB	PRO	334	-4.942	-0.630	-27.828	0.00	37.99	C
ATCM	2574	CG	PRO	334	-4.762	-2.051	-28.356	0.00	37.83	C
ATCM	2575	CD1	PRO	334	-3.042	-0.074	-25.311	0.00	38.00	C
ATCM	2576	CD2	PRO	334	-4.732	-0.094	-24.712	0.00	37.20	C
ATCM	2577	N	PHI	335	-6.138	-0.346	-24.975	0.00	38.58	N
ATCM	2578	CA	PHI	335	-7.154	-0.866	-24.044	0.00	39.69	C
ATCM	2579	CB	PHI	335	-5.067	-0.242	-23.457	0.00	40.93	C
ATCM	2580	CG	PHI	335	-7.612	0.940	-22.132	0.00	40.80	C
ATCM	2581	CD1	PHI	335	-6.652	0.429	-21.221	0.00	41.95	C
ATCM	2582	CD2	PHI	335	-5.187	-0.165	-20.972	0.00	39.29	C
ATCM	2583	CH2	PHI	335	-6.275	1.135	-20.186	0.00	41.38	C
ATCM	2584	CZ1	PHI	335	-7.839	2.869	-20.734	0.00	37.16	C
ATCM	2585	CZ2	PHI	335	-5.651	-0.320	-19.587	0.00	36.53	C
ATCM	2586	C	PHI	335	-6.036	-1.820	-24.844	0.00	39.01	C
ATCM	2587	O	PHI	335	-0.219	-1.668	-26.044	0.00	39.17	C
ATCM	2588	N	SER	336	-9.517	-2.864	-24.120	0.00	38.22	N
ATCM	2589	CA	SER	336	-8.050	-0.087	-24.710	0.00	37.86	C
ATCM	2590	CB	SER	336	-10.446	-3.956	-25.330	0.00	35.35	C
ATCM	2591	CG	SER	336	-11.336	-3.256	-24.492	0.00	30.00	C
ATCM	2592	C	SER	336	-8.371	-0.042	-25.713	0.00	37.88	C
ATCM	2593	O	SER	336	-9.463	-5.477	-26.614	0.00	37.01	C
ATCM	2594	N	GLY	337	-6.782	-4.438	-25.477	0.00	37.96	N
ATCM	2595	CA	GLY	337	-5.714	-5.088	-26.214	0.00	37.75	C
ATCM	2596	CB	GLY	337	-6.850	-0.560	-25.800	0.00	37.00	C
ATCM	2597	O	GLY	337	-5.333	-7.017	-24.799	0.00	38.16	C

ATOM	2728	CA	LEU	355	-4.158	-12.287	-33.244	0.00	22.18	C
ATOM	2729	CDL	LEU	355	-4.617	-11.092	-32.405	0.00	11.06	C
ATOM	2730	CDL	LEU	355	-3.719	-11.861	-34.647	0.00	22.49	C
ATOM	2731	C	LEU	355	-1.735	-11.563	-31.071	0.00	31.79	C
ATOM	2732	O	LEU	355	-1.810	-11.893	-29.891	0.00	31.94	C
ATOM	2733	C	VAL	356	-1.376	-10.303	-31.346	0.00	31.61	C
ATOM	2734	CA	VAL	356	-1.590	-9.178	-30.573	0.00	28.82	C
ATOM	2735	CB	VAL	356	-0.156	-8.824	-30.101	0.00	28.64	C
ATOM	2736	CDL	VAL	356	-0.203	-7.433	-29.588	0.00	27.60	C
ATOM	2737	CDL	VAL	356	0.361	-9.828	-29.064	0.00	30.86	C
ATOM	2738	C	VAL	356	-2.264	-8.023	-31.314	0.00	29.37	C
ATOM	2739	O	VAL	356	-1.704	-7.422	-32.226	0.00	29.87	C
ATOM	2740	CA	ASN	357	-3.309	-7.744	-30.805	0.00	28.63	N
ATOM	2741	CA	ASN	357	-4.211	-6.532	-31.296	0.00	28.77	C
ATOM	2742	CB	ASN	357	-3.408	-5.295	-30.847	0.00	28.65	C
ATOM	2743	CD	ASN	357	-2.087	-4.429	-29.376	0.00	29.42	C
ATOM	2744	CDL	ASN	357	-3.694	-5.991	-28.547	0.00	32.72	O
ATOM	2745	NDL	ASN	357	-1.796	-4.885	-29.118	0.00	21.22	N
ATOM	2746	C	ASN	357	-4.544	-6.465	-32.810	0.00	29.51	C
ATOM	2747	O	ASN	357	-4.496	-5.410	-33.421	0.00	29.85	C
ATOM	2748	N	ASP	358	-4.893	-7.648	-33.350	0.00	30.14	C
ATOM	2749	CA	ASP	358	-5.311	-7.865	-34.751	0.00	29.80	C
ATOM	2750	CB	ASP	358	-6.413	-6.905	-35.282	0.00	27.10	C
ATOM	2751	CD	ASP	358	-7.842	-7.198	-34.785	0.00	30.87	C
ATOM	2752	ODL	ASP	358	-8.010	-7.600	-33.648	0.00	24.87	O
ATOM	2753	ODL	ASP	358	-8.006	-7.057	-35.528	0.00	31.33	C
ATOM	2754	C	ASP	358	-4.117	-7.895	-35.733	0.00	30.06	C
ATOM	2755	O	ASP	358	-4.309	-8.099	-36.926	0.00	31.52	C
ATOM	2756	N	ALA	359	-2.909	-7.700	-35.195	0.00	29.44	N
ATOM	2757	CA	ALA	359	-1.690	-7.927	-36.933	0.00	28.27	C
ATOM	2758	CB	ALA	359	-0.711	-6.805	-35.590	0.00	27.82	C
ATOM	2759	C	ALA	359	-1.154	-9.303	-35.531	0.00	29.44	C
ATOM	2760	O	ALA	359	-0.976	-10.579	-34.336	0.00	30.43	C
ATOM	2761	N	VAL	360	-0.917	-10.167	-36.527	0.00	28.54	N
ATOM	2762	CA	VAL	360	-0.227	-11.412	-36.214	0.00	27.55	C
ATOM	2763	CB	VAL	360	-0.377	-12.479	-37.316	0.00	19.62	C
ATOM	2764	CDL	VAL	360	-1.753	-13.056	-37.287	0.00	19.67	C
ATOM	2765	CDL	VAL	360	-0.003	-11.994	-38.725	0.00	21.60	C
ATOM	2766	C	VAL	360	1.224	-11.041	-35.944	0.00	28.50	C
ATOM	2767	O	VAL	360	1.791	-10.188	-36.625	0.00	28.49	C
ATOM	2768	N	GLN	361	1.722	-11.704	-34.885	0.00	28.84	C
ATOM	2769	CA	GLN	361	3.031	-11.398	-34.363	0.00	25.66	C
ATOM	2770	CB	GLN	361	3.007	-11.806	-35.929	0.00	29.55	C
ATOM	2771	CD	GLN	361	2.098	-10.304	-32.255	0.00	25.30	C
ATOM	2772	CD	GLN	361	2.543	-8.932	-32.786	0.00	25.04	C
ATOM	2773	ODL	GLN	361	3.794	-8.678	-32.902	0.00	25.72	C
ATOM	2774	ODL	GLN	361	1.804	-8.122	-33.255	0.00	22.21	C
ATOM	2775	C	GLN	361	4.041	-12.391	-34.956	0.00	30.70	C
ATOM	2776	O	GLN	361	3.829	-13.603	-34.949	0.00	30.60	C
ATOM	2777	N	GLN	361	1.161	-11.782	-35.504	0.00	31.17	C
ATOM	2778	CD	PRO	362	5.494	-10.371	-35.391	0.00	30.86	C
ATOM	2779	CA	PRO	362	6.046	-12.529	-36.374	0.00	31.24	C
ATOM	2780	CB	PRO	362	6.374	-11.437	-36.334	0.00	30.70	C
ATOM	2781	CD	PRO	362	6.906	-10.272	-35.950	0.00	30.30	C
ATOM	2782	C	PRO	362	6.904	-13.562	-35.651	0.00	31.89	C
ATOM	2783	O	PRO	362	7.256	-14.596	-36.202	0.00	31.35	C
ATOM	2784	N	LEU	363	1.217	-13.221	-34.396	0.00	32.28	C
ATOM	2785	CA	LEU	363	8.029	-14.062	-33.502	0.00	33.69	C
ATOM	2786	CB	LEU	363	7.345	-15.411	-33.196	0.00	34.47	C
ATOM	2787	CD	LEU	363	8.306	-15.929	-33.040	0.00	32.76	C
ATOM	2788	ODL	LEU	363	5.211	-16.689	-32.671	0.00	29.71	C
ATOM	2789	ODL	LEU	363	5.355	-14.222	-32.076	0.00	34.44	C
ATOM	2790	C	LEU	363	9.476	-14.290	-34.006	0.00	34.17	C
ATOM	2791	O	LEU	363	6.698	-15.080	-34.817	0.00	34.16	C
ATOM	2792	N	GLU	364	10.456	-13.650	-33.310	0.00	35.12	N

Fig. 1

ATOM	2793	CA	GLU	364	11.875	-13.931	-33.603	0.00	35.29	C
ATOM	2794	CB	GLU	364	12.737	-12.660	-33.495	0.00	34.10	C
ATOM	2795	CD	GLU	364	13.627	-12.452	-34.739	0.00	42.56	C
ATOM	2796	CDL	GLU	364	12.949	-11.447	-35.687	0.00	42.95	C
ATOM	2797	ODL	GLU	364	12.218	-11.842	-36.599	0.00	44.78	C
ATOM	2798	ODL	GLU	364	13.166	-10.241	-35.501	0.00	41.63	C
ATOM	2799	C	GLU	364	12.478	-15.016	-32.687	0.00	36.20	C
ATOM	2800	O	GLU	364	13.224	-15.087	-33.125	0.00	36.78	C
ATOM	2801	N	PHE	365	12.124	-14.934	-31.387	0.00	36.81	N
ATOM	2802	CA	PHE	365	12.554	-15.089	-30.364	0.00	37.54	C
ATOM	2803	CD	PHE	365	11.792	-15.522	-29.069	0.00	31.47	C
ATOM	2804	CDL	PHE	365	10.288	-15.398	-29.193	0.00	35.32	C
ATOM	2805	ODL	PHE	365	9.470	-16.481	-28.899	0.00	37.18	C
ATOM	2806	ODL	PHE	365	9.682	-14.194	-29.564	0.00	33.82	C
ATOM	2807	CDL	PHE	365	8.088	-16.386	-28.992	0.00	34.58	C
ATOM	2808	CDL	PHE	365	8.301	-14.091	-29.649	0.00	34.48	C
ATOM	2809	CDL	PHE	365	7.501	-15.190	-29.372	0.00	35.26	C
ATOM	2810	C	PHE	365	12.466	-17.386	-30.828	0.00	38.90	C
ATOM	2811	O	PHE	365	13.417	-16.172	-30.711	0.00	40.64	C
ATOM	2812	N	CYS	366	11.300	-17.669	-31.449	0.00	39.11	N
ATOM	2813	CA	CYS	366	11.055	-18.967	-32.067	0.00	38.82	C
ATOM	2814	CB	CYS	366	9.729	-19.520	-31.551	0.00	29.14	C
ATOM	2815	CD	CYS	366	8.351	-18.372	-31.743	0.00	25.65	C
ATOM	2816	C	CYS	366	11.103	-18.928	-33.612	0.00	39.74	C
ATOM	2817	O	CYS	366	11.403	-19.961	-34.209	0.00	40.79	C
ATOM	2818	N	GLY	367	10.807	-17.764	-34.240	0.00	39.42	N
ATOM	2819	CA	GLY	367	10.975	-17.653	-35.683	0.00	38.50	C
ATOM	2820	CB	GLY	367	9.753	-18.144	-36.469	0.00	38.32	C
ATOM	2821	CD	GLY	367	9.738	-19.245	-37.009	0.00	38.51	C
ATOM	2822	ODL	GLY	368	8.288	-17.251	-36.312	0.00	37.51	C
ATOM	2823	CA	GLY	368	7.492	-17.597	-37.171	0.00	36.69	C
ATOM	2824	C	GLY	368	7.619	-17.682	-38.702	0.00	36.66	C
ATOM	2825	O	GLY	368	8.381	-16.975	-39.338	0.00	37.77	C
ATOM	2826	N	VAL	369	6.760	-18.588	-39.212	0.00	35.97	N
ATOM	2827	CA	VAL	369	6.400	-18.731	-40.614	0.00	33.92	C
ATOM	2828	CB	VAL	369	6.557	-20.202	-42.071	0.00	25.01	C
ATOM	2829	CDL	VAL	369	5.869	-21.233	-43.094	0.00	30.32	C
ATOM	2830	CDL	VAL	369	6.052	-20.443	-42.495	0.00	27.26	C
ATOM	2831	C	VAL	369	4.963	-18.204	-40.714	0.00	33.52	C
ATOM	2832	O	VAL	369	5.800	-18.795	-40.192	0.00	33.78	C
ATOM	2833	N	ASP	370	4.877	-16.993	-41.319	0.00	33.05	N
ATOM	2834	CA	ASP	370	3.744	-16.085	-41.095	0.00	32.05	C
ATOM	2835	CB	ASP	370	2.937	-16.337	-42.032	0.00	35.18	C
ATOM	2836	CD	ASP	370	2.755	-15.773	-43.462	0.00	41.63	C
ATOM	2837	ODL	ASP	370	1.787	-15.309	-44.049	0.00	44.49	C
ATOM	2838	ODL	ASP	370	3.865	-15.779	-43.878	0.00	43.42	C
ATOM	2839	C	ASP	370	3.282	-16.135	-39.626	0.00	30.80	C
ATOM	2840	O	ASP	370	2.166	-16.526	-39.301	0.00	31.36	C
ATOM	2841	N	GLY	371	4.213	-15.736	-38.736	0.00	29.05	N
ATOM	2842	CA	GLY	371	3.893	-15.641	-37.601	0.00	27.25	C
ATOM	2843	C	GLY	371	3.653	-17.047	-36.592	0.00	26.67	C
ATOM	2844	O	GLY	371	3.622	-17.105	-35.366	0.00	26.16	C
ATOM	2845	N	VAL	372	3.480	-16.337	-37.378	0.00	26.06	C
ATOM	2846	CA	VAL	372	3.378	-19.446	-36.726	0.00	25.71	C
ATOM	2847	CB	VAL	372	2.654	-20.455	-37.638	0.00	24.00	C
ATOM	2848	CDL	VAL	372	2.547	-21.840	-36.874	0.00	26.39	C
ATOM	2849	CDL	VAL	372	2.271	-18.942	-38.012	0.00	22.43	C
ATOM	2850	C	VAL	372	4.783	-19.963	-36.359	0.00	25.01	C
ATOM	2851	O	VAL	372	5.610	-20.192	-37.229	0.00	25.70	C
ATOM	2852	N	CYS	373	5.911	-20.152	-35.043	0.00	24.40	N
ATOM	2853	CA	CYS	373	6.103	-20.872	-34.455	0.00	24.75	C
ATOM	2854	CB	CYS	373	6.598	-20.124	-33.221	0.00	22.74	C
ATOM	2855	CD	CYS	373	7.722	-18.784	-33.625	0.00	26.35	C
ATOM	2856	C	CYS	373	5.697	-22.290	-33.919	0.00	25.84	C
ATOM	2857	O	CYS	373	4.438	-22.683	-34.033	0.00	25.84	C

ATOM	2988	CD	GLN	390	19.438	-15.553	-18.514	0.00	20.00	C
ATOM	2989	CE1	GLN	390	19.695	-14.579	-19.217	0.00	20.00	O
ATOM	2990	NE2	GLN	390	18.990	-16.747	-18.957	0.00	20.00	N
ATOM	2991	C	GLN	390	17.737	-13.666	-15.114	0.00	20.00	C
ATOM	2992	O	GLN	390	17.745	-12.998	-16.137	0.00	20.00	O
ATOM	2993	N	GLY	391	17.895	-13.125	-13.893	0.00	44.54	N
ATOM	2994	CA	GLY	391	18.107	-13.848	-12.645	0.00	44.56	C
ATOM	2995	C	GLY	391	17.772	-12.922	-11.483	0.00	45.39	C
ATOM	2996	O	GLY	391	18.589	-12.617	-10.611	0.00	45.39	O
ATOM	2997	N	ASP	392	16.512	-12.459	-11.550	0.00	45.62	N
ATOM	2998	CA	ASP	392	16.172	-11.299	-10.733	0.00	45.99	C
ATOM	2999	CB	ASP	392	16.318	-10.012	-11.582	0.00	45.28	C
ATOM	3000	OD	ASP	392	17.747	-9.666	-12.021	0.00	45.72	O
ATOM	3001	OD1	ASP	392	18.408	-8.853	-11.367	0.00	48.42	O
ATOM	3002	OD2	ASP	392	18.219	-10.183	-13.029	0.00	48.45	O
ATOM	3003	C	ASP	392	14.768	-11.401	-10.059	0.00	45.74	C
ATOM	3004	O	ASP	392	14.127	-10.372	-9.906	0.00	46.12	O
ATOM	3005	N	PHE	393	14.345	-12.637	-9.719	0.00	45.56	N
ATOM	3006	CA	PHE	393	13.145	-12.711	-8.984	0.00	45.07	C
ATOM	3007	CB	PHE	393	12.364	-14.018	-8.108	0.00	32.59	C
ATOM	3008	CG	PHE	393	10.989	-13.926	-8.494	0.00	20.25	C
ATOM	3009	CD1	PHE	393	10.610	-14.779	-7.469	0.00	15.47	C
ATOM	3010	CD2	PHE	393	10.086	-12.959	-8.914	0.00	19.44	C
ATOM	3011	CE1	PHE	393	9.382	-14.662	-6.833	0.00	13.08	C
ATOM	3012	CE2	PHE	393	8.861	-12.825	-8.279	0.00	20.53	C
ATOM	3013	CZ	PHE	393	8.501	-13.674	-7.241	0.00	11.71	C
ATOM	3014	C	PHE	393	13.509	-12.399	-7.407	0.00	45.73	C
ATOM	3015	O	PHE	393	12.773	-11.725	-6.687	0.00	45.31	O
ATOM	3016	N	ALA	394	14.728	-12.819	-6.990	0.00	46.74	N
ATOM	3017	CA	ALA	394	15.213	-12.325	-5.702	0.00	47.96	C
ATOM	3018	CB	ALA	394	16.367	-13.170	-5.159	0.00	45.87	C
ATOM	3019	C	ALA	394	15.584	-10.824	-5.750	0.00	49.39	C
ATOM	3020	O	ALA	394	15.262	-10.091	-4.827	0.00	50.93	O
ATOM	3021	N	LYS	395	16.238	-10.392	-6.853	0.00	49.20	N
ATOM	3022	CA	LYS	395	16.578	-8.971	-6.982	0.00	48.66	C
ATOM	3023	CB	LYS	395	17.418	-8.676	-6.234	0.00	46.40	C
ATOM	3024	CG	LYS	395	18.903	-9.027	-8.109	0.00	45.86	C
ATOM	3025	CD	LYS	395	19.203	-10.531	-8.116	0.00	48.64	C
ATOM	3026	CE	LYS	395	20.427	-10.893	-8.973	0.00	51.96	C
ATOM	3027	NE	LYS	395	20.206	-10.586	-10.393	0.00	58.42	N
ATOM	3028	C	LYS	395	15.309	-8.113	-7.032	0.00	48.82	C
ATOM	3029	O	LYS	395	15.296	-6.954	-6.641	0.00	49.36	O
ATOM	3030	N	CYS	396	14.223	-8.740	-7.504	0.00	49.05	N
ATOM	3031	CA	CYS	396	12.919	-8.116	-7.413	0.00	50.34	C
ATOM	3032	CB	CYS	396	11.929	-8.969	-8.198	0.00	41.14	C
ATOM	3033	SG	CYS	396	10.298	-9.201	-7.496	0.00	38.85	S
ATOM	3034	C	CYS	396	12.501	-7.884	-5.953	0.00	51.97	C
ATOM	3035	O	CYS	396	11.982	-6.834	-5.608	0.00	51.74	O
ATOM	3036	N	GLY	397	12.748	-8.874	-5.086	0.00	53.22	N
ATOM	3037	CA	GLY	397	12.538	-8.625	-3.702	0.00	54.85	C
ATOM	3038	C	GLY	397	10.811	-8.438	-3.581	0.00	55.89	C
ATOM	3039	O	GLY	397	10.287	-7.653	-2.783	0.00	55.84	O
ATOM	3040	N	PHE	398	10.123	-9.254	-4.400	0.00	56.89	N
ATOM	3041	CA	PHE	398	8.691	-9.354	-4.178	0.00	58.18	C
ATOM	3042	CB	PHE	398	7.989	-10.601	-5.381	0.00	47.91	C
ATOM	3043	CG	PHE	398	6.508	-9.922	-5.165	0.00	39.29	C
ATOM	3044	CD1	PHE	398	5.785	-11.035	-4.637	0.00	36.72	C
ATOM	3045	CD2	PHE	398	5.883	-8.694	-5.249	0.00	32.82	C
ATOM	3046	CE1	PHE	398	4.395	-10.905	-4.579	0.00	33.15	C
ATOM	3047	CE2	PHE	398	4.531	-8.938	-5.004	0.00	31.60	C
ATOM	3048	CS	PHE	398	3.783	-9.666	-4.671	0.00	33.30	C
ATOM	3049	C	PHE	398	8.407	-10.180	-2.914	0.00	60.26	C
ATOM	3050	O	PHE	398	8.310	-11.295	-2.980	0.00	60.24	O
ATOM	3051	N	VAL	399	8.242	-9.464	-1.783	0.00	0.00	N
ATOM	3052	CA	VAL	399	7.864	-10.116	-0.535	0.00	0.00	C
ATOM	3053	CB	VAL	399	8.386	-9.283	0.660	0.00	0.00	C
ATOM	3054	CG1	VAL	399	8.132	-9.947	2.020	0.00	0.00	C
ATOM	3055	CG2	VAL	399	9.889	-9.017	0.523	0.00	0.00	C
ATOM	3056	C	VAL	399	6.320	-10.276	-0.501	0.00	0.00	C
ATOM	3057	O	VAL	399	5.561	-9.327	-0.728	0.00	0.00	O
ATOM	3058	N	PRO	400	5.836	-11.505	-0.198	0.00	67.95	N
ATOM	3059	CD	PRO	400	6.606	-12.734	-0.020	0.00	68.35	C
ATOM	3060	CA	PRO	400	4.404	-11.689	0.013	0.00	69.31	C
ATOM	3061	CS	PRO	400	4.223	-13.204	0.109	0.00	69.06	C
ATOM	3062	CG	PRO	400	5.585	-13.702	0.577	0.00	68.86	C
ATOM	3063	C	PRO	400	3.956	-10.890	1.263	0.00	70.48	C
ATOM	3064	O	PRO	400	4.774	-10.547	2.115	0.00	70.92	O
ATOM	3065	N	SER	401	2.663	-10.529	1.242	0.00	0.00	N
ATOM	3066	CA	SER	401	2.069	-9.534	2.127	0.00	0.00	C
ATOM	3067	CB	SER	401	1.594	-6.365	1.238	0.00	0.00	C
ATOM	3068	OC	SER	401	1.960	-8.369	-0.114	0.00	0.00	O
ATOM	3069	C	SER	401	0.913	-10.174	2.938	0.00	0.00	C
ATOM	3070	OCT1	SER	401	1.034	-11.306	3.375	0.00	0.00	O
ATOM	3071	OCT2	SER	401	-0.118	-9.355	3.159	0.00	0.00	O
END										

Fig. 1

Fig. 1

【配列表】

0004426307000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 9/16 (2006.01)		C 1 2 N 9/16	Z

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(72)発明者 松井 知子
千葉県市川市東大和田 1 - 6 - 9 - エー 3 0 3

(72)発明者 フグルサン, クラウス クローネ
デンマーク国, デーコー - 3 6 7 0 ベクソー, コルショーイガールスバイ 7, ダムステズ, ガールズ

(72)発明者 スペンセン, アラン
デンマーク国, デーコー - 2 9 7 0 ホールショルム, オウエルダムスバイ 1 3

(72)発明者 福山 志朗
千葉県千葉市緑区有吉町 1 6 6 - 2

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 4 9 0 2 2 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq