

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5492879号
(P5492879)

(45) 発行日 平成26年5月14日 (2014. 5. 14)

(24) 登録日 平成26年3月7日 (2014. 3. 7)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 9/28 (2006. 01)	C 1 2 N 9/28 Z N A
C 1 1 D 3/386 (2006. 01)	C 1 1 D 3/386
C 1 2 P 19/04 (2006. 01)	C 1 2 P 19/04 Z
C 1 2 N 15/00 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00

請求項の数 8 (全 275 頁)

(21) 出願番号	特願2011-512598 (P2011-512598)	(73) 特許権者	509240479
(86) (22) 出願日	平成21年6月2日 (2009. 6. 2)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65) 公表番号	特表2011-522536 (P2011-522536A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4
(43) 公表日	平成23年8月4日 (2011. 8. 4)		3 0 4、パロ・アルト、ページ・ミル・ロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/046034		ード 9 2 5
(87) 国際公開番号	W02009/149130	(74) 代理人	100071010
(87) 国際公開日	平成21年12月10日 (2009. 12. 10)		弁理士 山崎 行造
審査請求日	平成23年2月3日 (2011. 2. 3)	(74) 代理人	100118647
(31) 優先権主張番号	61/059, 423		弁理士 赤松 利昭
(32) 優先日	平成20年6月6日 (2008. 6. 6)	(74) 代理人	100138438
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 尾首 亘聰
前置審査		(74) 代理人	100138519
			弁理士 奥谷 雅子
		(74) 代理人	100123892
			弁理士 内藤 忠雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された性質を有するゲオバチルスステアロセリモフィリス (*Geobacillus stearothermophilus*) アルファアミラーゼ (Amy S) 変異体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

αアミラーゼ活性を有し、酵素の性能を改善する少なくとも1つの変更された特徴を有する変異ポリペプチドであって、

前記ポリペプチドは Amy S (配列番号 1) 又は Amy S 切断変異体 (配列番号 2) から選択される親 αアミラーゼポリペプチドに対して少なくとも 95% の配列同一性を有し、親ポリペプチドと変異ポリペプチドとのアラインメントにより決定される親 αアミラーゼポリペプチドのアミノ酸残基に対応する変異体のアミノ酸残基において、該変異は親ポリペプチドのアミノ酸残基から該変異ポリペプチドのアミノ酸残基に変更するものである変異を有しており、

前記変異は、I 1 8 1 A、I 1 8 1 P、S 2 4 2 Q、N 1 9 3 Y、及び E 1 8 8 P からなる群より選択される 1 つ以上の置換を導入するものである、変異ポリペプチド。

【請求項 2】

親ポリペプチドが配列番号 1 のポリペプチドに対して少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 1 に記載の変異ポリペプチド。

【請求項 3】

親ポリペプチドが配列番号 2 のポリペプチドに対して少なくとも 95% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 1 に記載の変異ポリペプチド。

【請求項 4】

親ポリペプチドが C 末端の 29 アミノ酸残基が切断されている、請求項 1 に記載の変異ポ

リペプチド。

【請求項5】

請求項1乃至4のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む洗浄組成物。

【請求項6】

請求項1乃至4のいずれか1項に記載のポリペプチドを含むデンプン液化組成物。

【請求項7】

請求項1乃至4のいずれか1項に記載の変異体 α アミラーゼとデンプン基質を接触させる工程を含む、 α アミラーゼ変異体を用いて可溶性デンプン基質を加水分解する方法。

【請求項8】

デンプン基質を前記変異体 α アミラーゼと接触させる前又は同時にフィターゼと接触させる工程を更に含む、請求項7に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本出願は2008年6月に出願された米国特許継続出願61/059,423に基づいて優先権を主張する。

【0002】

親 α アミラーゼに対して特異活性、基質特異性、基質結合、基質切断、基質安定性、pH依存活性、pH依存安定性、酸化安定性、 Ca^{2+} 依存性、pI、及び洗浄性能の少なくとも1つが改善されている親 α アミラーゼの変異体を提供する。この変異体はデンプン

20

転換、エタノール生成、洗濯、食器洗浄、硬表面洗浄、テキスタイルデサイジング、及び／又は甘味料生産に適している。

【背景技術】

【0003】

アルファ(α)アミラーゼ($\alpha-1$, 4-グルカン-グルカノヒドロラーゼ、E.C. 3.2.1.1)はデンプン又は他の直鎖及び／又は分岐1, 4-グルコシドオリゴ及びポリサッカライドの加水分解を触媒する酵素のグループに属する。 α アミラーゼは、デンプン処理の初期ステージ(液化)、湿式トウモロコシ粉碎、アルコール生成、洗剤基材中の洗浄剤として、テキスタイル工業におけるデンプンデサイジングにおいて、パン焼き工程において、飲料工業において、油田のドリル工程において、再生紙製造のインク除去工程において、及び動物飼料において、商業的に用いられている。

30

【0004】

近年利用可能となっている α アミラーゼは前述の利用形態の幾つかにおいて、成功裏に用いられている。しかし、特異活性、改良された基質特異性、改善された熱、pH、及び酸化安定性、及び低い Ca^{2+} 依存性を有する α アミラーゼに対する需要がいまだ存在する。

【発明の概要】

【0005】

1つの側面において、SPEZYME(商標)Xtraの又はAmy S様 α アミラーゼの新規な α アミラーゼ変異体が提供される。特に、デンプンの工業的処理(デンプン液化、洗浄等)に関して有利な、改善された性質を有する変異体を提供する。

40

【0006】

そのような性質を変更することは親 α アミラーゼに、例えば、特異活性、基質特異性、基質結合、基質切断パターン、熱安定性、pH/活性プロファイル、pH/安定性プロファイル、酸化に対する安定性、 Ca^{2+} 依存性、及び他の所望の性質に影響を与える変異を導入することにより達成できる。例えば、この修飾は親Spezyme Xtra様 α アミラーゼと比較したときに、 Ca^{2+} 依存性が少なく、及び／又は変更されたpH/活性プロファイル及び／又は熱安定性を有する変異体となる。

【0007】

幾つかの態様において、この変異体は親ゲオバチルスステアロセリモフィリス(Geo

50

bacillus stearoothermophilus) αアミラーゼに基づくものであり、このαアミラーゼに対して、例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列同一性を有する。他の態様において、この変異体は関連する親αアミラーゼに基づくものであり、ゲオバチルスステアロセリモフィリスαアミラーゼに対して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の特定の配列同一性を有する。

【0008】

幾つかの態様において、このαアミラーゼ活性を有し、及び酵素の少なくとも1つの性質が修飾された変異ポリペプチドが提供される。この変異ポリペプチドはAmyS（配列番号1）由来αアミラーゼ又はAmySの欠失変異体（配列番号2）ポリペプチドから選択される親αアミラーゼポリペプチドに対して少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を有し、親ポリペプチドと変異ポリペプチドの配列アラインメントにより決定される、親αアミラーゼポリペプチドのアミノ酸残基において少なくとも1つの以下の変異を有する：

a)

D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443, 及びD458

からなる群より選択される1つ以上位置において陽性チャージされたアミノ酸残基を導入する置換、

b)

74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q, 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K, 474L, 474M, 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S, 及び474V

からなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換、

c)

10

20

30

6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I, 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S, 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S, 141V, 150E, 151I, 152G, 155S, 155Y, 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q, 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F, 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K, 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K, 294W, 301F, 301I, 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G, 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T, 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I, 343P, 343R, 343Y, 345I, 345Q, 369I, 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T, 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I, 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M, 433V, 433Y, 442A, 442G, 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I, 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H, 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I, 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T, 465V, 469D, 469W, 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 476A, 476G, 476L, 476M, 476N, 及び 476T

10

20

からなる群より選択されるアミノ酸残基の 1 つ以上を導入する置換、
d)

124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 179P, 180A, 180D, 180H, 180K, 180L, 180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P, 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N, 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q, 437Y, 446A, 474Q, 及び 474S

30

からなる群より選択されるアミノ酸残基の 1 つ以上を導入する置換、
e)

6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T, 14Y, 15A, 15D, 15E, 015G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E, 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 81Y, 121P, 139D, 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q, 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P, 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H, 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N, 221R, 221S, 221V, 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A, 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W, 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q, 268R, 268S, 274A, 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y, 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V, 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G, 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N, 340Q, 345E, 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H, 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A, 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R, 及び 471Y

10

20

からなる群より選択されるアミノ酸残基の 1 つ以上を導入する置換、及び f)

I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, G132A, N193Y, 及び E188P

からなる群より選択されるアミノ酸残基の 1 つ以上を導入する置換。

【 0 0 0 9 】

幾つかの態様において、この変異体は

30

D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443, 及び D458

からなる群より選択される 1 つ以上の陽性チャージされたアミノ酸を導入する変異を含む。特定の態様において、改善された洗浄は北米における洗濯条件下であり、マイクロスウォッチアッセイを用いて決定される。特定の態様において、この陽性にチャージされたアミノ酸残基はアルギニンである。

【 0 0 1 0 】

幾つかの態様において、この変異体は

40

74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q, 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K, 474L, 474M, 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S, 及び 474V

10

からなる群より選択されるアミノ酸の1つ以上を導入する置換を含む。この変異体は親ポリペプチドと比較した場合、改善された熱安定性を有する。

20

【0011】

幾つかの態様において、この変異体は

6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I,
 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S,
 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S, 141V, 150E, 151I, 152G, 155S, 155Y,
 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q,
 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F,
 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K,
 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K, 294W,
 301F, 301I, 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G,
 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T,
 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I, 343P, 343R, 343Y, 345I, 345Q, 369I,
 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T,
 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I,
 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M,
 433V, 433Y, 442A, 442G, 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I,
 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H,
 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I,
 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T,
 465V, 469D, 469W, 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 476A, 476G, 476L, 476M, 476N,
 及び 476T

からなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換を含む。この変異体は親ポリペプチドに対して改善された熱安定性を有する。

【0012】

幾つかの態様において、この変異体は

10

20

30

40

124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L,
 159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 179P, 180A,
 180D, 180H, 180K, 180L, 180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P,
 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N,
 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q,
 437Y, 446A, 474Q, 及び 474S

10

からなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換を含む。この変異体は親ポリペプチドと比較して高められた活性又は発現を示す。

【0013】

幾つかの態様において、この変異体は

6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T,
 14Y, 15A, 15D, 15E, 15G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E,
 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 81Y, 121P, 139D,
 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q,
 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P,
 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H,
 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N,
 221R, 221S, 221V, 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A,
 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W,
 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q, 268R, 268S, 274A,
 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y,
 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V,
 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G,
 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N,
 340Q, 345E, 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H,
 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A,
 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R, 及び 471Y

20

30

40

からなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換を含む。この変異体は

50

親ポリペプチドと比較して高い活性又は発現を示す。

【0014】

幾つかの態様において、この変異体は、

I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, G132A, N193Y, 及び E188P

からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸残基を導入する置換を含む。この変異体は親ポリペプチドと比較して、デンプン液化アッセイにおいて増大された粘度低下を示す。

【0015】

幾つかの態様において、変異体 α アミラーゼが提供される。このアミラーゼは親 α アミラーゼポリペプチド由来のアミノ酸配列を含み、

10

5, 6, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 27, 29, 36, 39, 50, 52, 53, 54, 67, 71, 73, 75, 77, 80, 81,
83, 85, 90, 92, 107, 111, 113, 114, 120, 121, 126, 128, 131, 133, 137, 138, 139, 141,
143, 147, 149, 150, 151, 152, 155, 160, 165, 168, 172, 173, 177, 188, 191, 192, 193,
196, 200, 201, 202, 213, 216, 217, 220, 221, 227, 232, 235, 237, 238, 240, 246, 249,
250, 252, 253, 254, 255, 257, 258, 268, 272, 274, 275, 279, 283, 285, 293, 294, 297,
300, 301, 306, 309, 312, 313, 317, 318, 319, 320, 338, 339, 340, 343, 345, 363, 366,
369, 370, 375, 379, 381, 385, 386, 391, 392, 393, 394, 400, 402, 403, 404, 406, 407,
410, 413, 414, 416, 419, 422, 427, 433, 436, 439, 442, 445, 447, 448, 450, 452, 455,
463, 465, 469, 471, 473, 及び 476

20

30

からなる群より選択される位置において3つ以上の変異の組み合わせを有する。このポリペプチドは α アミラーゼ活性を有し、少なくとも3つ以上の変異のそれぞれは、親ポリペプチドとは異なるアミノ酸残基を導入する。特定の態様において、変異箇所数は4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上である。

【0016】

幾つかの態様において、変異が既に242で起こっていなければ、変異はS242A、S242E、S242Q、S242F、S242H、又はS242Hの置換と組み合わせたものである。特定の態様において、この置換はS242Qである。幾つかの態様において、変異が既に179又は180で生じていなければ、変異は179及び180の位置の欠失とともに生じている。幾つかの態様において、変異が既に349又は428で生じていなければ、変異はこれらのアミノ酸の1つ以上におけるシステインの置換と共に生じている。

40

【0017】

幾つかの態様において、変異が既に以下に列挙する位置で生じていなければ、変異は

P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, G95, Q97, W115, D117,
 P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148, S153, Y159, W166,
 S169, K171, W187, P209, N224, S242, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304,
 R308, T321, Q358, P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432,
 W437, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474, 又は R483

10

の位置における置換と共に生じている。

【0018】

幾つかの態様において、変異が以下に列挙する位置で既に生じていなければ、この変異は

M8, M9, M15, M96, V128, A111, H133, W138, T149, M197, N188, M200, M206,
 A209, A210, M284, M307, M311, M316, H405, T412, M438, N193F, 及び V416G

の位置における置換と共に生じている。

20

【0019】

幾つかの態様において、親ポリペプチドは配列番号1のポリペプチドに少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、のアミノ酸配列同一性を有している。

【0020】

幾つかの態様において、この親ポリペプチドは配列番号2のポリペプチドに少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、のアミノ酸配列同一性を有している。

【0021】

幾つかの態様において、この親ポリペプチドは配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号15、及び配列番号16からなる群より選択されるポリペプチドに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有している。幾つかの態様において、この親ポリペプチドはC末端アミノ酸残基の欠失を含む。特定の態様において、この欠失はC末端の29アミノ酸残基である。

30

【0022】

幾つかの態様において、この変異ポリペプチドは106又は199のいずれか、あるいは両方の位置での変異を含まない。

【0023】

幾つかの態様において、本明細書から逸脱しない変異のリストから1つ以上の変異を追加又は欠失させることができる。関連して、変異のリストに照らして1つ以上の変異を変異のサブセットとして組み合わせることができる。

40

【0024】

他の側面において、前述の変異体αアミラーゼの1つ以上を含む組成物が提供される。特定の態様において、この組成物は洗濯用洗剤、食器用洗剤、硬表面洗浄組成物等の洗浄組成物である。この組成物は界面活性剤を含んでいてもよい。

【0025】

他の側面において、αアミラーゼ変異体を用いて可溶性デンプン基質を加水分解する方法を提供する。幾つかの態様において、この変異体はI181A、I181P、I181C、I181E、I181Y、S242A、S242E、S242Q、N193Y、及びE188Pからなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換を含む。

50

【0026】

幾つかの態様において、この変異体 α アミラーゼはフィチン酸加水分解酵素と一緒に組み合わせる。 α アミラーゼ活性（ α アミラーゼ単位）のフィチン酸活性（フィターゼ）に対する割合、即ち、AAU：FTUは約1：15乃至約15：1、及び好ましくは1：10乃至約10：1である。特定の態様において、AAU：FTUの割合は1：4乃至3：1、又は1：1でもよい。

【0027】

更なる態様において、スラリーにおいてデンプンを液化する方法を提供する。この方法は乾燥又は湿式粉碎のいずれかからの顆粒デンプン等の植物物質を含む基質を含む。この方法は1次及び／又は2次液化工程を含む。1次及び／又は2次液化工程において、スラ
 10
 リーに、少なくとも1つのフィチン酸加水分解酵素及び／又は少なくとも変異体 α アミラーゼとの組み合わせを、同時に又は任意の順番で別々に添加する工程を含む。この方法は更に、液化されたデンプンを糖化して発酵性糖を得る工程、及びこの発酵性糖を回収する工程を含む。幾つかの態様において、この方法は更に好適な条件下でこの発酵性糖を発酵させてアルコール等の最終生成物を得る工程を含む。幾つかの態様において、この酵素組成物は少なくとも1つの変異体 α アミラーゼ及びフィターゼを含む。幾つかの態様において、この酵素組成物はブレンドされたものである。

【0028】

更なる態様において、デンプン基質を発酵する方法を提供する。この方法は変異体 α アミラーゼ及びフィターゼの組み合わせを単独で、又は分割して添加する工程を含む。他の
 20
 側面において、処理されたデンプン基質はエタノールへと発酵される。

【0029】

他の側面において、デンプン転換方法及びエタノール発酵方法が提供される。これらの方法は酸又はアルカリを添加してpH調整をする必要がない。1つの態様は、pH調製を必要としない液化工程に関する。この液化工程のpHはpH4.5乃至5.4の範囲であり、酸性中和剤は液化工程に添加されない。他の態様において、この液化工程のpHは4.8乃至5.8の範囲であり、酸性中和剤を添加しない。

【0030】

他の側面において、発酵性基質を得る方法を提供する。この方法は基質デンプンを含む粉碎された穀物のスラリーを0乃至30℃のデンプンゼラチン化温度未満の温度で、フィ
 30
 チン酸加水分解酵素と接触させる工程、このスラリーを変異体 α アミラーゼと接触させる工程、温度を顆粒デンプンのゼラチン化温度以上に高くして、デンプンをゼラチン化する工程、及びデンプンを加水分解し発酵性基質を得るのに十分な時間、ゼラチン化されたデンプンをこの α アミラーゼと接触させて、ゼラチン化されたデンプンを加水分解する工程を含む。このフィチン酸加水分解酵素はバクテリア又は糸状菌フィターゼである。糸状菌フィターゼは（*Aspergillus*）アスペルギルス（*Aspergillus*）フィターゼ又はブチアウクセラ（*Buttiauxella*）フィターゼでよい。幾つかの態様において、バクテリアフィターゼはエシュリキアリ（*Escherichia coli*）由来である。

【0031】

他の側面において、発酵性糖を生成する方法を提供する。この方法は（a）粉碎されたデンプン含有物質を水又は蒸留残渣（thin stillage）と混合して（この蒸留残渣は10乃至70% v/vである）、及び乾燥固形含量（ds）が20乃至50% w/wデンプン含有スラリーを得る工程、（b）このスラリーをデンプンの液化前又は液化と同時にフィターゼで処理をする工程、（c）デンプンを液化する工程、（d）工程（b）の間に及び／又は液化工程と同時に、デンプンに変異体 α アミラーゼを添加する工程、及び（e）液化されたデンプンを糖化して発酵性糖を得る工程を含む。工程（a）、（b）、（c）、（d）、又は（e）のいずれにおいてもpHを調整しない。幾つかの態様において、発酵性糖は回収され、又は精製され、あるいは異性化される。他の態様において、フィターゼを液化工程の前に添加する。幾つかの態様において、この α アミラーゼをフ
 40
 50

ィターゼと一緒に添加する。更なる態様において、第二 α アミラーゼ投与が液化工程の間に行われる。

【0032】

更なる側面において、デンプン含有物質からアルコールを生成する方法を提供する。この方法は前述の液化デンプンを液化及び糖化して発酵性糖を得る工程、及びこの発酵性糖を発酵性微生物を用いて好適な条件下で更に発酵して、アルコールを得る工程を含む。幾つかの態様において、この糖化及び発酵工程は同時に行う。幾つかの態様において、アルコールはエタノールである。

【0033】

他の側面において、変異体 α アミラーゼをコードしている、発現ベクターを含むDNA構築体を提供する。この変異体 α アミラーゼを発現する方法、及び変異体 α アミラーゼ単独又は他の α アミラーゼ酵素と組み合わせて、デンプン液化工程及び洗浄等の各種工業プロセスに用いる方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は幾つかの関連するAmyS α アミラーゼの配列アラインメントを示す。

【図2】図2はpHPLT-AmySプラスミドを示す。

【図3】図3は95℃で30分間熱ストレス下に置いた後のS242ライブラリー変異体の残余活性を示す。P、S、W、及びYの位置での変異体は欠落しており、野生型AmyS (SPEZYME (商標) Xtra、「Z」のラベルがある) により置換されている。ラインは野生型酵素の残余活性の標準誤差の2倍及び3倍以上高い位置を示す。S242A及びS242Qは明らかに野生型酵素よりも高い残余活性を示している。

【図4】図4A乃至4Iは図1に示したアミノ酸配列の対アラインメントを示す。

【図5】図5は野生型及びアミラーゼ変異体のカルシウムを添加していない熱融解曲線及び融点を示す。

【図6】図6は2mMカルシウムを添加した野生型及びアミラーゼ変異体の熱融解曲線及び融点を示す。

【図7】図7は3つの経時ポイントにおけるLiquozyme SCと比較したSPEZYME (商標) Xtra及び2つの変異体の活性プロファイルを示す。

【図8】図8は3つの経時ポイントにおけるS242Q変異体と比較した4つの変異体の活性プロファイルを示す。

【図9】図9は30 μ g投与におけるLiquozyme (商標) SC又はPEZYME (商標) Xtra α アミラーゼの作用によるトウコロコシ粉の粘度減少を示す。

【図10】図10は30 μ g投与におけるLiquozyme (商標) SC又はPEZYME (商標) Xtra α アミラーゼ、又は2つの変異体の1つ (S242A及びS242Q) の作用に依存するトウコロコシ粉の粘度減少を示す。

【図11】図11は20 μ g投与におけるLiquozyme (商標) SC又はPEZYME (商標) Xtra α アミラーゼ、又は2つの変異体の1つ (S242A及びS242Q) の作用によるトウコロコシ粉の粘度減少を示す。

【図12】図12は、Liquozyme (商標) SC又はPEZYME (商標) Xtra、又は2つの変異体の1つ (S242A及びS242Q) で処理した全粒粉砕コーンの経時的 (0、30、60、及び90分) なDE変化を示す。

【図13】図13は、Liquozyme (商標) SC又はPEZYME (商標) Xtra、又は2つの変異体の1つ (S242A及びS242Q) で処理した全粒粉砕コーンの経時的 (0、30、60、及び90分) な蒸気処理後の粘度を示す。

【図14】図14は、フィターゼ及びアミラーゼ (PEZYME (商標) Xtra、又はS242Q変異体) で処理した全粒粉砕コーンの経時的 (0、30、60、及び90分) DE変化を示す。MAXALIQ (商標) はダニスコ、ジェネンコアディビジョンより入手可能なフィターゼ/アミラーゼブレンドである。実施例8参照。

【図15】図15はフィターゼ及びアミラーゼ (PEZYME (商標) Xtra、又はS

10

20

30

40

50

242Q変異体)で処理した全粒粉碎コーンの経時的(0、30、60、及び90分)蒸気処理後の粘度を示す。

【図16】図16は、S242Q変異体及びフィターゼで処理した全粒粉碎コーンのDE変化を示す。実施例9を参照。

【図17】図17はS242Q及びフィターゼで処理した全粒粉碎コーンの蒸気処理後の粘度を示す。実施例9を参照。

【図18】図18はS242Q変異体の熱安定性及び低pH安定性の増加における全粒コーンのフィターゼ処理の効果を示す。実施例9を参照。

【図19】図19は蒸気処理後の粘度低下における全粒コーンの1次液化の間にフィターゼを添加することの効果を示す。実施例9参照。

【図20】図20は1)従来法、及び2)pH調整を行わない方法におけるDDSGの硫酸塩及びフィチン酸含量を示す。実施例10参照。

【図21】図21はDE変化及びIP6としてのフィチン酸の減少の割合を示すグラフである。

【図22】図22は従来の処理条件下でのDE変化におけるS242Q変異体αアミラーゼの効果を示すグラフである。実施例8を参照。

【図23】図23は北米の洗浄条件下での機能を付加したコメデンプンマイクロスウォッチアッセイにおけるS242Q及びその変異体の性能を示すグラフである。条件はTIDE(商標)2x20℃。実施例16参照。

【図24】図24は西ヨーロッパ洗濯条件の下でコメデンプンマイクロスウォッチアッセイにおけるチャージ変異を有するTS-23アミラーゼ他のαアミラーゼ(即ち、欠失バチルス株、TS-23)の性能を示す図である。条件はPERSEL(商標)、40℃である。実施例16を参照のこと。

【図25】図25はS242Qの性能及び、チャージの機能としてのBODIPYデンプンアッセイにおけるその変異体の性能を示すグラフである。実施例16を参照。

【図26】図26Aは振とうチューブ発現の関数としての相対的BODIPYデンプン加水分解(即ち、相対的BODIPYデンプン加水分解対相対的振とうチューブ発現)図を示すグラフである。図26Bは相対的振とうチューブ発現の関数としての相対的マイクロスウォッチデンプン加水分解(即ち、相対的マイクロスウォッチデンプン加水分解対相対的振とうチューブ発現)を示すグラフである。実施例19参照。

【図27】図27Aはチャージの関数としての相対的振とうチューブ発現を示すグラフである。図27Bはチャージの関数としての相対的BODIPYデンプン加水分解を示すグラフである。実施例19参照。

【図28】図28Aはチャージの関数としての相対的な振とうチューブ発現を示すグラフである。図28Bはチャージの関数としての相対的マイクロスウォッチ洗浄活性を示すグラフである。実施例19を参照。

【図29】図29は、第一AmySラダー、30%DS、pH5.8、酵素量30mgを用いたコーンデンプン液化の後の最終粘度を示すグラフである。+6変異体について、最終粘度は非常に高く測定不能であった(装置過負荷)。実施例16参照。

【図30】図30は野生型に対するチャージ変化の関数としての第一AmySチャージラダーの熱安定性を示す図である。実験は標準的なアミラーゼ熱安定性アッセイを用いて行った。実施例17参照。

【図31A】図31AはpHの関数としての第一AmySチャージラダーのデンプン洗浄活性を示す。pH3.0乃至4.25は200mMギ酸ナトリウム+0.01%Tween-80である。pH4.25乃至5.5は200mMギ酸ナトリウム+0.01%Tween-80である。それぞれ単一のpK値を有する複数の滴定曲線にデータを当てはめた。実施例21を参照。

【図31B】図31BはAmyS触媒作用に対する見掛けのpKaにおけるチャージ変異体(第一チャージラダー)の効果を示すグラフである。実施例は21である。

【図32A】図32AはSPEZYME(商標)Xtraと比較するAmyS変異体によ

10

20

30

40

50

るコーン粉の粘度低下を示す。

【図32B】図32B上段はAmySSN193Yによるコーン粉の粘度低下を示す。
図32B下段はAmySSN193Yによる粘度低下におけるフィターゼ添加の効果を示す。
。配列の簡単な説明

【0035】

本明細書において以下のアミノ酸及び核酸を参照する。

【0036】

配列番号1（完全長野生型AmyS）

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEISGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSEKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

10

20

【0037】

配列番号2（欠失野生型AmyS、SPEZYME（商標）Xtra）

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEISGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSEKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTT

30

40

【0038】

配列番号3（完全長S242A AmyS）

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FAFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFGDYD GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

10

【0039】

配列番号4 (完全長S242Q AmyS)

20

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGWYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFGDYD GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

30

【0040】

配列番号5 (完全長S242E AmyS)

40

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSLGITALWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYLMYADLDMDHPEVVTELKNWGK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FEFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWYV GKQHAGKVFY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW
VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEFVRWTEPR LVAWP

10

【0041】

配列番号6 (Y a m a n e 7 0 7)

20

HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLSKSGITAVWIPPAWKGASQNDVGYGAYDLY
DLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTSLKNNGIQVYGDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRN
QEVGTGEYTIEAWTRFDFPGRGNTHSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVD
TENGNYDYLMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYTNLTGLDGRIDAVKHIKYSFTRDWINHVRSA
TGKNMFVAEAEFWKNDLGAIEENYLQKTNNHNSVFDVPLHYNLYNASKSGGNYDMRNIFNGTVVQR
HPSHAVTFVDNHDSQPEEALESFVEEWFKPLAYALTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMRS
KIDPILEARQKYAYGKQNDYLDHHNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWMFVGRNKAG
QVWSDITGNRTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNK

30

【0042】

配列番号7 (野生型A m y L ; L A T)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQND SAYLAEHGITAVWI PPAYKGTSQADVGYGAYDLYDL
GEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRV
ISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQGKAWDWEVSNENG
YDYLMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNHVREKTGKEM
FTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSFVPLHYQFHAASTQGGGYDMRKLLNGTVVSKHPLKS
VTFVDNHDTPGQSLESTVQTFKPLAYAFILTRESGYPQVFYGD MYGT KGDSQREIPALKHKI
EPILKARKQYAYGAQHDFDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNAGET
WHDITG NRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

10

【 0 0 4 3 】

配列番号 8 (野生型 Amy L ; T e r m a n y l)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWRRLQND SAYLAEHGITAVWI PPAYKGTSQADVGYGAYDLYDL
GEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRV
ISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQGKAWDWEVSNENG
YDYLMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNHVREKTGKEM
FTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSFVPLHYQFHAASTQGGGYDMRKLLNGTVVSKHPLKS
VTFVDNHDTPGQSLESTVQTFKPLAYAFILTRESGYPQVFYGD MYGT KGDSQREIPALKHKI
EPILKARKQYAYGAQHDFDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNAGET
WHDITG NRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

20

30

【 0 0 4 4 】

配列番号 9 (バチルスアミロリケファシエンスアミラーゼ)

VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYKGLSQSDNGYGPYDLYDLGE
FQQKGTVRTKYGTKSELQDAIGSLHSRNVQVYGDVVLNHKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETS
EEYQIKAWTDFRFPGRGNTYSDFKWHWHYHFDGADWDESRKISRIFKFRGEGKAWDWEVSSENG
YDYLMYADVDYDHPDVVAETKKWGIWYANELSLDGFRIDAACHIKFSFLRDWVQAVRQATGKEM
FTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFNQSVFDVPLHFNLQAASSQGGGYDMRRLLDGTVVSRHPEKA
VTFVENHDTQPGQSLESTVQTFWKPLAYAFILTRESGYPQVFYGDYMGTKGTSPKEIPSLKDNI
EPIIKARKEYAYGPQHDIYDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNAGET
WYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK

10

【0045】

配列番号10 (STAINZYME (商標))

HHNGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRSD ASNLKDKGIS AVWIPPAWKG ASQNDVGIGA
YDLYDLGEFN QKGTIRTKYG TRNQLQAAVN ALKSNGIQVY GDVVMNHKGG ADATEMVRVAV
EVNPNNRNQE VSGEYTIEAW TKFDFPGRGN THSNFKWRWY HFDGVDWDQS RKLNNRIYKF
RGDGKGWDWE VDTENGNYDY LMYADIDMDH PEVVNELRNW GVWYTNLTGL DGFRIDAVKH
IKYSFTRDWI NHVRSATGKN MFAVAEFWKN DLGAIENYLN KTNWNHVSVD VPLHYNLYNA
SKSGGNYDMR QIFNGTVVQR HPMHAVTFVD NHDSQPPEAL ESFVEEWFKP LAYALTLTRE
QGYPSVFYGD YYGIPTHGVP AMKSKIDPIL EARQKYAYGR QNDYLDHHNI IGWTREGNTA
HPNSGLATIM SDGAGGNKWM FVGRNKAGQV WTDITGNRAG TVTINADGWG NFSVNGGSVS
IWVNK

20

30

【0046】

配列番号11 (NATALASE (商標))

HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLRNRGITAIWIPPAWKGTSONDVGYGAYDLY
DLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLES A IHALKNNGVQVYGDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRN
QEISGDY TIEAWTKFDFPGRGNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRIYKFRGDGKAWDWEVD
SENGNYDYL MYADVDMDHPEVVNELRRWGEWYTNTLNLDGFRIDAVKHIKYSFTRDWLTHVRNA
TGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFVDVPLHYNLYNASNSGGNYDMAKLLNGTVVQK
HPMHAVTFVDNHDSQPGESLESFVQEFKPLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHSVPAMKA
KIDPILEARQNFAYGTQHDYFDHHNIIGWTREGNTTHPNSGLATIMSDGPGGEKWMYVGQNKAG
QVWHDI TGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR

10

【 0 0 4 7 】

配列番号 1 2 (K A O K S M 1 3 7 8)

HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDAANLKS K GITAVWIPPAWKGTSONDVGYGAYDLY
DLGEFNQKGTVRTKYGTRSQ L QGAVTSLKNNGIQVYGDVVMNHKGGADGTEMVNAVEVNRSNRN
QEISGEY TIEAWTKFDFPGRGNTHSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVD
IENGNYDYL MYADIDMDHPEVINELRNWGVWYTNTLNLDGFRIDAVKHIKYSYTRDWLTHVRNT
TGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLNKTSWNHVSFVDVPLHYNLYNASNSGGYFDMRNILNGSVVQK
HPIHAVTFVDNHDSQPGEALESFVQSWFKPLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPMSKS
KIDPLLQARQTYAYGTQHDYFDHHDIIIGWTREGDSSH P NSGLATIMSDGPGGNKWMYVGKHKAG
QVWRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVWVKQ

20

30

【 0 0 4 8 】

配列番号 1 3 (K A O K S M K 3 8)

DGLNGTMMQYYEWHLENDGQHWNRLHDDAAALSDAGITAIWIPPAYKGNSQADVGYGAYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSN DINVYGDVVMNHKMGADFEAVQAVQVNPTNRWQD
ISGAYTIDAWTGFD FSGRNNAYSDFKWRWFHFNGVDWDQRYQENHIFRFANTNWNWRVDEENG
YDYLLGSNIDFSHP EVQDELKDWGSWFTDEL DLDGYRLDAIKHIPFWYTS DWVRHQRNEADQDL
FVVGEYWKDDVGALEFYLD E MNWEMSLFDVPLN YNFYRASQQGGSYDMRNILRGSLVEAHPMHA
VTFVDNHDTQPGESLESWVADWFKPLAYATIL TREGGYPNVFYGDYYGIPNDNISAKKDMIDEL
LDARQNYAYGTQHDYFDHWDVVGW TREGSSSRPNSGLATIMSNGPGGSKWMYVGRQ NAGQTWTD
LTGNNGASVTINGDGWGEFFTNGG SVSVYVNQ

10

【0049】

配列番号14 (K A O K S M K 3 6)

DGLNGTMMQYYEWHLENDGQHWNRLHDDAEALSNAGITAIWIPPAYKGNSQADVGYGAYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSN DINVYGDVVMNHKLGADFEAVQAVQVNPSNRWQD
ISGVYTIDAWTGFD FPGRNNAYSDFKWRWFHFNGVDWDQRYQENHLFRFANTNWNWRVDEENG
YDYLLGSNIDFSHP EVQEELKDWGSWFTDEL DLDGYRLDAIKHIPFWYTS DWVRHQRSEADQDL
FVVGEYWKDDVGALEFYLD E MNWEMSLFDVPLN YNFYRASKQGGSYDMRNILRGSLVEAHPIHA
VTFVDNHDTQPGESLESWVADWFKPLAYATIL TREGGYPNVFYGDYYGIPNDNISAKKDMIDEL
LDARQNYAYGTQHDYFDHWDIVGW TREGTSSRPNSGLATIMSNGPGGSKWMYVGQQHAGQTWTD
LTGNHAASVTINGDGWGEFFTNGG SVSVYVNQ

20

30

【0050】

配列番号15 (L I Q U I Z Y M E (商標) S C)

AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGTSRSDVGYGVYDLYD
LGEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYADVVFDDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQ
EISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGKAWDWEVDTEFG
NYDYLMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLSYVRSQTGKP
LFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTL
AVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDP
LLIARRDYAYGTQHDYLDHSDIIGWTREGGTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFY
DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRKTTVS

10

【0051】

配列番号16 (SPEZYME (商標) Ethyl)

AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGTSRSDVGYGVYDLYD
LGEFNQKGTVRTKYGTKAQYLQAIQAAHAAGMQVYADVVFDDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQ
EISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFIGKAWDWEVDTEG
NYDYLMYADLDMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLSYVRSQTGKP
LFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTL
AVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDP
LLIARRDYAYGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFY
DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRKTT

20

30

【0052】

配列番号17 (プライマーS242F)

5'-[Phos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTCCTGATTGGTTG-3'

【0053】

配列番号18 (プライマーS242R)

5'-[Phos]CAACCAATCAGGAAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3'

40

【0054】

配列番号19 (BP17 phytase)

NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPNTWP EWPVKLGYYT
PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQRTLKTGE
AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLEHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMPSKLS
IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWNI HSEQEWASLL
KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLLQAISN ALNPNATESK LPDISPDNKI
LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
SVSMVYQTLQ QLRSTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
VVSQSVEPGC QLQ

10

20

【 0 0 5 5 】

配列番号 2 0 (LATシグナルペプチドのコード配列)

atgaaacaac aaaaacggct ttacgccoga ttgctgaogc tggtatttgc gctcatcttc
ttgctgcctc attctgcagc ttcagca

【 0 0 5 6 】

配列番号 2 1 (LATシグナルペプチド)

MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA

30

【 0 0 5 7 】

配列番号 2 2 (欠失 S 2 4 2 Q A m y S)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANE A NNLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY
DLYDLGEFNO KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE
VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSEKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG
IGKAWDWEVD TENGNYDYL M YADLDMDHPE VVTELKNW GK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK
FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK
SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG
YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP
GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKV FY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVN GGSVSVW
VPRKTT

10

【 0 0 5 8 】

配列番号 2 3 （成熟 A m y S のコード配列）

20

gccgcaccgt ttaacggtac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc
 acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct
 ctttggtctgc cgcccgctta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggtta cggagtatac
 gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca
 aaagctcaat atcttcaagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc
 gatgtcgtgt tegaccataa aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa
 gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tggggcacct atcaaatcca agcatggacg
 aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat 10
 tttagcggcg ttgactggga cgaaagccga aaattaagcc gcatttatac attccgcggc
 atcggcaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg
 tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa
 tgggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcataattaag
 ttcagttttt ttcttgattg gttgtcgtat gtgcgtttct agactggcaa gccgctatct
 accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca
 aacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
 tcagggggcg catttgatat ggcacgctta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg 20
 acattggcgg tcaccttcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca
 tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga
 taccgctgcg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tcttcgctg
 aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat
 gattatcttg atcactccga catcatcggg tggacaaggg aaggggtcac tgaaaaacca
 ggatccgggc tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt
 ggcaaacaac acgctggaaa agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgct
 accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggt ttcggtttgg 30
 gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcgccga tcacaaccgg accgtggact
 ggtgaattcg tccgttggac cgaaccacgg ttggtggcat ggct

【0059】

配列番号24 (Stator I F)

5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3'

【0060】

配列番号25 (Stator I R)

40

5'-TTATCCTTTACCTTGTCTCCAAGC-3'

【発明の詳細な説明】

【0061】

I. 序論

本発明の組成物及び方法は親 α アミラーゼに対して、特異活性、基質特異性、基質結合、基質切断、基質安定性、pH依存活性、pH依存安定性、酸化安定性、 Ca^{2+} 依存性、pI、及び洗浄性能のうちの少なくとも1つが改善されている親 α アミラーゼの変異体

50

を提供する。この変異体はデンプン転換、エタノール生成、洗濯、食器洗浄、硬表面洗浄、テキスタイルデザイン、及び／又は甘味料生産に適している。

【0062】

数多くの変異体を開示しているけれども、それらは、いずれもアミノ酸配列同一性、及び3次元構造の観点から構造的特徴を有する親 α アミラーゼの性能を改善するという共通の性質を有している。これらの変異体のいくつかは他の変異体と組み合わせて用いられる。この他の変異体は所望の性質を有する変異体 α アミラーゼに特定の性質を付与する。一般的に変異に適していないか又は変異及び他の変異との組み合わせに適していない位置も開示されている。これらの位置の同定は所望の性質を有する変異体 α アミラーゼの設計において重要である。

10

【0063】

本発明及び組成物の実施のために行った研究は主にゲオバチルスステアロセリモフィリス (*Geobacillus stearothermophilus*) 由来の特定の親 α アミラーゼを用いて行われたが、構造的に関連している α アミラーゼについても等しく有利である。従って、本明細書は多くの α アミラーゼのいずれかを修飾して有利な性質を創造し、特定の位置において特定のアミノ酸残渣の存在に基づいて好ましい性能を有するように新規な α アミラーゼを同定するためのロードマップを提供する。

【0064】

本発明の組成物及び方法の他の側面及び態様の詳細を以下に説明する。

II. 定義及び用語

20

【0065】

本発明の組成物及び方法を詳細に説明する前に、各種用語、命名法、及び一般的な原理を以下で定義する。

A. 定義

【0066】

以下の用語及びフレーズを明確するために以下のように定義する。定義されていない用語は、当業者が通常用いているものと同じ意味を有する。参考文献はSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2nd Ed., 1989); Kreigler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION; A LABORATORY MANUAL (1990); Ausubelら、(eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (1994); Singletonら、DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2D ED., John Wiley And Sons, New York (1994); 及び Hale And Markham, The HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, N Y (1991) 等の標準的な分子生物学のテキストである。

30

【0067】

本明細書において、「デンプン」の語は式 $(C_6H_{10}O_5)_x$ を有するアミロース及びアミロペクチンからなる植物の複合多糖炭水化物からなる任意の物質を意味する。式中Xは任意の整数である。デンプンの例示的な源は穀物、草、塊茎、及び根であり、より具体的には小麦、大麦、コーン、ライ麦、コメ、ソルガム、ふすま、キビ、ジャガイモ、甘藷、及びタピオカを含む。

40

【0068】

本明細書において、「アルファ (α) アミラーゼ」の語は、例えば、EC 3. 2. 1. 1のクラスの酵素であり、 α -1, 4-グルコシド結合の加水分解を触媒するものを意味する。これらの酵素は1, 4- α 結合D-グルコース単位を含むポリサッカライドにおいて、1, 4- α -D-グルコシド結合のエキソ型又はエンド型加水分解に作用するとも理解されている。これらの酵素に用いる他の用語は「グリコゲナーゼ」である。例示的な酵素は α -1, 4-グルカン-4-グルカノヒドラーゼグルカノヒドラーゼを含む。

50

【0069】

本明細書において、「組換え」の語は、細胞、核酸、タンパク質、又はベクターに対して用いた場合、この細胞、核酸、タンパク質、又はベクターが異種の核酸又はタンパク質、あるいは野生型核酸又はタンパク質の修飾を導入することにより修飾されている、あるいはそのように修飾された細胞由来の細胞であることを意味する。従って、例えば、組換え細胞はこの細胞の野生型（組換えされていない）には見られない遺伝子を発現し、又は野生型遺伝子が他の方法では過剰発現したり、又は少なく発現したり、全く発現しない場合に適当な発現を行う。

【0070】

本明細書において、「タンパク質」及び「ポリサッカライド」の語はペプチド結合により結合されたアミノ酸残基の連続的な鎖を意味する。従来用いられているアミノ酸の一字標記又は3文字表記を用いる。

10

【0071】

本明細書において、「シグナル配列」の語はポリペプチドのN末端のアミノ酸残基の配列を意味する。この配列は細胞の外に細胞外ポリペプチドの分泌を促進する。細胞外タンパク質の成熟形態は分泌工程でシグナル配列を切断するので、この配列を欠いている。

【0072】

本明細書において、「遺伝子」の語はポリペプチドの生成工程に関与するDNAセグメントであり、コード領域の前後の領域並びに個々のコード領域（エキソン）の間に、介在領域（イントロン）を含む。遺伝子の命名は通常、イタリックで表す。対応するタンパク質は通常イタリックでは表示せず、初めの文字を大文字で表記する。

20

【0073】

本明細書において、「核酸配列」及び「ポリヌクレオチド」の語は互換的に使用され、フォスフォジエステル又は同様の結合により結合されたヌクレオチドの連続的な鎖を意味し、1本鎖、2本鎖、又は部分的に2本鎖のDNA、RNA、並びにキメラ修飾されたDNA又はRNA、あるいはこれらの合成誘導体を含む。別に定義しない限り、核酸の配列は5'末端から3'末端方向へ記載する。当業者は遺伝子コドンの退縮により、1つ以上のコドンが特定のアミノ酸をコードすることを理解している。

【0074】

本明細書において、「ベクター」の語は1つ以上の細胞タイプへ核酸を導入するためのポリヌクレオチド配列を意味する。ベクターはクローニングベクター、発現ベクター、シャトルベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、カセット等を含む。

30

【0075】

本明細書において、「発現ベクター」の語は好適な宿主細胞中でDNAの効果的な発現を可能にする好適な制御配列に作動可能に結合しているDNA配列を含むDNA構築体を意味する。前述の制御配列は効果的な転写のためのプロモーター配列、転写を調節するための任意のオペレーター配列、mRNA上の好適なリボゾーム結合部位をコードしている配列、エンハンサー、並びに転写及び翻訳を制御する配列を含む。

【0076】

本明細書において、「プロモーター」の語は遺伝子の転写を開始するためにRNAポリメラーゼに結合する調節配列である。プロモーターは誘発プロモーター又は構造プロモーターのいずれかでよい。例示的なプロモーターは誘発プロモーターのトリコデルマレーシc b h 1遺伝子である。

40

【0077】

本明細書において、「転写調節下」の語は、特定のポリヌクレオチドの転写、通常DNA配列が特定のプロモーター及び／又はその転写を調節する他のエレメントに作動可能に結合してこれに依存していることを示す。

【0078】

本明細書において、「転写調節下」の語は、特定のポリヌクレオチドの転写、通常mRNA配列が特定のプロモーター及び／又はその転写を調節する他のエレメントに作動可能

50

に結合してこれに依存していることを示す。

【0079】

本明細書において、「由来」の語の意味は、「～から生じた」「～得られた」「～得ることができる」、及び「～単離された」を包括的に含み、特定されたポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター等が親ポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター、宿主細胞等の修飾された変異体であることを示す。

【0080】

本明細書において、「作動可能に結合する」の語は、説明されている成分がその意図する方式において機能するような位置関係にあることを意味する。例えば、調節配列は、コード配列の発現が調節配列に適合する条件を満たす方法でコード配列に結合しているとき

10

【0081】

「選択／選択可能マーカー」の語は、培地成分又は育成条件を用いてこれらの宿主細胞の選択を容易にするための宿主細胞で発現され遺得る伝子を意味する。例示的な選択マーカーの例としては、抗生物質／抗菌耐性（例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、又はクロラムフェニコール）を付与する遺伝子及び／又は代謝又は栄養的な利点をもたらす遺伝子があるがこれらに限定されない。

【0082】

本明細書において、複数の配列をアラインメントしたときに、塩基又はアミノ酸残基の特定されたパーセンテージが同じである場合、ポリヌクレオチド又はポリペプチドは特定の「パーセント配列同一性」（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、又は99%）を有すると言う。アラインメント及びパーセントホモロジー又は同一性はCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubelら(eds)(1987) Supplement 30, section 7.7.18)に記載のような、当業者に知られている任意の好適なソフトウェアを用いて決定することができる。好適なプログラムは、ベクター NTI Advance (商標) 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)、GCG Pileup、FASTA (Pearsonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:2444-2448)、及びBLAST (BLAST Manual, Altschulら, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Lib. Med. (NCIB NLM NIH)、Bethesda, Md., And Altschulら(1997) NAR 25:3389-3402) プログラムを含む。他の好適なアラインメントプログラムはALIGN Plus (Scientific And Educational Software, PA)であり、デフォルトパラメータを用いるのが好ましい。他の用いることができる配列ソフトウェアプログラムはThe TFASTA Data Searching Program available in The Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)である。

20

30

40

【0083】

本明細書において、「宿主株」又は「宿主細胞」の語は意図するポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含む発現ベクター又はDNA構築体を導入するのに好適な有機体を意味する。宿主細胞は好ましくはバクテリア又は糸状菌細胞であるが、植物細胞（例えば、プロトプラスト）、昆虫細胞、又は哺乳動物細胞でもよい。

【0084】

本明細書において、「培養」の語は液体又は固形培地において好適な条件下で微生物細胞の集団を育成することを意味する。培養は顆粒デンプンを含む基質を最終生成物へ（通常発酵管又は反応管において）生物学的に発酵転換することを含む。

【0085】

50

本明細書において「発酵」の語は、微生物がより単純な有機化合物を生成することによる、有機基質の酵素的及び実質的に嫌気性の分解を意味する。発酵は一般的に嫌気性条件下で起こるが、発酵は酸素の存在下でも生じるので、この語を単に厳密な嫌気性条件に限定することを意図しない。

【0086】

本明細書において、「接触」の語は酵素及びその基質が酵素を基質の十分に近い場所に配置させて酵素が基質を最終生成物に添加することを意味する（即ち、基質に作用する）。接触は酵素及び基質の溶液又は懸濁液を混合することにより行うことができる。

【0087】

本明細書において、「酵素的転換」の語は通常酵素作用により、基質の修飾を行うことを意味し、例えば、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、又は他の酵素の作用によるデンプン基質の修飾がある。

10

【0088】

本明細書において、「糖化」の語はデンプンをグルコースへ酵素的に転換することを意味する。

【0089】

本明細書において、「ゼラチン化」の語はデンプン（例えば、生の又は結晶性デンプン）を調理により粘性懸濁液に可溶化させることである。

【0090】

本明細書において「液化」の語はデンプンの転換において、ゼラチン化されたデンプンを加水分解して低分子量のデキストリンにすることを意味する。

20

【0091】

本明細書において、「重合の程度（DP）」の語は、所与のサッカライドにおける無水グルコピラノースの数（n）を意味する。DP1の例としては、グルコース及びフルクトース等の単糖である。DP2の例としては、マルトース及びスクロース等の二糖である。DP>3サッカライドは重合度3以上を有する。

【0092】

本明細書において、「最終生成物」又は「所望の最終生成物」の語はデンプン等の基質から酵素的に処理された分子を意味する。

【0093】

30

本明細書において、「乾燥固形含量（ds）」は乾燥重量ベースの％で表されるスラリーの総固形分を意味する。

【0094】

本明細書において、「スラリー」の語は不溶性固形物を含む水性混合物を意味する。

【0095】

本明細書において、「残余デンプン」（デンプン残渣）の語は発酵の後にデンプン組成物中に残っているデンプン（可用性又は不溶性）を意味する。

【0096】

本明細書において、「再生工程」の語は残余デンプン、酵素、及び／又は微生物を含むマッシュ成分を再利用して、追加的デンプン組成物の発酵において、作用させる又は参加させることを意味する。

40

【0097】

本明細書において、「マッシュ」の語は、アルコール等の発酵生成物を生成するのに使用される、水中の発酵可能な炭素分子の混合物を意味する。「ビア」及び「マッシュ」は互換的に使用される。

【0098】

本明細書において、「スティリッジ」の語は発酵されたマッシュからアルコールを除去した後の残渣である、非発酵固形物及び水の混合物を意味する。

【0099】

本明細書において、「醸造用乾燥固形穀物（DGS）」及び「水溶性醸造用乾燥固形穀

50

物」穀物発酵の有用な副生成物を意味する。

【0100】

本明細書において、「エタノール生成微生物」の語は、糖又はオリゴサッカライドをアルコールへ転換することができる微生物を意味する。エタノール生成微生物は通常個々に又は組み合わせて糖をアルコールに転換する1つ以上の酵素を発現する能力を有していることからエタノール生成微生物であるといわれている。

【0101】

本明細書において、「エタノール生成」の語はヘキソース又はペントースからエタノール生成することができる任意の有機体又は細胞を意味する。通常、エタノール生成細胞はアルコールデヒドロゲナーゼ及びピルビン酸デカルボキシラーゼを含む。エタノール生成微生物の例としては、酵母等の糸状菌微生物を含む。好ましい酵母はサッカロマイセス (*Saccharomyces*)、とくにサッカロマイセスセルビシアエ (*S. cerevisiae*) を含む。

10

【0102】

本明細書において、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに対して用いる「異種」の語は、宿主細胞中では自然発生しないポリヌクレオチド又はポリペプチドを意味する。酵素等の異種タンパク質は商業的に重要な工業用ポリペプチドである。この語は自然発生遺伝子、変異遺伝子、及び／又は合成遺伝子である（又はこれらにコードされた）ポリヌクレオチド及びポリペプチドを含むことを意図する。

20

【0103】

本明細書において、ポリヌクレオチド又はポリペプチドに対して用いる「内性」は宿主細胞中で自然発生するポリヌクレオチド又はポリペプチドを意味する。

【0104】

本明細書において、「回収された」「単離された」及び「分離された」の語は本来関与している少なくとも1つの成分から分離された、化合物、タンパク質、細胞、核酸、又はアミノ酸を意味する。

【0105】

ここで用いる「形質転換」、「安定な形質転換」又は「トランスジェニック」の語は、細胞がゲノム内に統合された、またはエピソームプラスミドとして少なくとも2世代に渡り維持された非天然（異種）核酸を有することをいう。

30

【0106】

ここで用いる「発現」とは、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて生成されるプロセスをいう。当該プロセスは転写及び翻訳の両方を含む。

【0107】

細胞内に核酸配列を挿入することの文脈上用いられる「導入」という語は、「形質感染」又は、「形質転換」又は「形質移入」及び核酸配列が、細胞内のゲノムに取り込まれ（例えば、染色体、プラスミド、プラスミド、又はミトコンドリアDNA）、自律レプリコン内に転化され、又は一時的な発現（例えば、核酸導入されたRNA）の場所である、真核又は原核細胞内へ、取り込まれることを言う。

【0108】

本明細書で用いる「特異活性」の語は、特定条件下において、所定の時間内に酵素調製物によりを生成物に転換する基質のモル数であると定義される。特異活性は、単位 (U) /mg タンパク質で表す。

40

【0109】

本明細書において、「生産性」の語は特定の方法及び特定の試薬（酵素を含む）を用いて生成された最終生成物の量を意味する。最終生成物の量としては、嵩、容量、濃度等で表され、開始物質（例えば、基質）の量、時間、又は他の条件を参照することを含む。

【0110】

本明細書において、「性能インデックス (PI)」の語は親又は対照とする酵素に対する変異酵素の性能の比を意味する。本明細書では、各種の更なる用語及びフレーズを用い

50

て変異の性能を特徴づけする；u p 変異は1より大きいP Iを有する；中性の変異は0.5より大きいP Iを有する；有害ではない変異は0.05より大きいP Iを有する；有害な変異はP Iが0.05である。結合可能変異はP Iが0.5の性質を少なくとも1つ有し、全ての性質のP Iが0.05より小さい。

【0111】

本明細書において、「結合可能変異」は1つ以上の所望の性質について予め決められたパフォーマンスインデックス（P I）を有するタンパク質を提供するために組み合わせることができる変異である。

【0112】

本明細書において、「ATCC」は米国、バージニア州、マナッサスにあるアメリカン
タイプカルチャーコレクションを意味する。 10

【0113】

本明細書において、「NRPL」の語は、米国、イリノイ州、ピオリアにある農業利用調査のための農業調査サービスカルチャーセンター、北センター（以前はUSDA北領域調査研究所として知られていた）を意味する。

【0114】

一般的に数の範囲は定義している範囲の数を含むものとする。単数の冠詞、「1つ」（a）（an）及び「この」（the）は別に明らかに定義しない限り複数も含むものとする。理解しやすくするために見出しを提供しているが、見出しは明細書の一部に説明された主題を確定するものであると理解すべきではない。全ての特許及び刊行物、並びにこれらの中に開示されている全ての配列は参照により本明細書に援用する。 20

B. 用語

【0115】

別に定義しない限り、従来用いられているアミノ酸の一文字表記及び三文字表記を用いる。変異ポリペプチドは以下のように記載する：オリジナルアミノ酸：位置：置換アミノ酸。

【0116】

このルールに従って、例えば、セリンを242位でアラニンに置換した場合はSer 242Ala又はS242Aと記載する。

【0117】

30位におけるアラニンの欠失はAla30*又は△A30と示す。 30

【0118】

追加的なアミノ酸残基の挿入は、それがリジンである場合、Ala30AlaLys又はA30AKと示す。

【0119】

30位から33位のアミノ酸残基の連続的な欠失は（30-33）*又は△（A30-N33）と示す。

【0120】

ポリペプチドが他のポリペプチド（又は親ポリペプチド）と比較して「欠失」を含み、その位置において挿入があった場合、*36Asp又は*36Dと示す。この例は36位におけるアスパラギン酸の挿入である。 40

【0121】

複数の変異はプラスの記号で分けて記載する。例えば、30位及び34位において、アラニンとグルタミン酸をアスパラギン酸及びセリンにそれぞれ置換した場合、Ala30Asp+Glu34Ser又はA30N+E34Sと記載する。

【0122】

1つ以上の代替的なアミノ酸残基が所与の位置において挿入された場合は、A30N、E又はA30N又はA30Eと示す。

【0123】

更に、修飾する形態を特定せずに、修飾に好適な位置のみが同定されている場合、任意 50

のアミノ酸をこの位置に存在しているアミノ酸残基に置換することを意味する。例えば、30位におけるアラニンの修飾を意図する場合、アラニンは任意の他のアミノ酸、例えば、R、N、D、A、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、Vのいずれかに置換される。

【0124】

更に、「A30X」は以下の置換のいずれかの1つを意味し得る。

A30R、A30N、A30D、A30C、A30Q、A30E、A30G、A30E、A30I、A30L、A30K、A30M、A30F、A30P、A30S、A30T、A30W、A30Y、又はA30V。

更に、これは以下のようにも記載される、

A30R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y、V。

10

【0125】

すでにナンバリングについて用いられた親酵素が所定の位置において置換をされたものとしてアミノ酸残基があるとする、X30N、又はX30NVと示される。このケースにおいて、例えば、N又はVは野生型において存在している。

【0126】

従って、他の対応する親酵素はAsn又はValが30位において置換されていることを示す。

C. アミノ酸残基の特徴づけ

20

【0127】

アミノ酸残基の特徴として以下の一般的な情報が参照として提供される。

【0128】

電荷アミノ酸

Asp、Glu、Arg、Lys、His

【0129】

負電荷アミノ酸（最も負にチャージされた残基を初めに記載）

Asp、Glu

【0130】

正電荷アミノ酸（最も正にチャージされた残基を初めに記載）

Arg、Lys、His

30

【0131】

中性アミノ酸

Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Met、Cys、Asn、Gln、Ser、Thr、Pro

【0132】

疎水性アミノ酸残基（最も疎水性の高いものを最後に記載）

Gly、Ala、Val、Pro、Met、Leu、Ile、Tyr、Phe、Trp

【0133】

親水性アミノ酸残基（最も親水性の高いものを最後に記載）

Thr、Ser、Cys、Gln、Asn

40

III. 本発明の組成物及び方法に用いるαアミラーゼ

【0134】

以下の段落は本明細書に従って修飾され及び使用することができる「Spezyme（商標）Xtra様又はAmyS様」αアミラーゼを説明する。

A. αアミラーゼ間の相同性

【0135】

本発明の組成物及び方法を説明するための実験は配列番号2で例示されるGeobacillus（Bacillus）ステアロセレモフィリスαアミラーゼを用いて行った。このアミラーゼの変異体はSPEZYME（商標）Xtra（ダニスコ・ユーエスインク

50

・ジェネンコア・ディビジョン、パロアルト、カリフォルニア、米国）として入手可能である。

【0136】

バチルス株により生成される α アミラーゼの多くはアミノ酸レベルでAmy Sに高い相同性（同一性）を有し、本明細書で説明する変異体の多くはこれらのアミラーゼにおいて生じる同様の効果を生成するために発現される。これらのアミラーゼは、正しくは「SPEZYME（商標）Xra様 α アミラーゼ」又は「Amy S様 α アミラーゼ」と言う。既知の多くのバチルス α アミラーゼを表Aにまとめた。

表A. パーセント同一性

	707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	LAT
707	100.0	86.4	66.9	66.5	87.6	86.2	95.5	68.1
AP1378	86.4	100.0	67.1	68.1	95.1	86.6	86.0	69.4
BAN	66.9	67.1	100.0	65.6	67.1	68.8	66.9	80.7
BSG	66.5	68.1	65.6	100.0	67.9	67.1	66.3	65.4
SP690	87.6	95.1	67.1	67.9	100.0	87.2	87.0	69.2
SP722	86.2	86.6	68.8	67.1	87.2	100.0	86.8	70.8
AA560	95.5	86.0	66.9	66.3	87.0	86.8	100.0	68.3
LAT	68.1	69.4	80.7	65.4	69.2	70.8	68.3	100.0

（表A パーセント同一性）

【0137】

配列番号7で定義されるアミノ酸配列を有するこのバチルスリケニフォルミス α アミラーゼ（LAT）は配列番号9で定義されるアミノ酸配列を有するバチルスアミロリケファシエンス α アミラーゼに81%の配列同一性を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むゲオバチルス（バチルス由来）ステアロセレモフィリス α アミラーゼに約65%の配列同一性を有することが発見されている。更なる相同 α アミラーゼはWO95/26397に記載のSP690及びSP722、及び配列番号6で示されTsukamotoら（1988）Biochemical And Biophysical Research Communications 151:25-31により説明されているバチルス株由来の#707 α アミラーゼを含む。KSMAPI378 α アミラーゼ（配列番号12）はWO97/00324（花王コーポレーション）に記載されている。

【0138】

更なる相同 α アミラーゼはEP0252666（ACTT27811）に記載のバチルスリケニフォルミス株及びWO91/00353およびWO94/18314に記載の α アミラーゼを含む。他の市販のSPEZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼは以下の商標で販売されているものである：SPEZYME（商標）AA及びUltraplow（ダニスコ・ユーエスインク・ジェネンコアディビジョン）、及びKEISTASE（商標）（Daiwa）及びLIQUEZYME（商標）SC（配列番号15）（ノボノルディスクDKより販売）。他の関連する α アミラーゼはTermamy1（商標）（配列番号8、ノボザイム）、STAINZYME（商標）（配列番号10、ノボザイム）、NATALASE（商標）（配列番号11、ノボザイム）、KAO KSMK38（配列番号13）、KAO KSM K36（配列番号24）、本発明明細書及び表に記載の他の α アミラーゼを含む。

【0139】

これらの α アミラーゼの間の同一性が高いことから、これらは α アミラーゼの同じクラスに属すると考えられ及び本発明の組成物及び方法に包含される。G. ステアロセレモフィリス α アミラーゼ（配列番号2）は出発材料として用いられるが、これらの又は他の α

アミラーゼにおける対応する位置、例えば、SP722、BLA、BAN、AA560、SP690、KSM AP1378、#707、及び他のバチルス α アミラーゼも説明されている修飾に起因する有利な効果を得ることが可能である。

【0140】

従って、SPEZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼ又はAmy S様 α アミラーゼは配列番号1、2、6、7、8、9、10、11、12、15、及び16のアミノ酸配列を有する α アミラーゼを含む。幾つかの態様において、SPEZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼ又はAmy S様 α アミラーゼは配列番号2に対してアミノ酸のレベルで、例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%の同一性を有する。更なる態様において、SEPZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼ又はAmy S様 α アミラーゼは配列番号1、2、6、7、8、9、10、11、12、15、及び16に対してアミノ酸のレベルで、例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は更には少なくとも99%の同一性を有する。

【0141】

参照する α アミラーゼに対する既知の又は予測される α アミラーゼの同一性は当業者に既知のコンピュータープログラム手段で決定される。通常、SPEZYME（商標）Xtra（配列番号2）及び例えば、他の α アミラーゼの間の構造的アラインメントは、同様の効果を生じさせるために本明細書で説明するように変異させることができる他のSPEZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼにおいて、等しい／対応する位置を決定するために用いる。1つの代表的なプログラムはGAPである。このプログラムはGCGプログラムパッケージ（前述）で提供されている。特に、GapCGCv8は同一性のデフォルトスコアリングマトリクスで用いられ、以下のパラメータを含む：GAPクリエーションペナルティー5.0及びGAPエクステンションペナルティー0.3をそれぞれの核酸配列の比較に用いる。GAPクリエーションペナルティー3.0及びGAPエクステンションペナルティー0.1をそれぞれのタンパク質配列の比較に用いる。GAPはアラインメントをつくり同一性を計算するためにNeedleman And Wunsch, (1970), J. Mol. Biol. 48:443-453を用いる。

【0142】

構造アラインメントを用いるための他の方法はgapペナルティーの既存の値、即ち、クリエーションペナルティー3.0及びエクステンションペナルティー0.1、を用いたGCGパッケージからのPile Upプログラムを用いることである。他の構造的なアラインメント方法は疎水性クラスター解析（Gaboriaudら（1987）, FEBS LETTERS 224, pp. 149-155）及びリバーススレッディング（reverse threading）（Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149（1998）を含む。

【0143】

SPEZYME（商標）Xtra様 α アミラーゼ又はAmy S様 α アミラーゼは更に1つ以上の前述の他の α アミラーゼをコードしているDNA配列にハイブリダイズするDNA配列によりコードされているポリペプチドを含んでいてもよい。そのような α アミラーゼは配列番号9（BAN）、配列番号5（BSG; Amy S）、配列番号3（SP722）、配列番号7（LAT）、及びWO06）／002643の配列番号11（AA560）及び配列番号1、2、6、7、8、9、10、11、12、15、及び16にアミノ酸配列をコードしているポリヌクレオチドである。核酸の1本鎖が好適な温度及び溶液イオン強度の好適な条件下で他の核酸にアニールすることができる場合、他の核酸配列にハイブリダイズ可能である。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は当業者に知られている（

例えば、Sambrook (1989) 上記、特に9章及び11章参照)。既知の又は配列決定されたSPEZYME (商標) Xtra様αアミラーゼの特徴付けに用いるオリゴヌクレオチドプローブは意図するαアミラーゼの完全長又は部分的親核酸配列又はアミノ酸配列に基づいて調製される。

【0144】

試験するハイブリダイゼーションについての好適な条件は、40℃、20%ギ酸溶液中で1時間の浸漬、次いで20%ギ酸、5xデンハード溶液、50mMリン酸ナトリウム、及び50mgの超音波で変性した仔ウシ胸腺DNAの溶液中で、40℃、1時間の予備ハイブリダーゼーション、次いで40℃、18時間、100mMATPを含む同じ溶液でのハイブリダーゼーション、次いで30分、40℃(低い過酷条件)、2XSSC、0.2%SDS中で3回洗浄を行う。この温度は、好ましくは50℃(中程度の過酷条件)、より好ましくは65℃(高い過酷条件)、更により好ましくは75℃(非常に過酷な条件)である。ハイブリダーゼーション方法のより詳しい記載はSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989にある。幾つかの態様において、過酷条件は65℃のT_m及び0.1xSSC、0.1%SDSに対応する。

B. 親αアミラーゼ

【0145】

任意の前述のSPEZYME (商標) Xtra/AmyS様αアミラーゼは本明細書において、修飾される又は用いられる親αアミラーゼとして提供される。この親αアミラーゼは「バックボーン」又は「テンプレート」と言い、変異体アミラーゼはこれらに由来する。幾つかの態様において、この親αアミラーゼはG. ステアロセレモフィリス由来である。特定の態様において、この親αアミラーゼは配列番号2を有する。幾つかの態様において、この親αアミラーゼは配列番号1、6、7、8、9、10、11、12、15、及び16のアミノ酸配列を有するか、配列番号1、2、6、7、8、9、10、11、12、15、及び16の配列にアミノ酸のレベルで相当な同一性、例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%の同一性を有する。

【0146】

親αアミラーゼはハイブリッドαアミラーゼ、即ち、前述の少なくとも2つの親アミラーゼに由来する親アミノ酸配列の組み合わせを含んでいてもよい。更に、このハイブリッドαアミラーゼはSPEZYME (商標) Xtra/AmyS様αアミラーゼ及び微生物(バクテリア又は糸状菌)及び/又は哺乳動物細胞由来の1つ以上の他のαアミラーゼの一部を含むハイブリッドαアミラーゼでもよい。

【0147】

従って、親ハイブリッドαアミラーゼは少なくとも2つのSPEZYME (商標) Xtra様αアミラーゼに由来するアミノ酸配列、又は少なくとも2つのSPEZYME (商標) Xtra様及び/又は少なくとも1つのSPEZYME (商標) Xtra様ではないαアミラーゼに由来する配列、又は少なくとも1つのSPEZYME (商標) Xtra様及び/又はSPEZYME (商標) Xtra1つの他の糸状菌αアミラーゼ等由来の配列を含む。例えば、親αアミラーゼはB. リケニフォルミス (B. licheniformis) 株由来のαアミラーゼのC末端と、G. ステアロセレモフィリス (G. stearothermophilus) 株由来のαアミラーゼのN末端を含む。

IV. αアミラーゼ変異体の変更された性質

【0148】

以下のセクションは本明細書で説明する変異ポリペプチドにおいて存在している変異体の間の関係を説明する。以下の説明は、それらの変異体から得られる性質の変更(親SPEZYME (商標) Xtra様αアミラーゼに対する)も説明する。

【0149】

第一の側面において、親 G. ステアロセリモフィリス (G. stearothermophilus) α アミラーゼの変異体が提供される。この変異体は

P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, G95, Q97, W115, D117, P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148, S153, Y159, W166, S169, K171, W187, P209, N224, S242, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304, R308, T321, Q358, P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432, W437, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474, R483

10

からなる群より選択される 1 つ以上の位置が変異されている (アミノ酸の位置番号は配列番号 1 又は 2 を用いる)。ここにおいて、

(a) それぞれの変異は独立して、

(i) 所定位置を占めるアミノ酸の下流におけるアミノ酸の挿入、

(ii) 所定位置を占めるアミノ酸の欠失、

(iii) 所定位置を占めるアミノ酸を別のアミノ酸で代替置換する、から選択され、

(b) この変異体は α アミラーゼ活性を有する、

(c) 各位置は配列番号 1 又は 2 で定義されるアミノ酸配列を有する親 G. ステアロセリモフィリス α アミラーゼのアミノ酸配列の位置に対応している。

20

【0150】

具体的に、意図される置換は、S242A、S242Q、S242N、及び S242E である。これらの変異はカルシウム-ナトリウム結合に関係している R179、G180、I181、G182、及び K183 における変異と組み合わせてもよく、α ヘリックスの中央において、P245 での変異と組み合わせてもよい。

【0151】

他の親 SPEZYME (商標) Extra 様 α アミラーゼにおける対応する位置は前述のアラインメントにより決定してもよいし、図 4 におけるアラインメントに示されている。

安定性

30

【0152】

本明細書の変異体において、重要な変異 (アミノ酸置換及び欠失を含む) は安定性を変更できるかどうかという観点から決められており、特に、遊離状態での (即ち、未結合、従って溶液) 60 ppm 以下のカルシウム濃度、高温での (即ち、70 乃至 120 °C) 及び/又は極限 pH (即ち、低い又は高い、即ち、pH 4 乃至 6 又は pH 8 乃至 11) において改善された安定性 (即ち、高い又は低い)、は「変更された性質」を説明するセクションに列挙されている変異体のいずれかを含む。この安定性は以下の方法のセクションで説明する。

【0153】

熱安定性が改善された SPEZYME (商標) Extra 及び変更された α アミラーゼの例としては、

40

(a) 以下のアミノ酸残基の 1 つ以上を導入する置換

74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q, 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K, 474L, 474M, 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S, 及び 474V,

10

(b) 以下のアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換

6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I, 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S, 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S, 141V, 150E, 151I, 152G, 155S, 155Y, 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q, 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F, 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K, 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K, 294W, 301F, 301I, 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G, 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T, 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I, 343P, 343R, 343Y, 345I, 345Q, 369I, 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T, 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I, 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M, 433V, 433Y, 442A, 442G, 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I, 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H, 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I, 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T, 465V, 469D, 469W, 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 476A, 476G, 476L, 476M, 476N, 及び 476T

20

30

40

を含む。

50

Ca²⁺ 安定性【0154】

変更されたCa²⁺ 安定性はCa²⁺ 欠失下での酵素の安定性が改善された、即ち、高い又は低い安定性のいずれかを示す。本明細書の変異体において、Ca²⁺ 安定性を特に、高いpH（即ち、pH 8乃至10.5）において改善された安定性（即ち、高い又は低い安定性）を達成することに関して重要な変異（アミノ酸置換及び欠失を含む）、は「変更された性質」を説明するセクションに列挙されている変異体のいずれかを含む。この安定性は以下の方法のセクションで説明する。

特異活性及び／又は改善された発現量【0155】

更なる側面において、変更された特異的活性、特に10乃至60℃の温度、好ましくは20乃至50℃、特に30乃至40℃、の温度において特に高められた又は減らされた活性、を有する変異体を得る事に関して重要な変異（アミノ酸置換及び欠失を含む）は「変更された性質」のセクションに列挙された任意の性質を有する。この特異活性は以下の「方法」のセクションで説明する。幾つかのケースにおいて、この変異体は特異活性よりも、又は特異活性に加えて、発現量が増えている。例示的な変異体を以下に示す：

(a)

124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L,
159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 179P, 180A,
180D, 180H, 180K, 180L, 180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P,
181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N,
278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q,
437Y, 446A, 474Q, 及び 474S,

よりなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換、又は

(b)

6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T, 14Y, 15A, 15D, 15E, 015G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E, 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 81Y, 121P, 139D, 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q, 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P, 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H, 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N, 221R, 221S, 221V, 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A, 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W, 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q, 268R, 268S, 274A, 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y, 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V, 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G, 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N, 340Q, 345E, 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H, 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A, 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R, 及び 471Y

10

20

30

よりなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換。

酸化安定性

【0156】

開示された変異体は親 α アミラーゼと比較して、変更された酸化安定性、特に高濃度酸化物に対する酸化安定性を有する。高められた酸化安定性は、例えば洗剤組成物において有利であり、修飾された酸化安定性はデンプン液化のための組成物において有利である。酸化安定性は以下の「方法」のセクションに記載する。

40

変更されたpHプロファイル

【0157】

変更されたpHプロファイル、特に高いpH（即ち、pH 8乃至10.5）又は低いpH（pH 4乃至6）における改善された活性を有する変異体を得るという点における重要な位置及び変異は活性部位残基の近くに位置しているアミノ酸残基の変異体を含む。幾つかのケースにおいて、この改善された活性は、例えば、pH 6未満、pH 5未満、又はpH 9以上で見られる。

【0158】

好適な特異変異／置換は意図する位置についての「変更された性質」のセクションで列挙しているものである。好適なアッセイは以下の「方法」のセクションで説明する。

50

洗浄性能

【0159】

特に高いpH（即ち、pH 8.5乃至11）において改善された洗浄性能を有する変異体を得るという点から重要な位置及び変異は意図する位置についての「変更された性質」のセクションで列挙しているものである。洗浄性能は以下の「方法」のセクションにおいて説明するように試験する。

デンプン液化

【0160】

いくつかの変異体はSPEZYME（商標）Xtra等の野生型αアミラーゼを用いた場合に観察されるものと比較すると、デンプン組成物の粘度を減らす効果が高い。例示的な変異体はI181A、I181P、I181C、I181E、I181Y、S242A、S242E、S242Q、G132A、N193Y、及びE188Pからなる群より選択されるアミノ酸残基の1つ以上を導入する置換を含む。

10

変異体における他の変異

【0161】

幾つかの態様において、本発明変異体は前述に加えて1つ以上の修飾を含む。例えば、1つ以上のプロリン残基は非プロリン残基に置換される。非プロリン残基の例としてはアラニン、グリシン、セリン、バリン、及びロイシンを含む。同様に、1つ以上のシステイン残基を非システイン残基に置換することも有効である。非システイン残基の例としては、セリン、アラニン、スレオニン、バリン、及びロイシンを含む。

20

【0162】

更に、1つ以上の以下の位置における変異も有効である。（ナンバリングは配列番号7に基づく）M15、V128、A111、H113、W138、T149、M197、N188、A209、A210、H405、T421、特に以下の部位において、1つ、2つ、3つ、又はそれ以上の置換が有効である：

M15X、特にM15T、L；

V128X、特にV128E；

H133X、特にH133Y；

N188X、特にN188S、T、P；

M197X、特にM197T、L；

A209X、特にA209V；

M197T/W138F；M197T/138Y；M15T/H133Y/N188S；

M15N128E/H133Y/N188S；E119C/S130C；D124C/R127C；H133Y/T149I；

G475R、H133Y/S187D；H133Y/A209V。

30

【0163】

配列番号7で定義されるアミノ酸配列を有する親αアミラーゼのケースにおいて、酸化安定性を改善する点ために欠失又は置換される関連するアミノ酸残基は、1つのシステイン残基（C363）及び配列番号2のM8、M9、M96、M200、M206、M284、M307、M311、M316、及びM438に位置しているメチオニン残基を含む。

40

【0164】

親αアミラーゼに対するαアミラーゼ変異体の熱安定性を高める点において、少なくとも1つの、好ましくは2つの、更に好ましくは3つの以下のアミノ酸残基を欠失することが特に好ましい。F178、R179、G180、I181、G182、及びK183（配列番号2のアミノ酸残基に対応する）。特に有用な組み合わせ欠失は、R179*+G180*、及びI181*+G182*（それぞれ配列番号15及び16）（又は本明細書における親αアミラーゼの条件を満たしている他のαアミラーゼにおけるこれらの欠失組み合わせに等しいもの）。

【0165】

50

所望の他の変異体は例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列におけるN193F及びV416Gを含む。

V. αアミラーゼ変異体の調製方法

【0166】

遺伝子に変異を導入する幾つかの方法は当業者に知られている。αアミラーゼをコードするDNA配列のクローニングの簡単な説明の後に、αアミラーゼのコード配列内の特定の部位における変異を生成する方法を説明する。

A. αアミラーゼをコードしている核酸のクローニング及び発現

【0167】

親αアミラーゼをコードしているDNA配列は当業者に知られている各種方法を用いて、意図するαアミラーゼを生成する任意の細胞又は微生物から単離される。第一に、ゲノムcDNA及び／又はcDNAライブラリーをが目的とするαアミラーゼを生成する有機体からの染色体DNA又はメッセンジャーRNAを用いて構築される。その後、このαアミラーゼのアミノ酸配列が知られているなら、相同体、ラベルされたオリゴヌクレオチドプローブが合成され、意図する有機体から調製されたゲノムライブラリー由来のαアミラーゼコーディングクローンを同定するのに用いられる。代替的に、既知のαアミラーゼ遺伝子に相同な配列を含むラベルされたオリゴヌクレオチドプローブが低い過酷条件のハイブリダーゼーション及び／又は洗浄条件を用いてαアミラーゼコーディングクローンを同定するためのプローブとして用いられる。

【0168】

αアミラーゼコードクローンを同定するための他の方法はプラスミド等の発現ベクターにゲノムDNA断片を挿入し、得られたゲノムDNAライブラリーでαアミラーゼを発現しない有機体を形質転換して、その後αアミラーゼの基質を含むアガー上で形質転換されたバクテリアを平板培養し、同定されるαアミラーゼ発現しているコロニーを育成する。

【0169】

酵素をコードしているDNA配列は確立された標準的な方法、例えば、S. L. Beaucage及びM. H. Caruthers (1981)に記載のフォスフォアミジン法及びMattesら (1984)に記載の方法により合成的に生成することができる。フォスフォアミジン法では、オリゴヌクレオチドは、例えば、DNA自動合成機で合成され、精製され、アニールされ、結合され、及び好適なベクター内でクローニングされる。

【0170】

最終的に、このDNA配列は、標準的技術に従って、合成、ゲノム、又はcDNAの断片（必要に応じて完全長DNA配列の各種部分に対応する断片）を結合することにより得られた、混合されたゲノム及び／又は合成物由来、混合された合成及び／又はcDNA由来物、又は混合されたゲノム及び／又はcDNA由来物である。このDNA配列は例えば、米国特許第4,683,202号に記載の特定のプライマーを用いてポリメラーゼチェーン反応(PCR)により調製することもできる。

B. 部位指定変異誘発

【0171】

一旦αアミラーゼコードDNA配列が単離され、好ましい部位に変異が同定されると、変異体は合成オリゴヌクレオチドを用いて導入される。これらのオリゴヌクレオチドは所望の変異部位に隣接しているヌクレオチドを含む、変異ヌクレオチドはオリゴヌクレオチド合成の間に挿入される。特定の方法において、αアミラーゼコード配列をつなぐDNAの1本鎖ギャップ(gap)をαアミラーゼ遺伝子を運ぶベクター内で生成する。その後、所望の変異を得た合成ヌクレオチドが1本鎖DNAの相同部位へアニールする。残りのギャップはその後DNAポリメラーゼI(クノウェルフラグメント)で満たされて、T4リガーゼを用いて結合される。

【0172】

αアミラーゼコードDNA配列へ変異を導入する他の方法は、キメラ的に合成されたD

10

20

30

40

50

NA鎖をPCR反応のプライマーの1つとして用いて導入された所望の変異を含むPCRフラグメントの3工程生成を含む。このPCR生成されたフラグメントから変異を運ぶDNAフラグメントを制限エンドヌクレアーゼで切断して、発現プラスミドに再挿入する。

【0173】

変異体を提供する代替的な方法はWO95/22625 (Affymax Technologies N. V.) 又はWO96/00343 (ノボノルディクスA/S) に記載の遺伝子シャッフリング、又は意図する変異、例えば、置換及び／又は欠失を含むハイブリッド酵素を得ることができる技術を含む。

C. α アミラーゼ変異体の発現

【0174】

前述の方法により、又は代替的な方法により生成された変異体をコードしているDNA配列は、発現ベクターを用いて発現させることができる。このベクターは通常、プロモーター、オペレーター、リボゾーム結合部位、翻訳開示シグナル、及び／又は任意でリプレッサー遺伝子、又は各種活性遺伝子をコードしている制御配列を含む。

【0175】

α アミラーゼ変異体をコードしているDNA配列を運ぶ組換え発現ベクターは組換えDNAに用いることができる任意のベクターであり、ベクターの選択は、ベクターを導入する宿主細胞に依存している。従って、このベクターは自動複製ベクター、即ち、染色体外に存在するベクターであり、その複製は染色体、例えば、プラスミド、バクテリオファージ、又は染色体外エレメント、ミニ染色体、又は人工染色体の複製から独立している。代替的に、このベクターは、宿主細胞に導入されたときに、宿主細胞のゲノムに統合され、組み込まれる染色体と一緒に複製される。

【0176】

DNA配列は好適なプロモーター配列に作動可能に結合している。このプロモーターはDNA配列であり、選択された宿主細胞において転写活性を示し、宿主細胞と相同又は異種のいずれかのタンパク質をコードしている遺伝子由来でよい。 α アミラーゼ変異体をコードしているDNA配列の転写、特にバクテリア宿主細胞における転写、を導くための好適なプロモーターの例としては、E. coliのlacオペロン、ストレプトマイセスコエリコラ (Streptomyces coelicolor) アガラーゼ遺伝子dagAプロモーター、バチルスリケニフォルミス (Bacillus licheniformis) α アミラーゼ遺伝子のプロモーター (amyL)、G. ステアロセレモフィリス (G. stearothermophilus) マルトース生成アミラーゼ遺伝子 (amyM)、B. アミミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) α アミラーゼ (amyQ) のプロモーター、バチルスブチリス (B. subtilis) xylA及びxylB遺伝子等である。糸状菌宿主細胞における転写に有用なプロモーターは、アスペルギルスオリザエ (A. oryzae) TAKAアミラーゼリゾムコールミエヘイ (Rhizomucor miehei) アスパラギン酸プロテイナーゼ、アスペルギルスニガー (A. niger) 中性 α アミラーゼ、アスペルギルスニガー (A. niger) 酸安定性 α アミラーゼ、アスペルギルスニガー (A. niger) グルコアミラーゼ、リゾムコールミエヘイ (Rhizomucor miehei) リパーゼ、アスペルギルスオリザエ (A. oryzae) アルカリプロテアーゼ、アスペルギルスオリザエ (A. oryzae) トリオースリン酸イソメラーゼ、又はアスペルギルスニデュランス (A. nidulans) アセトアミダーゼ由来のものである。

【0177】

発現ベクターは好適な転写ターミネーターも含む。真核細胞においては、 α アミラーゼ変異体をコードしているDNA配列に作動可能に結合しているポリアデニレーション配列である。ターミネーション及びポリアデニレーション配列はプロモーターと同じ源由来のものが好ましい。

【0178】

ベクターは、意図する宿主細胞中で複製することができるDNA配列を含む。そのよう

10

20

30

40

50

な配列の例としては、プラスミド pUC19、pACYC177、pUB110、pE194、pAMB1、及び pIJ702 の複製起源である。

【0179】

このベクターは選択マーカー、例えば、B. スブチリス (*B. subtilis*)、又は B. リケニフォルミス (*B. licheniformis*) 由来の *dal* 遺伝子等の宿主細胞中の欠損を補完する遺伝子、又はアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、又はテトラサイクリン耐性を付与するものである。更に、このベクターは、*amdS*、*argB*、*niaD*、及び *sc* 等の *Aspergillus* 選択マーカー、ハイグロマイシン耐性を高めるマーカーであり、例えば、WO91/17243 に記載の共形質転換により選択することができる。

10

【0180】

細胞内発現は、例えば、宿主細胞として特定のバクテリアを用いた場合には、有効であるが、通常、発現は細胞外であることが好ましい。通常、本明細書で言及するバチルス α アミラーゼは発現されたタンパク質を培養培地に分泌するためのプレ領域を含む。必要であれば、このプレ領域は、別のプレ領域又はシグナル配列に置換され、このことは個々のプレ領域をコードしている DNA 配列の置換により達成される。

【0181】

α アミラーゼ変異体、プロモーター、ターミネーター、又は他のエレメントをコードしている DNA 構築体を結合し、複製のために必要な情報を含む好適なベクターにそれらを挿入するのに用いる方法は当業者に知られている。(例えば、Sambrook ら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 参照。)

20

【0182】

DNA 構築体又は発現ベクターを含む細胞は、 α アミラーゼ変異体の組換え生成における宿主細胞として用いられることが好ましい。この細胞は変異体をコードしている DNA 構築体と共に形質転換され、これは好ましくは宿主細胞の染色体における DNA 構築体 (1 つ以上のコピーにおける) を組み込むことにより行われる。DNA 配列は細胞中ではより安定であるので、組み込みが通常有利であると考えられている。DNA 構築体の宿主細胞染色体への組み込みは従来する方法、例えば、相同又は異種組み込みにより、行うことができる。代替的に、この細胞は別のタイプの宿主細胞に関係している発現ベクターを用いて、前述のように、形質転換される。

30

【0183】

この細胞は哺乳動物又は昆虫のような高等有機体の細胞でもよいが、バクテリア又は糸状菌 (酵母を含む) 細胞等の微生物が好ましい。

【0184】

好適なバクテリアの例としては、バチルススブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルスリエキニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルスレンタス (*Bacillus lentus*)、バチルスブレビス (*Bacillus brevis*)、ゲオバチルスステアロセレモフィリス (*Geobacillus stearothermophilus*)、バチルスアルカロフィリス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルスアミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルスコアギュランス (*Bacillus coagulans*)、バチルスサーキュランス (*Bacillus circulans*)、バチルスレンタス (*Bacillus lautus*)、バチルスメガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルスツリングiensis (*Bacillus thuringiensis*)、ストレプトマイセスリビダンス (*Streptomyces lividans*)、又は ストレプトマイセスムリナス (*Streptomyces murinus*) 等のグラム陽性バクテリア、又は *E. coli* 等のグラム陰性バクテリアがある。バクテリアの形質転換は、例えば、プロトプラスト形質転換により、コンピテント細胞を既知の方法で用いることにより、行うことができる

40

50

。

【0185】

酵母微生物はサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 又はシズサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 例えば、サッカロマイセスセレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から選択される。アスペルギルス (*Aspergillus*) に属する微生物が好まれ、例としてはアスペルギルスオリザエ (*A. oryzae*) 又はアスペルギルスニガー (*A. niger*) がある。糸状菌細胞はプロトプラスト形成及びプロトプラストの形質転換を含む工程により形質転換され、次いで既知の方法による細胞壁の再生が行われる。アスペルギルス宿主細胞を形質転換するのに好適な方法はEP238023に記載されている。

10

【0186】

本発明の組成物及び方法の側面は、変異体アミラーゼの生成を行うための条件下で宿主細胞を培養して α アミラーゼ変異体を生成する工程及び細胞及び培養培地から変異体アミラーゼを回収する工程に関する。細胞の培養に用いる培地は意図する宿主細胞を育成し、 α アミラーゼ変異体の発現させることができるのに好適な従来の培地でよい。好適な培地は販売されており、公知のレシピ (例えば、ATCCのカatalogに記載のように) に基づいて調製することもできる。

【0187】

宿主細胞から分泌された α アミラーゼ変異体は遠心又はろ過、及び硫酸アンモニウム等の塩を用いて培地のタンパク様成分を沈殿させることを含む、既知の方法により、培地から細胞を分離し、次いで、エクステンジクロマトグラフィー、又は親和クロマトグラフィー等のクロマトグラフ法を用いて、培養培地から回収される。

20

VI. 工業的応用

【0188】

本発明 α アミラーゼ変異体は各種工業製品に有用な性質を有している。例えば、本発明の変異体はデンプン液化 (例えば、米国特許No. 3, 912, 590、EP特許出願Nos. 252730及び63909、WO99/19467、及びWO96/28567、これらの文献を参照により本明細書に援用する) のような、デンプン処理/添加に用いられる。本発明の変異体は更にデンプン又は全粒穀物からの燃料用、飲料用、及び工業用エタノール等の甘味料及びエタノールの生成に有用である (例えば、米国特許No. 5, 231, 017参照)。本発明の変異体はビール製造又は醸造に有用である。この変異体は、組成物中に用いることができ、この組成物は好適な緩衝剤、安定剤、防腐剤等のほかに、グルコアミラーゼ、プルラナーゼ、及び他の α アミラーゼを更含んでいてもよい。

30

【0189】

本発明のアミラーゼ変異体は洗剤組成物の成分として、洗濯、食器洗浄、及び硬表面洗浄において有用である。この変異体はテキスタイル、ファブリック、及びガーメント等のダサイジング (例えば、WO95/21247、米国特許No. 4, 643, 736、EP119, 920参照。これらの文献を参照により本明細書に援用する)、及びパルプ及び製紙工業において有用である。

40

【0190】

本発明の組成物及び方法のこれらの他の使用については以下でより詳細に説明する。

A. 穀物処理及びデンプン転換製品

【0191】

穀物処理製品及びデンプン転換製品は3つのカテゴリーに分けることができる。即ち、(1) デンプンを例えば、マルトデキストリン、デキストロース、及びフルクトース高含有シロップに転換する一般的なデンプン転換、(2) エタノール生成、及び(3) ビール醸造。これらの方法に含まれる数多くの工程は同じであるが、これらを別々に説明する。幾つかの態様において、変異体 α アミラーゼはフィターゼと組み合わせて用いる(4)。これらの製品を製造するための組成物も説明される(5)。

1. 一般的なデンプン転換

50

【0192】

液化及び糖化等の従来のデンプン転換工程は、例えば、米国特許No. 3, 912, 590、及びEP特許出願Nos. 252730及び63909に記載されている。これらの文献を参照により本明細書に援用する。一般的に、デンプン転換工程はデンプンをより低分子量の炭水化物成分に分解する。そのようなデンプンを糖へ転換する場合、デンプンは予備処理工程及び2つ又は3つの連続的処理工程、即ち、液化工程、糖化工程、及び意図される最終生成物に応じて、任意で異性化工程、を含む連続工程で、解重合される。

【0193】

a. 天然／生デンプンの前処理

マイクロサイズの顆粒からなる天然／生デンプンは室温では不溶性である。水性デンプンスラリーを加熱した時、顆粒は膨潤して、時々破裂し、デンプン分子が水溶液中に分散する。この「ゼラチン化」工程の間に粘度が劇的に上昇する。典型的な工業プロセスでは固形含量レベルは、30乃至40%であるので、デンプンを希釈又は「液化」して、操作しやすくしなければならない。このために粘度を低くすることは、酵素的分解により簡単に行うことができる。

10

b. 液化

【0194】

液化工程の間、長い鎖デンプン分子が、 α アミラーゼにより、より短い分岐及び直鎖分子（マルトデキストリン）へと分解される。この液化工程は105乃至110℃で5分間、次いで95℃で1乃至2時間行われる。pHは通常約5.5乃至約6.2である。これらの条件下における工学的酵素安定性を確実にするために、1mMのカルシウムが通常添加される（40ppmの遊離カルシウムイオン）。この処理の後、液化されたデンプンは10乃至15のデキストロース当量（DE）を示す。

20

【0195】

c. 糖化

液化工程の後、このマルトデキストリンはグルコアミラーゼ（例えば、OPTIDEX（商標）L-400）及びイソメラーゼ（米国特許No. 4, 335, 208）又はプルラーゼ等の脱分岐酵素の添加によりデキストロースへ転換される。この工程の前に、高温を維持して（約95℃）、pHを約4.5以下に下げ、液化 α アミラーゼを不活性化して、「パノース前駆体」といわれる短鎖オリゴサッカライドを形成させないようにする。この「パノース前駆体」は脱分岐酵素により加水分解できない。温度を60℃にまで下げて、グルコアミラーゼ及び脱分岐酵素を添加する。この糖化工程は24乃至72時間行われる。

30

【0196】

通常、液化工程の後に α アミラーゼを変性する場合、糖化生成物の約0.2乃至0.5%が、プルラーゼにより分解することができない、分岐トリサッカライド、GlcPal-GlcPal-4Glc（パノース）である。もし、液化工程からの活性アミラーゼが糖化工程の間に存在すると、（即ち、変性されていない）、パノースのレベルは1乃至2%にまで高くなり、このレベルは糖化工程での生産性を低めるので非常に好ましくない。

40

d. 異性化

【0197】

最終的に得られる所望の糖が、例えば、フルクトース高含有シロップ等のデキストロースシロップである場合、糖化工程の後に、pHを約6乃至8の範囲、好ましくは7.5に高め、イオン交換によりカルシウムを除去する。このデキストロースシロップは、例えば、固定化されたグルコースイソメラーゼ（GENSWEET（商標）IGI-HF）等を用いて、フルクトース高含有シロップへと転換される。

2. エタノール生成

【0198】

一般的に、全粒穀物からのアルコール（エタノール）生成は、4つの工程に分けられる

50

。即ち、(a) 粉碎、(b) 液化、(c) 糖化、及び (d) 発酵である。これらの工程の幾つかは前述と同じである。

a. 粉碎及びスラリー生成

【0199】

穀粒、コーン、マイロ等のデンプン含有基質を粉碎して、構造を壊し、更に処理しやすくする。用いられる2つのプロセスは、通常、湿式及び乾式粉碎である。乾式粉碎において、全粒穀物を粉碎し、このプロセスの残りの部分に用いる。湿式粉碎は胚及び粗引き粉（デンプン顆粒とタンパク質）の好適な分離を提供することができ、若干の例外を除いて、シロップを同時生産することができる。

【0200】

粉碎されたデンプン含有物質は水及び蒸留残渣を組み合わせ、水性シロップとなる。このスラリーは15乃至55% d s w / w（例えば、20乃至50%、25乃至50%、25乃至45%、25乃至40%、20乃至35%、及び30乃至36% d s）を含む。再利用された蒸留残渣（バックセット）は通常10乃至70% v / v（例えば、10乃至60%、10乃至50%、10乃至40%、10乃至30%、10乃至20%、20乃至60%、20乃至50%、20乃至40%、及び20乃至30%）の範囲である。25乃至40% d s が一般的である。

【0201】

一旦、粉碎されたデンプン含有物質が水及びバックセットと組み合わせられた後は、p Hは通常このスラリーにおいて、調整されない。更に、p Hはフィターゼ（以下参照）及びαアミラーゼをこのスラリーに添加した後でも、調整されない。このスラリーのp Hは通常p H 4.5乃至6.0未満である（例えば、p H 4.5-5.8、p H 4.5-5.6、p H 4.8-5.8、p H 5.0-5.8、p H 5.0-5.4、p H 5.2-5.5、及びp H 5.2-5.9）。このスラリーのp Hはスラリーに添加される蒸留残渣の量及び蒸留残渣に含まれる物質のタイプに依存して、p H 4.5乃至5.3の間である。例えば、蒸留残渣のp Hはp H 3.8及び4.5の間である、表Bは155 o Fで2時間攪拌した後に、全粒コーンスラリー（32% d s）に蒸留残渣を添加した量に応じたp H変化を示す。

10

20

表 B. 蒸留残渣の添加量に対する pH 変化

蒸留残渣 w/w %	最終 pH
0	5.52
20	5.29
40	5.16
50	5.09
60	5.05
80	4.98
100	4.94

(表 B 蒸留残渣の添加量の増加に伴う pH 変化)

【0202】

エタノール生成の間に、蒸留前、ビールに酸を添加して、pHを低くして、微生物汚染のリスクを減らす。

【0203】

幾つかのケースにおいて、フィターゼをスラリーに添加する。フィターゼは以下でより詳細に説明する。幾つかのケースにおいて、 α アミラーゼがこのスラリーに添加される。幾つかのケースにおいて、フィターゼ及び α アミラーゼをこのスラリーに連続的に添加する。幾つかのケースにおいて、フィターゼ及び α アミラーゼをこのスラリーに同時に添加する。幾つかのケースにおいて、フィターゼ及び α アミラーゼを含むスラリーを5分から8時間（例えば、5分から6時間、5分から4時間、5分から2時間、及び15分から4時間）インキュベーション（予備処理）する。他のケースにおいて、このスラリーを40-115℃の範囲の温度で（例えば、45℃乃至80℃、50℃乃至70℃、50℃乃至75℃、60℃乃至110℃、60℃乃至95℃、70℃乃至110℃、70℃乃至85℃、及び77℃乃至86℃）インキュベーションする。

【0204】

幾つかのケースにおいて、このスラリーをデンプン含有物質のデンプンゼラチン化温度以下の、0乃至30℃の温度で（例えば、0乃至25℃、0乃至20℃、0乃至15℃、0乃至10℃、及び0乃至5℃）、インキュベーションする。幾つかのケースにおいて、この温度は、68℃以下、65℃以下、62℃以下、60℃以下、更には55℃以下である。幾つかのケースにおいて、この温度は、45℃以上、50℃以上、55℃以上、及び更には60℃以上である。フィターゼ及び α アミラーゼを含むスラリーをデンプンゼラチン化温度以下の温度でインキュベーションすることは一次液化とも言われる。

【0205】

近年、液化工程で用いられる商業的に利用可能な微生物 α アミラーゼは80℃以上の温度、5.6未満のpHで全粒粉碎穀粒を用いた乾燥粉碎プロセスから液化デンプン基質を

生成するのに十分な安定性を有していないと信じられている。

b. 液化

【0206】

液化工程において、4以上のDPのマルトデキストリン部分を加水分解することにより、デンプン顆粒を可溶化する。原料は粉碎された全粒穀物又はデンプン処理からのサイド流である。粉碎された及び液化された穀物はマッシュとして知られている。加水分解は酸処理又は α アミラーゼによる酵素処理により行われる。酸加水分解は非常に限られた場合に行われる。

【0207】

酵素的液化は通常、3つの高温スラリープロセスとして実施される。このスラリーは60乃至95℃（好ましくは77–86℃、80–85℃、及び83–85℃）の間で加熱され、酵素が添加される。その後、このスラリーを95乃至140℃、好ましくは105乃至125℃で蒸気処理して、60乃至95℃に冷却し、追加的な酵素を添加して、最終的な加水分解物を得る。この液化工程は4.0乃至6.0のpH、通常5及び6の間pHで行われる。

【0208】

このスラリーを α アミラーゼと、任意でフィターゼと一緒に、60乃至75℃の範囲の温度で、5分から2時間の間インキュベーションする。更なる液化工程において、このインキュベーションされた又は前処理されたデンプン含有物質はデンプン含有物質のゼラチン化温度より0乃至45℃高い温度（例えば、70℃乃至120℃、70℃乃至110℃、及び70℃乃至90℃）に、2分乃至6時間（例えば、2分乃至4時間、90分、140分、及び90分乃至140分）、約4.0乃至5.5のpHで、より好ましくは1乃至2時間、曝される。この温度は、例えば、1乃至15分のような短時間、従来の蒸気処理により高くすることができる。その後このデンプンは15乃至150分（例えば、30乃至120分）の間、75℃乃至95℃（例えば、80℃乃至90℃、及び80℃乃至85℃）の範囲の温度で更に加水分解される。このpHはこれらの工程の間に調整せず、液化されたマッシュのpHは4.0乃至5.8（例えば、pH4.0乃至pH5.8、pH4.8乃至5.4、及びpH5.0乃至5.2）である。幾つかの態様において、熱安定性 α アミラーゼの第二投与分が第二液化工程で添加される。他の態様において、これらは α アミラーゼの追加的な投与分ではない。

【0209】

本発明のインキュベーション及び液化工程に次いで糖化工程及び発酵工程が行われる。

c. 発酵

【0210】

液化工程の間に得られた発酵性糖は微生物発酵による、アルコール生成、特にエタノール生成に用いられる。発酵に用いる微生物は最終生成物により異なる。

【0211】

通常、エタノールが所望の最終生成物である場合、酵母が発酵微生物として用いられる。幾つかの好適な態様において、エタノール生成微生物は酵母、特にサッカロマイセスセレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）（米国特許No. 4,316,956）等のサッカロマイセス（*Saccharomyces*）株である。各種サッカロマイセスセレビシアエ（*S. cerevisiae*）が販売されており、例としてはFALI（*Fleischmann's*酵母）、SUPERSTART（*Alltech*）、FERMIOL（*DSM Specialties*）、RED STAR（*Lesaffre*）、及びAngel alcohol yeast（*Angel Yeast Company, China*）を含むがこれらに限定されない。この方法に用いられる開始酵母の量は好適な時間に商業的に十分な量のエタノールを生成するのに効果的な量である（例えば、72時間未満に25乃至40%dsの基質から少なくとも1つ10%のエタノールを生成する）。酵母細胞は通常、発酵ブロス1ml当り 10^4 乃至 10^{12} の生菌量で供給され、好ましくは 10^7 乃至 10^{10} の生菌量で供給される。発酵は発酵

微生物（例えば、酵母）に加え、栄養素、任意フィターゼ含むがこれらに限定されない追加的な酵素を含む。発酵に酵母を使用することは当業者によく知られており。参考文献は *The ALCOHOL TEXTBOOK*, K. JACQUES ET AL., EDS. 1999, NOTTINGHAM UNIVERSITY PRESS, UK である。酵母発酵は通常 24 乃至 96 時間、典型的には 35 乃至 60 時間行われる。発酵の温度は通常 26℃ 乃至 34℃、例えば、32℃ であり、pH は約 3 乃至 6、好ましくは 4 乃至 5 である。

【0212】

好適な発酵微生物の使用により、他の最終生成物も得ることができる。これらの非限定的な例としては、グリセロール、1, 3-プロパンジオール、グルコネート、2-ケト-D-グルコネート、2, 5-ジケト-D-グルコネート、2-ケト-L-グルコネート、スクシニル酸、酪酸、アミノ酸、及びこれらの誘導体がある。例えば、酪酸が所望の最終生成物である場合、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 株 (ラクトバチルス カゼイ (*L. casei*)) を用いる。グリセロール又は 1, 3-プロパンジオールが所望の最終生成物である場合、*E. coli* が用いられる。2-ケト-D-グルコネート、2, 5-ジケト-D-グルコネート、及び 2-ケト-L-グルコン酸が所望の最終生成物の場合、パントエアシトレア (*Pantoea citrea*) が用いられる。

10

d. 糖化及びSSF

【0213】

液化されたデンプン含有物質はグルコアミラーゼ等の糖化酵素の存在下で糖化される。糖化プロセスは少なくとも 1 つ 12 時間乃至 120 時間、（例えば、12 乃至 90 時間、12 乃至 60 時間、及び 12 乃至 48 時間）行われる。しかしながら、約 30 分乃至 2 時間（例えば、30 乃至 90 分）、30 乃至 60℃、通常 50℃ 以上、しばしば 60℃ の温度範囲で予備糖化工程を行い、その後発酵の間に完全に糖化される。後者の工程は、同時糖化及び発酵 (SSF) に好適である。SSF はエタノール生成において、一般的であり、糖化酵素と発酵有機体（例えば、酵母）と一緒に添加し、70℃ 乃至 40℃ の温度及び 4.2 乃至 4.8 pH（好ましくは 4.5 の pH で実施する）。

20

【0214】

発酵性糖（例えば、デキストリン類、単糖類、特にグルコース）は酵素的糖化により生成される。これらの発酵性糖は、更に精製され、及び／又は有用な糖生成物に転換される。更に、糖はアルコール（例えば、エタノール及びブタノール）、有機酸（例えば、スクシニル酸及び酪酸）、糖アルコール（例えば、グリセロール）、アスコルビン酸中間体（例えば、グルコネート、2-ケト-D-グルコネート、2, 5-ジケト-D-グルコネート、及び 2-ケト-L-グルコン酸）、アミノ酸（例えば、リジン）、タンパク質（例えば、抗体及びそれらのフラグメント）等の最終生成物の製造のための微生物発酵プロセスにおける発酵原料として用いられる。

30

e. 蒸留

【0215】

任意で、発酵に次いで、アルコール（例えば、エタノール）が蒸留により回収される。エタノールの生成量は、通常少なくとも 8%、少なくとも 10%、少なくとも 12%、少なくとも 14%、少なくとも 15%、少なくとも 16%、少なくとも 17%、少なくとも 18% (v/v) であり、幾つかのケースにおいて、少なくとも 19%、少なくとも 20%、少なくとも 21%、少なくとも 22%、少なくとも 23% (v/v) である。得られたエタノールは、例えば、燃料エタノール、飲料用エタノール、即ち、ポータブルニュートラルスピリッツ、又は工業用エタノールに用いられる。

40

f. 副生成物

【0216】

発酵生成物を取り去ったものは穀物残渣であり、これは通常液体又は乾燥のいずれかの状態で、動物用飼料に用いられる。穀物残渣は「発酵共生生成物」といわれる、蒸留乾燥穀物 (DDG) や蒸留乾燥パルプ可溶化物 (DDGS) 等の形態をとり、動物用飼料に用

50

いられる。

3. ビール醸造

【0217】

本発明の変異体 α アミラーゼはビール製造工程にも有用である。通常、好ましくは α アミラーゼはマッシュ工程の間に添加される。デンプン転換の場合と同様に、安定性、特異活性等の観点からこのプロセスでの添加が有利である。

4. 変異体 α アミラーゼと他の酵素との組み合わせ

【0218】

液化、糖化、SSF、及び炭水化物処理の全ての側面において、通常、本発明の α アミラーゼポリペプチドは、例えば、追加的 α アミラーゼ、グルコアミラーゼ、イソアミラーゼ、 β アミラーゼ、マルトジェニックアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシダーゼ、エステラーゼ、オキシダーゼ、ペクチナーゼ、ペクチンリアーゼ、クチナーゼ、ラッカーゼ、及び／又はフィターゼ等の1つ以上の追加的な酵素と組み合わせて用いられる。これらの酵素の多くは、洗浄製品の関するセクションでより詳細に説明する。

【0219】

フィターゼは穀物及びオイルシードにおいて見られるフィチン酸（フィテート）を分解する能力のある酵素である。フィターゼ及び分解中の中間体は α アミラーゼの作用を阻害又は他の有害な作用を及ぼし、それゆえそれらの効率を減らすと信じられている。

【0220】

変異体 α アミラーゼと一緒に用いることができるフィターゼはインキュベーション及び液化工程の決められた条件下でフィチン酸を加水分解することができる。幾つかの態様において、フィターゼはイノシトールヘキサフォスヘート（フィチン酸）からの、無機リン酸の少なくとも1つを放出することができる。フィターゼは加水分解を開始するフィテート分子上のリン酸エステル基の特異位置に対する適合性に基づいてグループ分けすることができる（例えば、3-フィターゼ（EC 3. 1. 3. 8）又は6-フィターゼ（EC 3. 1. 3. 26）。フィターゼの典型的な例としては、myo-イノシトールフェキサキフォスヘート-3-フォスフォヒドロラーゼがある。

【0221】

フィターゼは糸状菌及びバクテリア有機体等の微生物から得ることができる。これらの微生物の幾つかは、アスペルギルス（*Aspergillus*）株（例えば、アスペルギルスニガー（*A. niger*）、アスペルギルステルレウス（*A. terreus*）、アスペルギルスフカム（*A. ficum*）及びアスペルギルスフミガタス（*A. fumigatus*））、マイセリオフトーラ（*Myceliophthora*）株（マイセリオフトーラセルモフィラ（*M. thermophila*））、タラロマイセス（*Talaromyces*）株（タラロマイセスセルモフィラス（*T. thermophilus*））、トリコデルマ（*Trichoderma*）株（トリコデルマレーシ（*T. reesei*））、及びセルモマイセス（*Thermomyces*）株（WO 99/49740）を含む。フィターゼは、ペニシリウム（*Penicillium*）株、例えば、ペニシリウムホルデイ（*P. hordei*）（ATCC No. 22053）、ペニシリウムピセウム（*P. piceum*）（ATCC No. 10519）、又はペニシリウムブレビーコンパクトム（*P. brevicompactum*）（ATCC No. 48944）からも利用可能である。例えば、米国特許No. 6, 475, 762参照。更に、バチルス（*Bacillus*）株（例えば、バチルススブチリス（*B. subtilis*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）株、ペニオフォラ（*Peniophora*）株、大腸菌（*E. coli*）株、シトロバクテリア（*Citrobacter*）、エンテロバクター（*Enterobacter*）及びブチラキセラ（*Buttiauxella*）（WO 2006/043178参照）からも利用可能である。

【0222】

商業的に利用可能なフィターゼはNATUPHOS（商標）（BASF）、RONOZYME（商標）P（ノボザイムA/S）、PHZYME（商標）（Danisco A/S

10

20

30

40

50

, *Diversa*)、及び *FINASE* (商標) (*AB Enzymes*) がある。微生物フィターゼ活性を決定して、フィターゼ単位を定義するための方法は、Engelenら(1994) *J. AOAC Int.* 11:160-764に記載されている。フィターゼは野生型フィターゼや、これらのフィターゼの変異体又は断片でもよい。

【0223】

例示的なフィターゼはブチラキセラ (*Buttiauxiella*) 種に由来する。この種は、ブチラキセラアグレスチツ (*B. agrestis*)、ブチラキセラブレンネラエ (*B. brennerae*)、ブチラキセラフェラグチアーゼ (*B. ferragutiasae*)、ブリラキセラガビニアエ (*B. gaviniae*)、ブチラキセライズアルディー (*B. izardii*)、ブチラキセラノアキアエ (*B. noackiae*)、及びブチラキセラワームドルディアエ (*B. warmboldiae*) を含む。ブチラキセラ (*Buttiauxella*) 株はDSMZ、The German National Resource Center For Biological Material (Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, DE) で入手可能である。登録番号NCIMB 41248のブチラキセラ (*Buttiauxella*) 株P1-29はフィターゼを得るのに特に有用な株の例である。フィターゼは、BP野生型、WO06/043178に記載のそれらの変異体、又は2007年3月6日に出願された米国特許出願公開公報US20080220498号に記載の変異体でよい(例えば、表1及び配列番号3)。

【0224】

このフィターゼは以下に示すハイブリダーゼーション19のアミノ酸配列を有するブチラキセラ (*Buttiauxiella*) フィターゼのBP-17変異体、又は配列番号19で定義されるアミノ酸配列に少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92.5%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、同一なフィターゼである。

```
NDTPASGYQV EKVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNTPW EWPVKLGYYT
PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQRTLKTGE
AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMPSKLS
IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWGNH HSEQEWASLL
KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLLQAISN ALNPNATESK LPDISPDNKI
LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
SVSMVYQTLE QLRSTPLSL NQFAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
VVSQSVEPGC QLQ (配列番号19)
```

(配列番号19)

【0225】

インキュベーション及び/又は液化工程に用いるフィターゼの量(投与量)は0.001乃至50FTU/gds(例えば、約0.01乃至25FTU/gds、約0.01乃至15FTU/gds、約0.01乃至10FTU/gds、約0.05乃至15FTU/gds、及び約0.05乃至5.0FTU/gds)である。

5. 穀物処理及びデンプン転換のための組成物

【0226】

本発明の組成物及び方法の1つの側面は一般的なデンプン転換、アルコール発酵、ビール製造等を含むデンプン転換に用いるための変異体 α アミラーゼの1つ以上を含む組成物である。そのような組成物は変異体 α アミラーゼの成熟前分解(タンパク質分解)から保

護し、貯蔵期間を長くし、概観を改善し、組成物のカラーコードのために選択された、緩衝剤、塩、ミネラル、安定剤、防腐剤、抗微生物剤、顔料、香料等を含む。

【0227】

この組成物は、例えば、グルコアミラーゼ及びフィターゼ等を含むデンプン転換に関連する追加的な酵素を更に含んでもよい。特定のグルコアミラーゼはBoelら(1984)EMBO J. 3:1097-1102に記載のアスペルギルスニガー(*Aspergillus niger*)由来のG1又はG2AMG又はWO00/04136 又はWO 01/04273に記載のそれらの変異体、WO99/28448に記載のタロマイセスエメルソニ(*Talaromyces emersonii*)由来のAMG、又はWO 06/060062に記載のトリコデルマレーシ(*Trichoderma reesei*)由来グルコアミラーゼである。

10

B. パルプ及び製紙

【0228】

本発明の変異体 α アミラーゼはデンプン強化古紙、ダンボールから、パルプ、紙、及びダンボール等のリグノセルロース系の物質の生成に用いられる。ここではリパルピングがpH7以上で行われ、アミラーゼが強化デンプンを分解して、古紙の分解を促進する。本発明の変異体 α アミラーゼはデンプンコートされた印刷紙から再生紙を精製する工程に特に有用である。このプロセスはW95/14807に記載のように行われ、(a)紙を分解してパルプを生成する工程、(b)工程(a)の前、間、又は後にデンプン分解酵素で処理工程、及び(c)工程(a)及び(b)の後パルプからインク分子を分離する工程を含む。

20

【0229】

この α アミラーゼは、酵素的に修飾されたデンプンが、炭酸カルシウム、カオリン、及びクレイ等のアルカリ充填剤と一緒に製紙工程に用いられる場合にも有用である。本発明の変異体 α アミラーゼと一緒に用いると、充填剤の存在下でデンプンを修飾することが可能になり、従って、単純化された総合的な工程が可能になる。

C. テキスタイル、ファブリック、及びガーメントのデサイジング

【0230】

本発明の変異体 α アミラーゼはテキスタイル、ファブリック、又はガーメントのデサイジングにも有用である。テキスタイルの工業的加工工程において、 α アミラーゼは伝統的に、デンプン含有サイズの除去を促進するためのデサイジング工程に補助的に用いられてきた。デンプン含有サイズウェービングの間に濡れた毛糸をコートして保護するために用いられている。ウェービングの後にサイズコーティングを完全に除去することは、布の汚れを落とし、色を落とし、染色する下流の工程を確実にを行うために重要である。繊維物質に有害な影響を含まないので、酵素的デンプン分解が他の方法より好ましい。

30

【0231】

処理コストを減らして、工場の処理能力を向上させるために、デサイジング工程は時たま、洗浄及び漂白工程と組み合わせられる。伝統的な α アミラーゼは、高いpH及び漂白剤と相性が悪いので、そのようなケースにおいて、1つの酵素的補助、アルカリ又は酸性剤等を用いてデンプンを分解する。デンプンデサイズの非酵素的分解は、刺激の強い薬品を使うので、繊維にダメージを与える。従って、アルカリ溶液中で改善された性能を示す変異体 α アミラーゼの使用が好まれる。そのような変異体は、セルロース含有ファブリック又はテキスタイルのデサイジングをするときに、セルラーゼと一緒に、又は別に用いてもよい。

40

【0232】

デサイジング及び漂白工程は当業者に知られている。例えば、そのような工程はWO95/21247, 米国特許No. 4, 643, 736, EP119, 920に記載されており、参照により本明細書に援用する。デサイジングに用いる近年の製品としてはジェネンコアのOPTISIZE(商標)FLEXがある。

D. 洗浄及び洗剤組成物

50

【0233】

本発明の変異体 α アミラーゼは洗剤組成物に添加することができるので、この組成物の成分として用いることができる。この洗浄組成物は汚れた布及びリンス添加された布用柔軟剤組成物の予備処理に好適な洗濯用添加剤を含む手動又は洗濯機用洗剤に製剤化することができる。洗浄組成物は手洗い用又は食器洗浄機用洗剤、又は一般的な家庭用硬表面洗浄用組成物にも製剤化することができる。一般的にこの変異体 α アミラーゼの性質は選択されたpH、他の酵素及び非酵素成分と相性がよい。

【0234】

洗剤組成物又は添加剤は、プロテアーゼ、リパーゼ、ペルオキシド、他のアミロ分解性酵素（例えば、他の α アミラーゼ）、グルコアミラーゼ、マルトジェニックアミラーゼ、CGTアーゼ、及び／又はセルラーゼ、マンナーゼ（MANNNASTAR（商標）、ダニスコユーエスインク、ジェネンコアディビジョン）、ペクチナーゼ、ペクチンリアーゼ、クリナーゼ、及び／又はラッカーゼ等の1つ以上の追加的な酵素を含む。これらの酵素は以下でより詳細に説明する。

【0235】

プロテアーゼ：好適なプロテアーゼは有機体由来のものであり、化学的に修飾された又は遺伝子工学的に処理された変異体も含む。このプロテアーゼはセリンプロテアーゼ、又はメタロプロテアーゼでよく、好ましくはアルカリ微生物プロテアーゼ、又はトリプシン様プロテアーゼでよい。アルカリプロテアーゼの例としては、スブチリシン、特に、バチルス（*Bacillus*）由来のもの、例えば、スブチリシンNovo、スブチリシンCarlsberg、スブチリシン309、スブチリシン147、及びスブチリシン168（WO89/06279に記載）がある。トリプシン様プロテアーゼの例としては、トリプシン（例えば、トリ又はウシ由来）、及びWO89/06270及びWO94/25583に記載のフサリウム（*Fusarium*）プロテアーゼを含む。

【0236】

有用なプロテアーゼの例としては、WO98/23732、WO99/20770、WO92/19729、WO98/20115、WO98/20116、及びWO98/34946に記載の変異体があり、特に、27、36、57、76、87、97、101、104、120、123、167、170、194、206、218、222、224、235、及び274の位置において1つ以上の置換を有する変異体を含む。

【0237】

好適な商業的に利用可能なプロテアーゼ酵素はALCALASE（商標）、SAVINASE（商標）、PRIMASE（商標）、DURALASE（商標）、ESPERASE（商標）、及びKANNASE（商標）（Novozymes A/S）、MAXATASE（商標）、MAXACAL、MAXAPEM（商標）、PROPERASE（商標）、PURAFECT（商標）、PURAFECTOX（商標）、FN2（商標）、FN3（商標）、FN4（商標）（ジェネンコアインターナショナルインク）を含む。

【0238】

リパーゼ：好適なリパーゼは糸状菌由来のバクテリアを含み、化学的に修飾された又は遺伝子工学的に処理された変異体を含む。有用なリパーゼの例としては、フミコーラ（*Humicola*）（セルモマイセス（*Thermomyces*）の別名）由来、例えば、EP258068及びEP305216に記載のフミコーララングイノーサ（*H. lanuginosa*）セルモマイセスラングイノーサ（*T. lanuginosus*））、あるいはWO96/13580に記載のフミコーラインソレンス（*H. insolens*）；シュードモナス（*Pseudomonas*）リパーゼ、例えば、シュードモナスアルカリゲネス（*P. alcaligenes*）又はシュードモナスシュードアルカリゲネス（*P. pseudoalcaligenes*）（EP218272）、シュードモナスセパシア（*P. cepacia*）（EP331376）、シュードモナススツゼリ（*P. stutzeri*）（GB1,372,034）、シュードモナスフルオレセンス（*P. fluorescens*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）株DS705（W

10

20

30

40

50

WO 95/06720 及び WO 96/27002), シュードモナスウィスコンシエンシス (*P. wisconsinensis*) (WO 96/12012); バチルス (*Bacillus*) リパーゼ、例えば、バチルススブチリス (*B. subtilis*) (Dartois ら (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360)、バチルスステアロセリモフィリス (*B. stearothermophilus*) (JP 64/744992) 又はバチルスプミラス (*B. pumilus*) (WO 91/16422) 由来を含む。他の例としては、WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079、及び WO 97/07202 に記載のリパーゼ変異体がある。好適な市販のリパーゼは LIPO LASE (商標) 及び LIPO LASE ULTRA (商標) (ノボザイム A/S) を含む。

10

【0239】

アミラーゼ：1つ以上の好ましくは追加的なアミラーゼも含まれる。好適なアミラーゼは (α 及び/又はベータ) はバクテリア又は糸状菌由来のものを含み、化学的に修飾された又は遺伝子工学的変異体を含む。アミラーゼの例としては、GB 1, 296, 839 に記載のバチルスリケニフォルミス (*B. licheniformis*) を含む。有用なアミラーゼの例としては、WO 94/18314、WO 96/39528、WO 94/02597、WO 94/18314、WO 96/23873、及び WO 97/43424 に記載の変異体であり、特に、15、23、105、106、124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408、及び 444 において、1つ以上の置換を有する変異体である。商業的に利用可能な α アミラーゼは DURAMY L (商標)、LIQUEZYME (商標)、TERMAMY (商標)、NATALASE (商標)、FNGAMY L (商標)、及び BAN (商標) (ノボザイム A/S)、RAPID ASE (商標) 及び PURASTAR (商標) (ジェネンコア) がある。

20

【0240】

セルラーゼ：好適なセルラーゼはバクテリア又は糸状菌由来のものを含み。化学的に修飾された又はタンパク質工学的に処理された変異体も含まれる。好適なセルラーゼはバチルス (*Bacillus*) 株、シュードモナス (*Pseudomonas*) 株、トリコデルマ (*Trichoderma*) 株、フミコーラ (*Humicola*) 株、フサリウム (*Fusarium*) 株、シエラビア (*Thielavia*) 株、アクレモニウム (*Acremonium*) 由来のものであり、例えば、米国特許 No. 4, 435, 307、米国特許 No. 5, 648, 263、米国特許 No. 5, 691, 178、米国特許 No. 5, 776, 757 及び WO 89/09259 記載のフミコーラインソレンス (*Humicola insolens*)、ミセリオフィセラセルモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) 及びフサリウムオキシオウポラム (*Fusarium oxysporum*) から生成されたセルラーゼを含む。トリコデルマレーシセルラーゼは米国特許 No. 4, 689, 297, 米国特許 No. 5, 814, 501, 米国特許 No. 5, 324, 649, WO 92/06221、及び WO 92/06165 に記載されている。バチルスセルラーゼは米国特許 No. 6, 562, 612 に記載されている。商業的に利用可能なセルラーゼは CELLUZYME (商標)、CAREZYME (商標) (ノボザイム A/S)、CLAZINASE (商標)、PURADAX HA (商標) (ジェネンコアインターナショナルリンク)、KAC-500 (B) (商標) (花王) を含む。

30

40

【0241】

ペルオキシダーゼ/オキシダーゼ：好適なペルオキシダーゼ/オキシダーゼは植物、バクテリア、又は糸状菌由来のものを含み、化学的に修飾された又は化学的に修飾されたものを含み。有用なペルオキシダーゼの例としては、コプリナス (*Coprinus*) 株、例えば、WO 93/24618、WO 95/10602、及び WO 98/15257 に記

50

載のコプリナスシネレウス (*C. cinereus*) 及びこれらの変異体を含む。商業的に利用可能なペルオキシダーゼは GUARDZYME (商標) (ノボザイム A/S) を含む。

【0242】

洗剤酵素は1つ以上の酵素を含む別の添加剤を添加することにより、又はこれらの酵素の全てを含む、組み合わせた添加剤を添加することにより、洗剤組成物に配合することができる。洗浄添加剤は液体、スラリー、バー、タブレット、粉末、ペースト等として製剤化することができる。例示的な洗浄添加剤組成物は粉塵精製の無い顆粒及び安定化された液体又はスラリーである。液体洗剤は水性でもよく、通常70%までの水を、0乃至30%の有機溶媒又は非水性溶媒を含む。

10

【0243】

粉塵精製の無い顆粒は、例えば、米国特許 Nos. 4, 106, 991 及び 4, 661, 452 に記載のように製造することができ、任意で当業者に既知の方法でコートされている。コーティング物質の例としては、ポリ(エチレンオキシド)製品、モル重量1000乃至20000(ポリエチレングリコール、PEG); 16乃至50エチレンオキシド単位のエチレンオキシレートノニルフェノール; 12乃至20炭素原子数のアルコールを含み、15乃至80エチレンオキシド単位のエトキシレートファッティールアルコール; 脂肪アルコール; 脂肪酸; 及び脂肪酸のモノー、ジー、及びトリグリセリドを含む。流動床技術での製造に好適なフィルム形成コーティング物質の例は GB 1483591 に記載されている、液体酵素調製は既知の方法に従って、例えば、ポリプロピレングリコース、糖又は糖アルコール、酪酸又はホウ酸により安定化される。保護された酵素は EP 238, 216 に記載の方法に従って、調製することができる。

20

【0244】

洗浄組成物は通常1つ以上の、非イオン性(準極性のものを含む)、アニオン、カチオン、及び/又は両性の界面活性剤を含む。この界面活性剤は重量により通常0.1%乃至60%の範囲で含まれる。例示的な界面活性剤の例は、約1%乃至約40%の直鎖アルキルベンゼンスルホネート、 α オレフィンスルホネート、アルキルスルホネート(脂肪アルコールスルフェート)、アルコールエトキシレート、二級アルカンスルホネート、 α スルホ脂肪酸メチルエステル、アルキル又はアルケニルスクシニル酸、又は石鹼等のアミオン界面活性剤、及び/又は約0.2%乃至約40%のアルコールエトキシレート、ノニルフェニルエトキシレート、アルキルポリグリコシド、アルキルジメチルアミンオキシド、エトキシレート脂肪酸モノエタノールアミド、脂肪酸モノエタノールアミド、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド、又はグルコサミン(グルコアミド)のN-アシルN-アルキル誘導体等の非イオン界面活性剤を含む。

30

【0245】

洗浄組成物は0乃至65%の洗浄ビルダー又はゼオライト、ジフォスフェート、カルボネート、シトレート、ニトリロトリアセチック酸、エチレンジアミンテトラアセチックアシド、ジエチレントリアミンペンタアセチックアシド、アルキル又はアルケニルスクシニック酸、可用性シリケート、又は層状シリケート(例えば、HoechstのSKS-6)等の複合剤を含む。洗浄組成物はカルボキシメチルセルロース、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニリデン-N-オキシド)、ポリ(ビニルイミダゾール)、ポリアクリレート、ポリカルボキシレート等のポリカルボキシレート、マレイン/アクリル酸コポリマー、及びラウリルメタアクリル酸コポリマー等の1つ以上のポリマーも含む。

40

【0246】

この洗剤はテトラアセチルエチレンジアミド又はノナノイルオキシベンゼネスルホネート等を組み合わせて過酸を形成する漂白剤となる、過ホウ酸、又は過炭酸等の、 H_2O_2 源漂白システムを含む。代替的に、この漂白システムはアミド、イミド、又はスルホンタイプ等のペルオキシ酸を含んでいてもよい。

【0247】

50

洗浄組成物の酵素は、例えば、プロピレングリコール、又はグリセロール、糖又は糖アルコール、酪酸、ホウ酸、又はホウ酸誘導体、例えば、芳香族ホウ酸、又は4-ホルミフェニルホウ酸等のフェニルホウ酸誘導体等の従来の安定剤を用いて安定化され、例えば、WO 92/19709及びWO 92/19708に記載の方法で製剤化される。

【0248】

この洗浄組成物は布柔軟剤、クレイ、発泡剤、抗凝集剤、汚れ懸濁剤、汚れ再付着防止剤、ダイ、殺菌剤、光学的漂白剤、ハイドロトロップ、変色防止剤、又は香料等の従来の洗浄組成物に用いる成分も含む。

【0249】

変異体 α アミラーゼは本明細書で説明するアッセイを用いて容易に検出することができる、有効量で存在すべきである。開始点として、1つ（又はそれ以上）の変異体 α アミラーゼは洗浄液1リットル当たり0.01乃至100mg、好ましくは0.1乃至1mgの酵素タンパク質になるように添加される。例示的な添加量は洗浄液1リットル当たり0.055mgである。

【0250】

例示的な食器用洗剤組成物は以下を含む；

1) 粉末自動食器洗浄機用組成物

非イオン界面活性剤 0.4－2.5%

メタシリケートナトリウム 0－20%

ジシリケートナトリウム 3－20%

ナトリウム三リン酸 20－40%

炭酸ナトリウム 0－20%

過ホウ酸ナトリウム 2－9%

テトラアセチルエチレンジイミド (TAED) 1－4%

硫酸ナトリウム 5－33%

酵素類 0.0001－0.1%

2) 粉末自動食器洗浄機用組成物

非イオン界面活性剤 1－2% (例えば、アルコールエトキシレート)

ジシリケートナトリウム 2－30%

炭酸ナトリウム 10－50%

リン酸ナトリウム 0－5%

無水クエン酸三ナトリウム 9－30%

酢酸ニトリロト酸ナトリウム (NTA) 0－20%

過ホウ酸ナトリウム一水和物 5－10%

テトラアセチルエチレンジイミド (TAED) 1－2%

ポリアクリレートポリマー 6－25% (例えば、マレイン酸／アクリル酸コポリマー)

酵素類 0.0001－0.1%

香料 0.1－0.5%

水 5－10%

3) 粉末自動食器洗浄機用組成物

非イオン界面活性剤 0.5－2.0%

ジシリケートナトリウム 25－40%

クエン酸ナトリウム 30－55%

炭酸ナトリウム 0－29%

重炭酸ナトリウム 0－20%

過ホウ酸ナトリウム一水和物 0－15%

テトラアセチルエチレンジイミド (TAED) 0－6%

マレイン酸／アクリル酸コポリマー 0－5%

クレイ 1－3%

ポリアミノ酸 0－20%

10

20

30

40

50

ポリアクリル酸ナトリウム	0-8%	
酵素類	0.0001-0.1%	
4) 粉末自動食器洗浄機用組成物		
非イオン界面活性剤	1-2%	
ゼオライトMAP	15-42%	
ジシリケートナトリウム	30-34%	
クエン酸ナトリウム	0-12%	
炭酸ナトリウム	0-20%	
過ホウ酸ナトリウム一水和物	7-15%	
テトラアセチルエチレン	0-3%	10
ジアミド(TAED)ポリマー	0-4%	
マレイン酸/アクリル酸コポリマー	0-5%	
有機リン酸塩	0-4%	
クレイ	1-2%	
酵素類	0.0001-0.1%	
硫酸ナトリウム(100%にする)		
5) 粉末自動食器洗浄機用組成物		
非イオン界面活性剤	1-7%	
ジシリケートナトリウム	18-30%	
クエン酸三ナトリウム	10-24%	20
炭酸ナトリウム	12-20%	
モノペルスルホネート	15-21%	
漂白安定剤	0.1-2%	
マレイン酸/アクリル酸コポリマー	0-6%	
ジエチレントリアミンペンタアセチレート	0-2.5%	
ペンタナトリウム塩		
酵素類	0.0001-0.1%	
硫酸ナトリウム、水(100%にする)		
6) 洗浄界面活性剤システムを含む粉末及び液体食器洗浄機用組成物		
非イオン界面活性剤	0-1.5%	30
オクタデシルジメチルアミンN-オキシドヒドレート	0-5%	
80:20(重量比)C18/C16オクタデシルジメチルアミンのブレンド	0-4%	
N-オキシド二水和物及びヘキサデシルジメチルアミンN-オキシドジヒドレート		
70:30(重量比)C18/C16オクタデシルビス(ヒドロキシエチル)アミンN-オキシドアンヒドラス及びヘキサデシルビス(ヒドロエチル)アミンN-オキシドアンヒドラス	0-5%	
平均エトキシ化3のC13-C15アルキルエトキシスルホネート	0-10%	
平均エトキシ化3のC12-C15アルキルエトキシスルホネート	0-5%	
平均エトキシ化12のC13-C15エトキシ化アルコール	0-5%	40
平均エトキシ化9のC12-C15エトキシ化アルコールのブレンド	0-6.5%	
平均エトキシ化30のC13-C15エトキシ化アルコールのブレンド	0-4%	
ジシリケートナトリウム	0-33%	
トリポリリン酸ナトリウム	0-46%	
クエン酸ナトリウム	0-28%	
クエン酸	0-29%	
炭酸ナトリウム	0-20%	
過ホウ酸ナトリウム一水和物	0-11.5%	
テトラアセチルエチレンジイミド(TAED)	0-4%	
マレイン酸/アクリル酸コポリマー	0-7.5%	50

硫酸ナトリウム	0-12.5%	
酵素類	0.0001-0.1%	
7) 非水性液体食器洗浄機用組成物		
液体非イオン界面活性剤 (例えば、アルコールエトキシレート)	2.0-10.0%	
アルカリメタルシリケート	3.0-15.0%	
アルカリメタルホスフェート	20.0-40.0%	
グリコール、ポリグリコール、ポリオキシド、グリコエーテルから選択される液体キャリア	25.0-45.0%	
安定剤 (例えば、リン酸の部分エステル及びC16乃至C18アルカノール)	0.5-7.0%	10
泡抑制剤 (例えば、シリコン)	0-1.5%	
酵素類	0.0001-0.1%	
8) 非水性食器洗浄組成物		
液体非イオン界面活性剤 (例えば、アルコールエトキシレート)	2.0-10.0%	
ケイ酸ナトリウム	3.0-15.0%	
アルカリ金属炭酸塩	7.0-20.0%	
クエン酸ナトリウム	0.0-1.5%	
安定化システム (例えば、細かく粉碎したシリコン及び低分子量のジアルキルポリグリコールエステル)	0.5-7.0%	
低分子量ポリアクリレートポリマー	5.0-15.0%	20
クレイゲル粘着剤 (例えば、ベントナイト)	0.0-10.0%	
ヒドロキシプロピルセルロースポリマー	0.0-0.6%	
酵素類	0.0001-0.1%	
高級ライコール、ポリグリコール、ポリオキシド、及びグリコールエステルから選択される液体キャリア (100%にする) バランス		
9) チキソトロピック液体食器洗浄機用洗剤組成物		
C12-C14脂肪酸	0-0.5%	
ブロックコポリマー界面活性剤	1.5-15.0%	
クエン酸ナトリウム	0-12%	
トリポリリン酸ナトリウム	0-15%	30
炭酸ナトリウム	0-8%	
アルミニウムトリスチアレート	0-0.1%	
クメンスルホン酸ナトリウム	0-1.7%	
ポリアクリレート粘着剤	1.32-2.5%	
ポリアクリル酸ナトリウム	2.4-6.0%	
ホウ酸	0-4.0%	
ギ酸ナトリウム	0-0.45%	
ギ酸カルシウム	0-0.2%	
n-デシルジフェニルオキシドジスルホン酸ナトリウム	0-4.0%	
モノエタノールアミン (MEA)	0-1.86%	40
水酸化ナトリウム (50%)	1.9-9.3%	
1,2-プロパンジオール	0-9.4%	
酵素類	0.0001-0.1%	
消泡剤、香料、水 (100%にする)		
10) 液体食器洗浄機用洗剤組成物		
アルコールエトキシレート	0-20%	
スルホン酸の脂肪酸エステル	0-30%	
ドデシルスルホン酸ナトリウム	0-20%	
アルキルポリグリコシド	0-21%	
オレイン酸	0-10%	50

ジシリケートナトリウム一水和物 18-33%
 無水クエン酸ナトリウム 18-33%
 ステアリン酸ナトリウム 0-2.5%
 過ホウ酸ナトリウム一水和物 0-13%
 テトラアセチルエチレンジイミド (TAED) 0-8%
 マレイン酸／アクリル酸コポリマー 4-8%
 酵素類 0.0001-0.1%
 11) 保護された漂白剤粒子を含む液体食器洗浄機用組成物
 ケイ酸ナトリウム 5-10%
 ピロリン酸四カリウム 15-25%
 トリリン酸ナトリウム 0-2%
 炭酸カリウム 4-8%
 保護された漂白剤粒子 (例えば、塩素) 5-10%
 ポリマー性増粘剤 0.7-1.5%
 水酸化カリウム 0-2%
 酵素類 0.0001-0.1%
 水 (100%にする)

12) 1)、2)、3)、4)、6) 及び 10) に記載の食器洗浄機用組成物であって、過ホウ酸塩過炭酸塩に置き換えられているもの

13) 1) - 6) に記載の食器洗浄機用組成物であって、更にマンガン酵素を含むもの。このマンガン酵素は、例えば、Efficient manganese catalysts For low-temperature bleaching, Nature 369, 1994, pp. 637-639 に記載のものでよい。

VII. αアミラーゼの性質を測定するための方法

【0251】

このセクションはαアミラーゼの性質を測定するための基本的なアッセイを説明する。追加的なアッセイは実施例のセクションで説明する。

A. フィルタースクリーニングアッセイ

【0252】

親アミラーゼ及びSPEZYME (商標) Xtra様αアミラーゼと比較して、変更された高い又は低いpHでの安定性及び／又はCa²⁺依存条件での安定性を有するSPEZYME (商標) Xtra様αアミラーゼ変異体のスクリーニングに以下のアッセイを用い得る。

1. 高pHフィルターアッセイ

【0253】

バチルスライブラリーは10マイクログラム/mlカナマイシンを含むTYアガープレート上のセルロースアセテート (OE67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) 一及びニトロセルロースフィルター (Protran-Ba85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) のサンドイッチで37℃で少なくとも21時間平板培養する。このセルロースアセテート層はTYアガープレート上に位置する。

【0254】

各フィルターサンドイッチを、プレートを形成した後でインキュベーションの前に、フィルター上に陽性変異体を局在させるために針を用いて傷をつけた。変異体が結合したニトロセルロースフィルターをpH8.6乃至10.6のグリシン-NaOH緩衝液を含むコンテナに移し、室温でインキュベーションした。(温度は10乃至60℃で変更することができる。) このコロニーを有するセルロースアセテートフィルターは、使用するまで、室温でTYプレート上で貯蔵する。インキュベーションの後、残りの活性をpH8.6乃至10.6のグリシン-NaOH緩衝液中に1%アガー、0.2%のデンプンを含むプレートで検出する。ニトロセルロースフィルターを含むアッセイプレートはフィルターサ

10

20

30

40

50

ンドイッチと同じ方法で印をつけ、2時間室温でインキュベーションした。フィルターを除去した後、のアッセイプレートに10%ルゴール溶液で染色した。デンプンを分解する変異体を暗青バックグラウンド上のホワイトスポットとして検出し、その後、貯蔵プレート上で同定する。陽性変異体を第一スクリーニングと同じ条件で2回スクリーニングする。

2. 低カルシウムフィルターアッセイ

【0255】

バチルスライブラリーは10マイクログラム/mlカナマイシンを含むTYアガープレート上のセルロースアセテート(OE67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE)ー及びニトロセルロースフィルター(Prottran-Ba85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE)のサンドイッチで37℃で少なくとも21時間平板培養する。このセルロースアセテート層はTYアガープレートの上に位置する。

【0256】

各フィルターサンドイッチを特に、プレートを形成した後でインキュベーションの前に、フィルター上に陽性変異体を局在させるために針を用いて傷をつけた。変異体が結合したニトロセルロースフィルターを異なるEDTA濃度(0.001mM乃至100mM)のpH8乃至10のカルボネート/ビカルボネート緩衝液を含むコンテナに移す。このフィルターを室温で1時間インキュベーションする。コロニーを有するセルロースアセテートフィルターを使用するまで室温でTYプレート上で貯蔵する。インキュベーションの後、残余活性を1%アガー、0.2%のデンプンを含むpH8.5乃至10のカルボネート/ビカルボネート緩衝液を含むプレートで検出する。このニトロセルロースフィルターを有するアッセイプレートをサンドイッチフィルターと同様に印を付け、室温で2時間インキュベーションする。フィルターを除去した後、このアッセイプレートを10%ルゴール溶液で染色した。デンプンを分解する変異体を暗青バックグラウンド上のホワイトスポットとして検出し、その後、貯蔵プレート上で同定する。陽性変異体を第一スクリーニングと同じ条件で2回スクリーニングする。

3. 低pHフィルターアッセイ

【0257】

バチルスライブラリーは10マイクログラム/mlカナマイシンを含むTYアガープレート上のセルロースアセテート(OE67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE)ー及びニトロセルロースフィルター(Prottran-Ba85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE)のサンドイッチで37℃で少なくとも21時間平板培養する。このセルロースアセテート層はTYアガープレートの上に位置する。

【0258】

各フィルターサンドイッチを特に、プレート形成の後でインキュベーションの前に、針で印をつけ、フィルター上の陽性変異体の位置を明らかにする。変異体が結合したこのニトロセルロースフィルターをpH4.5のクエン酸緩衝液を含むコンテナに移し、(野生型からの変異体をスクリーニングする場合)80℃で20分インキュベーションし、又は(親αアミラーゼの変異体をスクリーニングする場合)85℃で60分インキュベーションする。コロニーを含むこのセルロースアセテートフィルターは使用まで室温でTYプレート上に貯蔵される。インキュベーションの後、残りの活性を、pH6.0のクエン酸緩衝液中に1%のアガー、0.2%のデンプンを含むアッセイプレートで検出する。ニトロセルロースを含むこのアッセイプレートはフィルターサンドイッチと同様に印を付け、50℃で2時間インキュベーションする。フィルターを除去した後、このアッセイプレートを10%ルゴール溶液で染色した。デンプンを分解する変異体を暗青バックグラウンド上のホワイトスポットとして検出し、その後、貯蔵プレート上で同定する。陽性変異体を第一スクリーニングと同じ条件で2回スクリーニングする。

3. 二次的スクリーニング

【0259】

スクリーニングの後の陽性変異体を貯蔵プレートから採取し、二次プレートアッセイで試験する。陽性形質転換体は5 mlのLB+クロラムフェニコール中、37℃で22時間育成した。各陽性形質転換体のバチルス培養物及び対応するバックグラウンドを発現しているクローンをコントロールとして、pH 4.5、90℃でインキュベーションし、サンプルを0、10、20、30、40、60、及び80分後に採取する。3 µLのサンプルをアッセイプレート上にスポットする。このアッセイプレートは10%ルゴール溶液で染色する。改善された変異体は、バックボーンよりも残余活性の高い変異体として検出される（アッセイプレートのハローとして検出される）。この改善された変異体は核酸の配列決定により確定される。

10

B. 未精製変異体の安定性アッセイ

【0260】

変異体の安定性は以下のようにアッセイした。解析される変異体を発現しているバチルス培養物を10 ml LB+クロラムフェニコール中、37℃で21時間育成した。800 µLの培養物を200 µLのクエン酸緩衝液pH 4.5を混合する。採取時間ポイントの数に対応する70 µLのアリコートをしてPCRチューブにいれ、70℃又は90℃でPCR機器中で各種時間ポイント（通常、5、10、20、25、及び30分）でインキュベーションする。0分のサンプルは高温でインキュベーションしない。サンプルの活性を以下の「αアミラーゼのアッセイ」で説明するように、20 µL乃至200 µLのαアミラーゼPNG-G7基質MPR3（Boehringer Mannheim カタログNo. 1660730）に移して測定した。結果を時間対活性のパーセンテージ（0時間に対する）としてプロットするか、特定の時間インキュベーションしたとの残余活性のパーセンテージとして表す。

20

C. αアミラーゼ変異体の発酵及び精製

【0261】

関連する発現プラスミドを含むバチルススブチリス株を以下のように発酵及び精製する。この株は80℃のストックから10 µg/mlカナマイシンを含むLBアガープレート上に接種し、37℃で育成した。コロニーを10 µg/mlクロラムフェニコールを懸濁した100 mlのPS-1培地を含む500 ml振とうフラスコに移す。培養物を73℃、270 rpmで5日間培養する。

30

PS-1培地の組成：

タピオカ糖 100 g/L

ダイズミール 140 g/L

Na₂HPO₄・12H₂O 10 g/L

Pluronic（商標）PE6100 0.1 g/L

CaCO₃ 5 g/L

【0262】

細胞及び細胞の破片を4500 rpm、20乃至25分の遠心分離で取り除く。その後、上清をろ過し、完全に透明な溶液を得る。ろ過物を濃縮し、FUフィルター（10,000 MWろ過膜）で洗浄し、緩衝液を20 mM酢酸pH 5.5に変える。UFろ過したものをS-セファロースFFカラムを通して、0.2 MのNaClを含む同じ緩衝液中で溶出する。溶出物を10 mMトリスpH 9.0で透析し、Q-セファロースFFカラムを通して、6カラム容量異常の0.3 M NaClの直線グラジエントで溶出する。（Phadebasアッセイにより測定する）活性を含むフラクションを収集し、pHを7.5に調整し、残りの色を0.5% w/v活性炭で5分間処理して除去する。

40

D. 特異活性の検出

【0263】

特異活性はPHADEBAS（商標）アッセイ（ファルマシア）を用いて、酵素1グラム当りの活性をして決定した。取り扱い説明書は以下のものである（以下の「αアミラーゼ活性のアッセイ」参照）。

50

E. 等電点の決定【0264】

pI は等電点フォーカシング（例えば、ファルマシア、アンフォリン、pH 3.5 – 9.3）を用いて行う。

F. 安定性の決定【0265】

アミラーゼの安定性は、以下で説明する方法により決定する。

【0266】

酵素を関連する条件下でインキュベーションする。サンプルを各種タイムポイント（例えば、0、5、10、15、及び30）で採取し、アッセイ緩衝液（50 mM Britton 緩衝液、pH 7.3）で25倍に希釈剤する（採取したサンプルについて同じ希釈を行う）。アッセイは標準的な条件である pH 3.7、37°C で Phadebas アッセイ（ファルマシア）を用いて行う。

【0267】

インキュベーションの前に測定した活性を対照とする（即ち、100%）。パーセントの表示はインキュベーション時間のフラクションごとに計算する。表は、例えば、インキュベーションから30分後の残余活性を示す。

G. アッセイアミラーゼ活性のアッセイ1. PHADEBAS（商標）アッセイ【0268】

α アミラーゼ活性は基質として PHADEBAS（商標）タブレットを用いる方法により決定する。Phadebas タブレット（PHADEBAS（商標）アミラーゼ試験、ファルマシアダイアグノスティック）はボバインシーラムアルブミンと混合されたデンプンポリマー及び基質の緩衝剤とを混合しタブレットにした架橋された不溶性の青色のデンプン含有ポリマーである。

【0269】

1つの測定ごとに、1つのタブレットを5 ml の50 mM ブリットン-ロビンソン緩衝液（50 mM 酢酸、50 mM リン酸、50 mM ホウ酸、0.1 mM CaCl_2 、NaOH で pH を所望の値に調節する）を懸濁する。この試験は所望の温度のウォーターバス中で行う。試験する α アミラーゼをブリットン-ロビンソン緩衝液で希釈する。1 ml の希釈した α アミラーゼ溶液を5 ml の50 mM ブリットン-ロビンソン緩衝液に加える。 α アミラーゼはデンプンを加水分解した所与の可溶性青色フラグメントを生じる。得られた青色溶液の吸光度を、620 nm で測定し、 α アミラーゼ活性を計算する。インキュベーションの10又は15分後の620 nm の吸光度を測定することが重要である。この吸光度の範囲は活性と吸光度（Lambert-Beer 法）の間の直線性を示す。酵素の希釈率をこの基準に当てはめなければならない。特定の条件のセット（温度、pH、反応時間、緩衝液条件）の下において、所与の α アミラーゼ 1 g が特定量の基質を加水分解し、青色を呈する。色の強度は620 nm で測定される、この吸光度の測定は所与のセットの条件におけるこの α アミラーゼの特異活性に直接比例する。

2. 代替法【0270】

α アミラーゼ活性は PNP-G7 基質を用いる方法でも決定できる。PNP-G7 は p-ニトロフェニル- α , D-マルトヘパトシドの省略形であり、エンドアミラーゼにより切断されるブロックオリゴサッカライドである。切断に続いて、キットに含まれる α -グルコシドが基質を消化して、遊離 PNP 分子を放出する。この分子は黄色であり、 $\lambda = 405 \text{ nm}$ （400 乃至 420 nm）の分光光度計で測定される。PNP-G7 基質及び α -グルコシダーゼを含むキットは Boehringer-Mannheim（カタログ No. 1054635）により製造されている。

【0271】

試薬溶液を調製するために、10 ml の基質／緩衝液を50 ml の酵素／緩衝液溶液に

10

20

30

40

50

説明書に従って添加する。このアッセイは20 μ Lのサンプルを96ウェルのマイクロタイタープレートに移して、25℃でインキュベーションする。25℃で前もって平衡化しておいた200 μ Lの試薬溶液を添加する。この溶液を混合し、1分予備インキュベーションし、ELISAリーダーにおいてOD405nmで、各30秒ずつ4分間測定する。

【0272】

時間に依存している吸光度カーブの傾斜は所与のセット条件下での意図する α アミラーゼの活性に直接比例している。

H. LAS感受性の決定

【0273】

変異体を異なる濃度のLAS（直鎖アルキルベンゼンスルホネート、Nansal、1169P）で、40℃で10分インキュベーションする。残余活性をPHADEBAS（商標）アッセイ又はPNP-G7基質を用いる代替的な方法で決定する。LASは0.1Mリン酸緩衝液pH7.5で希釈剤する。以下の濃度を用いた：500ppm、250ppm、100ppm、50ppm、25ppm、及び10ppmLAS。

【0274】

この変異体を総量10ml中0.01乃至5mg/mlの濃度へと異なるLAS濃度の緩衝液で希釈し、温度を制御したウォーターバス中で10分間インキュベーションする。少量のサンプルアリコートをして冷却したアッセイ緩衝液に移すことによりインキュベーションを停止する。測定する活性に影響を与えないために、活性測定中はLAS濃度は1ppm以下であることが重要である。

【0275】

その後、残余活性をPHADEBAS（商標）アッセイ又は代替法で決定する。この活性はブランクを引いたあとで測定される。LASに曝されていないサンプルの活性を100%とする。

G. フィターゼ活性（FTU）の決定

【0276】

フィターゼ活性は無機リン酸の放出により測定する。この無機リン酸は酸性モリブデン試薬と結合して黄色になり、この黄色の複合体が分光光度計において415nmで測定され、放出された無機リン酸がリン酸の標準曲線を用いて定量化できる。フィターゼ1単位（FTU）はヨーロッパ標準における所与の反応条件下（CEN/TC 327, 2005-TC 327WI003270XX）で1分間に、フィテートから無機リン酸1マイクロモル放出する酵素の量である。

H. フィチン酸含量の決定

【0277】

フィチン酸含量を決定するために、フィチン酸を（もし乾燥サンプルであれば）5%スラリーのpHを10に調整することによりサンプルから抽出し、イオン交換カラムを用いたHPLC法により含量を決定する。フィチン酸はNaOHグラジエントシステムを用いてカラムから溶出される。液体中のフィチン酸含量はフィチン酸標準と比較して計算される。

【0278】

本発明の組成物及び方法は以下の実施例でより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。本明細書において引用される文献はその記載の全てを参照により本明細書に援用する。

【実施例】

【0279】

以下の開示及び実施例において、以下の略語を用いる。wt%（重量パーセント）；℃（摂氏）；H₂O（水）；dH₂O（脱イオン水）；dIH₂O（脱イオン水、ミリQろ過）；g又はgm（グラム）； μ g（マイクログラム）；mg（ミリグラム）；kg（キログラム）； μ L及び μ l（マイクロリットル）；mL及びml（ミリリットル）；mm

(ミリメートル) ; μm (マイクロメートル) ; M (モル) ; mM (ミリモル) ; μM (マイクロモル) ; U (単位) ; MW (分子量) ; sec (秒) ; min (s) (分) ; hr (s) (時間) ; DO (溶存酸素) ; W/V (重量対容量) ; w/w (重量対重量) ; V/V (容量対容量) ; IKA (IKA Works inc. 2635 North Chase Parkway SE, Wilmington, NC) ; ジェネンコア (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA) ; Ncm (ニュートンセンチメートル) 、 ETOH (エタノール) ; eq (等量) ; N (ノルマル) ; ds 又は DS (乾燥固形含量) 、 SAPU (分光光度のプロテアーゼ単位、1 SAPU はアッセイ条件下でカゼインから1分間に1マイクロモルのトリプシンを放出するプロテアーゼ酵素の量である) GAU (グルコアミラーゼ単位、pH 4.2 及び 60 °C において可溶性基質から1時間当たりグルコースとして還元糖を1 g 生成する酵素の量であると定義される) 。

10

実施例 1

変異体の構築

【0280】

Amy S の成熟配列の変異体を部位変異誘発法を用いて構築した。例として、S242 変異体を以下のように構築した。

【0281】

変異体のテンプレートは New England Biolabs (Massachusetts) の dam-メチラーゼを用いたメチル化 pHP LT-Amy S (図2 参照) である。変性プライマー (S242 F (前方向) 及び S242 R (後ろ方向) (以下に示す) を合成し、この反応において結合のために 5' リン酸を含む前方向及び後ろ方向の配列の両方で、Operon (Huntsville, AL) において、10 μM に希釈した。親 α アミラーゼの配列を配列番号 2 に示す。標的位置において NN (G/C) でランダム化されたオリグヌクレオチドプライマーを用いる Stratagene QUIK-CHANGE (商標) Multi-site キットでライブラリーを生成した。選択されたアミノ酸 (例えば、S242) を 19 の可能な代替物とランダムに置換した。変異のための S242 プライマー：

20

S242 F: 5'-[Phos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTCCTGATTGGTTG-3'

配列番号 17

30

S242 R: 5'-[Phos]CAACCAATCAGGAAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3'

配列番号 18

反応は以下のように行った：

クイックチェンジ反応

【0282】

反応物は 18 μL の蒸留 H_2O 、2.5 μL の 10x キット緩衝液、1.25 μL の前方向プライマー (10 μM ストック)、1.25 μL の後ろ方向プライマー (10 μM ストック)、1 μL の pHP LT-Amy S プラスミド DNA (テンプレートとして) (~70 ng)、及び 1 μL のキットの酵素ブレンド、総量で 26.5 μL からなる。

40

サイクル条件

【0283】

サイクル条件は 95 °C で 1 分を 1 回、その後、95 °C 1 分、55 °C 1 分、65 °C 10 分を 25 サイクル行う。1 μL Dpn I (10 U/ μL) をこの Multi-site Quick-Change 反応混合物に添加して、37 °C で 18 時間インキュベーションして、その後他の 0.5 μL を添加して 3 時間インキュベーションを続けた。

【0284】

50

1 μ LのDpnI消化反応物をTempliphi増幅キット (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いるローリングサイクル増幅に、テンプレートとして用いて、アマシャムの説明書に基づいて反応を行った。1 μ LのローリングサイクルDNAを100 μ Lのバチルススブチリス (B. subtilis) コンピテントセル (2つのプロテアーゼを欠失させたバチルススブチリス (B. subtilis) 株 (Δ aprE, Δ nprE, amyE::xylRPxylAconik-phleo)) へ形質転換し、1時間37℃で振とう培養した。全ての形質転換をLA+10 ppmNeo+1%不溶性デンプンプレート上で平板培養し (25 μ Lプレート、75 μ L他のプレート)、37℃で一晩インキュベーションした。69の形質転換体をマイクロタイタープレート中の150 μ LのLB+10 ppmNeoに採取し、37℃で一晩育成した。一晩培養したプレートをラージLA+10 ppmNeo+1%不溶性デンプンプレート上に96ピン複製ツールでスタンプして、コロニーPCRのためのQuintara Biosciences (Berkeley, CA, USA) を行い、配列決定した。

【0285】

変異体の配列決定を行った後、この変異体を125 μ LのLB+10 ppmNeoを含む96ウェルマイクロタイタープレートへ採取して、コントロールと共に4つ一組の配列とした。配置させたマイクロタイタープレートを37℃、250 rpmで、6時間育成した。複製ツール (EnzyScreen, Leiden, THE Netherlands) を用いて、このマイクロタイター培養プレートをタンパク質発現のためのMBD培地 (G. Vogtentanzら, A Bacillus subtilis fusion protein system to produce soybean Bowman-Birk protease inhibitor, Prot. Expr. & Purif., 55 (2007) 40-52) の150 μ Lを含む新しいマイクロタイタープレートへ接種し、タンパク質発現のために5mMのCaCl₂で懸濁した。発現プレートは70%の湿度で37℃、250 rpmで64時間育成された。発現培地をマイクロフィルタープレート (0.22 μ m, ミリポア, Billerica, MA) を通して次にろ過し、改善された熱安定性のスクリーニングに用いた (実施例3参照)。

AmySライブラリー

【0286】

以下のAmyS変異体についての部位評価ライブラリーを生成した：

P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, W115, D117, P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148A, S153A, Y159, W166, S169, K171, R179, G180, I181, G182, K183, W187, G194, P209, N224, S242, P245, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304, R308, T321, Q358, P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432, W437, Q443, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474, R483

実施例2

変異体の発現、精製、及び特徴付け

【0287】

コロニーをマイクロタイタープレートからストリークし、10 ppmネオマイシンを含むデンプンプレート上に置いた。このプレートを37℃で一晩インキュベーションし、1つずつのコロニーを採取し、培地 (以下参照により本明細書に援用する。及び20 ppmネオマイシンを含む振とうフラスコ (20 mlの培地を含む250 mlの)) に用いた。これらを37℃、275 ppmで約8時間、(OD600 nmになるまで) 育成した。培地ブ罗斯を50%グリセロールと2:1の割合で混合するとき、それらを別々のラベルされた培地バイアルへ置き、-8℃で冷凍した。これらのグリセロールストックから選択されたアミラーゼの以降の育成がなされた。

【0288】

アミラーゼの発酵は1% (w/v) ソイトンを含むMOPS (Neidhardtら, J. Bacteriol. (1974) 119(3): 736-747) を最小培地中で、500ml 振とうフラスコにおいて、37℃、60時間行った。疎水相互クロマトグラフィ法を用いて、発酵ブロスから酵素を精製した。簡単に説明すると、ブロスを10倍濃縮し、その後、1M硫酸アンモニウムを含む50mM MES、2mM CaCl₂、pH 6.8で希釈して、ガラス繊維フィルターで滅菌ろ過した。その後、サンプルを同じ緩衝液で予備平衡化したフェニルセファロースFF高密度カラム(20x95mm; Amersham, GE Healthcare BIO-Sciences, Sweden) に導入した。非アミラーゼタンパク質を、10倍カラム量の硫酸アンモニウムを含まない同じ緩衝液で洗浄、除去し、ついで5カラム容量の水で洗浄した。最後に所望の酵素を40

10

【0289】

タンパク質濃度は標準的な提供DS Dページゲルデンシトメトリー法又はMegazyme (Wicklow, Ireland) からの標準的なアミラーゼアッセイキットを用いた活性測定のいずれかにより決定した。アッセイは精製アミラーゼ(バチルス707アミラーゼ、配列番号6)を用いて作成された標準曲線を用いて、タンパク質濃度を換算した。

実施例3

変性された性質の決定

20

【0290】

この実施例は本発明の変異体が親αアミラーゼに対して修飾された性質を有していることを示す。G. ステアロセリモフィリスαアミラーゼ(Amy S) 変異体の高い熱安定性のスクリーニングを行った。

【0291】

熱ストレス条件を調査し、熱ストレス後に、開始野生型酵素が熱ストレスを受けていないときの活性の約40%になるように(即ち、熱ストレス後の活性/熱ストレス前の活性が約0.4である)、選択した。変異体のライブラリーを4つ一組でスクリーニングし、同じ野生型酵素の平均残余活性よりも標準偏差の2倍より高いものを可能性のある好適な変異体とした。

30

【0292】

アミラーゼ発現は発現プレートの培地の上清中約100ppmであった。高湿シェーカー中37℃で60乃至65時間の育成の後、培地上清をフィルタープレートを用いて培養物質と分けて透明にした。この透明な培地を50mM NaOAc/2.6mM CaCl₂/0.002% Tween-20、pH 5.8を含む緩衝液で10倍に希釈して、最終濃度を10ppmにした。上清の1つのアリコートで0.02ppmまで更に希釈して、変異体酵素の活性を蛍光ラベルしたコーンスターチ基質を用いて以下で説明するように決定した。50mM NaOAc/2.6mM CaCl₂/0.002% Tween-20、pH 5.8を含む緩衝液で0.02ppmで希釈する前に、上清の第二のアリコートをサーモサイクラーで90℃の熱ストレス下で30分過熱し、以下と同様の基質及びアッセイを用いて残余活性をアッセイした。

40

【0293】

アミラーゼ活性は、説明書に従って、アミラーゼEnz Checkアッセイ(Invitrogen, San Diego, CA)を用いて決定した。このアッセイにおけるアミラーゼの最終濃度は約0.02ppmである。緩衝液は50mM NaOAc/2.6mM CaCl₂/0.002% Tween-20、pH 5.8であった。基質はBODIPY蛍光剤を結合させたDQ(商標)コーンスターチ100μg/mL(Invitrogen - Eugene, OR)であった。アミラーゼ活性を示す高い蛍光性はSpectraMax M2(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて測定した。動的モードの機械的な記録を用いて、5分間室温で反応をモニタリン

50

グした。励起波長は485nmで、発光波長は250nmで、515nmのカットオフフィルターを用いた。

【0294】

野生型AmyS (SPEZYME (商標) Xtra) は95℃で30分熱ストレス下においた後に33乃至43%の残余活性を示した。AmyS変異体であるS242A及びS242Qは、同じ熱ストレス下でそれぞれ55乃至65%及び70乃至80%の残余活性を示した。図3及び表3-1参照。これらの残余活性測定値はこの2つの変異体が野生型αアミラーゼよりも高い熱安定性を有することを示す。幾つかの変異体はライブラリーから消えた。このことは消し線で示した。その代わり、野生型 (SPEZYME (商標) Xtra) を置いた； (WT) は代わりに置かれた野生型を示す。各プレートは対照としてSPEZYME (商標) Xtraを含む。

表3-1. 各種変異体サンプルの残余活性パーセンテージ

変異体	% 残余活性				平均	標準偏差	%CV
A	60.6	59.8	56.5	64.6	60.4	3.3	5
C	38.1	35.6	28.3	34.5	34.1	4.2	12
D	50.6	42.9	45.0	48.7	46.8	3.5	7
E (WT)	45.3	38.6	39.5	40.7	41.0	3.0	7
F (WT)	40.5	40.2	41.2	38.9	40.2	1.0	2
G	36.4	35.7	44.8	36.7	38.4	4.3	11
H (WT)	34.9	36.9	37.0	42.1	37.7	3.0	8
I	20.9	26.7	27.5	17.2	23.1	4.9	21
K	22.6	21.5	19.3	24.5	22.0	2.2	10
L	34.9	30.7	34.5	30.7	32.7	2.3	7
M	35.3	37.3	38.3	41.3	38.1	2.5	7
N (WT)	43.9	43.2	46.0	42.2	43.8	1.6	4
P (WT)	33.8	35.6	40.2	37.4	36.8	2.7	7
Q	80.6	71.0	75.9	71.5	74.8	4.5	6
R	9.6	4.5	6.1	5.4	6.4	2.2	35
S (WT)	38.6	39.9	37.2	37.3	38.3	1.3	3
T	36.8	31.5	35.1	27.8	32.8	4.0	12
V	25.0	24.7	25.0	22.9	24.4	1.0	4
W (WT)	32.7	37.5	36.3	38.8	36.3	2.6	7
Y (WT)	37.1	42.6	46.0	38.6	41.1	4.0	10
Z (Xtra)	38.8	41.5	42.5	32.7	38.9	4.4	11

(表3-1)

実施例4 DCSによる修飾された性質の決定

【0295】

SPEZYME (商標) Xtra、S242A、及びS242Qを疎水相互作用クロマトグラフィーを用いて振とうフラスコ発酵ブロスから精製した。このタンパク質を40%プロピレングリコール及び2mM CaCl₂を含む50mM MESを用いて、精製形態で、このカラムから溶出した。

【0296】

過度の熱キャパシティー曲線を超高感度マイクロカロリーメーター、VP-CapDSC (MicroCal, Inc., Northampton, MA) を用いて測定した。DSC測定についての標準的手順及びこの技術の理論は公開されている (Freire, E. (1995) Differential Scanning Calorimetry Methods. Mol. Biol. 41, 191-218)。約500 μ Lの、0.5 mg/ml野生型バチルスステアロセリモフィリス (*Bacillus stearothermophilus*) α アミラーゼ又は変異体S242S及びS242Q (2 mM塩化カルシウムを加えた場合と加えない場合において) を30乃至120 $^{\circ}$ C温度範囲をスキャンした。同じサンプルをこの方法の可逆性をチェックするために再スキャンした。用いた緩衝液は10 mM酢酸ナトリウム pH 5.5であった。200 $^{\circ}$ C/hr スキャン速度を用いて凝集に起因するアーティファクトを最小化した。DSCカーブの熱中点 (T_m) を熱安定性のインジケーターとして用いた。表4-1は試験されたアミラーゼタンパク質についての熱融点を示す。この熱融点曲線及び野生型及びアミラーゼ変異体の融点を図5に示す。

【0297】

2 mM塩化カルシウムを加えた場合と加えない場合の有無において、アミラーゼ変異体S242A及びS242Qの熱折り畳みを野生型と比較したときの変異体の融点の増加を示す。塩化カルシウムを添加しない場合において、この野生型アミラーゼは100.8 $^{\circ}$ Cの融点を有する。一方S242A及びS242Qはそれぞれ106.5 $^{\circ}$ C及び110.1 $^{\circ}$ Cであった。従って、S242をAで置換すると5.7 $^{\circ}$ C、 T_m が増加し、S242をQで置換すると T_m が9.3 $^{\circ}$ C増加する。

【0298】

2 mM塩化カルシウムの存在下において、特徴づけられた野生型アミラーゼは106.8 $^{\circ}$ Cの熱融点を有する、一方S242A及びS242Qの T_m はそれぞれ111.8 $^{\circ}$ C及び113.8 $^{\circ}$ Cであった。従って、2 mMの塩化カルシウムの存在下において、これら3つのタンパク質は高められた T_m の値を示す。野生型及びS242Aの T_m における増加はそれぞれ、6 $^{\circ}$ C及び5.3 $^{\circ}$ Cであった。S242Qの T_m における増加は3.7 $^{\circ}$ Cであった。このことは、S242Q変異体がカルシウムにより不安定になり、安定性についてカルシウムに依存していることを示している。塩化カルシウムの存在下での野生型に対するS242A及びS242Qの T_m の増加分はそれぞれ、5 $^{\circ}$ C及び3 $^{\circ}$ Cであった。このことは、変異体の熱力学的性質はSPEZYME (商標) Xtraのものとは異なり、応用研究 (実施例5参照) における高められた性能と一致する。

表4-2

	T_m (no Ca_2^+)	T_m (w/2 mM Ca_2^+)
SPEZYME® Xtra	100.8	106.8
S242A	106.5	111.8
S242Q	110.1	113.8

(表4-1)

実施例5

活性プロファイル

【0299】

この実施例は試験された変異体が親 α アミラーゼだけでなく、工業的標準物質に対しても修飾された活性プロファイルを有することを示す。タンパク質の検出は精製された又は平板培養されたサンプルで作られた。全ての実験変異体及び標準 α アミラーゼを同じ濃度で投与した。

【0300】

平板培養された又は精製された変異体のいずれかを pH 5.6 のマレイン酸緩衝液を用いて約 20 ppm に希釈した。基質は同じ pH 5.6 マレイン酸緩衝液中 15 % のコーンスターチを含む。デンプン懸濁液 400 μ L を 2.5 分間 70 °C で平衡化した。7 μ L の希釈酵素を素早く平衡化したデンプンに添加した（最終タンパク質濃度 0.36 ppm）。この反応混合物を 85 °C の予備加熱した振とう熱ブロックにおき、300 rpm で混合した。予め決められた時間間隔で、反応物を 50 μ L の 125 mM NaOH で冷却した。反応チューブからサンプルを採取し、上清を 10 mM NaOH で 10 倍に希釈して、HPLC-PAD による DP プロファイルについて解析した。

【0301】

反応物を 4 分、10 分、及び 20 分に採取した。HPLC 稼働の最後まで DP 2 の総面積を積分し、この面積を総タンパク質及び反応時間で割った。

10

【0302】

4 分の反応生成物はどれほど早く酵素が基質を分解するかを示し、10 分の反応生成物は酵素の熱活性を示し、20 分の反応生成物は、酵素の熱安定性を提供した。これらの結果は図 7 及び 8 に示す。

実施例 6

粘度計における液化

【0303】

この実施例は野生型に対して変更された残余活性を有する実施例 3 の S242A 及び S242Q 変異体が親 α アミラーゼに対しても変更された性能を有することを示す。実施例 2 の変異体 α アミラーゼを精製し、この実施例を行う前に、総タンパク質及び特異活性について特徴付けた。

20

【0304】

α アミラーゼの作用に依存するトウモロコシ粉の粘度低下は、HAAKE 粘度計 550 装置を用いてモニターした。基質スラリーを 30 % のトウモロコシ粉乾燥固形重量になるようにバッチモードで毎日新しく作った。pH を酸で 5.8 に調整した。スラリーの 50 g（15 グラム乾燥固形分）を量り、10 分で 70 °C になるように攪拌しながら予備インキュベーションした。 α アミラーゼの添加において、75 の回転速度で温度を直ちに 70 °C から 85 °C に上げた。一旦スラリー及び酵素の温度が 85 °C に達すると、この温度を一定に維持し、以降 30 分間粘度をモニターした。この粘度を稼働中モニターし、 μ Nm で報告した。野生型 Amy S、S242A、及び S242Q は全て同じタンパク濃度で投与された（20 又は 30 μ g / 50 g トウモロコシスラリー）。

30

【0305】

この粘度計応用試験は両方の Amy S 変異体、S242A 及び S242Q がベンチマーク α アミラーゼ、即ち、LIQUOZYME（商標）SC 及び SPEZYME（商標）Xtra よりも好適な性能を有する結果となった。両変異体は SPEZYME（商標）Xtra の特徴である低いピーク粘度及び LIQUOZYME（商標）SC の低い最終粘度を示した。20 μ g 総タンパク質の低濃度の場合は、LIQUOZYME（商標）SC のピーク粘度と比較したこれらの変異体の低いピーク粘度の違いは更に大きかった。図 9、10、及び 11 参照。

40

実施例 7

ジェットクーラーにおける液化

【0306】

全粒粉碎コーンを 70 : 30 の割合の水 : 蒸留残渣を用いて、32 %（乾燥固形コーン）のスラリーを調製した。このスラリーの pH を 10 N の NaOH を用いて pH 5.8 に調整した。このスラリーをジャケットケトル中の水及び蒸気を用いて 70 °C（158 °F）に加熱した。液化酵素（SPEZYME（商標）Xtra、LIQUOZYME（商標）SC、又は S242Q）を添加して、このスラリーを 85 °C（185 °F）に加熱して 10 分以上置いた。85 °C で更に 10 分インキュベーションを行い、このスラリーを 107 °C（Hydro-thermal Corp., Waukesha, Wisconsin）

50

nのM103水熱器を備えた) ラージパイロットプラントジェットを用いて3分のホールド時間で107℃で(225°F)維持した。この液化物をジェットクッカーから収集し、85℃のウォーターバス中に置いた。液化酵素の第二投与をジェットクッカーに投与した。サンプルを0、30、60、及び90で採取した。全てのサンプルをDEについてポストジェットで試験し(スカラー法及び他の方法を用いて)、及び粘度について(Brookfield-type viscometer (Lab-line Instruments Inc. of Melrose Park, Illinois)スピンドル3、20rpm)試験した。プレ又はポストジェット処理の液化酵素の投与はX+Yの式で示す。式中、Xはジェットの前に添加する酵素単位数を示し、ジェットクッカーで処理した後の液化物に添加する酵素の単位数を示す。結果を図12及び13に示す。

10

実施例8

αアミラーゼ熱安定性におけるフィチン酸除去の効果

【0307】

全粒粉碎コーンのスラリー(Badger State Ethanol, Monroe, WI, USAより入手)を30%v/v蒸留残渣を含む水で最終濃度が32%dsのスラリーを調製した。トウモロコシ固形物をジャケットケトル中で調製した。このスラリーをよく混合し、pHを測定し(pH5.2)、更なるpH調製を行わずに用いた。このスラリーをジャケットケトルで混合し、70℃の前処理温度にまで高くした。70℃になる直前に、液化酵素、即ち、αアミラーゼ(コーン1グラム当り4AAU)及びフィターゼ(コーン1グラム当り4FTU)を添加して、タイマーを始動させ、インキュベーション又は一次液化を開始した。このスラリーを追加的なフィターゼのある場合とない場合とにおいて、30分インキュベーションした。この実験に用いたフィターゼはBP-17(上記参照)であった。このフィターゼをこの実験ではαアミラーゼと同時に添加したけれども、アミラーゼの前に添加してもよい。

20

【0308】

処理したスラリーを90℃に維持したウォーターバス中に置き、第二液化工程を行った。サンプルを0、30、60、及び90分で採取して、粘度及びDE(スカラー法)を測定した。結果を図14乃至15に示す。

B. 蒸気処理有り(部分的な酵素投与)

【0309】

全粒粉碎コーンのスラリー(Badger State Ethanol, Monroe, WIより入手)を蒸留残渣を30%(v/v)含む水を用いて最終濃度が約32%dsに成るように調製した。トウモロコシ固形物はジャケットケトル中で調製した。このスラリーをよく混合し、pHを測定した(pH5.2)。このスラリーをジャケットケトル中で混合し、70℃の予備加熱温度に加熱した。70℃になる直前に、液化酵素、即ち、S242Q変異体αアミラーゼを添加し(コーン1グラム当り3FTU)、タイマーを始動させ、インキュベーション又は一次液化を開始した。このスラリーを追加的なフィターゼのある場合(コーン1グラム当り4FFU)とない場合とにおいて、30分インキュベーションした。このフィターゼをこの実験ではαアミラーゼと同時に添加したけれども、アミラーゼの前に添加してもよい。

30

40

【0310】

インキュベーションしたスラリーを蒸気及び水を用いて所望の温度に予備加熱しておいたジェットクッカー(225°F; 107.2℃)に通過させた。このスラリーをその後約4リットル/分の最大スピードでジェットに送り込んだ(1.5セット)。固定コイルの初めの3つのループを用いて、ホールド時間が3分を少し超えるように設定した。水の全部を分散させ、所望の温度に安定した後、可溶化されたコーンマッシュのアリコートを集し、85℃に維持した第二バス(上部攪拌)中に置き、第二液化工程を開始した。S242Qの第二投与(1AAU/gmds)を添加し、液化を更に90分続けた。サンプルを0、30、60、90分に採取し、粘土(ブルックフィールド法)及びDE(スカラー法)を試験した。この液化物は実施例10Bで用いた。

50

C. ジェットクッキング、従来法

【0311】

全粒粉碎コーンのスラリー (Badger State Ethanol, Monroe, WI より入手) を蒸留残渣を 30% (v/v) 含む水を用いて最終能動が約 32% ds に成るように調製した。トウモロコシ固形物はジャケットケトル中で調製した。このスラリーをよく混合し、pH を測定し (pH 5.2)、希釈 NaOH で pH 5.8 になるように調整した。このスラリーをジャケットケトル中で混合し、温度を 70°C にまで加熱した。70°C になる直前に、液化酵素、即ち、S242Q 変異体 α アミラーゼを添加し (コーン ds 1 グラム当り 3 FTU)、タイマーを始動させ、インキュベーション又は一次液化を開始した。このスラリーを追加的なフィターゼのある場合とない場合とにおいて、30 分インキュベーションした。

10

【0312】

インキュベーションしたスラリーを蒸気及び水を用いて所望の温度に予備加熱しておいたジェットクッカー (225°F; 107.2°C) に通過させた。このスラリーをその後約 4 リットル/分の最大スピードでジェットに送り込んだ (1.5 セット)。水の全部を分散させ、所望の温度に安定した後、可溶化されたコーンマッシュのアリコートを集集し、85°C に維持した第二バス (上部攪拌) 中に置き、第二液化工程を開始した。S242Q の第二投与 (1 AAU/g md s) を添加し、液化を更に 90 分続けた。この実験のスラリーの pH は 5.5 であった。図 22 参照。この液化物を実施例 10A に用いた。

D. ジェットクッキング処理及び無処理の結果

20

【0313】

インキュベーション (一次液化) の間に BP-17 フィターゼを添加すると、全粒粉碎コーンのフィチン酸含量を 0.60% ds コーンから 0.09% ds コーンに減らした (>85% 低減) (図 21)。図 14 及び 15 から、この α アミラーゼは DE 変化及び粘度低減に基づいて、225°F (107°C) のジェットクッキング温度で不活性化したことが明らかとなった。しかしながら、ジェットクッキングの前にフィターゼ (フィターゼはフィチン酸抑制を除去すると信じられている) を添加しておく、第二液化工程の間の 90°C での DE 変化及び粘度低減により示されるように、この α アミラーゼの熱安定性が有意に高くなった。同様な結果が図 14 及び 15 で示すように、ジェットクッキングを用いても見られた。

30

実施例 9

低 pH における BP-16 フィターゼ濃度の α アミラーゼの熱安定性における効果

【0314】

α アミラーゼの熱安定性の向上は α アミラーゼのフィチン酸抑制の除去に依存しているかどうかを試験した。フィチン酸は全粒粉碎コーンの第二液化の前にフィターゼを用いて加水分解し、低 pH における pH 安定性における改善を試験した。

【0315】

典型的な実験において、全粒粉碎コーンを水及び蒸留残渣の比が 70:30 である溶液を用いて 32% (ds コーン) のスラリーを調製した。このスラリーの pH を測定して、pH 5.2 であることを確認した。このスラリーをジャケットケトル中の水及び蒸気を用いて 70°C に加熱した。液化酵素、即ち、S242Q 変異体 α アミラーゼ (4 AAU/g md s コーン) 及び各種濃度の BP-17 (0-12 FTU/g md s コーン) を添加し、このスラリーを 70°C で 45 分間維持して予備加熱した。予備加熱の 45 分後、このスラリーを 90°C のウォーターバス中に置いた。液化物を連続攪拌し、90°C で 90 分維持した。サンプルを 0、30、60、及び 90 分後に採取した。全てのサンプルを DE (スカラー法) 及び粘度 (ブルックフィールド粘度計スピンドル 2、20 rpm) について試験した。DE 変化及び粘度のデータを図 16 及び 17 にまとめた。

40

【0316】

図 16 及び 17 の結果はフィチン酸抑制による S242Q 変異体 α アミラーゼの低減は、90°C での DE 変化における安定的な増加と液化による粘度の低減が両方とも達成され

50

ていることから、活性の低 pH における安定性が有意に高くなったといえる。このデータは S 2 4 2 Q 変異体 α アミラーゼがフィチン酸抑制が排除された場合、pH 5.2 における全粒粉碎コーンの液化工程に好適に用いることができることを示している。図 2 1 において、DE 変化の速度がフィチン酸の除去と共に増加しており、4 FTU/gm で最大になることを示している。このことは、フィターゼがスラリーからフィチン酸を除去して S 2 4 2 Q 変異体 α アミラーゼの熱安定性を高くすることを示している。

実施例 10

pH の効果

【0317】

この実施例において、S 2 4 2 Q 変異体 α アミラーゼの pH における影響を試験した。

10

【0318】

全粒粉碎コーンを水及び蒸留残渣の比が 70 : 30 である溶液を用いて 32% (ds コーン) のスラリーを調製した。このスラリーの pH を測定して、pH 5.2 であることを確認した。pH を H_2SO_4 を用いて 4.2 乃至 4.8 の間に調整した。このスラリーをジャケットケトル中の水及び蒸気を用いて 70°C に加熱した。液化酵素、即ち、S 2 4 2 Q 変異体 (4 AAU/gm ds コーン) 及び BP-17 (4 FTU/gm ds) を添加して、このスラリーを 70°C で 45 分間維持して、予備加熱した。予備加熱の 45 分後、このスラリーを 90°C でウォーターバス中に置いた。この液化物を連続的に攪拌して、90°C で 90 分間維持した。サンプルを 0、30、60、及び 90 分に採取した。全てのサンプルは (スカラズ法を用いて) DE について及び粘度 (ブルックフィールド粘度計スピンドル 2、20 rpm) について試験した。DE 変化及び粘度のデータを図 18 及び 19 にまとめた。

20

【0319】

結果は、pH を 5.2 から 4.5 に低めると、DE 生成も低くなることを示した。この酵素は pH 4.2 で完全に失活した。

実施例 11

エタノール生成における影響

【0320】

液化物をエタノール発酵の発酵原料として、アルコール生成を行った。全粒粉碎コーンのスラリー (Badger State Ethanol, Monroe, WI より入手) を蒸留残渣を 30% (v/v) 含む水を用いて最終濃度が約 32% ds になるように調製した。

30

A. 従来法

【0321】

実施例 8 C からの液化を用いた (液化物 A)。

【0322】

第二液化物の pH を H_2SO_4 を用いて、同時糖化及び発酵 (SSF) 工程の前に、4.2 に調整した。

B. 低 pH、ジェットクッキング (線量分割法)

実施例 8 B からの液化物を用いた (液化物 B)。SSF の前に pH 調整を行わなかった。

40

C. 同時糖化及び発酵

【0323】

各実験において、発酵間の風袋重量を培地調製の前に測定した。32% DS コーン ds 液化物 (2 リットル) を 2 L フラスコに入れた。Red Star Ethanol Red yeast (RED STAR (Lesaffre) 接種材料を、10 グラムの酵母及び 1 グラムの来るコースを 40 グラムの水に緩やかに攪拌しながら添加して、調製した。各接種材料の 5 グラムを平衡化した発酵間に添加して、0.4 GAU/g ds コーンの G Zyme (商標) 480 (ダニスコユーエスインク、ジェネンコアディビジョンを添加してエタノール同時糖化及び発酵を開始した。初期増加重量を記録しフラスコを 32

50

℃に維持したウォーターバス中に入れた。サンプルを異なるインターバルで採取し、HPLCを用いて炭水化物及びエタノールについて解析した。発酵物は各液化物のそれぞれ1キログラムを用いても行い、発酵の間の重量損失を異なる時間間隔で測定した。二酸化炭素の損失による重量ロスに基づいて、アルコールを測定した。発酵の最後に、最終総重量を測定した。このプロセスは同じように5Lの円底反応管へも移した。希釈は真空下で、200mlまでの水を含んでもよく、約800mlのエタノールが収集されるまで行った。このエタノールを2Lに希釈して、HPLCで解析した。残留物の重量及びDSを乾燥前に測定した。残余デンプン解析をDDGSにおいて行った。化学量論的計算を重量損失分、希釈率、及び残余デンプン解析に基づいて行った。

【0324】

CO₂重量損失に基づくエタノール計算:

エタノール生成 (mmol) = CO₂ 損失分 (g) / 88

エタノール生成 (g) = (CO₂ 損失分 (g) / 88) * 92 → CO₂ 損失分 (g) * 1.045

エタノール生成 (ml) = ((CO₂ 損失分 (g) / 88) * 92) / 0.789 → CO₂ 損失分 (g) x 1.325

【0325】

図20におけるデータは従来法及び本発明のpH調製プロセスの間の遊離硫酸塩及びフィチン酸の主な違いを示している。インキュベーション中の熱安定性αアミラーゼのフィチン酸抑制の除去はフィチン酸含量の減少、高い遊離利用可能磷酸塩及び硫酸の減少を伴うDDGSの結果となった。従って、pH調製を行わない方法はデンプンの液化における液化熱安定性αアミラーゼに低pHでのpH安定性を付与する。

実施例12

追加的な方法

【0326】

以下で説明するアッセイを、以下で説明する実施例で用いている。以下で提供するプロトコルの変法もこの実施例で用いることができる。これらの実験において、反応が完了した後の生成物の吸光度を分光光度計で測定した。

A. タンパク質含量測定

BCA (ビシンコニン酸) アッセイ

【0327】

これらのアッセイにおいて、BCA (ピマス) アッセイを用いて、マイクロタイタープレートスケールのサンプルのタンパク質濃度を決定した。このアッセイシステムにおいて、用いた化合物及び試薬は以下のものである: BCAタンパク質アッセイ試薬、及びピマス希釈緩衝液850mM MES、pH6.5、2mM CaCl₂、0.005% TWEEN (商標) 80)。用いた装置はSpectraMAX (タイプ340; デモキュラーデバイス) MTPリーダーであった。MTPをCostar (タイプ9017) より入手した。

【0328】

この試験において、200μLのBCA試薬を各ウェルに分注し、20μL希釈タンパク質を分注した。軽く攪拌した後、mTPを37℃で30分インキュベーションした。気泡を抜き、各ウェル内の光学密度(OD)562nmで読み取った。タンパク質濃度を決定するために、猴グラウンド試薬をサンプル測定値から差し引いた。OD562をタンパク質標準(精製酵素)に基づいてプロットし、標準曲線を作成した。サンプルのタンパク質濃度をこの標準曲線から補完した。

ブラッドフォードアッセイ

【0329】

これらのアッセイにおいて、ブラッドフォードダイ試薬(クイックスター)をアッセイをMTPスケールにおけるサンプルのタンパク質濃度の決定に用いた。このアッセイシステムにおいて、用いた化学物質及び試薬溶液はQuick Start Bradford

10

20

30

40

50

d Dye Reagent (BIO-RAD Catalog No. 500-0205), 希釈緩衝液 (10mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.005% TWEEN-80) であった。用いた装置は SpectraMAX (タイプ340; モレキュラーデバイス) MTPリーダーであった。MTPを Costar (タイプ9017) より入手した。

【0330】

この試験において、200 µLのBCA試薬を各ウェルに分注し、15 µL希釈タンパク質を分注した。最終的に10 µLの希釈した培地ブロスはこのウェルに添加した。軽く攪拌した後、mTPを室温で10分インキュベーションした。気泡を抜き、各ウェル内の光学密度 (OD) 595 nmで読み取った。タンパク質濃度を決定するために、バックグラウンド試薬 (即ち、接種なし) をサンプル測定値から差し引いた。OD 595をタンパク質標準 (精製酵素) に基づいてプロットし、標準曲線を作成した。

10

B. 試験に供する酵素の性能についてのマイクロスウォッチアッセイ

【0331】

このアッセイにおいて用いた試薬は酵素を含んでいない、又は市販の洗剤中に存在する酵素は本明細書において説明するほうに熱により失活させた。エッペンドルフサーモミキサーに含まれる装置及び SpectraMAX (タイプ340) MTPリーダーを用いた。MTPを Costar (タイプ9017) より入手した。

洗剤調製 (AATCC HDL; USコンディション)

【0332】

ミリQ水を6 p p水硬度 (Ca/Mg = 3/1) に調節し、1.5 g/L AATCC 2003 標準対照液体洗剤 (漂白剤無し) を添加した。洗剤溶液を激しく、少なくとも15分間攪拌した。その後、5 mM HEPES (酸無し) を添加して、pHを8.0に調製した。

20

試験アミラーゼ性能のためのコメデンブンマイクロスウォッチアッセイ

【0333】

試験洗剤を本明細書に説明しているように調製した。用いた装置は New Brunswick Innova 4230 シェーカー/インキュベーター及び SpectraMAX (タイプ340) MTPリーダーであった。MTPはコーニング (type 3641) より入手した。有機酸含量スウォッチ (CS-28) を含む老化させたコメデンブンを試験物質センター (Vlaarding en, Netherlands) から入手した。0.25 インチの円形マイクロスウォッチを切断する前に、布を水で洗浄した。2つのマイクロスウォッチを96ウェルのマイクロタイタープレートに入れた。試験洗剤を20°C (北米)、又は40°C (西ヨーロッパ) で平衡化した。190 µLの洗剤溶液をマイクロスウォッチを含む各ウェルに添加した。この混合物に、10 µLの希釈した酵素溶液を添加した。このMTPを粘着性ホイルで密閉して、所望の試験温度 (通常20°C ± 40°C) で、750 rpmで攪拌しながら、1時間インキュベーションした。インキュベーションに続いて、各ウェルからの150 µLの溶液を新しいMTPに移した。このMTPを SpectraMax MTPリーダーを用いて488 nmを読み取り、洗浄を定量化した。ブランクコントロール、並びにマイクロスウォッチ及び洗剤を含むが酵素を含まない対照も含む。

30

40

酵素性能の計算

【0334】

得られた吸光度の値をブランクの値 (酵素を添加しないで洗浄したマイクロスウォッチ) で補正した。得られた吸光度は加水分解活性の測定値である。

C. 抗体滴定によるアミラーゼ濃度測定

【0335】

本明細書で説明するように、αアミラーゼ濃度及び特異活性は抑制ポリクローナル抗体を用いた滴定により決定した。ポリクローナル抗体はバチルスステアロセリモフィリス (Bacillus stearothermophilus) αアミラーゼ (AmyS)

50

により育成され、Amy S 及びバチルス株 TS 2 3 由来の α アミラーゼの強力な抑制効果があることが知られている（例えば、この結合は活性損失の線形滴定を形成するのに充分である）。それゆえ、この抗体は、特異活性の計算の代わりに酵素濃度の測定に用いることができる。簡単に説明すると、幾つかの知られている酵素により精製された酵素抑制の量を測定する。この情報から、完全な抑制のために必要な抗体の濃度が推定され、この濃度はサンプル中の酵素濃度と等しい。 α アミラーゼ活性及び抑制を蛍光 BODIPY デンプンアッセイを用いて測定した。緩衝液は 0.005 % TWEEN を含む 50 mM MOPS、pH 7.0 であった。

【0336】

精製された Amy S に対するポリクローナル抗体をラビットで生成し、標準的方法で生成した。抗体ストック溶液の経験による明らかな濃度の値を特異活性の分かっている AMt S のサンプルの抑制を測定することにより決定した。その後、この抗体サンプルを Amy S 及び TS 2 3 t 変異体の濃度及び特異活性を決定するために用いた。これらの値を用いて、変異体の全て同じ濃度に希釈して、標準化された 96 ウェル酵素ストックプレート

10

D. 野生型タンパク質ゲル電気泳動

【0337】

変異体タンパク質サンプルの電気泳動移動度を 7.5 % 又は 12.5 % の濃度のいずれかで、プレキャストネイティブポリアクリルアミドゲル (Phast Gel Homogeneous) 上で、ファストゲルシステム (GE Healthcare) を用いて、測定した。0.88 M L-アラニン、0.29 M トリス緩衝液、pH 8.8 からなるバッファーストリップ (Phast Gel Native) を用いた。通常の稼動条件は 400 V を 12.5 分で、陽極から陰極の距離が 3.7 cm 分である。

20

【0338】

代替的に、変異体タンパク質サンプルの電気泳動移動度は、1 mm 厚の 0.5 % - 1.5 % のアガロースゲルに対する各種 pH（即ち、5.8、8.0、及び 10.0）好適な緩衝システムを選択して、測定することができる。この電気泳動は濃度勾配のない状態で行われる。陽極-陰極の長さは 13.9 cm である。1 - 2 μ g タンパク質のサンプルを 5 % グリコール + 0.05 % ブロモフェノールブルーを混合して各レーンに装填する。ゲルを通常 100 V で 1 時間泳動する。

30

【0339】

いずれかのケースにおいて、ルイスビル青色ダイを 10 % 酢酸に溶解した溶液でゲルを染色し、10 % エタノール及び 10 % 酢酸水溶液で脱色した。用いた天然ゲルシステムに依存して、12 及び 20 の間の変異体を同時に検査することができる。タンパク質変異体の電気泳動移動度は同じサンプルゲル上の付加されたチャージラダー標準に対して評価することができる。

【0340】

E. 洗剤の熱失活

市販の洗剤を熱失活すると、酵素成分の酵素活性は破壊されるが、非酵素成分のタンパク質は維持されている。従って、この方法は本発明の酵素を試験するのに用いる市販洗剤商品に好適な方法である。北米 (NA) 及び西ヨーロッパ (WE) における重質液体洗剤について、95 °C のウォーターバス中で 2 時間、予め重量を測定した液体洗剤 (ガラスボトル) を置くことにより熱失活を行った。北米 (NA) 及び日本 (JPN) の重質顆粒潜在 (HDG) についてのインキュベーション時間は 8 時間であり、西ヨーロッパ (WE) HDG 洗剤は 5 時間であった。NA 及び EW 食器洗浄機の熱失活についてのインキュベーション時間は 8 時間であった。洗剤は地域のスーパーマーケットより購入した。非加熱及び過熱した洗剤を 5 分以内で八日し、ただちに失活したパーセンテージを決定した。酵素活性を su-AA-PF-pNA アッセイにより試験した。

40

【0341】

熱失活洗剤における酵素活性の試験のために、洗剤の希釈標準溶液を熱非失活ストック

50

から作成した。好適な水硬度（6 g p g 及び 12 p g p）及び緩衝液を洗剤溶液に添加し、所望の条件を作成した（表 1 2 - 1）。この溶液をボルテクス又はボトルを反転することにより混合した。

表 1 2 - 1. 洗濯用及び食器洗浄用組成物							
地域	型	投与量	洗剤*	緩衝液	Gpg	pH	T (°C)
洗濯用（重質洗剤及び顆粒）							
NA	HDL	0.78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM HEPES	6	8.0	20
WE	HDL	5.0 g/L	Henkel Persil	5 mM HEPES	12	8.2	40
WE	HDG	8.0 g/L	P&G Ariel	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10.5	40
JPN	HDG	0.7 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
NA	HDG	1.0 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10.0	20
食器洗浄器用							
WE	ADW	3.0 g/L	RB Calgonit	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10.0	40
NA	ADW	3.0 g/L	P&G Cascade	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10.0	40

* 略語: Procter & Gamble (P&G); 及び Reckitt Benckiser (RB).

(表 1 2 - 1)

F. 洗浄性能を決定するためのテルゴーオーメータアッセイ

【0342】

タンパク質及び炭水化物汚れを評価する標準的な方法は各種レベルの汚れを付着させた布見本を標準的な条件下での洗浄前と後で測定する。この布見本はキビデンプン、コメデンプン、又は血液、ミルク、及び炭化水素混合物で汚れを付けた綿布からなり、Test fabrics, Inc. (West Pittston, PA) より入手した。キビデンプン (EMPA 161) 及び血液、ミルク、カーボンブラック (EMPA 116) 試験用汚れを EMPA Test materials AG (St. Gallen, Switzerland) により調製した。コメデンプン (CFT-28) 汚れは The Center For Test materials BV (Vlaardingem, Netherlands) が調製した。各汚れを D65 (5600 oK) にセットした Minolta Reflectometer CR-410 を用いて光反射率により、洗浄前と後で測定した。L、a、b の値における違いを CIE-LAB カラー空間により定義されているように総色違い (dE) に転換した。汚れの洗浄は洗浄前及び後の色の違いの間の比を用いて、汚れの付いていない布に対する汚れの付着した洗浄していない布の違いを比較して、汚れの除去指標 (%SRI) として表す。

【0343】

洗浄実験を上部に攪拌装置を有する 2 リットルのステンレスポット 6 つを有する Terg-O-meter (United States Testing Co., Hoboken, NJ) 中で行った。各処理を 1 ガロン当たり 6 グラムの 3:1 (カルシウム: マグネシウム) 水硬度、又は 1 ガロン当たり 12 グ레인水硬度のいずれかの水 1 L 中で行った。洗浄試験に用いた洗剤は 5 mM HEPES 緩衝液、pH 8 を含む 1.5 g/L AATCC HDL WOB 2003 液体洗剤、0.7 g/L AATCC HDD

WOB 1993 顆粒洗剤, 過ホウ酸及びTAEDを含む8 g/L IEC A*60 456 顆粒洗剤又は5 g/L Persil パワーゲル液体洗剤であった。酵素40 g/L又は200 g/Lの汚されたバラストを直接洗剤溶液に添加して、反応を開始した。洗浄反応は100 rpmで撹拌しながら、10、15、又は40分で、20℃、25℃、30℃、40℃、又は50℃で行った。洗浄に続き、布見本を水道水で3分間すすぎ、前蓋式の洗濯機に1000 rpmで回転させ過剰な水を除去し、乾燥機に入れパーマネントプレスサイクルで約加えて45分低温で乾燥させた。固形除去の程度の比較は反射率測定法により比較され、パーセント汚れ除去指数(%SRI)として表した。対照は酵素を含んでおらず、ベンチマーク市販酵素の各量を含むものを陽性対照とした。

G. アミラーゼ活性の決定のためのBodipyデンブンアッセイ

10

【0344】

このBodipyデンブンアッセイはENZCHEK (商標) Ultra Amylase Assayキット(E33651, Invitrogen)を用いて行った。DQデンブン基質の1 mg/mlストック溶液を50 mM酢酸ナトリウム緩衝液pH 4.0の100 µLで凍結乾燥デンブンを含むバックボーン威圧の内容物を溶解して調製した。このバイアルを約20秒ボルテックス撹拌して、暗室で室温放置し、使用するまで、時々混合した。900 µLのアッセイ緩衝液(2.6 mM CaCl₂を含む50 mM酢酸ナトリウム、pH 5.8)を添加して、このバイアルを約20秒間ボルテックス混合した。基質溶液を暗室において、使用まで室温又は4℃で貯蔵した。アッセイのために、100 µg/mlのDQ基質の希釈標準溶液をアッセイ緩衝液中の1 mg/mL基質から調製した。100 µg/mLの190 µL基質溶液を96ウェル平底マイクロタイタープレート中の各ウェルに添加した。酵素サンプルの10 µLをこのウェルに添加して、30秒間、サーモミキサーを用いて800 rpmで混合した。緩衝液及び基質のみを含むブランクサンプル(酵素非含有サンプル)をアッセイに含めた。蛍光強度の変化の速度を25℃で5分間蛍光マイクロタイタープレートリーダーで測定した(励起: 485 nm、蛍光520 nm)。

20

H. アミラーゼ活性の決定のためのコーン粉加水分解

【0345】

酵素活性のためのコーン粉基質アッセイのデンブン加水分解。有機コーン粉(Azure Farms, ロットNo. 03227)を固形物分散装置(V&P Scientific)を用いて、ポリプロピレン、ブラック、平底煙突型96ウェルマイクロプレートに均一に広げた。20 mM酢酸ナトリウムpH 5.6の85 µLを各ウェルに添加して、混合した。オイルシールでプレートの上を密封し、このプレートをサーモサイクラーで20乃至30分予備インキュベーションした。酵素サンプルを20 mM酢酸ナトリウム緩衝液中のAgilent ポリプロピレンプレート(5042-1385)中に希釈した。110 µLの希釈した控訴を基質プレートに転換して、このプレートを新しいオイルで硬く密閉した。このプレートをその後、金属ブロックを有するLabnet Vortemp 56 Incubator/Shakerに移して、95℃で予備加熱して、振とうスピードを500 rpmにした。このインキュベーションを30分続けた。インキュベーションの最後に、アイスバケット中でこのプレートを急激に冷却して、100 µLの0.1 N H₂SO₄を各ウェルに添加してデンブン加水分解反応を停止した。このプレートを軽く混合し、デンブン加水分解反応精製物をPAHBAHアッセイ又はHPLCのいずれかで解析した。

30

40

【0346】

コーン粉基質の酵素加水分解物の可溶性糖濃度の程色反応検出。0.5 N NaOHの80 µLアリコート空のPCRプレートの全てのウェルに添加して、次いで20 µLのPAHBAH試薬(5% w/v p-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジド(PAHBAH, シグマ # E9882, 0.5 N HCl中に溶解)を添加して、混合した(PAHBAH 反応プレート)。10 µLのデンブン加水分解反応上清をこのPAHBAH 反応プレートに添加した。全てのプレートを密封し、2時間95℃、その後20℃に冷却するようにブ

50

ログラムされた熱サイクラー (MJ Research Tetrad) 中に置いた。得られた PAHBAH 反応混合物の 80 μ L のサンプルをリードプレートに写し、分光光度計中 405 nm で吸光度を測定した。

【0347】

トウモロコシ粉基質の酵素加水分解からの可溶性糖濃度の HPLC 法検出。Sigma (St. Louis, MO) からえら得た可溶性糖基質 (DP1-DP7) をミリQ水で 100 mg/mL に希釈して、糖のピークエリア面積を実際の糖濃度へ換算するのに用いた。デンプン加水分解アッセイらの冷却サンプルを 3000 rpm、25 $^{\circ}$ C で 5 分間 Beckman Coulter Allegra 6RCentrifuge で遠心分離した。この上清をスパンプレートから採取して、Multiscreen-HV フィルタープレート (Catalog No. MAHVN4550) に移した。このフィルタープレートを 6000 rpm、25 $^{\circ}$ C、10 分で Hettich Rotanta 遠心分離機の Agilent HPLC プレートで回転させた。50 μ L の 0.01 N 硫酸移動相 (0.1 M 硫酸をミリQ水で 10 倍に希釈) を Agilent HPLC プレートの新しい各ウェルに添加した。ろ過されたプレートを簡単に混合し、50 μ L のろ過物を移動相を 50 μ L 含む対応する各ウェルに移した。希釈した糖標準溶液をプレートの空のウェルに添加して、キャリブレーションに用いた。内容物をプレートフォームシェーカーで簡単に混合して、このプレートを Nalgene Preslit ウェルキャップで密閉した。0.6 mL/分の流速で 2 L も移動相を用いて行う前に、HPLC カラム (BIO-Rad Aminex HPLC-87E カラムカタログ No. 125-0140) を調製した。プレート中の全てのサンプルを 20 μ L のインジェクション容量で解析して、検出器として AMINEXH. M And RID (屈折率) を用いた。試験が終わった後、HPLC の流速を 0.05 mL/分に落とした。

I. アミラーゼのよるデンプン粘度減少の検出

【0348】

このアッセイにおいて、コーンスターチ基質溶液の粘度低下を粘度計で測定した。コーンスターチ基質スラリーはバッチモードで 30 % のトウモロコシ粉固形分になるように蒸留水中で調製し、硫酸で pH を 5.8 に調整した。各回のテストのために、このスラリーの 50 グラム (15 グラム乾燥固形分) の重量を測定し、70 $^{\circ}$ C になるまで 10 分、予備インキュベーションした。アミラーゼ添加後、この温度を急激に 75 rpm の速度で攪拌しながら上昇させた。このスラリー及びアミラーゼ混合物の温度が 85 $^{\circ}$ C になると、温度を一定に維持して更に 30 分間粘度をモニターした。

J. マクロ分子基質に結合する酵素の測定

【0349】

結合アッセイは、アミラーゼチャージラダー変異体 (チャージ変化 = 野生型 AmyS に対して -12 乃至 +12) のコーンストーバー及びバガスへの基質結合を評価するために行った。用いた基質はバガス (ブラジルのシュガーコーンバガス, National Renewable Energy Laboratory により入手、希酸処理し、pH 5 で洗浄及び緩衝)、AFEX (アンモニアで繊維を膨張させたコーンストーバー)、及び PCS (希硫酸で前処理したコーンストーバー、pH 5 で洗浄及び緩衝) を含む。全ての基質を使用前に所望及びの固形分含量に調整した。

【0350】

アミラーゼ結合: アミラーゼチャージラダー変異体を精製し、試験のために 200 ppm に希釈した。1 % セルロースバガス溶液をホウ酸緩衝液 (40 mM、pH 8.5、0.016 % Tween 80) 中で調製した。150 μ L のバガス溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。150 μ L のホウ酸緩衝液を別のウェルに添加して対象として用いた。10 μ L のアミラーゼチャージラダー変異体をろ過プレートに添加した。各条件について 2 回試験を行った。このプレートを室温で 2 時間インキュベーションした。このろ過物を収集し、上清中のアミラーゼ活性を BODIPY デンプンアッセイにより測定した。

【0351】

マイクロスウォッチへの酵素結合の測定：アミラーゼ変異体を標準的な洗浄条件下で、30分間CS-28コメデンプンマイクロスウォッチを添加し、又は添加しないでインキュベーションした。遊離酵素の量をBODIPYデンプンアッセイにより測定した。マクロスウォッチに結合した酵素分画を以下のように計算した：布結合＝（汚れのない布中の酵素活性－汚れたマイクロスウォッチ中の酵素活性）／マイクロスウォッチがない場合の酵素活性）。

K. ゲオバチルスステアロセレモフィリス (Geobacillus stearothermophilus) アミラーゼタンパク質の定量

【0352】

ゲオバチルスステアロセレモフィリス (G. stearothermophilus) アミラーゼタンパク質を競合イムノアッセイにより定量化した。簡単に説明すると、精製されたゲオバチルスステアロセレモフィリス (G. stearothermophilus) アミラーゼを蛍光ダイ（蛍光色素）でラベルして、抗体に結合するゲオバチルスステアロセレモフィリスを消光ダイ（テトラメチルローダミン）でラベルした。蛍光色素アミラーゼ結合体の蛍光シグナルを消光分子ラベル抗体の結合により消光した。サンプル中遊離アミラーゼの存在が消光ラベル抗体と競い合って、蛍光シグナルが増加する。それゆえ、蛍光シグナル強度がサンプル中の蛍光シグナルに比例する。このアッセイは精製された既知の濃度のゲオバチルスステアロセレモフィリスアミラーゼでキャリブレーションしている。

【0353】

ゲオバチルスステアロセレモフィリスアミラーゼの蛍光ダイでのラベル：精製されたゲオバチルスステアロセレモフィリスアミラーゼを蛍光イソチオシアネート (Molecular Probes, Eugene OR) で、50mM炭酸ナトリウム緩衝液中pH9.5で、説明書に従ってラベルした。反応の最後に、セファロース緩衝整理食塩水中でSephadex G-25（シグマ, St. Louis, MO, USA）でゲルろ過してこのタンパク質を未結合ダイから分離した。

【0354】

抗体調製及び蛍光ダイでのラベル：ゲオバチルスステアロセレモフィリスアミラーゼの抗体をウサギでの免疫作成及び抗血清から回収して調製した。この抗血清は使用まで-20℃で保存した。1.5ml、3.75M硫酸アンモニウムでの沈殿により得た免疫グロブリン分画の調製物を、20ml抗血清に添加して、4℃で60分放置して、2,000gで遠心分離して、沈殿物を得た。沈殿物を回収して、再懸濁して2回洗浄し、1.6M冷却硫酸アンモニウム10ml中で沈殿させた。採取沈殿生成物を4mlの水に溶解して、50mM炭酸ナトリウム、pH9.5、4℃で透析した。減衰係数 $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 15$ を用いてA280によりタンパク質濃度は29.2mg/mlであると測定された。このイムノグロブリン分画を50mM炭酸ナトリウムpH9.5中でテトラメチルローダミンイソチオシアネート（シグマ, St. Louis, MO）でラベルした。未結合ダイをその後、0.1%デオキシクロレートを含むリン酸緩衝整理食塩水で平衡化したセファデックスG-25のカラム上でゲルろ過した。

【0355】

アッセイ手順：このイムノアッセイは96ウェルマイクロタイタープレート（コーニング#3650）で行った。蛍光色素－アミラーゼの濃度をこのアッセイにおける最終濃度が所望の標準曲線の真ん中になるように調整した。同様に、消光色素－抗体を最終布見本濃度が蛍光シグナルの最大調節を許容するように調整した。自動的に生成された液体ハンドリングシステムを用いて、5μLの各サンプル、蛍光色素－アミラーゼ、及び冷却抗体を2% (w/v) ポリエチレングリコール8000（シグマ, St. Louis, MO, USA）を含む180μLリン酸緩衝生理食塩水に添加した。軽く混合した後、このプレートを室温で1時間インキュベーションし、蛍光シグナルを励起波長及び蛍光波長をそれぞれ495nm及び520nmに設定した、蛍光プレートリーダー（モレキュラーデバイ

10

20

30

40

50

ス)を用いて決定した。

実施例 13. B. スブチリスにおけるアミラーゼ生成

【0356】

この実施例において、ゲオバチルスステアロセレモフィリスアミラーゼから切断された変異体アミラーゼ (S242Q 変異体及び C 末端の 29 アミノ酸の欠失を有する; これも S242Q 変異体と言う) 及びそれらの変異体のバチルススブチリス中での生成を説明する。形質転換は既知の方法 (例えば、WO 02/14490 参照) で行った。簡単に説明すると、親アミラーゼをコードしている遺伝子を発現ベクタークローニングした。この発現ベクターは LAT プロモーター (PLAT)、LAT シグナルペプチド (preLAT) をコードしている配列、次いで、クローニングのための Pst I 及び Hpa I 制限部位を含む。

10

【0357】

LAT シグナルペプチドのコード領域を以下に示す:

atgaaacaac aaaaacggct ttacgcccca ttgctgacgc tggtatttgc gctcatcttc

ttgctgcctc attctgcagc ttcagca (配列番号 20)

(配列番号 20)

【0358】

LAT シグナルペプチドのアミノ酸配列を以下に示す:

20

MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA (配列番号 21)

(配列番号 21)

【0359】

置換アミノ酸を有する成熟切断 S242Q 変異体のアミノ酸配列を本明細書における変異体ライブラリーの作成のための根拠として用いた:

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEAN NLSSLGITA LWLPPAYKGT SRSDVGYGVY

DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTIEWDAVE

30

VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT KFDFPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG

IGKAWDWEVD TENGNYDYL M YADLDMDHPE VVTELKNW GK WYVNTTNIDG FRLDAVKHIK

FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NKLHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK

SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLA YAFILTRQEG

YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG WTREGVTEKP

40

GSGLAALITD GPGGSKWYV GKQHAGKV FY DLTGNRSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW

VPRKTT (配列番号 22)

(配列番号 22)

【0360】

成熟 Amy S アミラーゼをコードする領域を以下に示す:

gccgcaccgt ttaacggtac catgatgcag tatttttgaat ggtacttgcc ggatgatggc
 acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct
 ctttggtgctgc cgcccgctta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggta cggagtatac
 gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca
 aaagetcaat atottcaagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc
 gatgtcgtgt tcgaccataa aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgcgctcgaa
 gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg
 aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat 10
 ttgacggcg ttgactggga cgaaagccga aaattaagcc gcatttataa attccgcggc
 atcggcaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg
 tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtctgacgg agctgaaaaa ctgggggaaa
 tgggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcatattaag
 ttcagttttt ttcttgattg gttgtcgtat gtgcgtttct agactggcaa gccgctatct
 accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca
 aacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgtttccaaa
 tcagggggcg catttgatat gcgcacgtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg 20
 acattggccg tcaccttcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca
 tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga
 taccctgtcg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tcttcgctg
 aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttaagg aacgcaacat
 gattatcttg atcaactcca catcatcggg tggacaaggg aaggggtcac tgaanaacca
 ggatccgggc tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt
 ggcaaacac acgctggaaa agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgtc
 accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggt ttcggtttgg 30
 gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcggccga tcacaaccgg accgtggact
 ggtgaattcg tccgttggac cgaaccacgg ttggtggcat ggcc (配列番号23)

(配列番号23)

【0361】

成熟Amy S アミラーゼのアミノ酸配列をAmy S 変異体ライブラリーの根拠として用いた。この配列は配列番号2である。

【0362】

PCR生成物をキアゲンカラムを用いて生成し、脱イオン水50 μLに再懸濁した。50 μLの精製したDNAをHpaI (ロシュ) 及びPstI (ロシュ) で消化した。得られたDNAを30 μL脱イオン水に再懸濁した。10乃至20 ng/mlのDNAをPstI 及びHpaI クローニング部位を用いてプラスミドpHPLTへクローンした。このリゲーション混合物を直接コンピテントバチルススブチリス細胞 (ゲノタイプ: Δvpr, ΔwprA, Δmpr-ybfJ, ΔnprB) で形質転換した。このバチルススブチリス細胞はキシロース誘発プロモーターの下流にあるコンピテンシー遺伝子 (comK) を有しており、キシロースがDNA結合及び取込を誘発するのに用いることができる (Hahnら (1996) Mol. Microbiol. 21: 763-775 参照)。

【0363】

プラスミドpHPLAT-Amy Sの要素は、プラスミドpUB110由来のpUB1

10

20

30

40

50

10 = DNAフラグメントを含む (McKenzieら (1986) Plasmid 15: 93-103)。プラスミドの特徴は、ori-pUB110 = pUB110由来の複製起源、neo = pUB110由来のネオマイシン耐性遺伝子、Plat = バチルスリケニフォルミスアミラーゼからの転写プロモーター、PreLAT = バチルスリケニフォルミスアミラーゼ由来のシグナルペプチド、SAMY425ss = 切断されたAmyS遺伝子配列のコード領域 (この実験では、発現された各切断AmyS変異体についてのコード領域で置換している)。ターミネーター = バチルスリケニフォルミスアミラーゼからの転写ターミネーター。

実施例14. 酵素変異体の発現

【0364】

この実施例は前述の実施例で形質転換されたバチルススブチリスの各種組換え酵素の発現に用いた方法を、2mlスケールで、説明する。

【0365】

AmyS (又はこれらの変異体) 又はS242Q (又はこれらの変異体) 発現ベクターを含むバチルススブチリスクロノンをグリセロールストックから150 μ LのLAB培地 + 10 μ g/mlのネオマイシンを含む96ウェル培養プレートへ、スチール96ウェルレプリケーターで、37°C、高湿な容器内で、220 rpmで複製した。一晚培養した培地からの100 μ Lのアリコートに5mlのプラスチックチューブに2,000 μ Lの決められた培地 + 10 μ g/mlのネオマイシンに接種した。この培養培地は主な窒素源としての尿素、主な炭素源としてグルコース、及び細胞育成を確実にするための1%ソイトン及び5mMカルシウムを含むMOPS緩衝液に基づいた強化セミデファインド培地である。培養チューブを37°C、250 rpmで72時間インキュベーションした。インキュベーションの後、培地ブロスに3,000 x gで10分間遠心分離した。この上清を15mlのポリプロピレンコニカルチューブ内に移し、タンパク質定量のために80 μ Lの各サンプルを96ウェルプレートに分注した。

実施例15. 酵素変異体の生成

【0366】

この実施例は酵素チャージラダー (charge ladder) 及びチャージラダーの組み合わせの生成を説明する。

酵素チャージラダー

【0367】

所望の物理的特徴の範囲を有する複数のタンパク質変異体を既存のライブラリーから選択し、又は既知の部位指定変異誘発 (例えば、米国特許出願公開公報No. 2008-0293610参照) により生成した。プローブタンパク質の決められたセットをその後所望の試験でアッセイした。

【0368】

典型的なアミラーゼ変異体チャージラダーを以下のテーブルで示し、本明細書に記載のようにアッセイした。これらのテーブルにおいて、チャージ変化は親酵素に関連していた。

【0369】

AmyS遺伝子の配列を、表15-1乃至15-2に示すように28チャージラダーの合成のためにジーンオラクル (Gene Oracle) (Mountain View, CA) へ提供した。ジーンオラクルではベクターpGov4でAmyS変異体をクローニングして、E. coliで形質転換し、ミニプレップから単離されたDNA、並びにアガースタブを各変異体について供給した。

【0370】

変異体をPCR増幅し、pHPLTバチルススブチリス発現ベクターへクローンした。変異体を以下のプライマーを用いてpGov4プラスミドからPstI-HindIIIフラグメントとして増幅した。

10

20

30

40

Satori F 5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3' (配列番号 2 4)

Satori R 5'-TTATCCTTTACCTTGTCTCCAAGC-3' (配列番号 2 5)

(配列番号 2 4 及び配列番号 2 5)

【0371】

このPCR生成物をキアゲンクイックチェンジカラムを用いて生成して、50 µLのミ
リQ水中に再懸濁した。生成したDNA 50 µLをHindIII (ロシュ) 及びPst
I (ロシュ) で切断し、得られたDNAを30 µL脱イオン水に再懸濁した。10乃至2
0 ng/mlのDNAをPstI及びHpaIクロニング部位を用いてプラスミドpH
PLTへクローンした。リゲーション混合物を直接バチルススプチリスコンピテント細胞
へ形質転換した (ゲノタイプ: amyE::xylRPxylAcomK-phleo)。これらのバチルススプチリス細胞はこのバチルススプチリス細胞はキシロース誘発プロ
モーターの下流にあるコンピテンシー遺伝子 (comK) を有しており、キシロースがD
NA結合及び取込を誘発するのに用いることができる。

表 15-1 第一Amy Sチャージラダー

番号	Amy S変異体	Δ チャー ジ
1-6	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E	-12
1-5	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q N28D N224D N271D N281D Q86E	-10
1-4	R308Q R483Q K171Q K383Q N28D N224D N271D N281D	-8
1-3	R308Q R483Q K171Q N28D N224D N271D	-6
1-2	R308Q R483Q N28D N224D	-4
1-1	R308Q N28D	-2
AmyS	Parent	0
2-1	D318N N28R	+2
2-2	D318N D306N N28R N224R	+4
2-3	D318N D306N D19N N28R N224R N271R	+6
2-4	D318N D306N D19N D393N N28R N224R N271R N281R	+8
2-5	D318N D306N D19N D393N D458N N28R N224R N271R N281R Q86R	+10
2-6	D318N D306N D19N D393N D458N E29Q N28R N224R N271R N281R Q86R Q89R	+12

(表 15-1)

	表 1 5 - 2 第二Amy S チャージラダー	
3-7	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q	-12
3-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q	-10
3-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D R308Q R483Q K171Q K383Q	-8
3-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D R308Q R483Q K171Q	-6
3-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q R483Q	-4
3-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D	-2
3-1	Q97R Q319R Q358E Q443E	0
4-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K D318N	+2
4-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K D318N D306N	+4
4-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K D318N D306N D19N	+6
4-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K D318N D306N D19N D393N	+8
4-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R D318N D306N D19N D393N D458N	+10
4-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R Q89R D318N D306N D19N D393N D458N E29Q	+12
5-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D R308Q S242E	-3
5-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242E	-4
5-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242Q	-3

(表 1 5 - 2)

表 15-3. AmyS-S242Q チャージラダー	
AmyS-S242Q 変異体	Δ チャージ
Q97E-Q319E-Q358E-Q443E	-4
Q97E-Q319E-Q358E	-3
Q97E-Q319E	-2
Q97E	-1
Q97R-Q319E	0
Parent AmyS-S242Q	0
Q97R	+1
Q97R-Q319R	+2
Q97R-Q319R-Q358R	+3
Q97R-Q319R-Q358R	+4

(表 15-3)

酵素組み合わせチャージラダー (CCL) : ゲオパチルスステアロセリモフィリス AmyS S242Q CCL の生成

【0372】

AmyS-S242Q プラスミド DNA を形質転換された B. スブチリス 株 (ゲノタイプ: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAconik-phleo) から単離して、DNA 2.0 Inc. に CCL 工構築物をテンプレートとして送った。表 15-4 に示すように AmyS-S242Q (S242Q) アミラーゼにおける 4 つの位置のそれぞれにおいて、位置ライブラリーを DNA 2.0 Inc. (Mountain View, CA, USA) に作るように要求した。変異体は 96 ウェルプレート中のグリセロールストックとして供給された。

【0373】

AmyS S242Q 組み合わせチャージライブラリーは以下の 4 つの残基を同定することにより設計された: Gln-97, Gln319, Gln358, 及び Gln443。4 つの部位について、81 メンバー CCL を各部位における 3 つの可能な組み合わせ、野生型、アルギニン、又はアスパラギン酸、の全部を作成することにより生成した。

表 15-4. S242Q CCL 変異体					
変異体 #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δチャージ
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2
3	Q97E	Q319E	Q358E	-	-3
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0
6	Q97E	Q319E	Q358R	-	-1
7	Q97E	Q319E	-	Q443E	-3
8	Q97E	Q319E	-	Q443R	-1
9	Q97E	Q319E	-	-	-2
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0
12	Q97E	Q319R	Q358E	-	-1
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0

(表 15 - 4)

表 15-4. S242Q CCL 変異体

変異体 #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ チャージ
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	+2
15	Q97E	Q319R	Q358R	-	+1
16	Q97E	Q319R	-	Q443E	-1
17	Q97E	Q319R	-	Q443R	+1
18	Q97E	Q319R	-	-	0
19	Q97E	-	Q358E	Q443E	-3
20	Q97E	-	Q358E	Q443R	-1
21	Q97E	-	Q358E	-	-2
22	Q97E	-	Q358R	Q443E	-1
23	Q97E	-	Q358R	Q443R	+1
24	Q97E	-	Q358R	-	0
25	Q97E	-	-	Q443E	-2
26	Q97E	-	-	Q443R	0
27	Q97E	-	-	-	-1
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0
30	Q97R	Q319E	Q358E	-	-1
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	+2
33	Q97R	Q319E	Q358R	-	+1
34	Q97R	Q319E	-	Q443E	-1
35	Q97R	Q319E	-	Q443R	+1
36	Q97R	Q319E	-	-	0
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	+2
39	Q97R	Q319R	Q358E	-	+1
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	+2
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	+4
42	Q97R	Q319R	Q358R	-	+3
43	Q97R	Q319R	-	Q443E	+1
44	Q97R	Q319R	-	Q443R	+3
45	Q97R	Q319R	-	-	+2
46	Q97R	-	Q358E	Q443E	-1
47	Q97R	-	Q358E	Q443R	+1
48	Q97R	-	Q358E	-	0
49	Q97R	-	Q358R	Q443E	+1
50	Q97R	-	Q358R	Q443R	+3
51	Q97R	-	Q358R	-	+2
52	Q97R	-	-	Q443E	0
53	Q97R	-	-	Q443R	+2
54	Q97R	-	-	-	+1
55	-	Q319E	Q358E	Q443E	-3
56	-	Q319E	Q358E	Q443R	-1
57	-	Q319E	Q358E	-	-2
58	-	Q319E	Q358R	Q443E	-1

(表 15 - 4)

表 15-4. S242Q CCL 変異体					
変異体 #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ チャージ
59	-	Q319E	Q358R	Q443R	+1
60	-	Q319E	Q358R	-	0
61	-	Q319E	-	Q443E	-2
62	-	Q319E	-	Q443R	0
63	-	Q319E	-	-	-1
64	-	Q319R	Q358E	Q443E	-1
65	-	Q319R	Q358E	Q443R	+1
66	-	Q319R	Q358E	-	0
67	-	Q319R	Q358R	Q443E	+1
68	-	Q319R	Q358R	Q443R	+3
69	-	Q319R	Q358R	-	+2
70	-	Q319R	-	Q443E	0
71	-	Q319R	-	Q443R	+2
72	-	Q319R	-	-	+1
73	-	-	Q358E	Q443E	-2
74	-	-	Q358E	Q443R	0
75	-	-	Q358E	-	-1
76	-	-	Q358R	Q443E	0
77	-	-	Q358R	Q443R	+2
78	-	-	Q358R	-	+1
79	-	-	-	Q443E	-1
80	-	-	-	Q443R	+1
81 (parent)	Q97	Q319	Q358	Q443	0

(表 15-4)

実施例 16

酵素の洗浄性能

【0374】

この実施例は各種イオン強度下における AATCC HDL 洗剤又は 5 mM HEPES 緩衝液中 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマイクロスウォッチアッセイにおける S242Q 変異体の試験を説明する。実施例 12 で説明した方法を用いた。(例えば、「試験アミラーゼ性能のためのコメデンプンマイクロスウォッチアッセイ」を参照。)

【0375】

AATCC HDL 洗剤において酵素についての洗浄性能のための好適な正味のチャージ変化がある。性能はコメデンプンマイクロスウォッチ活性アッセイにおいて観察された洗浄性能の観点で測定する。1.0 付近の値がこのアッセイにおいて最高の洗浄性能を示す。このことは所与の結果又は効果を改善する(例えば、液体洗濯用洗剤の洗浄性能)ためのタンパク質の物理的性質(例えば、正味のチャージ)最適化の例である。プローブタンパク質の限られたセットで同定されたチャージ最適化は、全体チャージ組み合わせライブラリーを測定したときに観察される最適チャージと同時に生じる。プローブタンパク質の使用はそれゆえライブラリー全体の特性が予測される。

【0376】

Debye-Huckel 理論 (Israelachvili, Intermolecular And Surface Forces, Second Edition: With Applications to Colloidal And Biological Systems, Academic Press 2d Ed. [1992]) によると、静電相互作用は一定のポテンシャル、又は一定のチャージ(酵素、基質、布、及び洗剤)、それらのサイズ、及び環境媒体の誘電率における物質の相互作用の間の二層エネルギーの強度により主に抑制される。洗剤製剤等の複合媒体中の粒子の電気的特性

を特徴付けるために、同じDebyeスクリーニングレングスを処理している還元された環境における相互作用が好ましい。これは、適合するpHの緩衝液及び洗浄条件下での緩衝液の伝導性を選択することにより達成できる。そのような試験に好適な緩衝液はNaClのような、中性電解液の量を変化させた、pH8.0の5mMHEPES緩衝液である。この緩衝液に2.5mMのNaClを添加すると、北米洗浄条件のタイプのpH及び伝導性になる。100mMのNaClの添加は日本及び西ヨーロッパの洗浄条件であり、通常水の硬度と洗剤の濃度の両方が高くなると、イオン強度も高くなる。

【0377】

図23は陽性チャージS242Qは北米洗浄条件下でコメデンプンマイクロスウォッチの洗浄が優れていることを示した。同様に、他のαアミラーゼ（即ち、TS23t）の陽性変異体は北米洗浄条件下でコメデンプンマイクロスウォッチの洗浄が優れていることを示した（図24）。このことは異なるαアミラーゼにおいてチャージ変異体が同様の効果有することを示している。陽性チャージS242Q変異体は粉碎コーン基質加水分解に対するより高い特異活性も示している（図25）。

10

【0378】

AmySチャージラダーによるデンプン液化はコーンスターチの液化の後の最終粘度のモニタリングにより決定した。低い粘度の値は、デンプンポリサッカライドの分解を示す。図14に示すように、チャージ最適化（例えば、-4乃至-2）を液化について観察した。陰性の強いAmyS変異体（例えば、-12乃至-10）は非常に高い最終粘度を示し、陽性の強い変異体（例えば、+6以上）もより高い最終粘度を示した（例えば、トルク過負荷により試験装置の限界を超えていた。）

20

実施例17

熱安定性

【0379】

タンパク質チャージ及び熱安定性の間の関係を決定する実施例を説明する。アミラーゼアッセイを培養上清を過熱する前及び後で、BODIPYデンプン加水分解に基づいてアッセイした。実施例12で説明した化合物及び試薬溶液を用いた。

αアミラーゼの熱安定性アッセイ

【0380】

ろ過した培養上清を0.002%Tweenを含む50mM酢酸ナトリウム+2mMNaCl2、pH5.8で連続的に希釈した。10μLの希釈した各培養上清をBODIPYデンプンアッセイにより初期の活性を決定した。50μLの各希釈培養上清をVWRロープロファイルPCR96ウェルプレートに入れた。30μLのミネラルオイルを各ウェルに添加して密閉した。このプレートを、BioRad DNA engine Peltier Thermal Cyclerで、親酵素の安定性により、30μ60分で、95℃でインキュベーションした。インキュベーションの後、このプレートを4℃で5分間冷却して、その後室温で維持した。10μLの各サンプルを新しいプレートに添加して、実施例1で説明したように、BODIPYデンプンアッセイにより最終アミラーゼ活性を決定した。

30

熱安定性の計算

40

【0381】

サンプルの残余活性を初期の吸光度に対する最終吸光度の比として表した。両吸光度はブランクで補正している。高い指標はより熱安定性があることを示している。これは液体洗濯用洗剤の改善された酵素熱安定性について、タンパク質物理的性質、この場合は正味のチャージの最適化の例である。

【0382】

変異体の熱安定性は前述のように評価した。S242QCC Lからの熱安定性の優れているものを表17-1に示す。熱安定性の優れている変異体は親（即ち、S242Q）残余活性に対する変異体の残余活性の比が1より大きなものであると定義した。図30は野生型に対するチャージラダーの関数としてのAmySチャージラダーの残余活性を示す。

50

このアッセイに用いた熱安定性は実施例 1 2 で説明した。図で証明されたように、野生型に対して過剰な陰性チャージ（- 1 2）又は陽性チャージ（+ 4）は熱安定性には有害である。このことは、液体洗濯用洗剤の酵素熱安定性改善するためのタンパク質物理的性質、この場合正味チャージの最適化の例である。

表 17-1: S242Q CCL 熱安定性の優秀な変異体

変異体#	97	319	358	443	変異体残余活性／ 野生型残余活性
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	1.12
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	1.12
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	1.36
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	1.16
15	Q97E	Q319R	Q358R		1.37
17	Q97E	Q319R		Q443R	1.29
18	Q97E	Q319R			1.11
27	Q97E				1.16
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	1.18
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	1.29
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	1.22
39	Q97R	Q319R	Q358E		1.21
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	1.20
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	1.26
42	Q97R	Q319R	Q358R		1.48
43	Q97R	Q319R		Q443E	1.21
44	Q97R	Q319R		Q443R	1.21
45	Q97R	Q319R			1.14
50	Q97R		Q358R	Q443R	1.14
62		Q319E		Q443R	1.26
63		Q319E			1.18
64		Q319R	Q358E	Q443E	1.19
65		Q319R	Q358E	Q443R	1.28
68		Q319R	Q358R	Q443R	1.14
70		Q319R		Q443E	1.22
73			Q358E	Q443E	1.15
74			Q358E	Q443R	1.15
75			Q358E		1.18

実施例 18

酵素性能

【0383】

この実施例は酵素性能がチャージにより影響されることを示す。酵素性能は実施例 12 で説明したように、熱失活させた洗剤を用いて評価した。好適な変異体は性能インデックス (PI) が 1 より大きなものであると定義した。PI は親 (即ち、S242Q) の残余活性に対する変異体残余活性の比である。結果を表 18-1 及び 18-2 に示した。

Variant #	97	319	358	443	変異体残余活性／ 野生型残余活性
27	Q97E				1.16
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	1.18
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	1.29
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	1.22
39	Q97R	Q319R	Q358E		1.21
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	1.20
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	1.26
42	Q97R	Q319R	Q358R		1.48
43	Q97R	Q319R		Q443E	1.21
44	Q97R	Q319R		Q443R	1.21
45	Q97R	Q319R			1.14
50	Q97R		Q358R	Q443R	1.14
62		Q319E		Q443R	1.26
63		Q319E			1.18
64		Q319R	Q358E	Q443E	1.19
65		Q319R	Q358E	Q443R	1.28
68		Q319R	Q358R	Q443R	1.14
70		Q319R		Q443E	1.22
73			Q358E	Q443E	1.15
74			Q358E	Q443R	1.15
75			Q358E		1.18

(表 18-1)

表 18-1: S242Q CCL - CS-28 コメデンブンマイクロスウォッチ試験の成績良好な変異体,
Tide 2x (実施例 1 2 の北米洗浄条件)

変異体#	97	319	358	443	rel charge	PI
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	1.44
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	1.32
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	1.40
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1.33
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1.40
18	Q97E	Q319R			0	1.41
20	Q97E		Q358E	Q443R	-1	1.15
23	Q97E		Q358R	Q443R	1	1.21
25	Q97E			Q443E	-2	1.18
26	Q97E			Q443R	0	1.25

10

(表 1 8 - 1)

変異体#	97	319	358	443	rel charge	PI
27	Q97E				-1	1.16
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	2.32
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	2.54
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	2.93
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	2.27
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	2.28
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	2.34
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	2.31
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	2.31
36	Q97R	Q319E			0	2.14
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	1.93
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	1.85
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	2.14
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	1.92
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	1.37
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	1.61
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	1.90
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	1.64
45	Q97R	Q319R			2	1.99
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	1.40
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	1.29
48	Q97R		Q358E		0	1.60
49	Q97R		Q358R	Q443E	1	1.57
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	1.38
51	Q97R		Q358R		2	1.37
52	Q97R			Q443E	0	1.51
54	Q97R				1	1.51
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	1.14
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	1.38
57		Q319E	Q358E		-2	1.10
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	1.25
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	1.41
60		Q319E	Q358R		0	1.49
61		Q319E		Q443E	-2	1.16
62		Q319E		Q443R	0	1.45
63		Q319E			-1	1.28
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1.12
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	1.19
66		Q319R	Q358E		0	1.36
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1.24
69		Q319R	Q358R		2	1.19
70		Q319R		Q443E	0	1.29
76			Q358R	Q443E	0	1.22
78			Q358R		1	1.25
79				Q443E	-1	1.24
80				Q443R	1	1.17

表 18-2: S242Q CCL - CS-28 コメデンプンマイクロスウォッチ試験の成績良好な変異体,
Persil (西ヨーロッパ洗浄条件)

変異体 #	97	319	358	443	rel charge	PI
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1.41
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1.94
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1.61
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0	1.39
6	Q97E	Q319E	Q358R		-1	2.04
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	2.05
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1.84
9	Q97E	Q319E			-2	2.27
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1.35
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	1.45
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	1.17
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	1.22
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1.26
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1.29
18	Q97E	Q319R			0	1.76
26	Q97E			Q443R	0	1.36
27	Q97E				-1	1.31
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	2.21
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	1.96
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	1.94
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	2.11
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	1.87
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	2.41
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	2.20
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	2.21
36	Q97R	Q319E			0	2.07
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	1.86
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	1.83
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	1.99
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	1.85
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	1.36
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	1.90
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	1.99
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	1.94
45	Q97R	Q319R			2	1.75
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	1.71
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	1.39
48	Q97R		Q358E		0	1.85
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	1.24
51	Q97R		Q358R		2	1.36
52	Q97R			Q443E	0	1.25
54	Q97R				1	1.88
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	1.12

(表 18 - 2)

変異体 #	97	319	358	443	rel charge	PI
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	1.17
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	1.16
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	1.25
60		Q319E	Q358R		0	1.50
63		Q319E			-1	1.36
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1.10
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	1.18
66		Q319R	Q358E		0	1.25
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1.29
70		Q319R		Q443E	0	1.15

10

(表 18-2)

【0384】

活性を本明細書で説明したBODIPYデンプン加水分解アッセイを用いても評価した。結果を表18-3に示す。このデンプン基質（コーンスターチ）に対する相対的特異活性が1よりおおきなものはS242Q親株よりも高い特異活性を有する変異体である。相対的ppmを親に対する変異体の発現力価であり、1より大きなものはS242Q親株よりも高い力価（振とうチューブ内）を示す。

20

表 18-3: S242Q CCL-力価及び／又は BODIPY-デンプン試験の成績良好な変異体

変異体#	97	319	358	443	チャー ジ	Rel ppm	Rel Sp act
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1.27	1.29
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1.19	1.31
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1.00	1.43
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1.23	1.43
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0	0.94	1.78
6	Q97E	Q319E	Q358R		-1	0.89	1.81
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	1.40	1.41
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1.12	1.58
9	Q97E	Q319E			-2	1.09	1.56
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1.45	1.32
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1.32	1.49
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1.58	1.27
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	0.65	1.44
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	0.66	1.65
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	0.80	1.64
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1.09	1.51
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1.00	1.42
18	Q97E	Q319R			0	0.87	1.78
19	Q97E		Q358E	Q443E	-3	1.22	0.88
21	Q97E		Q358E		-2	1.12	0.88
22	Q97E		Q358R	Q443E	-1	0.91	1.16
23	Q97E		Q358R	Q443R	1	0.78	1.25
24	Q97E		Q358R		0	1.08	1.14
25	Q97E			Q443E	-2	1.12	1.00

(表 18-3)

10

20

30

変異体#	97	319	358	443	チャー ジ	Rel ppm	Rel Sp act
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	0.78	1.87
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	0.80	1.81
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	0.68	2.21
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	0.68	1.96
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	0.70	2.05
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	0.60	2.27
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	0.65	2.25
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	0.70	2.15
36	Q97R	Q319E			0	0.73	2.23
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	0.93	2.11
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	0.65	2.21
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	0.82	2.22
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	0.74	2.28
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	0.55	2.09
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	0.67	2.48
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	0.84	2.35
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	0.73	2.41
45	Q97R	Q319R			2	0.76	2.45
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	0.79	1.45
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	0.75	1.42
48	Q97R		Q358E		0	0.82	1.46
49	Q97R		Q358R	Q443E	1	0.67	1.69
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	0.60	1.60
51	Q97R		Q358R		2	0.64	1.29
52	Q97R			Q443E	0	0.83	1.43
54	Q97R				1	0.72	1.49
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	0.99	1.15
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	0.77	1.40
57		Q319E	Q358E		-2	0.83	1.34
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	0.73	1.49
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	0.67	1.61
60		Q319E	Q358R		0	0.80	1.67
61		Q319E		Q443E	-2	0.91	1.39
62		Q319E		Q443R	0	0.73	1.45
63		Q319E			-1	0.75	1.41
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1.05	1.28
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	0.94	1.42
66		Q319R	Q358E		0	0.96	1.39
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1.02	1.50
68		Q319R	Q358R	Q443R	3	0.71	1.57
69		Q319R	Q358R		2	0.71	1.58
70		Q319R		Q443E	0	0.91	1.49
72		Q319R			1	0.95	1.56
77			Q358R	Q443R	2	0.67	1.22
78			Q358R		1	0.66	1.15

実施例 19アミラーゼ活性及び発現におけるバランス変異効果

【0385】

この実施例は、2つの矛盾する酵素の性質が変異アミノ酸置換の導入により同時に最適化されることを示す。

【0386】

これまで説明してきたように、陽性チャージを増加させるとAmyS-242平均的発現が減少した。しかしながら、特定のBODIPYデンプン加水分解は要請チャージが増加すると増加した。高められた組換えアミラーゼ発現及びデンプン加水分解は燃料エタノール工業におけるデンプン液化又は所望の洗剤製品における洗浄に好適なAmyS242Qの変異体の改良に好ましい。これまで説明してきたように、本発明の方法を用いると、選択された1部位変異の組み合わせにより、デンプン加水分解に妥協することなく、より高いアミラーゼ変異体を生成することが可能になる。本発明の戦略は第一性質（例えば、主要な性質としての発現）において改善を有し、第二性質（例えば、第二性質としてデンプン加水分解）を改善又は損なわずに、複数置換されたAmyS242Q変異体の生成及び選択に用いた。

10

【0387】

更に、AmyS242Qheの平均発現とは反対に、コーンスターチマイクロスウォッチ洗浄が陽性チャージが高くなるにつれて向上した。高められた組換えアミラーゼ発現及び洗浄性能はAmyS242Qの修飾された変異体において望ましい。しかしながら、これらの性質も明らかに矛盾した性質である。本発明についてこれまで説明してきたように、本発明の方法を用いて、1部位変異の組み合わせを選択することにより、洗浄性能を犠牲にすることなく、より高いアミラーゼ変異体を発現させることができる。本明細書に説明した戦略は第二性質（例えば、第二性質として、コメデンプンマイクロスウォッチ洗浄性能）を改善しつつ又は犠牲にすることなく、第一性質（例えば、第一性質としての発現）における改善を有する複数置換されたAmyS-242Q変異体を生成及び選択に使用される。

20

表 19-1. AmyS-S242Q 発現及び BODIPY-デンプン加水分解の成績良好な変異体

変異体	97	319	358	443	チャージ	発現 (PI)	BODIPY (PI)
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1.27	1.29
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1.19	1.31
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1.00	1.43
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1.23	1.43
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	1.40	1.41
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1.12	1.58
9	Q97E	Q319E			-2	1.09	1.56
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1.45	1.32
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1.32	1.49
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1.58	1.27
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1.09	1.51
17	Q97E	Q319R		Q443R	+1	1.00	1.42
24	Q97E		Q358R		0	1.08	1.14
25	Q97E			Q443E	-2	1.12	1.00
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1.05	1.28
67		Q319R	Q358R	Q443E	+1	1.02	1.50

表 19-1. AmyS-S242Q 発現及び BODIPY-デンプン加水分解の成績良好な変異体

変異体	97	319	358	443	チャージ	発現	CS-28
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1.27	1.01
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1.32	1.18
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1.58	1.13
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1.09	1.43
17	Q97E	Q319R		Q443R	+1	1.00	1.55
24	Q97E		Q358R		0	1.08	1.15
25	Q97E			Q443E	-2	1.12	1.09
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1.05	1.18
67		Q319R	Q358R	Q443E	+1	1.02	1.15

【 0 3 8 8 】

特に、1つ乃至4つのチャージされた残基の組み合わせを有する変異体を含む、80メンバーのAmyS-S242Qチャージ組み合わせライブラリー(CCL)を振とうフラスコ発現、BODIPYデンプン加水分解、及びコメデンプン洗浄活性について試験した。成績のよいAmyS-S242Q変異体を表19-1及び19-2に示す。重要なことは、表19-1の複数置換をした変異体は親酵素と比較して、同じか又は改善された発現及び同じか又は改善されたBODIPYデンプン加水分解を有している。同様に、表19-2の複数置換の変異体は、親酵素と比較して、同じか又は改善された発現、又は同じか又は改善されたコメデンプン洗浄活性を示した。

【0389】

まとめると、酵素活性及び酵素生成は異なるチャージ依存性を有することから（図27A、27B、28A、及び28B）、これらは負の相関を有する（図26A及び26B参照）。しかしながら、発現及び活性の両方が改善された多くの変異体があり、これらを解析して同定した。

【0390】

アミラーゼを用いて説明してきたけれども、この方法はプロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、トランスフェラーゼ、及びペクチナーゼ等の他の酵素のクラスにも適用することができる。更に、発現、活性、結合、熱安定性、界面活性剤及びキレート安定性等の2つ以上の性質の任意の組み合わせを同時に解析することができる。

10

実施例20

マイクロスウォッチ洗浄及びデンプン加水分解

【0391】

酵素性能は前述のように熱失活させた洗剤を用いて評価した。アッセイは実施例12で説明するように行った（試験アミラーゼのためのコメデンプンマイクロスウォッチアッセイ及びアミラーゼ活性の決定のためのBodipy-デンプンアッセイを参照）。良好な結果の変異体は1より大きな性能インデックス（PI）を有するものであると定義する。PIは野生型残余活性に対する変異体残余活性の比である。表20-1はチャージ変化スコア（ Δ CHRG）と比較したときの、野生型（ Δ EG<0）野生型よりも良好なAmyS変異体についての計算を示す。チャージ変化、Kyte-Doolittle、Eisenberg及び水素結合は、2008年6月6日に出版されたWO2008/15925に記載されている。更に、表20-1はKyte-Doolittle hydrophobicity（ Δ K-D）及びEisenberg hydrophobicity スケール（ Δ E）の結果も示す。表20-1は水素結合（ Δ HB）の値も示す。-2のスコアは水素結合能力の損失を意味する。表20-1は5分、10分、及び60分におけるコーン粉加水分解について、pH4.0及び5.8（pH4、pH5.8）におけるDP7基質における活性、pH8.6及び10（Clean8及びClean10）コメデンプン洗浄能力、及びバチルススブチリス（EXP）におけるタンパク質発現の野生型よりも良い結果であるAmyS変異体についての計算を示す。活性におけるチャージの影響は発現に対するチャージの影響とは反対であった。水素結合及び加水分解も、これらの性質に統計的に有意な影響を示した。明らかに、チャージ及び加水分解等アミノ酸置換体の性質はバチルススブチリス及びE.coliでの発現レベル並びにタンパク質の基本的活性及び安定性に影響を与えた。

20

30

表 20-1. 各種性質についての AmyS Quintiles の結果							
AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e
CF5 Δ AG		CF5 Δ AG		CF5 Δ AG		CF5 Δ AG	
Δ CHRG -2	1.60	Δ HB -2	0.84	Δ K-D -2	1.12	Δ E -2	1.13
Δ CHRG -1	1.29	Δ HB -1	0.98	Δ K-D -1	1.19	Δ E -1	1.09
Δ CHRG 0	0.97	Δ HB 0	1.02	Δ K-D 0	0.83	Δ E 0	1.05

40

(表 20-1)

表 20-1. 各種性質についての AmyS Quintiles の結果

Δ CHRG +1	0.84	Δ HB +1	0.92	Δ K-D +1	1.15	Δ E +1	0.89
Δ CHRG +2	0.56	Δ HB +2	1.19	Δ K-D +2	0.77	Δ E +2	1.12
CF10 $\Delta\Delta$ G		CF10 $\Delta\Delta$ G		CF10 $\Delta\Delta$ G		CF10 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.66	Δ HB -2	0.86	Δ K-D -2	1.10	Δ E -2	1.26
Δ CHRG -1	1.18	Δ HB -1	1.00	Δ K-D -1	1.15	Δ E -1	1.04
Δ CHRG 0	0.97	Δ HB 0	1.02	Δ K-D 0	0.86	Δ E 0	1.08
Δ CHRG +1	0.91	Δ HB +1	0.97	Δ K-D +1	1.12	Δ E +1	0.90
Δ CHRG +2	0.77	Δ HB +2	1.12	Δ K-D +2	0.82	Δ E +2	1.16
CF60 $\Delta\Delta$ G		CF60 $\Delta\Delta$ G		CF60 $\Delta\Delta$ G		CF60 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.46	Δ HB -2	1.00	Δ K-D -2	0.94	Δ E -2	0.98
Δ CHRG -1	1.33	Δ HB -1	0.96	Δ K-D -1	1.15	Δ E -1	1.01
Δ CHRG 0	0.96	Δ HB 0	1.01	Δ K-D 0	0.79	Δ E 0	1.05
Δ CHRG +1	0.84	Δ HB +1	0.95	Δ K-D +1	1.16	Δ E +1	0.94
Δ CHRG +2	0.82	Δ HB +2	1.05	Δ K-D +2	0.89	Δ E +2	1.54
pH4 $\Delta\Delta$ G		pH4 $\Delta\Delta$ G		pH4 $\Delta\Delta$ G		pH4 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.63	Δ HB -2	0.91	Δ K-D -2	1.29	Δ E -2	1.07
Δ CHRG -1	1.28	Δ HB -1	0.89	Δ K-D -1	1.19	Δ E -1	1.13
Δ CHRG 0	0.96	Δ HB 0	0.97	Δ K-D 0	0.72	Δ E 0	1.01
Δ CHRG +1	0.88	Δ HB +1	0.93	Δ K-D +1	1.12	Δ E +1	0.89
Δ CHRG +2	0.19	Δ HB +2	1.26	Δ K-D +2	0.86	Δ E +2	0.95
pH5.8 $\Delta\Delta$ G		pH5.8 $\Delta\Delta$ G		pH5.8 $\Delta\Delta$ G		pH5.8 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.66	Δ HB -2	0.99	Δ K-D -2	1.00	Δ E -2	1.23
Δ CHRG -1	1.26	Δ HB -1	0.99	Δ K-D -1	1.17	Δ E -1	1.06
Δ CHRG 0	0.95	Δ HB 0	0.95	Δ K-D 0	0.80	Δ E 0	0.99
Δ CHRG +1	0.94	Δ HB +1	0.90	Δ K-D +1	1.08	Δ E +1	0.94
Δ CHRG +2	0.83	Δ HB +2	1.15	Δ K-D +2	0.92	Δ E +2	1.16
Clean8 $\Delta\Delta$ G		Clean8 $\Delta\Delta$ G		Clean8 $\Delta\Delta$ G		Clean8 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.34	Δ HB -2	1.07	Δ K-D -2	0.89	Δ E -2	0.88
Δ CHRG -1	1.22	Δ HB -1	1.02	Δ K-D -1	1.10	Δ E -1	0.98
Δ CHRG 0	0.96	Δ HB 0	0.96	Δ K-D 0	0.83	Δ E 0	1.00
Δ CHRG +1	0.94	Δ HB +1	0.90	Δ K-D +1	1.07	Δ E +1	1.01
Δ CHRG +2	0.62	Δ HB +2	1.05	Δ K-D +2	1.02	Δ E +2	1.32
Clean10 $\Delta\Delta$ G		Clean10 $\Delta\Delta$ G		Clean10 $\Delta\Delta$ G		Clean10 $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	1.32	Δ HB -2	0.86	Δ K-D -2	1.03	Δ E -2	0.81
Δ CHRG -1	1.43	Δ HB -1	1.36	Δ K-D -1	1.11	Δ E -1	1.03
Δ CHRG 0	0.92	Δ HB 0	0.72	Δ K-D 0	0.80	Δ E 0	1.00
Δ CHRG +1	0.88	Δ HB +1	1.07	Δ K-D +1	1.16	Δ E +1	0.97
Δ CHRG +2	0.74	Δ HB +2	1.11	Δ K-D +2	0.91	Δ E +2	1.48
EXP $\Delta\Delta$ G		EXP $\Delta\Delta$ G		EXP $\Delta\Delta$ G		EXP $\Delta\Delta$ G	
Δ CHRG -2	0.00	Δ HB -2	0.63	Δ K-D -2	0.65	Δ E -2	0.71
Δ CHRG -1	0.35	Δ HB -1	0.91	Δ K-D -1	1.11	Δ E -1	1.29
Δ CHRG 0	1.08	Δ HB 0	0.95	Δ K-D 0	1.49	Δ E 0	1.06
Δ CHRG +1	1.35	Δ HB +1	1.39	Δ K-D +1	0.77	Δ E +1	0.79
Δ CHRG +2	1.64	Δ HB +2	1.16	Δ K-D +2	0.72	Δ E +2	0.20

(表 20-1)

実施例 21

酵素の pH-活性プロファイルの調整

【0392】

この実施例は所与の反応のための酵素の pH-活性プロファイルを最適化するための表面チャージへの使用を説明する。図 31A は実施例 15 の第一 AmyS チャージラダーについての pH の関数としてのコメデンブンマイクロスウォッチ洗浄活性を示す。3.0 乃

10

20

30

40

50

至4.25の範囲のpHは0.01% Tween-80を含む200mMギ酸ナトリウムで調整し、4.25乃至5.5のpH範囲は0.1% Tween-80を含む200mM酢酸ナトリウムで調整した。データをそれぞれが1つのpKa値を有する滴定曲線に当てはめた。図31Bは実施例15の第一AmySチャージラダーについてのチャージ変化の関数としてのAmyS触媒についての明らかなpKaを示す。これらのデータはαアミラーゼについてのpH-活性プロファイルは200mM緩衝液の中でさえ、表面チャージ変異体により有意にシフトすることができることを示している。このことは、非常に低イオン強度のスブチリシン(Russellら(1987) J. Mol. Biol. 193: 803-13)及びD-キシロールイソメラーゼ(Chara(1998) Mol. Cell. 11: 374-82)では報告されているけれども、本発明はαアミラーゼにおいて、
驚くべきことに高いイオン強度でも、達成できることを始めて証明した。

10

実施例22

AmySスーパースクリーン

【0393】

以下のアッセイを以下の実施例で用いた。以下に提供するプロトコルからの任意の偏差がこの実施例において示されている。これらの試験において、96ウェル分光光度計を用いて組成物の反応の後に形成された生成物の吸光度を測定した。

特異活性決定及び熱安定性のためのデンブン加水分解アッセイ

【0394】

コーン粉に対するαアミラーゼ活性アッセイを用いてバチルススブチリスAmyS及びAmyS変異体の特異活性及び安定性を測定した。活性はPAHBAH(p-ヒドラジドニトロヒドロキシ安息香酸)法によるコーン粉の酵素分解により精製する還元糖として決定された。安定性は85℃における持続活性により評価した。

20

【0395】

設備: PCRプレートアダプターを備えたInheco Variomag Telshake 95、Thermo Electron Multidrop、Axygen PCR-96-FS-CフルスカートPCRプレート、最小で4つの96ウェルブロックを備えたサーモサイクラー(an MJ Research Tetrad)、Biomek FX液体ハンドラー

【0396】

デンブン加水分解: 液体ハンドリング目的にシフトされた、アジアーファームズ有機コーン粉(Azure Farms Organic Corn Flour)を600未満ミクロン分画を入手し、4時間80℃で焼成し、室温で一晩平衡化した。2%(w/w)懸濁液を500g及び1000gバッチ中で調製した。この懸濁液を激しく攪拌して、pH調整及びpH平衡化を連続的に行い、ビーカーからPCRプレートに移した。23g予備焼成したコーン粉及び977gの脱イオン水で1000gとし、15分間攪拌して、H2SO4でpHを5.8にして、30分間平衡化した。必要に応じて最終的なpH調整を行った。8チャンネルのチップを装着したピペットを約1.5mmの好適なサイズに合わせて、懸濁液をAxygen PCRプレートに移した。

30

【0397】

AmyS及びAmyS変異体の培養上清を希釈緩衝液(水+0.005% Tween-80)で約1µg/mlに希釈して、10µLの希釈した各上清を5分、10分、及び60分反応プレートに移して、サンプルをピペットを用いて上下させて1度混合した。50µLの形質ミネラルオイルのアリコートを各ウェルに移した。プレートを85℃に予備加熱したInhecoユニットに移した。インキュベーションの後決められた時間で(5、10、及び60分)で、各ウェルに10µLの4N NaOHを添加して、反応を停止させた。デンブン加水分解反応生成物をPAHBAHアッセイにより解析した。

40

【0398】

PAHBAHアッセイ: 80µLの0.5N NaOHのアリコートを空のPCRプレートの全てのウェルに添加し、次いで20µLのPAHBAH試薬(5% w/vのp-ヒド

50

ラジドニトロヒドロキシ安息香酸) (PAHBAH, シグマ #H9882, 0.5NHCl中に溶解) を添加し、ピペットで内容物を上下させて混合した (PAHBAH反応プレート)。全てのプレートを密閉して、95℃2分その後20℃で冷却するように設定された熱サイクラー中に置いた。発色したPAHBAH反応混合物の80μLのサンプルを新しいプレート (リードプレート) に移し、吸光度を分光光度計において、405nmで測定した。

汚れ除去性能のためのスウォッチ洗浄アッセイ

【0399】

このアッセイにおいて、バチルススブチリスAmyS及びAmyS変異体の汚れ除去性能をCS-28コメデデンブンで汚れたマイクロスウォッチを用いてマイクロタイタープレートスケールで行った。直径1/4"マイクロスウォッチをCFT Vlaardingen (Netherlands) より入手した。2つのマイクロスウォッチを96マイクロタイタープレートの各ウェルに置いた。

10

【0400】

ろ過した培養ブロスサンプルを10mMNaCl、0.1mM CaCl_2 、0.005%Tween-80の混合物で20倍希釈してこの性能試験の所望の最終濃度にして試験を行った (試験に用いる最終濃度は0.0025乃至0.10ppm)。

【0401】

アミラーゼ性能はpH8及びpH10の両方で測定した。

【0402】

190μLの25mMHEPES (シグマ、H7523)、2mM CaCl_2 、0.005%Tween-80を含む緩衝液190μL、pH8.0又は190μLの25mMCAPS (シグマ、C2632)、2mM CaCl_2 、0.005%Tween-80を含む緩衝液190μL、pH10.0いずれかをマイクロスウォッチを含むプレートの各ウェルに添加した。10μLの希釈したアミラーゼサンプルをマイクロスウォッチを含むウェルに添加した (総容量は200μL/ウェル)。このプレートをプレートシールで覆って、1150rpmで攪拌しながら、40℃に維持しているインキュベーター中に60分置いた。好適な条件下でのインキュベーションの後、100μLの各ウェルからの溶液を除去し、新しいマイクロタイタープレートに移し、分光光度計で488nmの吸光度を測定した。1ウェル当たり2つのマイクロスウォッチ及び洗剤を含むが、酵素サンプルを含まない「ブランクカラム」もこの試験でインキュベーションした。

20

30

【0403】

CS-28コメデデンブンか性能の計算：得られた吸光度の値を (酵素なしでインキュベーションしたマイクロスウォッチ) ブランクの値で補正した。得られた吸光度 $-\Delta OD_{488}$ をデンブン分解活性について測定した。各サンプルについて (AmyS又はAmyS変異体)、性能インデックスを野生型酵素の活性で変異体の活性を割って計算した。同じタンパク質濃度で変異体の性能 (実際の値) 及び標準的なAmyS対照酵素 (理論的値) の性能インデックスを比較した。

【0404】

1より大きい (PI>1) 性能インデックス (PI) はより良い変異体 (標準、例えば、野生型と比較して) を示す。1のPI (PI=1) は標準と同じ性能の変異体である。1より低いPI (PI<1) は標準より劣る性能の変異体である。従って、PIは野生型とは異なる性能を有する変異体を同定した。

40

【0405】

以下の部位変異はこの実施例で評価された。

P17A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
D19A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
T21A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
N28A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
S51A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
G72A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
V74A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
A82A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
Q86A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
Q89A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
A93A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
W115D, E, F, G, K, L, N, P, Q, R, S, V, Y
D117A, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

10

20

P123A, D, E, G, K, L, M, P, Q, R, S, T, V
S124A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, Y
D125A, D, E, G, K, M, Q, R, S, T, V
N127A, C, D, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
I130A, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
G132A, C, D, E, F, G, H, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y 10
Q135A, F, G, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, Y
P145A, D, E, F, H, I, K, L, N, P, R, S, T, V, Y
G146A, C, D, E, G, H, K, L, P, R, S, T, V, W
G148A, C, D, E, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
S153A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
Y159A, C, D, E, F, G, H, K, L, N, R, S, T, V, W 20
W166C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, T, V, Y
S169A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, Y
K171C, D, E, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
R179A, G, H, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
G180A, C, D, F, G, H, I, K, L, N, P, R, S, T, V, Y
I181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, P, R, S, T, V, Y
G182A, C, D, E, F, G, H, K, L, P, R, S, T, V, Y 30
K183A, C, E, F, G, H, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y
W187A, C, E, G, I, K, L, N, P, Q, R, S, V, W
G194A, E, G, H, K, L, M, P, R, S, T, V, W
P209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
N224A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
S242A, C, D, G, I, K, L, M, Q, R, S, T, V 40
P245A, C, D, E, F, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y
G256A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W
D269A, C, D, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y
N271A, D, F, H, I, K, L, M, N, P, S, T, V, W, Y
T278A, E, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, W, Y

N281A, D, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y
G302C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
A304A, D, E, F, H, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
R308A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
T321A, C, F, H, I, L, P, Q, R, S, T, V, Y
Q358A, C, D, E, F, G, H, L, M, N, P, Q, R, S, T, V
P378C, D, F, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V, Y
S382A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W
K383A, C, D, E, F, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
T398A, C, D, E, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V
H405A, C, D, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
T417A, D, E, H, I, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
E418A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y
P420A, C, D, E, H, I, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
G421A, D, E, F, G, H, I, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
P432A, D, E, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, Y
W437C, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
Q443A, C, F, G, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
G446A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
G454A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V
S457A, C, D, E, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
T459A, D, G, I, K, L, Q, R, S, T, V, Y
T461A, D, E, F, G, I, K, L, N, P, R, S, T, V, W, Y
S464D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, V, W, Y
G474A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V
R483A, C, F, G, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, Y

10

20

30

40

Amy S 変異体の性能

【0406】

Amy S 変異体の性能（例えば、実施例 22 で説明したような）をタンパク質発現（発現）、10 分間でのコーン粉加水分解（コーン粉 10）、又は 60 分間でのコーン粉加水分解（コーン粉 60）、pH 4 での DP7 基質における活性（DP7 pH 4）又は pH 5.8 での DP7 基質における活性（DP7 pH 5.8）、pH 8 での CS28 コメデンプンマイクロスウォッチ洗浄（クリーニング 8）又は pH 10 での CS28 コメデンプンマイクロスウォッチ洗浄（クリーニング 10）について試験した。結果を表 23-1 に示す。タンパク質発現は実施例 12 で説明したブラッドフォードアッセイで測定した。コーン粉加水分解及びスウォッチ洗浄アッセイは実施例 22 で説明したように測定した。Amy S 変異体の機能性を性能インデックス（Pi）（即ち、野生型 Amy S に対する変異体の性能の比）で定量化した。各種性質について、 $PI > 1$ はこの性質について変異体が改善されていることを示す。ND は得られた値がアッセイの範囲外であることを示す。

表 23-1: AmyS 変異体の性能

位置	変異体	コーン 粉 10	コーン 粉 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5.8	洗浄能 力 pH 8	洗浄能 力 pH 10	発現
017	P017A	1.08	1.07	1.13	1.32	1.35	1.04	0.58
017	P017C	1.38	1.46	1.20	1.41	1.47	1.29	0.50
017	P017D	1.30	1.30	1.02	1.24	1.33	1.10	0.58
017	P017E	1.07	1.20	1.03	1.18	1.29	1.04	0.70
017	P017F	0.95	1.10	0.84	0.95	1.37	0.83	0.59
017	P017G	0.90	0.83	0.83	0.90	1.04	0.84	0.88
017	P017H	0.91	0.84	1.03	1.03	1.07	0.86	0.96
017	P017I	0.78	0.83	0.79	0.91	0.83	0.77	0.87
017	P017K	0.88	0.64	0.83	0.96	1.11	0.88	0.90
017	P017L	0.69	0.64	0.44	0.32	0.91	0.92	0.67
017	P017M	1.19	1.46	1.13	1.32	1.58	0.83	0.50
017	P017N	1.05	1.16	1.13	1.30	1.14	0.81	0.70
017	P017Q	1.24	1.31	1.19	1.21	1.09	0.90	0.73
017	P017R	1.21	1.23	0.93	1.13	1.40	1.01	0.71
017	P017S	0.97	0.85	0.78	0.84	1.00	0.87	0.76
017	P017T	0.81	0.91	0.68	0.75	1.12	0.73	0.76
017	P017V	0.79	0.79	0.70	0.75	0.94	0.82	0.81
017	P017W	0.81	0.77	0.70	0.82	0.89	0.77	0.75
017	P017Y	0.75	0.79	0.98	0.97	1.01	0.95	0.96
019	D019A	1.50	1.69	1.29	1.55	2.01	1.42	0.48
019	D019C	1.34	1.49	1.29	1.47	1.59	1.25	0.51
019	D019E	1.39	1.38	1.41	1.48	1.69	1.40	0.67
019	D019F	3.22	3.51	0.75	0.87	6.54	3.43	0.10
019	D019G	1.20	1.29	1.19	1.20	0.98	1.22	0.75
019	D019H	0.93	0.97	0.91	1.05	1.32	0.98	0.93
019	D019I	1.13	0.90	0.93	1.05	1.82	0.96	0.38
019	D019K	0.90	0.81	0.97	1.09	0.93	0.91	0.99
019	D019L	0.84	0.65	-0.65	-0.23	1.79	1.94	0.13
019	D019M	1.60	1.98	1.07	1.40	1.63	1.41	0.35
019	D019N	1.34	1.16	1.69	1.23	1.20	1.06	0.71
019	D019P	0.93	1.14	1.00	1.27	1.56	1.32	0.53
019	D019Q	1.35	1.24	1.94	1.65	1.31	1.20	0.74
019	D019R	1.02	1.05	0.94	1.03	1.44	1.12	0.80
019	D019S	1.03	1.12	1.08	1.12	1.09	0.89	0.95
019	D019T	1.04	1.06	1.07	1.11	1.22	0.89	0.97
019	D019V	1.05	1.28	1.07	1.27	2.16	1.52	0.36
019	D019W	0.64	0.93	0.52	0.71	1.24	0.81	0.56
019	D019Y	0.98	1.10	1.43	1.32	1.34	1.03	0.69
021	T021A	1.25	1.34	1.36	1.50	1.41	1.19	0.75
021	T021C	1.59	1.73	1.42	1.58	1.79	1.26	0.49
021	T021D	1.23	1.39	1.63	1.54	1.48	1.27	0.78
021	T021E	1.32	1.35	1.53	1.59	1.48	1.05	0.72
021	T021F	1.26	1.36	1.66	1.48	1.42	1.11	0.71
021	T021G	1.11	1.14	1.35	1.29	1.24	1.05	0.91
021	T021H	0.87	0.85	0.95	0.98	1.08	0.86	1.10

(表 23-1)

021	T021H	1.04	1.04	1.31	1.31	1.57	1.14	0.71
021	T021K	0.89	0.88	1.02	1.07	1.02	1.01	1.07
021	T021L	0.80	0.92	1.33	1.20	1.08	0.88	0.89
021	T021M	1.37	1.40	1.34	1.55	1.48	1.34	0.75
021	T021N	1.36	1.42	1.28	1.47	1.23	1.16	0.75
021	T021P	1.13	1.25	1.14	1.27	1.30	1.20	0.82
021	T021Q	1.32	1.42	1.50	1.55	1.33	1.20	0.79
021	T021R	1.17	1.26	1.14	1.21	1.23	1.11	0.86
021	T021S	1.08	1.28	1.09	1.17	1.12	0.97	0.91
021	T021V	1.10	1.19	1.12	1.24	1.35	0.95	0.73
021	T021W	0.98	1.01	0.91	0.95	1.17	1.11	0.75
021	T021Y	0.81	0.89	1.02	1.07	1.03	0.62	0.87
028	N028A	1.28	1.51	1.24	1.42	1.64	1.39	0.74
028	N028C	-0.92	-2.93	1.18	0.31	1.18	2.17	-0.05
028	N028D	1.29	1.39	1.69	1.63	1.37	1.23	0.77
028	N028E	1.26	1.36	1.21	1.38	1.21	1.06	0.79
028	N028F	1.29	1.34	1.16	1.35	1.48	1.26	0.54
028	N028G	0.98	1.05	0.99	1.08	0.98	0.81	1.06
028	N028H	0.98	1.09	1.06	1.18	1.20	1.01	0.94
028	N028I	0.88	1.02	0.86	0.97	1.17	0.87	0.71
028	N028K	0.93	0.95	1.01	1.09	0.84	0.94	0.98
028	N028L	0.79	1.00	0.91	1.02	1.11	0.87	0.74
028	N028M	1.48	1.67	1.62	1.79	2.01	1.57	0.53
028	N028P	1.47	1.60	2.00	2.47	1.89	1.47	0.48
028	N028Q	1.19	1.23	1.01	1.18	1.20	1.24	0.75
028	N028R	1.11	1.07	1.10	1.27	1.38	1.10	0.80
028	N028S	1.11	1.23	0.98	1.08	1.03	0.94	0.91
028	N028T	1.13	1.22	1.07	1.21	1.22	0.99	0.84
028	N028V	0.98	0.97	1.12	1.13	1.35	0.90	0.75
028	N028W	1.00	1.05	0.92	1.08	1.25	0.92	0.65
028	N028Y	0.92	1.00	0.87	0.88	1.13	0.76	0.86
051	S051A	1.01	0.99	1.39	1.21	1.11	1.14	0.97
051	S051C	0.96	1.01	1.06	1.36	0.91	0.51	0.80
051	S051D	0.94	1.00	1.34	1.42	0.95	1.07	0.97
051	S051E	0.71	0.64	1.10	1.25	0.79	1.02	1.11
051	S051F	0.96	0.93	1.04	1.29	1.06	1.06	0.89
051	S051G	0.83	0.77	0.81	0.82	0.80	1.09	1.24
051	S051H	0.74	0.70	0.56	0.86	0.93	0.99	1.20
051	S051I	0.75	0.73	0.80	0.83	0.82	0.74	1.18
051	S051K	0.62	0.58	0.54	0.67	0.68	0.82	1.39
051	S051L	0.71	0.72	0.85	0.88	0.74	0.83	1.41
051	S051M	0.97	1.00	1.24	1.26	1.11	1.01	0.94
051	S051N	1.04	1.05	0.99	1.02	0.64	1.02	0.96
051	S051P	0.81	0.79	0.31	1.23	1.22	0.78	0.75
051	S051Q	1.01	0.96	1.07	1.08	1.07	1.06	1.03
051	S051R	0.88	0.88	0.66	0.89	0.92	1.09	1.02
051	S051T	0.89	0.80	0.76	0.79	0.96	0.91	1.17
051	S051V	0.78	0.70	0.70	0.75	0.86	0.78	1.21
051	S051W	0.81	0.76	0.81	0.94	0.87	0.81	1.17
051	S051Y	0.70	0.76	0.98	0.96	0.83	0.93	1.16
072	G072A	1.53	1.40	1.25	1.36	1.46	1.46	0.65
072	G072C	1.53	1.39	1.52	1.68	1.40	1.20	0.61

10

20

30

40

072	G072D	1.36	1.38	1.69	1.72	1.36	1.59	0.78
072	G072E	0.13	0.59	0.75	0.39	-0.18	-0.75	-0.19
072	G072F	0.07	0.74	1.79	0.84	0.39	0.30	-0.07
072	G072H	0.97	0.96	0.95	1.09	1.05	1.11	0.98
072	G072I	12.27	18.04	-7.88	-5.43	-47.34	-40.91	0.00
072	G072K	0.20	-2.21	-4.25	-2.09	3.20	-0.46	0.04
072	G072L	0.21	-1.59	-3.13	-1.59	-0.59	-0.13	0.04
072	G072M	0.09	0.37	0.78	0.27	0.06	0.01	-0.16
072	G072N	-0.09	0.41	0.34	0.12	0.01	0.12	-0.17
072	G072P	-0.20	0.29	1.24	0.48	0.06	-0.23	-0.11
072	G072Q	1.68	1.60	1.60	1.66	1.62	1.60	0.68
072	G072R	1.23	1.19	0.83	1.05	1.06	1.42	0.80
072	G072S	0.77	-1.60	-0.59	2.54	0.70	8.99	-0.01
072	G072T	0.93	0.98	0.88	0.94	1.08	1.05	1.02
072	G072V	1.31	1.27	1.19	1.30	1.48	1.22	0.68
072	G072W	0.10	-0.61	-1.03	-0.54	0.41	-0.49	0.12
072	G072Y	1.11	1.01	1.28	1.31	1.21	1.01	0.84
074	V074A	1.43	1.43	1.55	1.54	1.43	1.38	0.79
074	V074C	0.05	0.20	0.77	0.33	-0.16	0.40	-0.19
074	V074D	-0.22	0.91	2.69	1.24	0.32	-0.58	-0.05
074	V074E	1.65	1.71	1.69	1.69	1.56	1.84	0.65
074	V074F	2.44	2.48	0.48	0.33	3.48	3.18	0.13
074	V074G	1.29	1.28	1.15	1.14	0.98	1.08	0.97
074	V074H	0.79	0.78	0.82	0.89	0.84	0.78	1.19
074	V074I	1.15	1.16	1.26	1.26	1.21	1.01	0.98
074	V074K	0.08	-0.61	-1.67	-0.73	1.78	0.54	0.07
074	V074L	0.77	-0.57	-2.18	-1.10	0.59	-1.43	0.07
074	V074M	-0.14	-0.19	1.02	0.48	0.45	-0.53	-0.13
074	V074N	-0.22	0.25	1.07	0.53	0.05	0.15	-0.13
074	V074Q	1.57	1.60	1.61	1.59	1.30	1.16	0.78
074	V074R	-0.93	-0.49	1.45	0.77	-0.63	-1.66	-0.08
074	V074S	-3.20	-3.28	-0.69	-1.93	-2.28	-5.92	0.05
074	V074T	7.70	-8.69	-7.16	-3.32	-0.73	-6.93	0.02
074	V074W	0.47	-0.38	-3.18	-1.38	0.49	0.72	0.04
074	V074Y	1.12	1.08	0.88	0.91	0.97	1.00	0.93
082	A082C	1.45	1.58	1.16	1.26	1.31	1.25	0.64
082	A082E	1.37	1.32	1.36	1.39	1.12	1.02	0.89
082	A082F	1.36	1.33	1.07	1.14	1.25	1.19	0.84
082	A082G	1.17	1.33	0.79	0.93	1.18	1.07	0.68
082	A082H	1.08	1.04	0.95	0.96	0.90	1.13	1.15
082	A082I	0.96	1.00	1.04	1.03	0.97	0.82	1.15
082	A082K	9.74	1.65	-13.38	-6.33	-9.02	35.95	0.01
082	A082L	1.00	0.96	0.94	0.99	0.82	0.84	1.08
082	A082M	-0.42	0.35	0.64	0.22	0.16	-0.23	-0.20
082	A082N	1.36	1.39	1.35	1.45	1.38	1.31	0.83
082	A082P	1.54	1.45	1.25	1.38	1.44	1.14	0.76
082	A082Q	-0.19	0.28	1.16	0.54	0.15	1.37	-0.12
082	A082R	1.17	1.17	1.29	1.34	1.42	1.45	0.99
082	A082S	1.02	1.07	0.92	1.01	0.90	0.86	1.06
082	A082T	1.08	1.08	0.99	1.06	1.00	1.32	1.02
082	A082V	0.98	1.08	0.97	1.05	1.02	0.90	1.02

10

20

30

40

082	A082W	1.16	1.16	0.83	0.99	1.08	0.97	0.96
082	A082Y	0.81	0.87	0.95	0.95	0.95	1.06	1.14
086	Q086A	1.00	1.11	1.43	1.46	1.25	1.02	0.83
086	Q086C	1.00	1.11	1.01	1.19	1.09	0.64	0.73
086	Q086D	0.96	1.03	1.22	1.29	1.11	0.99	0.87
086	Q086E	0.92	0.93	1.12	1.15	0.80	0.97	0.97
086	Q086F	0.26	-0.46	-3.07	-1.44	-0.60	-1.61	0.05
086	Q086G	0.21	1.02	-1.18	-0.54	-0.42	-2.55	0.12
086	Q086H	1.34	1.23	-1.23	-0.61	-2.15	-1.84	0.10
086	Q086I	0.84	0.85	0.88	0.95	0.85	0.81	0.99
086	Q086K	0.64	0.66	0.88	0.84	0.71	0.81	1.42
086	Q086L	0.71	0.71	0.78	0.80	0.71	0.70	1.24
086	Q086N	-4.91	-2.76	5.03	2.01	3.01	2.98	-0.02
086	Q086P	1.13	1.17	1.36	1.48	1.31	1.11	0.86
086	Q086R	-7.06	24.56	-23.74	-11.36	-12.19	-55.94	0.00
086	Q086S	0.44	1.09	-1.75	-0.70	-0.40	-2.57	0.08
086	Q086T	0.94	0.91	0.90	0.99	0.78	0.91	1.03
086	Q086V	0.88	0.89	0.85	0.91	0.81	0.71	0.93
086	Q086W	0.78	0.74	0.81	0.85	0.80	0.69	1.24
086	Q086Y	0.72	0.74	0.94	0.91	0.77	0.82	1.13
089	Q089A	0.33	-0.78	0.99	0.42	-0.25	3.87	-0.12
089	Q089C	-0.69	0.00	0.05	-0.23	-0.17	0.59	-0.11
089	Q089D	1.32	1.36	1.41	1.47	1.37	1.07	0.73
089	Q089E	-0.37	-0.82	0.68	0.35	0.65	1.13	-0.12
089	Q089F	1.56	1.48	1.17	1.25	1.54	1.00	0.44
089	Q089G	1.13	1.03	1.21	1.15	1.10	1.02	0.93
089	Q089H	1.82	1.91	0.35	0.65	1.10	1.61	0.17
089	Q089I	1.16	1.01	1.04	1.10	1.15	0.90	0.77
089	Q089K	0.85	0.87	1.20	1.06	1.11	0.87	1.10
089	Q089L	0.95	0.94	0.97	0.98	0.72	0.77	0.86
089	Q089M	1.29	1.21	1.53	1.56	1.40	1.16	0.64
089	Q089N	1.40	1.30	1.64	1.67	1.56	1.26	0.71
089	Q089P	-0.80	0.03	1.23	0.45	0.97	2.98	-0.11
089	Q089R	1.15	1.00	1.27	1.34	1.15	1.13	0.95
089	Q089T	11.41	-3.81	-9.90	-2.46	-5.57	-36.35	0.02
089	Q089V	1.15	0.96	1.24	1.23	1.20	0.84	0.90
089	Q089W	0.84	0.66	0.84	0.84	0.79	0.69	1.11
089	Q089Y	0.97	0.97	1.23	1.19	1.06	0.88	0.95
093	A093C	1.36	1.43	1.51	1.80	1.74	1.33	0.57
093	A093D	1.21	1.41	1.52	1.53	1.26	1.12	0.80
093	A093E	1.53	1.50	1.78	1.75	1.55	1.55	0.71
093	A093F	1.24	1.42	1.20	1.45	1.54	1.13	0.72
093	A093G	1.20	1.15	1.23	1.29	1.35	1.10	0.89
093	A093H	0.98	0.88	1.01	1.03	1.01	0.91	1.11
093	A093I	0.97	1.11	1.11	1.39	1.28	1.16	0.76
093	A093K	0.93	0.92	1.10	1.07	0.87	0.86	1.14
093	A093L	0.90	0.91	1.08	1.09	0.97	1.03	0.96
093	A093M	1.10	1.13	1.45	1.53	1.42	1.34	0.82
093	A093N	1.52	1.46	1.77	1.72	1.46	1.59	0.73
093	A093P	-0.84	-0.82	0.20	-0.65	-0.46	-0.39	-0.09
093	A093Q	1.36	1.45	1.41	1.56	1.41	1.40	0.76
093	A093R	1.15	1.13	1.23	1.32	1.29	1.04	0.91

10

20

30

40

093	A093S	1.09	1.11	1.30	1.22	1.02	0.93	0.94
093	A093T	0.93	0.90	1.02	1.05	0.89	0.98	1.02
093	A093V	1.02	1.08	1.11	1.16	1.10	-0.93	0.87
093	A093W	1.02	0.97	0.98	1.05	0.92	0.82	0.88
093	A093Y	0.93	0.91	1.17	1.22	1.12	1.12	0.83
115	W115D	0.97	1.05	0.95	1.04	1.15	1.05	0.91
115	W115E	0.88	0.90	0.91	0.96	0.69	0.88	1.09
115	W115F	0.87	0.92	0.79	0.85	0.95	0.73	1.11
115	W115G	0.81	0.81	0.93	0.89	0.84	1.10	1.28
115	W115K	0.67	0.64	0.75	0.74	0.73	0.62	1.44
115	W115L	0.58	0.58	0.67	0.65	0.62	0.69	1.63
115	W115N	0.87	0.94	1.13	1.07	1.08	0.98	1.02
115	W115P	1.12	1.12	1.18	1.20	1.22	1.29	0.87
115	W115Q	0.96	0.96	1.01	1.04	0.99	0.85	1.00
115	W115R	0.79	0.83	0.92	0.94	0.95	0.65	1.07
115	W115S	0.92	0.87	1.02	0.98	0.96	1.00	1.14
115	W115V	0.77	0.81	0.83	0.79	0.89	0.82	1.27
115	W115Y	0.56	0.63	0.74	0.73	0.77	0.69	1.41
117	D117A	1.29	1.21	1.20	1.32	1.83	1.39	0.45
117	D117E	1.40	1.34	1.30	1.21	1.65	1.33	0.65
117	D117G	1.10	1.02	1.08	1.08	1.19	1.33	0.78
117	D117H	0.92	0.82	0.84	0.89	1.21	1.08	0.87
117	D117I	0.98	0.70	0.65	0.79	1.49	1.26	0.50
117	D117K	0.68	0.57	0.93	0.89	0.82	0.86	1.30
117	D117L	0.81	0.77	0.94	0.86	1.09	0.86	0.64
117	D117M	1.21	1.13	1.23	1.32	1.44	0.97	0.53
117	D117N	1.30	1.26	1.63	1.48	1.48	1.23	0.71
117	D117P	1.07	1.04	1.27	1.17	1.29	1.10	0.88
117	D117Q	1.63	1.62	1.46	1.51	2.08	1.57	0.56
117	D117R	1.06	1.12	1.12	1.05	1.25	0.83	0.95
117	D117S	0.89	0.90	0.92	0.98	1.09	0.94	0.81
117	D117T	0.93	0.83	0.82	0.88	1.03	1.20	0.91
117	D117V	1.08	0.86	0.91	1.08	2.00	1.98	0.40
117	D117W	0.76	0.56	0.82	0.82	0.74	0.70	1.20
123	P123A	1.06	1.01	1.43	1.25	1.10	0.95	0.84
123	P123D	1.19	1.05	1.18	1.22	1.38	1.34	0.84
123	P123E	1.49	1.39	1.45	1.41	1.65	1.24	0.66
123	P123G	1.10	0.96	1.18	1.07	1.18	1.10	0.90
123	P123K	0.84	0.62	1.09	0.96	1.00	0.89	1.18
123	P123L	0.83	0.72	1.03	1.00	1.21	0.98	0.93
123	P123M	1.14	1.00	1.13	1.29	1.52	1.25	0.61
123	P123Q	1.25	1.15	1.19	1.35	1.55	1.30	0.68
123	P123R	1.02	0.95	1.28	1.28	1.12	1.11	0.96
123	P123S	1.07	0.84	0.88	0.92	1.17	0.97	0.96
123	P123T	1.00	0.89	0.83	0.90	1.13	0.83	0.97
123	P123V	0.83	0.79	0.97	1.08	1.23	0.99	0.83
124	S124A	1.33	1.45	1.31	1.39	1.27	1.34	0.79
124	S124C	1.28	1.32	0.93	1.15	1.54	1.21	0.77
124	S124D	1.19	1.20	1.14	1.24	1.35	1.31	0.88
124	S124E	1.15	1.22	1.16	1.19	1.24	1.11	0.93
124	S124F	1.12	1.19	1.05	1.16	1.05	0.98	1.01
124	S124G	0.92	0.81	0.79	0.84	1.14	0.80	1.08

10

20

30

40

124	S124H	0.91	0.98	0.97	1.02	1.12	1.11	0.98
124	S124I	0.93	0.92	0.92	0.91	0.99	1.05	1.10
124	S124K	0.89	0.89	0.95	0.90	0.92	0.77	1.24
124	S124L	0.70	0.73	0.74	0.62	0.74	0.61	1.36
124	S124N	1.16	1.18	1.00	1.15	1.17	0.96	0.87
124	S124P	1.08	0.97	1.06	1.25	1.43	1.02	0.71
124	S124Q	1.16	1.22	1.09	1.18	1.27	1.20	0.82
124	S124R	1.26	1.24	1.05	1.16	1.35	1.21	0.88
124	S124T	1.03	1.09	0.90	0.92	1.06	1.03	1.02
124	S124V	0.97	0.96	0.81	0.86	0.98	1.00	1.01
124	S124Y	0.87	0.88	0.74	0.83	0.86	0.75	1.13
125	D125A	0.75	0.72	1.11	1.21	1.17	1.04	0.82
125	D125E	1.02	1.00	0.92	1.01	0.96	0.77	0.94
125	D125G	0.51	0.48	0.91	0.90	0.46	0.77	1.15
125	D125K	0.37	0.34	0.65	0.80	0.79	0.68	1.23
125	D125M	1.08	1.06	1.02	1.11	1.11	0.98	0.93
125	D125Q	0.87	0.74	0.92	1.03	0.85	0.81	0.94
125	D125R	0.43	0.43	0.69	0.92	0.74	0.61	1.06
125	D125S	0.67	0.57	0.96	1.03	0.80	0.82	1.12
125	D125T	0.91	0.92	0.78	0.80	0.78	0.59	1.17
125	D125V	0.38	0.36	0.67	0.81	0.78	1.01	1.17
127	N127A	0.80	0.88	1.41	1.37	1.42	1.34	0.69
127	N127C	1.25	1.40	1.26	1.39	1.48	1.45	0.69
127	N127D	1.21	1.24	1.24	1.31	1.19	1.41	0.78
127	N127F	0.98	0.84	1.27	1.23	1.09	0.90	0.82
127	N127G	0.86	0.71	1.05	1.04	1.03	1.05	0.93
127	N127H	0.70	0.63	0.83	0.89	0.86	0.81	1.02
127	N127K	0.51	0.47	0.77	0.86	0.95	1.01	1.03
127	N127L	0.71	0.67	0.99	1.04	1.12	1.01	0.93
127	N127M	1.00	1.15	1.47	1.46	1.35	1.23	0.73
127	N127P	1.10	1.04	1.30	1.39	1.16	1.21	0.65
127	N127Q	1.04	1.01	1.42	1.47	1.33	1.00	0.71
127	N127R	0.88	0.87	1.04	1.10	1.14	0.89	0.96
127	N127S	0.87	0.71	1.08	1.06	1.04	0.91	0.90
127	N127T	0.78	0.68	0.79	0.79	0.93	0.75	1.08
127	N127V	0.75	0.78	1.34	1.27	1.11	0.97	0.75
127	N127W	0.79	0.73	0.76	0.80	0.84	0.82	1.16
127	N127Y	1.16	1.12	1.23	1.15	1.21	1.14	0.82
130	I130A	1.15	1.06	1.61	1.47	1.25	1.13	0.82
130	I130G	0.81	0.71	1.10	1.12	1.25	1.11	0.91
130	I130H	0.58	0.51	0.83	0.87	0.92	0.79	1.18
130	I130K	0.73	0.64	1.06	0.96	0.94	0.84	1.14
130	I130L	0.80	0.77	1.08	1.04	0.99	0.92	0.96
130	I130M	1.45	1.37	1.42	1.44	1.33	1.19	0.77
130	I130N	1.08	0.95	1.48	1.46	1.11	1.01	0.78
130	I130P	0.29	0.41	0.91	1.29	1.33	1.36	0.76
130	I130Q	-0.18	-1.25	1.18	0.52	-0.19	0.03	-0.12
130	I130R	1.09	0.91	1.30	1.34	0.91	1.00	0.85
130	I130S	1.02	0.81	1.02	1.06	1.07	0.84	0.97
130	I130T	0.97	0.99	1.09	1.04	0.97	0.99	0.98
130	I130V	1.12	1.21	1.12	1.12	0.94	0.96	0.83
130	I130W	0.85	0.69	0.95	1.01	1.11	0.89	0.89

10

20

30

40

132	G132A	1.52	1.66	1.32	1.47	1.60	1.39	0.68
132	G132C	1.38	1.47	1.26	1.28	1.10	0.87	0.79
132	G132D	1.84	1.78	1.18	1.50	1.56	1.56	0.51
132	G132E	1.17	1.33	1.11	1.21	0.90	0.86	0.86
132	G132F	1.20	1.21	1.03	1.18	1.03	1.03	0.91
132	G132H	0.98	1.03	0.93	0.97	1.04	0.99	1.02
132	G132L	0.98	1.03	0.76	0.84	0.88	0.85	0.95
132	G132M	1.81	1.76	1.51	1.61	1.81	1.73	0.61
132	G132N	1.18	1.23	1.11	1.27	1.15	1.08	0.82
132	G132P	1.51	1.59	1.28	1.40	1.26	1.34	0.75
132	G132R	1.35	1.32	0.97	1.12	1.02	1.06	0.87
132	G132S	1.32	1.34	1.08	1.22	1.15	0.96	0.77
132	G132T	1.09	1.05	0.87	0.96	0.94	0.98	1.03
132	G132V	0.99	1.09	0.96	1.02	0.95	1.03	0.98
132	G132W	1.17	1.13	0.95	1.07	1.02	0.84	0.91
132	G132Y	0.93	0.87	0.81	0.86	0.80	0.81	1.15
135	Q135A	0.95	0.99	1.00	1.20	1.13	0.99	0.84
135	Q135F	0.93	1.05	0.91	1.03	1.04	1.39	0.94
135	Q135G	0.77	0.80	0.75	0.84	0.97	1.05	1.08
135	Q135K	0.59	0.69	0.63	0.71	0.70	0.74	1.27
135	Q135L	0.40	0.22	-0.66	-0.33	0.38	-0.14	0.19
135	Q135M	0.91	1.03	1.01	1.14	0.90	1.01	0.86
135	Q135P	1.12	1.16	0.96	1.07	0.85	1.16	0.87
135	Q135R	0.92	1.01	0.95	1.00	0.95	1.14	1.08
135	Q135S	0.93	0.93	0.80	0.95	0.91	0.87	0.94
135	Q135T	0.84	0.83	0.73	0.80	0.79	0.83	1.19
135	Q135V	0.92	0.84	0.66	0.75	0.98	1.23	0.76
135	Q135Y	0.75	0.75	0.69	0.79	0.75	0.91	1.16
145	P145A	1.15	1.17	1.44	1.50	1.30	1.29	0.71
145	P145D	1.35	1.61	1.15	1.33	1.45	1.48	0.57
145	P145E	1.55	1.48	1.26	1.45	1.34	1.65	0.63
145	P145F	1.34	1.32	1.02	1.20	1.12	1.32	0.74
145	P145H	0.98	0.88	0.81	0.99	1.13	1.03	0.90
145	P145I	1.20	1.06	0.84	0.98	1.10	1.20	0.85
145	P145K	0.90	0.89	0.88	1.05	1.15	1.02	0.88
145	P145L	1.03	0.90	0.81	1.01	0.97	1.23	0.85
145	P145N	1.19	1.43	1.41	1.58	1.49	1.48	0.61
145	P145R	1.22	1.11	1.10	1.29	1.14	1.11	0.86
145	P145S	1.12	1.04	1.03	1.10	1.08	1.12	0.85
145	P145T	1.15	0.99	0.91	1.00	0.92	0.81	0.89
145	P145V	1.09	1.18	1.08	1.19	1.24	1.25	0.73
145	P145Y	1.14	1.12	0.89	1.15	1.08	1.16	0.75
146	G146A	1.18	1.00	1.34	1.41	1.19	1.05	0.77
146	G146C	2.03	1.89	1.71	1.89	2.19	1.52	0.40
146	G146D	1.32	1.35	1.45	1.52	1.50	1.17	0.70
146	G146E	1.43	1.43	1.63	1.62	1.38	1.33	0.82
146	G146H	1.00	0.99	0.77	0.88	1.01	0.93	1.06
146	G146K	0.94	0.84	1.06	1.07	1.05	1.10	1.08
146	G146L	0.99	0.80	0.85	ND	0.97	0.74	0.97
146	G146P	1.33	1.24	1.30	1.36	1.43	1.31	0.76
146	G146R	1.21	1.07	1.12	1.30	1.21	1.41	0.85
146	G146S	1.18	1.13	1.02	1.04	0.97	0.94	0.91

10

20

30

40

146	G146T	0.91	0.83	0.98	1.00	0.97	0.78	1.13
146	G146V	1.19	1.04	1.15	1.21	1.22	1.16	0.79
146	G146W	0.94	0.88	0.83	0.91	0.80	1.01	0.93
148	G148A	1.20	1.28	1.37	1.49	1.22	1.10	0.71
148	G148C	1.09	0.94	1.25	1.28	1.17	1.19	0.84
148	G148D	-1.07	-0.40	0.77	0.36	0.81	1.35	-0.11
148	G148E	1.17	1.19	1.27	1.27	1.37	1.02	0.89
148	G148F	1.08	1.07	1.13	1.16	1.03	1.27	0.97
148	G148H	0.89	0.90	1.00	0.97	0.91	0.66	1.13
148	G148L	0.88	0.83	0.89	0.90	0.94	0.91	1.16
148	G148N	1.00	0.98	1.20	1.17	1.13	1.18	1.01
148	G148P	1.30	1.33	1.34	1.45	1.35	1.09	0.76
148	G148Q	-1.69	-1.32	1.69	0.84	-0.01	0.58	-0.07
148	G148R	1.27	1.20	1.12	1.24	1.14	0.71	0.85
148	G148S	0.96	0.97	0.92	0.96	0.84	1.05	1.03
148	G148T	1.35	1.20	0.70	0.86	1.35	0.90	0.49
148	G148V	0.96	0.95	0.95	1.02	1.04	0.69	1.03
148	G148W	1.00	0.88	0.90	0.96	0.89	0.83	1.00
148	G148Y	0.82	0.74	0.86	0.93	0.91	0.87	1.14
153	S153A	1.14	1.15	1.09	1.23	1.21	1.09	0.86
153	S153C	1.70	1.78	1.37	1.54	1.51	1.61	0.53
153	S153D	1.34	1.25	0.99	1.11	1.18	1.02	0.88
153	S153E	1.76	1.18	1.20	1.34	1.54	1.36	0.61
153	S153F	1.42	1.35	1.07	1.18	1.22	1.36	0.80
153	S153G	1.35	1.16	0.97	1.03	1.08	1.25	0.88
153	S153H	0.98	0.91	0.72	0.77	0.92	1.00	1.05
153	S153I	1.31	1.09	0.95	1.05	1.28	1.35	0.74
153	S153K	0.79	0.82	0.80	0.87	1.02	1.00	1.08
153	S153L	1.11	0.96	0.92	0.98	1.03	1.26	0.92
153	S153N	1.29	1.38	1.38	1.43	1.20	1.75	0.76
153	S153P	1.09	1.19	1.21	1.28	1.15	1.15	1.00
153	S153Q	1.14	1.22	0.95	1.21	1.39	1.47	0.73
153	S153R	1.29	1.16	1.00	1.12	1.18	1.16	0.95
153	S153T	0.93	1.02	0.82	0.89	0.88	0.97	1.01
153	S153V	1.30	1.16	0.97	1.07	1.08	1.26	0.77
153	S153W	0.94	0.95	0.75	0.86	0.85	1.21	0.90
153	S153Y	1.15	1.03	0.96	1.00	1.03	1.13	0.86
159	Y159A	1.17	1.17	1.42	1.52	1.50	1.70	0.74
159	Y159C	1.46	1.19	1.80	1.73	1.10	1.66	0.66
159	Y159D	1.08	1.21	1.89	1.88	1.63	2.01	0.78
159	Y159E	1.23	1.25	1.34	1.50	1.31	1.66	0.73
159	Y159F	1.11	1.10	1.03	1.10	0.96	1.17	0.97
159	Y159G	0.92	0.79	0.95	1.02	1.22	1.44	0.94
159	Y159H	0.97	0.86	0.97	1.05	1.07	1.17	1.01
159	Y159K	1.03	0.78	1.20	1.21	0.96	1.71	0.90
159	Y159L	0.77	0.61	0.95	1.00	1.24	1.41	0.98
159	Y159N	0.97	0.94	1.46	1.56	1.40	1.85	0.78
159	Y159R	1.10	0.86	1.19	1.40	1.39	1.75	0.80
159	Y159S	0.97	0.82	1.01	1.09	1.25	1.44	0.94
159	Y159T	0.93	0.93	1.18	1.20	1.26	1.74	0.87
159	Y159V	1.09	0.95	0.96	1.07	1.12	1.48	0.87
159	Y159W	1.08	1.12	0.98	1.08	0.73	0.96	0.88

10

20

30

40

166	W166C	0.57	0.71	0.61	0.60	0.90	1.03	0.80
166	W166E	0.58	0.78	0.94	0.74	1.09	1.12	0.97
166	W166F	0.75	0.82	0.73	0.81	0.82	1.06	1.07
166	W166G	0.65	0.57	0.42	0.50	0.84	0.93	1.18
166	W166H	0.59	0.64	0.57	0.67	0.90	0.92	1.26
166	W166I	0.56	0.65	0.85	0.79	0.65	1.16	1.13
166	W166K	0.47	0.49	0.96	0.81	0.60	1.09	1.49
166	W166L	0.45	0.54	0.79	0.64	0.58	0.91	1.46
166	W166M	0.70	0.83	0.96	0.82	0.89	1.24	1.00
166	W166P	0.16	0.30	-0.15	-0.02	1.19	1.09	0.69
166	W166R	0.67	0.86	1.40	1.17	0.83	0.76	0.94
166	W166S	0.61	0.64	0.63	0.57	0.90	0.95	1.14
166	W166T	0.60	0.73	0.92	0.76	0.70	0.33	1.15
166	W166V	0.51	0.61	0.88	0.75	0.49	0.98	1.10
166	W166Y	0.65	0.70	0.73	0.78	0.81	0.96	1.16
169	S169A	1.10	1.14	1.17	1.30	1.17	1.35	0.85
169	S169C	1.05	1.37	1.33	1.43	1.54	1.47	0.74
169	S169D	0.91	1.17	1.21	1.26	1.36	1.42	0.71
169	S169E	1.24	1.36	1.37	1.59	1.65	1.81	0.67
169	S169F	1.04	1.33	1.01	1.13	1.15	1.36	0.74
169	S169G	1.05	0.90	0.97	0.99	0.99	1.22	0.97
169	S169I	0.84	0.82	0.84	1.02	1.18	1.00	0.93
169	S169K	0.81	0.85	0.78	0.94	0.88	1.03	1.00
169	S169L	0.82	0.65	0.83	0.95	0.99	1.00	1.09
169	S169M	0.98	0.71	1.05	1.17	0.98	1.17	0.92
169	S169N	0.88	1.09	1.28	1.35	1.43	1.41	0.76
169	S169P	0.55	0.85	0.74	1.10	1.25	0.96	0.78
169	S169Q	1.08	1.18	1.27	1.43	1.43	1.54	0.75
169	S169R	0.95	0.88	1.01	1.13	1.08	1.26	0.96
169	S169T	0.78	0.75	0.87	0.96	0.92	0.79	1.07
169	S169V	0.78	0.88	0.78	1.01	1.10	1.00	0.94
169	S169Y	0.91	0.87	1.00	1.11	0.97	1.10	0.93
171	K171C	1.20	1.53	1.27	1.46	1.71	1.56	0.54
171	K171D	1.22	1.28	1.11	1.32	1.03	1.49	0.75
171	K171E	1.18	1.46	1.26	1.33	1.61	1.36	0.65
171	K171G	1.03	1.06	0.87	0.91	1.08	1.29	0.80
171	K171H	0.90	0.76	0.82	0.90	0.93	0.94	1.20
171	K171L	0.70	0.76	0.84	0.88	0.88	0.86	1.05
171	K171M	1.11	1.32	1.25	1.34	1.43	1.08	0.67
171	K171P	0.99	1.09	1.19	1.31	1.36	1.32	0.73
171	K171Q	1.08	1.15	1.05	1.26	1.66	1.37	0.67
171	K171R	1.01	0.96	0.96	1.08	1.10	1.42	0.92
171	K171S	1.12	0.97	0.86	0.96	0.90	1.17	0.93
171	K171T	1.00	0.88	0.87	0.93	0.96	1.03	1.09
171	K171V	0.87	0.92	0.81	0.92	1.13	0.97	0.89
171	K171W	0.74	0.74	0.59	0.82	0.88	0.86	1.03
171	K171Y	0.86	0.73	0.70	0.90	0.96	1.06	0.92
179	R179A	0.88	0.88	1.28	1.47	1.62	1.55	0.83
179	R179G	0.53	0.56	0.93	1.05	1.02	1.09	1.05
179	R179H	0.82	0.78	1.07	1.19	1.25	1.32	1.00
179	R179L	0.71	0.62	0.79	0.93	1.00	1.28	0.99
179	R179M	0.81	1.14	1.24	1.51	1.58	1.52	0.66

10

20

30

40

179	R179P	0.33	0.50	1.14	1.33	1.42	1.61	0.79
179	R179Q	1.07	0.98	1.03	1.27	1.31	1.39	0.82
179	R179S	0.86	0.62	0.94	1.12	1.11	1.21	1.02
179	R179T	0.97	0.78	1.00	1.16	1.31	1.32	0.94
179	R179V	0.90	0.89	0.84	1.03	1.26	1.12	0.91
179	R179W	0.81	0.70	0.92	1.19	1.17	1.71	0.87
179	R179Y	0.64	0.49	0.81	0.95	0.89	1.22	1.06
180	G180A	0.82	0.75	1.37	0.96	1.25	1.45	0.76
180	G180C	0.43	0.46	1.29	0.82	1.35	1.56	0.73
180	G180D	0.50	0.54	1.39	0.99	1.37	1.36	0.81
180	G180F	0.32	0.32	1.19	1.03	0.90	1.75	0.72
180	G180H	0.38	0.36	0.95	0.80	0.89	1.00	1.12
180	G180I	0.21	0.21	0.87	0.73	1.17	1.09	0.84
180	G180K	0.13	0.16	0.77	ND	0.99	1.02	1.26
180	G180L	0.22	0.25	1.02	0.72	0.81	0.94	1.38
180	G180N	0.46	0.52	1.41	1.13	1.24	0.89	0.81
180	G180P	0.42	0.45	1.39	ND	1.46	1.74	0.75
180	G180R	1.27	0.83	ND	ND	-0.82	-12.79	-0.03
180	G180S	0.82	0.70	0.98	0.79	0.90	0.92	0.96
180	G180T	0.46	0.37	0.91	0.76	1.02	0.77	1.07
180	G180V	0.25	0.18	0.89	ND	1.01	0.98	0.96
180	G180Y	0.29	0.34	0.91	0.75	1.03	1.11	1.03
181	I181A	1.16	1.15	1.60	1.19	1.45	1.48	0.78
181	I181C	1.18	1.21	1.79	ND	1.10	1.35	0.68
181	I181D	1.19	1.29	1.61	1.22	1.64	1.19	0.74
181	I181E	1.44	1.47	1.54	1.27	1.48	1.55	0.72
181	I181F	1.11	1.04	1.20	0.92	1.24	0.84	0.87
181	I181G	0.69	0.59	1.20	1.02	1.15	1.12	0.94
181	I181H	0.88	0.73	1.13	ND	0.95	0.95	0.98
181	I181K	0.58	0.43	1.15	ND	0.96	0.87	1.04
181	I181L	0.76	0.75	1.09	ND	0.91	0.78	1.01
181	I181P	1.04	1.07	1.35	ND	1.30	1.34	0.85
181	I181R	0.49	0.47	0.78	0.87	1.43	1.64	0.87
181	I181S	0.93	0.83	1.09	0.80	1.02	1.15	0.97
181	I181T	0.80	0.75	1.02	0.85	0.94	1.13	1.09
181	I181V	1.20	1.04	1.39	1.12	1.18	1.16	0.81
181	I181Y	0.83	0.69	1.06	0.89	0.94	0.87	0.95
182	G182A	0.82	0.87	1.36	1.14	1.24	1.11	0.72
182	G182C	1.18	1.14	1.73	1.58	1.96	1.42	0.45
182	G182D	0.79	0.71	1.40	1.17	1.40	1.56	0.77
182	G182E	0.68	0.64	1.45	1.26	1.73	1.43	0.66
182	G182F	1.30	1.21	1.10	1.06	1.50	1.46	0.46
182	G182H	0.64	0.53	1.01	ND	1.13	1.22	1.01
182	G182K	-0.04	-0.01	-0.15	ND	0.07	-0.08	0.91
182	G182L	0.53	0.48	1.12	ND	1.26	0.86	0.70
182	G182P	0.61	0.47	1.45	1.23	1.57	1.40	0.73
182	G182R	0.77	0.69	1.32	0.99	1.30	1.56	0.81
182	G182S	0.68	0.57	0.99	0.87	1.16	1.10	0.85
182	G182T	0.49	0.49	1.00	0.89	1.22	1.12	0.84
182	G182V	0.61	0.46	1.26	1.12	1.38	1.18	0.66
182	G182Y	0.61	0.48	0.85	0.88	1.00	0.96	0.84
183	K183A	0.20	0.17	1.19	1.20	1.58	1.99	0.66

10

20

30

40

183	K183C	0.18	0.19	1.35	1.24	1.38	2.02	0.62
183	K183E	0.14	0.02	1.20	1.10	1.37	1.55	0.72
183	K183F	0.15	-0.05	1.11	1.08	1.61	2.04	0.59
183	K183G	0.15	0.13	0.96	ND	1.24	1.35	0.94
183	K183H	0.27	0.15	0.93	0.84	1.31	1.26	0.86
183	K183L	0.05	0.10	0.91	0.93	1.15	1.44	0.86
183	K183M	0.14	0.18	1.42	1.40	1.60	2.40	0.58
183	K183P	0.03	0.17	1.27	1.06	1.73	1.64	0.58
183	K183Q	0.12	0.14	1.30	1.21	1.51	2.11	0.71
183	K183R	0.20	0.11	1.03	1.00	1.13	2.07	0.82
183	K183S	0.15	0.18	0.92	0.83	1.18	1.33	0.93
183	K183T	0.20	0.01	1.10	1.11	1.16	1.71	0.80
183	K183V	0.10	0.07	0.82	0.89	1.38	1.73	0.62
183	K183W	0.07	0.13	0.66	0.77	1.23	1.09	0.70
183	K183Y	0.08	0.14	0.66	0.73	1.10	1.32	0.88
187	W187A	0.45	0.36	1.67	1.77	1.21	1.02	0.90
187	W187C	0.48	0.40	1.23	1.49	1.19	1.13	0.88
187	W187E	0.62	0.51	1.18	1.22	1.14	1.08	1.04
187	W187G	0.16	0.13	0.57	0.86	0.86	0.73	1.13
187	W187I	0.70	0.57	0.83	0.86	0.78	0.82	1.29
187	W187K	0.16	0.16	0.85	0.90	0.71	0.64	1.72
187	W187L	0.69	0.69	0.72	0.78	0.75	0.66	1.29
187	W187N	0.53	0.62	1.29	1.41	1.10	1.08	0.91
187	W187P	0.17	0.14	0.29	1.65	1.19	1.15	0.85
187	W187Q	0.41	0.35	1.27	1.30	1.09	0.92	1.03
187	W187R	0.29	0.28	0.96	1.19	0.92	0.92	1.08
187	W187S	0.40	0.28	1.01	1.07	0.86	0.76	1.25
187	W187V	0.20	-0.60	-0.25	0.12	0.26	0.77	0.20
194	G194A	1.33	1.26	1.40	1.36	1.55	1.18	0.68
194	G194E	1.28	1.12	1.13	1.10	1.37	1.25	0.79
194	G194H	1.09	1.02	0.91	0.92	1.10	0.72	0.97
194	G194K	0.77	0.75	0.80	0.80	1.01	0.68	1.18
194	G194L	0.74	0.64	0.81	0.85	0.97	0.78	1.01
194	G194M	1.38	1.33	1.65	1.48	1.40	1.19	0.69
194	G194P	0.04	0.01	0.00	2.12	1.14	0.37	0.78
194	G194R	1.04	0.96	0.98	1.05	1.08	0.86	1.01
194	G194S	1.08	1.02	1.14	1.09	0.94	0.70	1.03
194	G194T	0.93	0.77	0.87	0.92	1.05	0.71	1.07
194	G194V	1.26	1.08	0.97	1.01	1.14	0.80	0.84
194	G194W	0.61	0.51	0.60	0.62	0.75	0.48	1.31
209	P209A	1.22	1.30	1.67	1.68	1.52	1.20	0.68
209	P209C	1.24	1.20	1.01	1.00	1.37	1.29	0.58
209	P209D	1.35	1.33	1.41	1.57	1.39	1.30	0.76
209	P209E	1.34	1.25	1.31	1.47	1.34	1.35	0.82
209	P209F	1.23	1.36	1.22	1.48	1.51	1.50	0.62
209	P209G	1.09	0.92	1.10	1.09	0.98	0.91	1.01
209	P209H	1.02	0.91	1.20	1.15	0.97	1.00	1.00
209	P209I	0.94	0.85	1.01	1.03	0.91	0.84	0.95
209	P209K	1.24	0.95	1.22	1.23	0.99	1.03	0.98
209	P209L	0.83	0.92	1.00	1.06	1.02	1.02	0.87
209	P209M	1.34	1.34	1.48	1.61	1.81	1.18	0.65
209	P209N	1.65	2.42	0.99	1.11	2.77	2.36	0.21

10

20

30

40

209	P209Q	-0.73	-0.45	ND	ND	-0.20	0.55	-0.12
209	P209R	1.38	1.03	1.41	1.45	1.08	1.22	0.91
209	P209S	1.14	1.02	1.13	1.21	1.02	0.86	0.89
209	P209T	1.12	1.10	1.37	1.35	1.35	0.97	0.84
209	P209V	0.98	0.83	1.10	0.93	1.16	1.04	0.82
209	P209W	0.99	1.06	1.03	1.10	1.16	0.86	0.80
209	P209Y	0.64	0.73	0.53	0.76	0.96	1.10	0.82
224	N224A	0.65	1.07	1.11	1.13	1.47	1.19	0.81
224	N224C	0.91	1.07	1.05	1.08	1.22	1.00	0.82
224	N224D	0.81	1.10	0.96	1.08	0.85	0.75	0.82
224	N224E	0.93	1.78	0.68	0.91	1.68	1.83	0.31
224	N224F	0.79	1.11	0.81	0.93	1.33	1.31	0.67
224	N224G	0.72	0.80	0.82	0.87	0.72	0.97	1.26
224	N224H	0.60	0.80	0.74	0.84	0.66	0.83	1.20
224	N224I	0.71	0.95	0.85	0.99	0.95	0.97	0.86
224	N224K	0.56	0.64	0.78	0.81	0.58	0.78	1.42
224	N224L	0.55	0.72	0.69	0.75	0.89	0.73	1.11
224	N224M	0.84	1.07	1.07	1.13	1.22	1.27	0.73
224	N224P	1.21	1.26	0.87	1.03	1.04	1.19	0.83
224	N224Q	0.97	1.03	0.98	0.98	1.12	1.07	0.90
224	N224R	0.89	1.22	0.65	0.76	1.15	1.34	0.53
224	N224S	0.91	0.84	0.88	0.93	0.78	0.82	1.11
224	N224T	0.90	0.86	0.93	0.95	0.78	0.99	1.17
224	N224V	0.83	0.88	0.78	0.89	0.92	0.89	0.92
224	N224W	0.82	0.87	0.70	0.80	0.79	0.88	1.02
224	N224Y	0.92	1.03	0.81	0.89	0.87	0.77	0.93
242	S242A	1.44	1.56	1.59	1.45	1.19	1.10	0.72
242	S242C	1.73	1.99	1.84	1.93	1.97	1.06	0.46
242	S242D	1.36	1.51	1.45	1.43	1.29	1.11	0.81
242	S242G	1.24	1.20	1.29	1.22	1.12	0.92	0.93
242	S242I	1.36	1.12	1.14	1.24	1.43	1.34	0.55
242	S242K	0.80	0.70	0.92	0.92	0.99	0.86	1.26
242	S242L	0.77	0.75	1.26	1.08	1.06	0.99	0.93
242	S242M	1.56	1.70	1.48	1.78	1.54	1.10	0.55
242	S242Q	1.44	1.62	1.28	1.34	1.34	1.14	0.84
242	S242R	0.98	0.82	1.14	1.15	1.02	1.07	1.05
242	S242T	1.06	0.93	0.90	0.91	1.08	0.71	0.99
242	S242V	1.19	1.00	0.90	1.00	1.28	0.94	0.65
245	P245A	1.53	1.58	1.74	1.69	1.46	1.09	0.68
245	P245C	1.18	1.01	1.45	1.43	1.25	1.07	0.63
245	P245D	1.52	1.36	1.65	1.61	1.45	1.53	0.77
245	P245E	1.39	1.24	1.28	1.40	1.24	0.80	0.95
245	P245F	1.28	1.35	1.13	1.15	1.23	0.93	0.77
245	P245H	1.11	0.94	1.16	1.06	1.03	0.75	1.09
245	P245I	0.81	0.61	1.05	0.96	0.93	0.90	0.97
245	P245L	0.82	0.71	0.92	0.92	1.05	0.90	0.98
245	P245M	1.18	1.20	1.76	1.74	1.60	1.27	0.67
245	P245N	1.70	1.40	1.62	1.60	1.40	1.42	0.79
245	P245Q	1.49	1.22	1.61	1.52	1.26	0.99	0.96
245	P245R	1.37	1.23	1.19	1.26	1.47	1.08	0.88
245	P245S	1.16	1.01	1.20	1.21	1.07	0.88	1.07
245	P245T	1.31	0.99	1.26	1.23	1.13	0.97	0.92

10

20

30

40

245	P245V	1.03	0.95	0.97	1.00	0.94	0.75	1.00
245	P245Y	0.89	0.87	1.09	0.99	0.88	0.65	1.15
256	G256A	1.13	1.22	1.07	1.22	1.09	1.29	0.70
256	G256C	0.94	1.02	0.83	0.95	0.92	1.05	0.64
256	G256D	0.98	1.00	1.18	1.17	1.01	1.15	0.95
256	G256E	0.84	0.87	0.81	0.86	0.71	1.24	1.04
256	G256H	0.71	0.74	0.74	0.77	0.83	0.70	1.18
256	G256I	0.75	0.93	0.43	0.54	0.96	0.78	0.71
256	G256K	0.58	0.60	0.56	0.65	0.68	0.84	1.38
256	G256L	0.60	0.68	0.56	0.66	0.76	0.86	0.91
256	G256M	1.15	1.07	0.97	1.13	1.14	1.24	0.67
256	G256N	0.94	0.97	1.18	1.23	1.05	1.01	0.98
256	G256P	1.50	1.45	0.71	0.89	1.51	1.67	0.46
256	G256R	1.02	0.96	0.86	0.96	1.08	0.32	0.91
256	G256S	0.96	0.96	0.79	0.87	0.82	0.98	0.95
256	G256T	0.90	0.93	0.62	0.67	0.87	0.80	0.96
256	G256V	0.89	0.84	0.77	0.77	1.07	1.11	0.72
256	G256W	0.74	0.77	0.53	0.60	0.78	0.84	0.81
269	D269A	1.71	1.92	1.19	1.67	1.38	2.24	0.23
269	D269C	1.67	1.68	1.02	1.35	1.95	2.39	0.28
269	D269F	-8.17	-9.85	2.60	1.57	-14.68	-4.97	0.02
269	D269G	1.18	1.30	0.68	0.96	1.59	1.43	0.37
269	D269H	0.88	0.93	0.86	1.01	1.21	1.07	0.56
269	D269I	-4.21	-1.61	-2.68	-0.84	1.26	3.06	0.03
269	D269K	0.61	0.49	0.73	0.93	0.98	1.08	0.68
269	D269M	2.30	4.29	1.94	2.82	6.32	9.02	0.02
269	D269N	1.20	1.07	1.39	1.58	1.07	1.36	0.68
269	D269P	1.10	1.31	0.98	1.54	2.14	2.17	0.19
269	D269Q	1.53	1.50	1.31	1.60	1.53	1.51	0.44
269	D269R	1.11	1.09	0.80	1.25	1.59	1.26	0.39
269	D269S	0.82	0.86	0.93	0.96	0.89	0.91	1.07
269	D269T	0.76	0.98	0.78	0.96	1.43	1.43	0.30
269	D269Y	1.05	0.91	0.73	1.06	1.46	1.47	0.20
271	N271A	1.26	1.33	1.32	1.38	1.07	1.21	0.79
271	N271D	1.25	1.29	1.25	1.37	1.21	1.35	0.80
271	N271F	1.75	1.69	1.17	1.33	1.37	1.75	0.64
271	N271H	0.79	0.76	0.84	0.80	0.89	0.91	1.10
271	N271I	1.19	1.10	1.12	1.21	1.16	1.42	0.67
271	N271K	0.79	0.75	0.92	0.93	0.94	1.20	1.15
271	N271L	0.98	0.95	1.24	1.07	0.93	0.93	0.81
271	N271M	1.25	1.29	1.40	1.44	1.16	1.59	0.68
271	N271P	1.42	1.54	1.12	1.23	1.61	1.59	0.40
271	N271S	0.99	1.03	0.96	1.04	1.02	1.10	0.97
271	N271T	0.91	0.89	1.00	0.99	0.90	0.83	0.98
271	N271V	0.70	0.88	0.80	1.01	1.07	1.08	0.76
271	N271W	0.99	0.93	0.83	0.96	1.02	0.69	0.80
271	N271Y	0.95	0.87	0.86	0.96	0.84	0.94	0.78
278	T278A	1.17	1.21	1.25	1.41	1.11	1.35	0.84
278	T278E	0.92	0.80	0.99	1.13	1.06	1.35	0.88
278	T278G	-1.12	0.26	-4.08	-1.79	3.31	1.75	0.04
278	T278H	0.89	0.89	0.92	1.02	0.94	1.03	1.00
278	T278I	0.89	0.87	0.81	0.86	0.82	0.89	1.10

10

20

30

40

278	T278K	0.84	0.75	0.91	0.96	0.82	0.91	1.08
278	T278L	0.82	0.80	1.02	0.99	0.82	0.93	0.96
278	T278M	1.26	1.35	1.27	1.47	1.32	1.35	0.70
278	T278N	1.22	1.19	1.17	1.30	1.00	1.35	0.86
278	T278P	1.78	1.71	1.06	1.79	2.30	3.46	0.19
278	T278R	1.13	1.07	1.00	1.24	1.10	1.47	0.83
278	T278S	0.91	0.92	0.86	1.00	0.99	1.01	1.06
278	T278W	0.92	0.99	0.84	1.00	1.04	1.08	0.85
278	T278Y	0.76	0.84	0.79	0.90	0.72	0.87	1.04
281	N281A	1.06	1.16	1.13	1.25	1.06	1.07	0.82
281	N281D	1.08	1.33	1.09	1.22	1.41	1.29	0.61
281	N281G	0.78	0.79	0.93	0.93	0.82	0.90	1.21
281	N281H	0.76	0.82	0.83	0.87	0.73	0.63	1.10
281	N281I	0.84	0.81	0.79	0.84	0.79	0.78	1.17
281	N281L	0.66	0.72	0.77	0.78	0.58	0.55	1.43
281	N281M	1.15	1.12	0.98	1.12	0.93	1.08	0.84
281	N281P	1.15	1.18	1.09	1.18	1.05	0.89	0.85
281	N281Q	1.22	1.33	1.00	1.13	1.10	1.16	0.62
281	N281R	1.03	1.05	0.98	1.02	0.95	0.97	0.96
281	N281S	0.90	0.91	0.88	0.89	0.72	1.01	1.09
281	N281T	-0.21	1.17	-0.65	-0.27	-0.63	-0.72	0.14
281	N281V	0.85	0.88	0.80	0.87	0.76	1.07	0.86
281	N281Y	0.79	0.84	0.75	0.80	0.59	0.73	1.18
302	G302C	1.40	1.39	1.42	1.50	1.34	1.39	0.66
302	G302D	1.10	1.14	1.13	1.17	1.14	0.96	0.88
302	G302E	1.25	1.34	1.43	1.42	1.38	1.28	0.75
302	G302F	1.26	1.51	1.02	1.22	1.42	1.77	0.50
302	G302H	0.95	0.94	0.94	0.92	0.80	0.84	1.09
302	G302I	1.34	1.31	1.13	1.25	1.63	1.52	0.67
302	G302L	0.84	0.86	0.92	0.98	0.78	0.86	0.98
302	G302M	1.31	1.35	1.35	1.51	1.31	1.52	0.69
302	G302N	1.38	1.39	1.48	1.48	1.17	1.18	0.70
302	G302P	1.24	1.29	1.32	1.43	1.23	1.03	0.59
302	G302R	1.13	1.19	1.06	1.14	0.99	0.94	0.89
302	G302S	1.05	1.11	0.91	0.96	0.87	0.99	1.01
302	G302T	0.89	0.92	0.94	0.95	0.77	0.70	1.05
302	G302V	1.08	1.16	1.09	1.15	0.76	0.96	0.88
302	G302W	0.79	0.75	0.85	0.83	0.80	0.75	1.30
302	G302Y	0.91	0.98	0.91	0.99	0.75	0.92	0.93
304	A304D	1.19	1.30	1.42	1.44	1.16	1.22	0.75
304	A304E	1.70	1.57	1.41	1.47	1.45	1.45	0.69
304	A304F	1.14	1.14	1.27	1.18	0.86	0.87	1.02
304	A304H	0.85	0.85	0.77	0.83	0.81	0.68	1.15
304	A304L	0.92	0.95	0.91	0.96	0.80	0.74	1.00
304	A304M	1.18	1.21	1.45	1.49	0.98	1.18	0.72
304	A304N	1.42	1.41	1.30	1.44	1.43	1.28	0.71
304	A304P	1.24	1.30	1.24	1.35	1.49	1.34	0.77
304	A304R	1.14	1.16	1.05	1.13	0.93	1.03	0.90
304	A304S	0.84	0.94	0.80	1.15	0.87	0.71	0.67
304	A304T	1.00	1.07	0.89	0.99	0.98	0.75	0.92
304	A304V	1.16	1.18	1.13	1.21	0.94	0.70	0.81
304	A304W	0.88	0.89	0.89	0.93	0.73	0.94	1.07

10

20

30

40

304	A304Y	0.89	0.93	0.87	0.95	0.66	0.77	1.01
308	R308A	1.52	1.58	1.23	1.51	1.40	1.34	0.52
308	R308C	1.61	2.01	0.97	1.22	1.95	1.87	0.39
308	R308D	2.54	2.88	1.75	2.01	3.24	2.75	0.24
308	R308E	1.54	1.66	1.15	1.34	1.42	1.45	0.53
308	R308F	1.91	2.67	0.69	1.30	1.80	1.55	0.18
308	R308G	1.27	1.29	0.81	0.95	1.02	1.10	0.59
308	R308H	1.10	1.08	0.77	0.92	1.06	0.97	0.66
308	R308I	1.13	1.55	0.57	0.76	0.92	0.84	0.43
308	R308K	1.00	0.97	1.00	0.99	0.99	0.92	0.95
308	R308L	0.97	1.33	0.36	0.67	0.93	0.19	0.33
308	R308M	1.94	2.07	1.31	1.66	1.65	1.92	0.38
308	R308N	1.72	1.86	1.09	1.37	1.94	1.71	0.41
308	R308P	4.38	4.55	1.93	2.52	5.05	3.89	0.12
308	R308S	1.06	1.00	0.84	0.97	0.84	0.87	1.00
308	R308T	1.36	1.34	0.91	1.08	1.16	1.24	0.73
308	R308V	1.31	1.47	0.62	0.88	1.06	0.97	0.42
308	R308W	0.92	1.50	0.34	0.70	1.29	1.01	0.31
308	R308Y	0.90	1.28	0.46	0.70	0.92	1.14	0.41
321	T321A	1.07	1.20	0.95	1.19	1.44	1.33	0.84
321	T321C	1.35	1.36	0.92	1.09	1.63	1.10	0.52
321	T321F	1.00	0.96	0.90	1.00	1.14	1.07	1.03
321	T321H	0.89	0.85	0.81	0.90	1.03	1.37	1.14
321	T321I	0.81	0.87	0.66	0.77	1.13	0.93	0.83
321	T321L	0.74	0.77	0.67	0.75	0.91	0.96	1.11
321	T321P	1.23	1.25	1.08	1.18	1.69	1.22	0.79
321	T321Q	1.12	1.15	1.05	1.10	1.14	1.27	0.93
321	T321R	1.02	0.92	1.02	0.96	1.09	0.96	1.04
321	T321S	1.02	0.91	0.88	0.99	1.14	0.84	1.08
321	T321V	0.95	0.92	0.72	0.81	1.34	0.43	0.84
321	T321Y	0.76	0.82	0.69	0.77	1.23	0.79	1.04
358	Q358A	1.07	1.42	1.63	1.45	1.54	1.31	0.65
358	Q358C	1.95	2.35	1.34	1.85	2.83	1.62	0.26
358	Q358D	1.35	1.37	1.21	1.29	1.55	1.10	0.79
358	Q358E	1.30	1.35	1.22	1.27	1.57	1.02	0.74
358	Q358F	1.35	1.32	1.05	1.14	1.49	1.19	0.71
358	Q358G	1.15	1.03	0.90	0.96	1.10	1.06	0.74
358	Q358H	1.05	0.99	0.95	0.97	1.15	1.40	0.94
358	Q358L	0.92	1.06	1.05	1.06	1.24	0.84	0.83
358	Q358M	1.12	1.37	1.42	1.41	1.52	1.17	0.72
358	Q358N	1.27	1.37	1.32	1.42	1.63	1.06	0.73
358	Q358P	1.27	1.33	1.10	1.23	1.72	1.17	0.65
358	Q358R	1.03	1.07	1.08	1.07	1.18	1.15	0.91
358	Q358S	1.09	0.99	1.02	1.04	1.01	0.91	0.93
358	Q358T	1.05	1.05	1.04	1.00	1.17	1.10	0.95
358	Q358V	1.15	1.18	1.02	1.13	1.35	1.35	0.67
378	P378C	28.49	39.29	11.48	19.82	40.84	34.77	0.05
378	P378D	1.13	1.20	1.15	1.18	1.12	0.99	0.88
378	P378F	1.84	2.17	0.62	1.01	2.97	0.36	0.15
378	P378G	1.21	1.20	1.00	1.06	1.44	1.30	0.75
378	P378H	0.90	0.94	0.80	0.85	1.11	0.50	1.06
378	P378I	1.16	1.20	1.03	1.15	1.33	1.26	0.62

10

20

30

40

378	P378L	0.78	0.89	0.88	0.97	1.08	0.79	0.82
378	P378N	1.31	1.39	1.19	1.37	1.42	0.97	0.71
378	P378R	0.94	0.93	1.10	1.07	1.05	1.03	1.28
378	P378S	1.15	1.09	0.99	1.04	1.08	1.11	0.90
378	P378T	0.83	0.96	0.90	0.93	0.87	0.73	1.04
378	P378V	1.08	1.08	1.09	1.10	1.15	0.94	0.87
378	P378Y	0.87	0.92	0.78	0.91	1.11	0.97	0.67
382	S382A	1.05	1.33	1.16	1.30	1.57	1.17	0.76
382	S382C	1.20	1.19	1.01	1.12	1.27	1.05	0.87
382	S382D	1.43	1.42	1.19	1.34	1.35	1.41	0.74
382	S382E	1.23	1.39	1.14	1.27	1.47	1.23	0.83
382	S382G	1.05	1.06	0.90	0.96	0.96	0.95	1.02
382	S382H	1.10	1.02	0.96	0.99	1.10	0.98	1.00
382	S382I	1.03	1.07	0.82	0.88	1.07	0.96	0.79
382	S382K	0.94	0.84	0.95	0.98	1.12	0.78	1.09
382	S382L	0.93	0.93	0.69	0.82	0.95	0.70	0.79
382	S382M	1.51	1.84	1.25	1.51	2.20	1.47	0.54
382	S382N	1.39	1.43	1.15	1.35	1.55	1.16	0.72
382	S382P	1.41	1.42	1.22	1.33	1.65	1.25	0.70
382	S382R	1.23	1.19	0.97	1.17	1.14	0.78	0.91
382	S382T	1.18	1.15	0.98	1.08	1.30	1.14	0.90
382	S382V	1.13	1.07	0.85	0.98	1.22	0.89	0.81
382	S382W	1.08	1.03	0.90	0.98	1.19	0.94	0.98
383	K383A	1.26	1.16	1.24	1.35	1.17	0.86	0.66
383	K383C	1.85	2.15	0.60	1.01	1.16	0.02	0.16
383	K383D	1.14	1.17	1.16	1.13	1.04	0.89	0.69
383	K383E	1.04	0.98	0.98	1.00	1.00	0.82	0.94
383	K383F	1.43	1.44	0.93	1.01	1.47	0.86	0.50
383	K383H	0.80	0.78	0.79	0.84	0.97	1.03	0.96
383	K383L	0.64	0.66	0.50	0.60	0.66	0.92	0.76
383	K383M	1.32	1.19	0.94	1.10	1.20	1.01	0.57
383	K383N	1.27	1.20	0.98	1.11	1.07	1.16	0.64
383	K383P	1.89	2.46	1.17	1.37	1.82	2.31	0.22
383	K383Q	1.03	0.98	1.01	1.06	0.95	1.15	0.94
383	K383R	1.02	0.91	1.00	0.95	1.10	0.84	0.99
383	K383S	0.92	0.92	0.87	0.92	0.97	0.74	0.86
383	K383T	0.79	0.76	0.83	0.84	0.90	0.83	0.98
383	K383W	0.70	0.78	0.62	0.68	0.74	0.39	0.61
383	K383Y	0.62	0.72	0.78	0.75	0.73	0.67	0.87
398	T398A	1.28	1.18	1.34	1.43	1.37	1.17	0.73
398	T398C	1.58	1.46	1.20	1.39	1.61	1.35	0.46
398	T398D	1.29	1.24	1.33	1.33	0.88	1.42	0.75
398	T398E	1.33	1.24	1.31	1.32	1.17	1.38	0.81
398	T398I	0.81	0.87	0.91	0.96	0.91	0.86	1.04
398	T398K	0.92	0.76	0.99	0.97	0.97	0.66	1.06
398	T398L	0.76	0.68	0.85	0.87	0.86	1.14	0.99
398	T398M	1.29	1.24	1.39	1.38	1.18	1.03	0.75
398	T398N	1.96	1.88	1.34	1.58	1.23	1.31	0.37
398	T398P	1.38	1.29	1.33	1.35	0.97	1.29	0.77
398	T398Q	1.47	1.41	1.61	1.52	1.46	1.51	0.74
398	T398R	1.16	1.08	1.25	1.16	1.25	1.02	0.98
398	T398S	1.03	0.94	1.08	1.05	0.92	0.67	1.07

10

20

30

40

398	T398V	1.00	1.06	1.20	1.19	1.03	0.96	0.87
405	H405A	1.61	1.64	1.45	1.54	1.54	1.15	0.56
405	H405C	1.92	2.06	1.69	1.91	2.68	1.40	0.33
405	H405D	1.45	1.44	1.25	1.30	1.37	1.21	0.47
405	H405F	2.03	2.09	1.28	1.41	3.15	1.98	0.20
405	H405G	1.16	1.20	1.10	1.14	1.50	1.14	0.72
405	H405K	0.71	0.58	0.87	0.89	1.05	0.64	0.72
405	H405L	0.79	0.89	0.77	0.94	0.97	0.72	0.49
405	H405M	1.65	1.66	1.28	1.51	1.67	1.22	0.41
405	H405N	1.42	1.26	1.37	1.42	1.43	1.09	0.69
405	H405P	-12.67	11.60	-0.88	-2.21	-6.12	-0.26	-0.03
405	H405Q	1.50	1.53	1.33	1.42	1.76	1.33	0.59
405	H405R	1.54	1.56	1.22	1.36	1.29	0.84	0.51
405	H405S	1.09	1.00	1.05	1.03	1.10	0.91	0.90
405	H405T	0.99	0.94	0.86	0.89	0.96	0.77	0.87
405	H405W	0.86	0.83	0.43	0.64	1.32	0.50	0.35
405	H405Y	0.96	1.07	0.84	0.93	1.37	0.96	0.50
417	T417A	1.55	1.30	1.42	1.39	1.28	1.05	0.71
417	T417D	1.55	1.28	1.40	1.43	1.14	1.34	0.80
417	T417E	1.22	1.07	1.16	1.17	1.12	1.07	0.89
417	T417H	0.98	0.89	0.91	0.95	1.07	0.89	0.98
417	T417I	1.00	0.99	0.79	0.84	0.90	0.82	0.82
417	T417L	0.87	0.79	0.88	0.89	0.98	1.03	0.92
417	T417M	1.65	1.65	1.39	1.52	1.82	1.41	0.49
417	T417P	1.38	1.25	1.34	1.35	1.26	1.12	0.74
417	T417Q	1.47	1.24	1.21	1.24	1.40	1.26	0.84
417	T417R	1.34	1.15	1.36	1.31	1.13	1.08	0.85
417	T417S	1.10	0.95	1.01	1.03	0.96	1.13	1.02
417	T417V	0.88	0.86	0.85	0.92	0.97	0.94	0.97
417	T417W	0.97	0.84	0.72	0.89	1.01	0.77	0.90
418	E418A	1.16	1.16	1.32	1.29	1.44	0.99	0.83
418	E418C	1.14	1.24	0.98	1.10	1.21	0.73	0.66
418	E418D	0.94	0.94	1.06	1.11	0.98	0.84	0.96
418	E418G	0.68	0.70	0.81	0.82	0.82	0.58	1.17
418	E418H	0.71	0.73	0.76	0.80	0.87	0.75	1.04
418	E418I	0.80	0.75	0.76	0.79	1.09	0.70	0.97
418	E418K	0.68	0.62	0.68	0.71	0.77	0.79	1.27
418	E418L	0.69	0.64	0.72	0.78	0.39	0.47	1.08
418	E418M	0.96	0.95	1.01	1.07	1.33	0.81	0.86
418	E418N	1.00	1.01	1.18	1.20	1.11	0.87	0.83
418	E418P	1.04	1.03	1.15	1.19	1.09	0.72	0.87
418	E418Q	1.11	1.13	1.05	1.16	1.22	0.76	0.84
418	E418R	1.08	1.01	0.95	1.03	1.26	1.01	0.86
418	E418S	1.03	0.94	0.80	0.85	0.94	0.85	0.86
418	E418T	0.87	0.80	0.82	0.84	0.91	0.50	1.09
418	E418V	0.71	0.65	0.66	0.82	0.83	0.34	1.22
418	E418Y	0.80	0.77	0.65	0.79	0.88	0.59	0.81
420	P420A	1.16	1.17	1.41	1.49	1.36	0.97	0.81
420	P420C	1.17	1.32	1.37	1.47	1.09	1.02	0.70
420	P420D	1.29	1.25	1.37	1.38	1.35	0.90	0.75
420	P420E	1.32	1.27	1.32	1.35	1.45	0.79	0.75

10

20

30

40

420	P420H	1.05	0.95	0.95	1.01	1.11	0.69	0.98
420	P420I	0.98	0.95	0.87	0.95	1.07	0.62	0.98
420	P420L	0.85	0.82	0.87	0.91	1.07	0.74	0.97
420	P420M	1.37	1.41	1.33	1.29	1.28	0.75	0.73
420	P420N	1.42	1.38	1.30	1.41	1.50	0.95	0.73
420	P420R	0.49	-5.15	-1.38	-0.61	-11.09	-1.99	-0.01
420	P420S	1.01	0.88	1.10	1.09	0.93	0.81	1.11
420	P420T	0.97	0.87	0.94	0.95	0.68	0.87	1.10
420	P420V	1.11	1.06	1.10	1.12	1.21	0.77	0.84
420	P420W	0.72	0.69	0.71	0.75	0.80	0.54	1.29
420	P420Y	0.90	0.83	0.80	0.76	1.05	0.85	0.96
421	G421A	1.36	1.28	1.23	1.30	1.31	0.79	0.79
421	G421D	1.23	1.28	1.43	1.38	1.28	0.99	0.72
421	G421E	1.44	1.43	1.47	1.46	1.48	1.23	0.66
421	G421F	1.23	1.19	1.13	1.13	1.50	0.75	0.79
421	G421H	0.91	0.81	0.80	0.84	0.69	0.71	1.19
421	G421I	1.19	1.13	0.97	1.08	1.38	0.80	0.65
421	G421L	0.80	0.77	0.91	0.95	1.24	0.74	0.97
421	G421N	1.28	1.30	1.23	1.34	1.49	0.82	0.75
421	G421P	1.20	1.22	1.22	1.27	1.41	0.83	0.74
421	G421Q	1.31	1.27	1.27	1.29	1.30	1.15	0.75
421	G421R	1.17	1.04	1.05	1.09	1.08	0.85	1.00
421	G421S	1.11	1.02	1.05	1.04	1.05	0.80	0.97
421	G421T	1.04	0.91	0.95	0.98	1.05	0.86	1.05
421	G421W	0.84	0.85	0.86	0.94	0.94	0.74	0.96
421	G421Y	0.98	0.86	0.89	0.94	1.12	0.64	0.95
432	P432A	1.40	1.30	1.44	1.53	1.64	1.26	0.75
432	P432D	1.77	1.59	1.72	1.77	1.95	1.24	0.61
432	P432E	1.39	1.29	1.40	1.41	1.33	1.19	0.77
432	P432H	1.14	1.07	0.83	1.01	1.35	0.97	0.80
432	P432K	1.21	0.96	1.05	1.08	1.22	1.02	0.91
432	P432L	1.06	0.90	0.98	0.98	1.26	0.63	0.97
432	P432M	1.48	1.47	1.72	1.71	2.15	1.45	0.65
432	P432N	1.31	1.38	1.28	1.41	1.59	1.02	0.73
432	P432Q	1.62	1.39	1.31	1.46	1.69	1.46	0.70
432	P432R	1.60	1.35	1.36	1.43	1.27	1.21	0.78
432	P432S	1.16	1.02	0.94	1.00	1.07	0.78	1.04
432	P432T	1.19	0.99	1.33	1.13	1.27	1.08	0.98
432	P432Y	1.14	0.98	0.82	0.94	1.21	0.69	0.90
437	W437C	0.83	0.77	1.09	1.15	0.89	0.84	1.01
437	W437D	0.97	0.85	1.12	1.15	0.98	0.97	1.08
437	W437E	0.99	1.00	0.79	0.87	0.95	0.76	0.59
437	W437F	1.01	0.81	0.94	1.00	0.74	0.80	1.22
437	W437G	0.83	0.72	0.82	0.82	0.78	0.66	1.42
437	W437H	0.65	0.64	0.83	0.84	0.78	0.71	1.52
437	W437L	0.64	0.60	0.73	0.75	0.59	0.68	1.55
437	W437M	1.03	0.86	1.01	1.06	0.83	0.63	1.11
437	W437N	1.01	0.94	1.02	1.06	0.87	1.07	1.04
437	W437Q	1.05	0.90	1.08	1.11	0.90	0.77	1.12
437	W437R	0.91	0.83	1.07	1.02	0.83	0.53	1.19
437	W437S	0.96	0.75	0.99	0.96	0.86	0.90	1.24
437	W437T	0.78	0.71	0.92	0.89	0.77	0.71	1.32

10

20

30

40

437	W437V	0.75	0.73	0.90	0.87	0.81	0.87	1.36
437	W437Y	0.66	0.59	0.78	0.77	0.64	0.68	1.50
443	Q443A	1.24	1.01	1.35	1.32	1.08	1.08	0.83
443	Q443C	1.27	1.23	1.16	1.22	1.02	1.22	0.80
443	Q443F	1.26	1.14	1.18	1.20	1.10	1.15	0.86
443	Q443G	1.12	0.94	1.11	1.02	1.01	1.00	1.08
443	Q443K	0.79	0.75	0.93	0.90	0.83	0.76	1.10
443	Q443L	0.84	0.81	1.07	1.02	0.89	0.85	1.09
443	Q443N	1.22	1.18	1.41	1.53	1.21	1.23	0.77
443	Q443P	1.02	0.97	1.08	1.16	1.03	0.64	0.92
443	Q443R	1.06	1.03	1.03	1.10	0.99	0.98	0.98
443	Q443S	0.89	0.82	0.95	0.94	0.84	0.87	1.20
443	Q443T	1.01	0.76	0.88	0.89	0.89	0.69	1.15
443	Q443V	1.02	0.90	1.09	1.10	1.23	1.03	0.95
443	Q443W	0.57	0.59	0.57	0.63	0.65	0.63	0.87
443	Q443Y	0.82	0.87	0.95	0.97	0.97	0.86	0.92
446	G446A	1.00	0.91	1.25	1.26	0.97	1.08	0.95
446	G446C	1.39	1.31	1.84	1.78	1.40	1.23	0.73
446	G446D	1.12	0.99	1.15	1.25	1.15	0.97	0.93
446	G446F	1.34	1.37	1.00	1.15	1.03	1.22	0.75
446	G446H	0.93	0.80	0.65	0.70	0.84	0.83	1.32
446	G446I	1.22	1.07	0.97	1.04	1.39	1.05	0.70
446	G446K	0.97	0.83	0.80	0.86	0.70	0.87	1.10
446	G446L	0.80	0.78	0.86	0.88	0.94	0.85	1.07
446	G446M	1.21	1.05	0.85	0.99	1.06	1.16	0.87
446	G446N	1.17	1.08	1.05	1.21	1.07	1.07	0.88
446	G446P	1.21	1.09	1.07	1.16	1.09	0.95	0.74
446	G446Q	1.28	1.21	1.16	1.23	1.09	1.01	0.83
446	G446R	0.37	0.07	0.71	1.10	0.22	0.65	0.75
446	G446S	1.07	0.95	0.95	0.95	0.75	1.01	1.11
446	G446T	1.03	0.88	0.69	0.81	0.91	0.96	1.09
446	G446V	1.17	1.09	0.91	0.98	1.14	0.90	0.82
446	G446W	0.85	0.72	0.83	0.89	0.92	0.80	1.05
446	G446Y	0.88	0.76	1.02	1.00	0.83	0.91	1.09
454	G454A	1.33	1.25	1.61	1.60	1.14	1.26	0.88
454	G454C	1.33	1.18	1.15	1.20	1.14	1.37	0.78
454	G454D	1.40	1.30	1.27	1.36	1.18	1.09	0.76
454	G454E	1.36	1.21	1.08	1.19	0.99	0.91	0.83
454	G454H	0.92	0.83	0.89	0.95	0.83	0.83	1.10
454	G454I	0.87	0.79	0.77	0.82	0.88	0.75	1.02
454	G454K	0.86	0.80	0.99	0.97	0.82	0.81	1.13
454	G454L	0.12	-0.34	-0.62	-0.26	0.50	-0.62	0.11
454	G454M	1.39	1.26	1.14	1.42	1.26	1.30	0.68
454	G454N	1.20	1.09	1.07	1.20	1.11	1.10	0.91
454	G454P	1.41	1.34	1.14	1.29	1.16	0.96	0.77
454	G454R	1.25	1.09	0.99	1.12	1.07	1.01	0.92
454	G454S	0.83	0.80	0.83	0.90	0.89	0.79	1.17
454	G454T	1.04	0.93	0.90	0.98	0.99	0.94	1.02
454	G454V	1.20	1.07	1.05	1.10	1.18	0.89	0.93
457	S457A	1.05	0.95	1.22	1.27	1.23	1.21	0.89
457	S457C	1.27	1.23	0.72	0.72	1.53	1.44	0.59
457	S457D	1.02	0.89	1.05	1.16	0.93	0.81	0.99

10

20

30

40

457	S457E	1.10	0.95	0.97	1.06	0.97	0.79	0.95
457	S457G	0.82	0.71	0.82	0.87	0.80	0.88	1.21
457	S457H	0.83	0.72	0.81	0.90	0.89	1.12	1.17
457	S457K	0.74	0.63	0.79	0.86	0.76	0.62	1.37
457	S457L	0.67	0.61	0.68	0.79	0.64	0.63	1.27
457	S457M	1.07	0.98	0.96	1.08	1.03	0.99	0.92
457	S457N	1.08	0.92	1.10	1.19	1.13	1.15	0.86
457	S457P	1.29	1.21	1.09	1.18	1.30	1.19	0.88
457	S457Q	1.10	1.01	1.06	1.13	1.14	0.96	0.91
457	S457R	1.58	1.31	0.89	1.10	1.59	1.89	0.42
457	S457T	0.88	0.70	0.94	0.94	0.85	1.01	1.18
457	S457V	0.89	0.82	0.83	0.88	0.84	0.78	1.11
457	S457W	0.87	0.69	0.64	0.74	0.84	0.60	1.05
457	S457Y	0.81	0.70	0.70	0.80	0.80	0.79	1.15
459	T459A	1.10	1.03	1.25	1.34	1.46	1.18	0.83
459	T459D	1.20	1.17	1.19	1.24	1.37	1.44	0.82
459	T459G	1.15	1.01	0.98	0.97	0.81	1.36	1.08
459	T459I	1.05	0.95	0.95	1.01	1.04	1.04	1.02
459	T459K	1.04	0.91	0.86	0.90	0.80	0.72	1.08
459	T459L	0.93	0.83	1.19	1.10	0.91	0.81	1.04
459	T459Q	1.46	1.43	1.40	1.47	1.29	1.24	0.72
459	T459R	1.09	1.00	1.09	1.09	0.90	0.97	1.05
459	T459S	0.99	1.00	0.85	0.87	1.04	0.90	1.06
459	T459V	1.11	1.02	0.92	0.99	1.07	1.35	0.93
459	T459Y	1.10	1.02	0.97	1.06	1.14	0.74	0.92
461	T461A	1.40	1.44	1.16	1.28	1.74	1.18	0.47
461	T461D	1.26	1.09	1.21	1.25	1.25	1.10	0.92
461	T461E	1.52	1.44	1.49	1.43	1.22	1.06	0.74
461	T461F	1.29	1.22	1.31	1.25	1.14	1.12	0.79
461	T461G	1.09	1.03	1.08	1.04	1.16	1.14	0.98
461	T461I	1.11	1.00	0.99	1.05	1.03	1.33	0.93
461	T461K	0.89	0.75	0.78	0.91	0.98	0.99	1.01
461	T461L	0.92	0.85	1.03	1.02	1.15	0.91	0.87
461	T461N	1.18	1.18	1.35	1.37	1.36	1.30	0.81
461	T461P	1.19	1.10	1.37	1.33	1.14	1.17	0.92
461	T461R	1.19	1.04	1.13	1.18	1.11	0.91	0.99
461	T461S	1.12	1.04	0.87	0.88	1.03	0.90	0.88
461	T461V	0.95	1.00	1.01	1.05	1.11	1.28	0.87
461	T461W	0.97	0.82	0.77	0.86	0.75	0.67	0.87
461	T461Y	1.02	0.93	0.90	1.02	1.01	1.11	0.87
464	S464D	1.45	1.23	1.24	1.31	1.51	1.21	0.73
464	S464E	0.95	0.98	1.04	1.06	1.06	1.23	1.03
464	S464G	0.94	0.86	0.92	1.00	0.98	0.97	1.04
464	S464H	0.88	0.84	0.82	0.87	0.99	1.04	1.10
464	S464I	0.94	0.80	0.78	0.83	0.96	1.15	1.00
464	S464K	0.94	0.85	0.88	0.93	0.93	0.81	0.97
464	S464L	0.77	0.81	0.79	0.91	0.88	0.86	1.02
464	S464M	1.32	1.27	1.35	1.50	1.18	1.42	0.81
464	S464N	1.15	1.03	1.16	1.25	1.18	1.38	0.85
464	S464P	1.42	1.38	1.32	1.42	1.40	1.56	0.76
464	S464Q	1.33	1.30	1.12	1.29	1.28	1.21	0.80
464	S464V	0.94	0.96	0.94	1.02	1.12	1.33	0.89

10

20

30

40

464	S464W	1.06	0.95	0.94	1.08	0.98	0.84	1.01
464	S464Y	0.81	0.71	1.01	1.02	0.75	0.84	1.33
474	G474A	1.03	1.20	1.25	1.35	1.12	1.27	0.81
474	G474C	1.05	1.30	1.18	1.31	1.55	1.04	0.66
474	G474D	1.13	1.26	1.35	1.41	1.26	1.28	0.78
474	G474E	1.13	1.13	1.17	1.27	1.16	1.23	0.87
474	G474F	1.23	1.34	1.20	1.29	1.22	1.47	0.80
474	G474H	0.86	0.95	0.94	1.02	1.06	1.11	1.07
474	G474I	0.79	0.99	0.91	0.97	0.95	0.81	0.99
474	G474K	0.81	0.82	0.92	0.97	1.06	0.97	1.07
474	G474L	0.70	0.75	0.81	0.87	0.88	0.91	1.12
474	G474M	1.18	1.26	1.24	1.40	1.20	1.05	0.74
474	G474N	1.14	1.02	1.09	1.16	1.29	1.29	0.89
474	G474P	1.53	1.45	1.25	1.38	1.39	0.36	0.72
474	G474Q	1.19	1.14	1.26	1.33	1.35	1.37	0.79
474	G474R	1.15	1.17	1.16	1.29	1.31	1.41	0.82
474	G474S	0.87	0.89	0.97	0.99	1.00	0.93	1.09
474	G474T	0.97	1.01	1.13	1.06	1.03	1.00	1.01
474	G474V	0.88	0.91	1.03	1.02	1.03	0.94	1.01
483	R483A	1.25	1.23	1.35	1.43	1.43	1.34	0.74
483	R483C	1.19	1.17	1.73	1.51	1.19	1.59	0.70
483	R483F	1.08	1.49	1.36	1.23	1.51	1.18	0.57
483	R483G	1.07	1.13	1.07	1.12	1.14	1.08	0.86
483	R483K	0.82	0.73	0.86	0.90	0.91	0.69	1.12
483	R483L	1.10	1.03	1.29	1.20	1.06	0.93	0.94
483	R483M	1.31	1.50	1.42	1.56	1.51	1.26	0.66
483	R483N	1.17	1.32	1.46	1.39	1.34	1.09	0.75
483	R483P	1.19	1.17	1.37	1.35	1.17	1.05	0.83
483	R483Q	1.38	1.48	1.84	1.67	1.72	1.51	0.65
483	R483S	0.99	1.05	0.92	0.96	1.04	0.94	1.02
483	R483T	1.10	1.03	1.04	0.98	0.98	0.93	0.93
483	R483V	1.11	1.18	1.25	1.26	1.25	1.20	0.80
483	R483Y	0.81	0.86	1.07	1.06	1.04	0.81	0.96

10

20

30

【0407】

野生型 α アミラーゼに対して1つ以上の改善された性質を有する数多くの変異体 α アミラーゼが生成されたことが明らかである。これらの置換体は本発明の組成物及び方法に含まれる。

実施例24

AmyS変異体の変更された性質

【0408】

この実施例は幾つかのゲオバチルスステアロセレモフィリス α アミラーゼ (AmyS) 変異体 (実施例22で説明) が親 α アミラーゼに対して変更された性質を有していることを示す。AmyS変異体の高い熱安定性の処理能力スクリーンを実施例3のように行った。性能は活性について示し (BODIPYアッセイで測定)、残余活性を (熱ストレス後) を表24-1、24-2、及び24-3に示した。

40

表24-1

野生型AmySよりも活性及び熱ストレス後残余活性の両方についての性能インデックスを有する変異を有するAmySタンパク質の置換位置 (カラムではVariantと記載)

変異体	活性	残余活性
72 D	1.0300361	1.0701945
74 A	1.0821966	1.2443197
74 E	1.0425346	1.0348158
74 G	1.1272413	1.0873821
74 H	1.0489031	1.0047597
74 I	1.0441329	1.0204416
74 Y	1.0962024	1.0243028
86 E	1.0744425	1.0082956
86 K	1.0320588	1.0003874
115 E	1.0371929	1.0263233
115 K	1.0983963	1.1179136
115 L	1.0304852	1.2220073
115 N	1.0617811	1.0373701
115 Q	1.0585819	1.0086197
115 R	1.0362569	1.0196812
115 Y	1.0818022	1.0155115
124 A	1.0066154	1.0764058
124 K	1.0875013	1.3977188
124 N	1.2073767	1.1957849
124 Q	1.0581528	1.1748222
124 R	1.0401245	1.2046408
125 N	1.2111343	1.111989
132 A	1.0229275	1.3339209
135 F	1.0125922	1.1400675
145 A	1.0535347	1.269397
146 A	1.0159296	1.2695343
146 D	1.0111003	1.0989512
146 E	1.0209598	1.076157
146 T	1.0557131	1.0905141
146 W	1.0503671	1.0446909
148 A	1.1550962	1.3714229
148 E	1.0257123	1.1367377
148 F	1.0047267	1.0833811
148 R	1.1439066	1.0724962
153 A	1.0933406	1.1903028
153 D	1.047218	1.0763254
153 G	1.0314126	1.0393344
153 H	1.0243746	1.0325474
153 N	1.0749307	1.1537286
153 P	1.1090313	1.1653113
153 R	1.0695773	1.050884
159 A	1.2514424	1.8489959
159 C	1.1389324	1.4229765

10

20

30

40

159 D	1.3042895	1.616517
159 E	1.3048703	1.6426287
159 F	1.0692526	1.2740874
159 G	1.309088	1.4806394
159 H	1.2239861	1.4766606
159 K	1.3024788	1.6188749
159 L	1.2438467	1.7685564
159 N	1.4021695	1.747298
159 R	1.3445318	1.6062932
159 S	1.3352659	1.5322275
159 T	1.2115923	1.5982316
159 V	1.1075763	1.5364844
169 L	1.2709	1.221157
169 M	1.0720854	1.2525822
169 Y	1.1519097	1.3009779
179 A	1.2856782	1.4150905
179 Q	1.0837406	1.0777175
180 A	1.223674	1.1463487
181 A	1.5853606	2.5498838
181 C	1.0805237	1.2359592
181 D	1.2451756	1.4958763
181 E	1.2126846	1.3673333
181 F	1.1174172	1.0714025
181 L	1.0562715	1.2603028
181 M	1.0553459	1.1115696
181 N	1.0657087	1.058626
181 P	1.3407541	1.8191875
181 Q	1.1827757	1.3094913
181 R	2.1023852	1.000651
181 V	1.2072805	1.2882775
181 Y	1.1468422	1.2888335
187 L	1.0631177	1.1713174
242 D	1.053295	1.2659451
242 E	1.1904636	1.4089496
242 G	1.0897161	1.0670134
259 M	1.054788	1.1174398
261 L	1.1311136	1.2682418
271 K	1.0660617	1.1281026
271 V	1.0912656	1.3024768
278 A	1.1681249	1.3749858
278 H	1.2287582	1.3214257
278 K	1.2908668	1.3351968
278 N	1.2587781	1.4816971
278 R	1.2602246	1.3802029
278 S	1.0407916	1.051006
281 A	1.0778757	1.302493
281 I	1.0773434	1.0691046
281 L	1.0664433	1.5428781
281 M	1.2357293	1.317267
281 P	1.1452343	1.1634661
281 R	1.1498741	1.1898966
281 Y	1.0366211	1.0814182

10

20

30

40

302 C	1.0627926	1.0743991
302 D	1.3067743	1.3085968
302 E	1.0492343	1.1151221
302 M	1.0807557	1.2463993
304 D	1.1358974	1.304862
304 E	1.1872403	1.2138013
304 F	1.1250781	1.0476505
304 M	1.2316987	1.2224245
304 N	1.0270711	1.0584592
304 P	1.0166456	1.0403283
304 R	1.0960387	1.0336549
304 V	1.0716606	1.0416779
304 W	1.1600113	1.0109269
304 Y	1.3289811	1.1964204
308 A	1.0074309	1.189004
321 A	1.0826055	1.2311805
321 H	1.384587	1.4691649
321 Q	1.3306703	1.3485614
321 R	1.2446359	1.3138378
321 S	1.1483705	1.1251132
321 Y	1.0396471	1.1263643
333 Q	1.425789	1.6656427
378 D	1.0880667	1.2202146
378 N	1.0064817	1.2616767
378 R	1.0264777	1.2826859
378 T	1.042994	1.0795534
382 D	1.1628676	1.2206133
382 G	1.0050534	1.009576
382 K	1.1896345	1.178075
382 N	1.0241429	1.1576205
382 P	1.001145	1.0672392
398 A	1.0127464	1.2067063
418 A	1.070915	1.3701437
418 M	1.101424	1.3091549
418 N	1.1440828	1.4650527
420 A	1.1288416	1.2216203
420 D	1.0368387	1.065286
420 M	1.011372	1.1274183
420 N	1.0213745	1.1440374
421 E	1.010536	1.0961403
421 H	1.0434891	1.0576175
421 L	1.0197128	1.0679988
421 N	1.092512	1.1299631
421 Q	1.0784982	1.1126707
421 R	1.142674	1.2396538
421 T	1.0098565	1.023113
432 A	1.1828859	1.4534375
432 D	1.1261465	1.2701694
432 E	1.0932052	1.1438228
432 K	1.0432215	1.1145887
432 L	1.1040571	1.2896033
432 M	1.1530369	1.3947422

10

20

30

40

432 N	1.1373288	1.2843802
432 Q	1.2305257	1.3438957
432 R	1.1226193	1.2108348
432 S	1.1383528	1.1690319
432 T	1.0946975	1.1651163
432 Y	1.0242088	1.2209025
437 C	1.0389223	1.0550093
437 D	1.0648095	1.2263069
437 F	1.0884138	1.0761389
437 G	1.1270339	1.2057266
437 H	1.0624587	1.2128077
437 L	1.0706178	1.2702869
437 M	1.1727007	1.3357945
437 N	1.0678835	1.1245993
437 Q	1.0533035	1.1845926
437 R	1.0211609	1.01587
437 S	1.0996009	1.0837657
437 V	1.0035949	1.1373234
437 Y	1.2190374	1.428939
443 G	1.039287	1.0340347
443 L	1.0229234	1.0966951
443 P	1.0219417	1.0948128
446 A	1.2002798	1.498028
446 D	1.0773299	1.1176728
446 H	1.0897531	1.071114
446 K	1.039616	1.0263734
446 N	1.1867752	1.1501356
446 R	1.0179243	1.035122
446 S	1.00426	1.0219768
446 Y	1.1205486	1.2525673
459 I	1.0404304	1.0379194
459 M	1.0320006	1.1066777
459 Y	1.0131462	1.0198803
461 P	1.084833	1.1869717
464 D	1.0164453	1.0297077
464 H	1.0355113	1.0962268
464 L	1.0084324	1.0510274
464 M	1.0026999	1.1589373
464 N	1.0727228	1.1205096
464 Q	1.0719588	1.2199585
464 Y	1.1888873	1.3747167
474 A	1.1556971	1.3935021
474 D	1.0692943	1.1879003
474 E	1.1729152	1.3481142
474 F	1.0633952	1.1462803
474 H	1.0620029	1.1722857
474 I	1.0766474	1.1352128
474 K	1.1240341	1.2036886
474 L	1.110407	1.267509
474 M	1.1869843	1.3422689
474 N	1.1135684	1.2124349
474 P	1.0761861	1.2293237

10

20

30

40

474 Q	1.2580448	1.3477339
474 R	1.1994238	1.3506214
474 S	1.2348915	1.2615358
474 T	1.1757697	1.1841873
474 V	1.0823992	1.2078523

表 2 4 - 2

野生型 A m y S よりも熱ストレス後残余活性が野生型に対して少なくとも 2 0 % 良好で開始活性又は発現が野生型 A m y S の少なくとも半分である性能インデックスを有する変異を有する A m y S タンパク質の置換位置（カラムでは V a r i a n t と記載）

変異体	活性	残余活性
74A	1.0821966	1.2443197
115L	1.0304852	1.2220073
124K	1.0875013	1.3977188
124R	1.0401245	1.2046408
132A	1.0229275	1.3339209
132C	0.9072598	1.2271522
135A	0.9014583	1.2604591
145A	1.0535347	1.269397
146A	1.0159296	1.2695343
148A	1.1550962	1.3714229
148N	0.8803735	1.202166
159A	1.2514424	1.8489959
159C	1.1389324	1.4229765
159D	1.3042895	1.616517
159E	1.3048703	1.6426287
159F	1.0692526	1.2740874
159G	1.309088	1.4806394
159H	1.2239861	1.4766606
159K	1.3024788	1.6188749
159L	1.2438467	1.7685564
159N	1.4021695	1.747298
159R	1.3445318	1.6062932
159S	1.3352659	1.5322275
159T	1.2115923	1.5982316
159V	1.1075763	1.5364844
169A	0.9976004	1.3149706
169L	1.2709	1.221157
169M	1.0720854	1.2525822
169Y	1.1519097	1.3009779
179A	1.2856782	1.4150905
181A	1.5853606	2.5498838
181C	1.0805237	1.2359592
181D	1.2451756	1.4958763
181E	1.2126846	1.3673333
181L	1.0562715	1.2603028
181P	1.3407541	1.8191875
181Q	1.1827757	1.3094913
181V	1.2072805	1.2882775

10

20

30

40

181Y	1.1468422	1.2888335
242A	0.8658592	1.3402797
242D	1.053295	1.2659451
242E	1.1904636	1.4089496
242Q	0.9905304	1.8848517
261L	1.1311136	1.2682418
271A	0.9883235	1.3367718
271V	1.0912656	1.3024768
278A	1.1681249	1.3749858
278H	1.2287582	1.3214257
278K	1.2908668	1.3351968
278N	1.2587781	1.4816971
278R	1.2602246	1.3802029
281A	1.0778757	1.302493
281L	1.0664433	1.5428781
281M	1.2357293	1.317267
302D	1.3067743	1.3085968
302M	1.0807557	1.2463993
304D	1.1358974	1.304862
304E	1.1872403	1.2138013
304M	1.2316987	1.2224245
321A	1.0826055	1.2311805
321H	1.384587	1.4691649
321Q	1.3306703	1.3485614
321R	1.2446359	1.3138378
333Q	1.425789	1.6656427
378D	1.0880667	1.2202146
378N	1.0064817	1.2616767
378R	1.0264777	1.2826859
382D	1.1628676	1.2206133
398A	1.0127464	1.2067063
418A	1.070915	1.3701437
418M	1.101424	1.3091549
418N	1.1440828	1.4650527
420A	1.1288416	1.2216203
421R	1.142674	1.2396538
432A	1.1828859	1.4534375
432D	1.1261465	1.2701694
432L	1.1040571	1.2896033
432M	1.1530369	1.3947422
432N	1.1373288	1.2843802
432Q	1.2305257	1.3438957
432R	1.1226193	1.2108348
432Y	1.0242088	1.2209025
437D	1.0648095	1.2263069
437G	1.1270339	1.2057266
437H	1.0624587	1.2128077
437L	1.0706178	1.2702869
437M	1.1727007	1.3357945
437Y	1.2190374	1.428939
446A	1.2002798	1.498028
446Y	1.1205486	1.2525673

10

20

30

40

454A	0.9816646	1.2570919
464Q	1.0719588	1.2199585
464Y	1.1888873	1.3747167
474A	1.1556971	1.3935021
474E	1.1729152	1.3481142
474K	1.1240341	1.2036886
474L	1.110407	1.267509
474M	1.1869843	1.3422689
474N	1.1135684	1.2124349
474P	1.0761861	1.2293237
474Q	1.2580448	1.3477339
474R	1.1994238	1.3506214
474S	1.2348915	1.2615358
474V	1.0823992	1.2078523

10

20

表 2 4 - 3

野生型 A m y S よりも少なくとも 2 0 % 大きな活性又は発現の性能インデックスを有する変異を有する A m y S タンパク質の置換位置（カラムでは V a r i a n t と記載）

変異体	活性	残余活性
124N	1.2073767	1.1957849
125A	1.372718	-0.3461869
125K	1.2754087	-0.3195654
125N	1.2111343	1.111989
130A	1.2829276	-0.1606582
130S	1.2547959	-0.2396474
159A	1.2514424	1.8489959
159D	1.3042895	1.616517
159E	1.3048703	1.6426287
159G	1.309088	1.4806394
159H	1.2239861	1.4766606
159K	1.3024788	1.6188749
159L	1.2438467	1.7685564
159N	1.4021695	1.747298
159R	1.3445318	1.6062932
159S	1.3352659	1.5322275
159T	1.2115923	1.5982316
166F	1.3226117	0.9751853
166G	1.3251188	-0.8989095
166H	1.5608888	0.889625
166S	1.5553953	-0.4698927
166Y	1.3161377	0.9404254
169L	1.2709	1.221157
179A	1.2856782	1.4150905
179P	1.2367832	-0.2832651
180A	1.223674	1.1463487
180D	1.3732003	0.5446904
180H	1.3854073	-0.9190277
180K	1.4038831	-1.1078033
180L	1.6414819	-0.6936105

10

20

30

40

180N	1.2646998	-1.0108408
180T	1.4553893	-0.8759486
180V	1.2190216	-1.0611484
180Y	1.3113267	0.6162484
181A	1.5853606	2.5498838
181D	1.2451756	1.4958763
181E	1.2126846	1.3673333
181G	1.2893058	0.9117403
181P	1.3407541	1.8191875
181R	2.1023852	1.000651
181S	1.2285225	0.9373869
181V	1.2072805	1.2882775
187A	1.3658382	-0.221251
187C	1.3181513	-0.2335241
187K	1.2523832	-0.2685104
187N	1.2632558	0.127576
187P	1.4102122	-0.2495879
187Q	1.2477941	-0.2008265
187R	1.3445711	-0.2482154
187S	1.2513011	-0.2208563
242H	1.280464	0.7629545
242N	1.29758	0.8729278
278H	1.2287582	1.3214257
278K	1.2908668	1.3351968
278N	1.2587781	1.4816971
278R	1.2602246	1.3802029
281M	1.2357293	1.317267
302D	1.3067743	1.3085968
304M	1.2316987	1.2224245
304Y	1.3289811	1.1964204
321H	1.384587	1.4691649
321Q	1.3306703	1.3485614
321R	1.2446359	1.3138378
333Q	1.425789	1.6656427
432Q	1.2305257	1.3438957
437Y	1.2190374	1.428939
446A	1.2002798	1.498028
474Q	1.2580448	1.3477339
474S	1.2348915	1.2615358

10

20

30

40

表 2 3 - 1、2 4 - 1、2 4 - 2、及び 2 4 - 3 に記載の A m y S 位置に関する相対的性能及び熱安定性データに基づいて、以下のように A m y S 位置を限定対非限定として分類した：非限定的位置は少なくとも 1 つの性質について 2 0 % 以上ニュートラル変異を有する。これらの位置における変異は性能が改善される可能性が高い変異体であるので、これらの位置は、修飾された α アミラーゼを作るときには好適な候補変異部位である。限定的位置は活性及び安定性が 2 0 % 未満のニュートラル変異を有する。これらの位置は、性能を高めるというよりもむしろ減少させる置換位置であるので、 α アミラーゼの修飾についてはそのままにしておく（即ち、変異させない）。

実施例 2 5

A m y S タンパク質における追加的なポジショナルライブラリー

10

【 0 4 1 0 】

実施例 2 2 に記載の A m y S 変異体に加えて、追加的な部位におけるポジショナルライブラリーを切断部位を有するゲオパチルスステアロセリモフィリス α アミラーゼ（配列番号 2）中に生成した。このライブラリーは Geneart（Geneart GmbH, Joseph-Engert-Strasse 11, D-93053 Regensburg, DE）により生成された。表 2 5 - 1 は生成された部位変異体を示す。

表 25-1Amys において作成された部位変異体

N5: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G6: A,D,E,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E13: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W14: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
Y15: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W
L16: A,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D18: A,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G20: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K25: A,C,D,E,F,G,H,L,M,N,P,Q,R,S,T,Y
A27: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E29: A,D,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
L36: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T39: C,D,E,F,G,H,K,M,N,P,Q,R,S,V,W
T50: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
R52: A,C,D,E,G,H,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
S53: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,T,V,W,Y
D54: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E67: A,C,D,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
K71: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T73: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
R75: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,S,T,V,W,Y
K77: A,C,D,E,F,G,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
T80: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
K81: A,C,D,E,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q83: A,C,D,E,G,G,H,I,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
L85: A,C,D,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
A90: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,O,Q,R,S,T,V,W,Y
H92: C,D,E,F,G,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
H106: A,C,D,E,G,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K107: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D111: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T113: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,V,W
E114: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y
E120: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
V121: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,W,Y
R126: A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,T,V,W,Y
Q128: A,C,D,E,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y

10

20

30

40

S131: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,R,T,W,Y
T133: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
Q137: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
A138: C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W139: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,Y
K141: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D143: A,C,E,G,H,I,K,L,M,N,P,T,V,W,Y
R147: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
N149: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,V,W
T150: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,Q,R,S,V,Y
Y151: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
S152: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,Q,R,T,V,W,Y
K155: A,C,D,E,G,H,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
H160: A,C,D,E,F,G,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D165: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E168: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
L172: A,C,D,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S173: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,T,V,W,Y
K177: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
E188: A,C,D,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
T191: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W
E192: A,C,D,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N193: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,R,S,T,W,Y
Y196: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W
L199: A,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
M200: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,S,T,V,W
Y201: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
A202: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
T213: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W
K216: A,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N217: A,C,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K220: A,C,D,E,F,G,H,I,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W221: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,Y
N227: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
R232: A,C,D,E,G,H,K,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
A235: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K237: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
H238: A,C,D,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,Y
K240: A,D,E,F,G,H,I,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D246: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,Y
S249: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,P,Q,R,T,V,W,Y
Y250: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
R252: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,Y
S253: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,W,Y
Q254: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,R,S,T,V,W,Y
T255: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
K257: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
P258: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
Y268: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
K272: A,C,D,E,F,G,H,I,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
H274: A,C,D,E,F,G,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y
N275: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y

10

20

30

40

K279: C,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
T283: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
S285: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,Q,R,T,V,W,Y
N293: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K294: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T297: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
K300: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
S301: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
D306: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T309: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
T312: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
N313: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,V,W
K317: A,C,D,E,F,G,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D318: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q319: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
P320: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y
L338: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q339: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
S340: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,Y
D343: A,C,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,W,Y
W345: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V
C363: A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y366: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
Y369: A,C,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,T,V,W
Y370: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W
Y375: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W
S379: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
K381: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D385: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
P386: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,S,T,V,W,Y
R391: A,C,E,G,H,K,L,N,P,Q,S,T,V,W,Y
R392: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
D393: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y394: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,V,W
H400: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y402: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W
L403: A,C,D,E,F,G,H,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D404: A,C,E,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
S406: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,Y
D407: C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G410: A,C,D,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
R413: A,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
E414: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
V416: A,C,D,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
K419: A,C,D,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S422: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
L427: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G433: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,W,R,S,T,V,Y
K436: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y439: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
K442: A,C,F,G,H,I,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
A445: C,D,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W

10

20

30

40

K447: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
V448: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
Y450: A,C,D,E,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
L452: A,C,D,E,F,G,H,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
N455: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N463: A,D,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D465: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E469: A,C,D,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K471: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
N473: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S476: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y

10

実施例 2 6実施例 2 5 における変異体の変更された性質

20

【 0 4 1 1 】

この実施例は（実施例 2 5 で説明した）ゲオバチルスステアロセレモフィリス α アミラーゼ（A m y S）変異体が親 α アミラーゼに対して変更された性質を有することを示す。A m y S 変異体の高い処理能力の熱安定性スクリーンを実施例 3 に記載の通りに行った。活性（B O D I P Y アッセイ）及び残余活性（熱ストレス後）についての性能インデックスを表 2 6 - 1、2 6 - 2、及び 2 6 - 3 に示す。

表 2 6 - 1

活性及び熱ストレス後の残余活性の両方について野生型 A m y S よりも好適な性能インデックスを有する変異を有する A m y S タンパク質中の置換位置（変異体と表示したカラム）

30

Variant	Activity	Residual Activity
006A	1.59	1.10
006D	1.64	1.14
006E	1.93	1.08
006I	1.47	1.23
006L	1.61	1.15
006M	1.60	1.11
006N	1.61	1.21
006P	2.47	1.10
006Q	1.34	1.26
006S	1.86	1.12
006T	2.01	1.21
006V	1.54	1.29
006W	1.32	1.13
006Y	1.88	1.07
014F	1.25	1.06
014T	1.22	1.22
014Y	1.71	1.08
015A	1.48	1.05
015H	1.85	1.01
016E	1.21	1.09

10

20

025C	1.46	1.33
025D	1.03	1.06
025H	1.06	1.03
025Q	1.07	1.24
027N	1.00	1.06
036K	1.05	1.01
036M	1.05	1.05
039C	1.05	1.09
039D	1.47	1.15
039E	1.32	1.15
039G	1.05	1.23
039H	1.10	1.16
039K	1.10	1.12
039N	1.64	1.14
039Q	1.43	1.20
039R	1.10	1.01
039S	1.02	1.15
050G	1.18	1.00
050N	1.12	1.20
050Q	1.08	1.31
050S	1.09	1.07
052M	1.00	1.01
052T	1.00	1.11
053A	1.00	1.03
053H	1.00	1.12
053K	1.10	1.03
053T	1.02	1.25
067G	1.13	1.01
067H	1.03	1.04
071R	1.10	1.10
075A	1.14	1.05
075M	1.04	1.04
085E	1.02	1.09
085M	1.04	1.01
085S	1.04	1.02
090H	1.03	1.05
090M	1.02	1.02
113L	1.08	1.08
133P	1.08	1.41
138P	1.15	1.07
138S	1.02	1.12
138T	1.05	1.16
139Y	1.63	1.14
141M	1.01	1.23
141N	1.02	1.11
143G	1.09	1.13
143V	1.01	1.00
150M	1.00	1.05
160N	1.02	1.11
165N	1.10	1.16
172A	1.06	1.14
172R	1.06	1.16

10

20

30

40

173K	1.03	1.17
188P	1.16	1.40
193K	1.17	1.28
193Y	1.10	1.89
201H	1.44	1.06
201M	1.21	1.16
213Q	1.02	1.12
213R	1.05	1.05
213S	1.08	1.10
216E	1.30	1.03
216Q	1.34	1.04
221F	1.28	1.07
221I	1.23	1.33
221M	1.35	1.16
221N	1.57	1.11
221S	1.40	1.34
221V	1.31	1.13
221Y	1.36	1.14
227A	1.02	1.01
227D	1.06	1.01
227E	1.06	1.03
227G	1.09	1.05
227K	1.13	1.00
235R	1.14	1.03
246E	1.03	1.18
249K	1.02	1.15
249R	1.03	1.07
250C	1.12	1.03
250E	1.33	1.13
250F	1.28	1.29
250G	1.33	1.09
250I	1.27	1.35
250K	1.48	1.07
250L	1.32	1.02
250M	1.39	1.35
250N	1.40	1.05
250Q	1.54	1.01
250S	1.41	1.02
252A	1.08	1.12
252E	1.12	1.09
252K	1.21	1.19
252Q	1.04	1.16
252S	1.01	1.04
253D	1.04	1.07
253K	1.01	1.10
253N	1.03	1.06
258D	1.10	1.33
258G	1.02	1.30
258H	1.13	1.38
258K	1.11	1.29
258N	1.01	1.07
258Q	1.13	1.31

10

20

30

40

258R	1.13	1.02
258S	1.08	1.12
258T	1.10	1.27
258Y	1.08	1.16
268F	1.07	1.28
268G	1.21	1.03
268S	1.22	1.06
274Y	1.07	1.05
283K	1.01	1.14
283S	1.06	1.02
283Y	1.04	1.01
285F	1.02	1.18
285Q	1.22	1.38
285W	1.08	1.13
293H	1.05	1.12
293K	1.41	1.42
293Q	1.06	1.14
293T	1.12	1.10
297R	1.14	1.03
301G	1.05	1.02
301K	1.05	1.08
309K	1.08	1.18
309R	1.08	1.12
312A	1.00	1.01
312G	1.07	1.18
313R	1.13	1.19
313S	1.05	1.25
318H	1.10	1.12
318S	1.37	1.11
318T	1.32	1.40
318Y	1.33	1.10
319A	1.13	1.02
319G	1.03	1.14
319K	1.52	1.10
319R	1.44	1.18
319V	1.08	1.07
319W	1.08	1.05
319Y	1.41	1.04
320S	1.03	1.16
320T	1.28	1.11
320Y	1.03	1.05
338A	1.29	1.36
338G	1.34	1.38
338I	1.32	1.12
338M	1.27	1.20
338P	1.23	1.11
338S	1.51	1.13
338T	1.05	1.42
338V	1.55	1.14
339A	1.13	1.08
339G	1.21	1.17
339H	1.04	1.03

10

20

30

40

339K	1.13	1.26
339P	1.24	1.02
339S	1.02	1.02
339T	1.01	1.35
340A	1.43	1.23
340H	1.45	1.12
340I	1.07	1.07
340M	1.20	1.24
340N	1.75	1.10
340Q	1.76	1.21
340T	1.14	1.21
343E	1.07	1.00
343P	1.03	1.30
343Q	1.01	1.14
343R	1.03	1.25
345D	1.15	1.10
345E	1.24	1.06
345H	1.10	1.15
345M	1.01	1.02
345N	1.10	1.07
345Q	1.10	1.26
345S	1.12	1.01
345T	1.15	1.15
345V	1.02	1.16
366H	1.12	1.07
366Q	1.49	1.03
366S	1.02	1.07
369M	1.02	1.06
370A	1.21	1.03
370G	1.18	1.21
370N	1.41	1.04
370S	1.50	1.06
370T	1.10	1.07
370V	1.13	1.05
375A	1.39	1.03
375L	1.07	1.03
375T	1.04	1.25
379A	1.02	1.01
385Q	1.01	1.02
392K	1.09	1.10
394K	1.07	1.09
394L	1.11	1.22
394Q	1.13	1.09
394S	1.15	1.11
394W	1.16	1.11
402T	1.02	1.32
403R	1.01	1.36
403V	1.00	1.34
413A	1.06	1.02
419A	1.29	1.36
419I	1.32	1.12
419M	1.27	1.20

10

20

30

40

419P	1.23	1.11
419S	1.51	1.13
419T	1.05	1.42
419V	1.55	1.14
422N	1.03	1.12
433A	1.08	1.27
433K	1.05	1.27
433M	1.01	1.23
433Y	1.01	1.26
442G	1.02	1.23
442H	1.04	1.07
442N	1.03	1.39
442P	1.03	1.11
442Q	1.05	1.11
442R	1.01	1.33
442S	1.07	1.24
442T	1.06	1.34
442Y	1.08	1.24
445G	1.01	1.21
447A	1.06	1.09
447L	1.01	1.06
448D	1.02	1.15
448F	1.01	1.48
448G	1.05	1.26
448H	1.03	1.37
448K	1.07	1.20
448L	1.08	1.04
448Q	1.16	1.18
448S	1.10	1.20
448Y	1.27	1.33
450R	1.02	1.22
450S	1.01	1.22
452A	1.06	1.08
452G	1.00	1.07
452K	1.08	1.11
452M	1.09	1.13
452N	1.28	1.06
452T	1.18	1.02
452V	1.14	1.14
452Y	1.07	1.17
455A	1.04	1.07
455G	1.00	1.23
455H	1.01	1.05
455K	1.08	1.10
455R	1.02	1.13
463A	1.06	1.25
463G	1.00	1.04
463L	1.01	1.16
463M	1.08	1.24
469A	1.01	1.16
469D	1.02	1.22
469F	1.00	1.11

10

20

30

40

469Q	1.04	1.03
469T	1.06	1.15
469V	1.08	1.15
469Y	1.09	1.35
471A	1.09	1.09
471D	1.06	1.01
471F	1.05	1.10
471G	1.12	1.13
471I	1.02	1.22
471N	1.12	1.04
471T	1.09	1.11
471V	1.11	1.28
471Y	1.36	1.15
473K	1.02	1.02
473M	1.00	1.11
473R	1.05	1.08
473T	1.04	1.04
476A	1.02	1.51
476M	1.08	1.58
476Q	1.03	1.13
476R	1.08	1.01
476T	1.01	1.78

10

20

表 2 6 - 2

30

野生型 Amy S よりも熱ストレス後残余活性が野生型に対して少なくとも 20 % 良好で開始活性又は発現が野生型 Amy S の少なくとも半分である性能インデックスを有する変異を有する Amy S タンパク質の置換位置（カラムでは Variant と表示）

Variant	Activity	Residual Activity
006I	1.47	1.23
006N	1.61	1.21
006Q	1.34	1.26
006T	2.01	1.21
006V	1.54	1.29
014T	1.22	1.22
016F	0.98	2.17
025A	0.82	1.22
025C	1.46	1.33
025G	0.97	1.27
025Q	1.07	1.24
027M	0.88	1.21
036Q	0.78	1.40
036S	0.69	1.25
039G	1.05	1.23
039V	0.82	1.30
050I	0.61	1.24
050L	0.67	1.22
050M	0.62	1.32
050N	1.12	1.20
050Q	1.08	1.31
052S	0.92	1.21
053T	1.02	1.25
067N	0.95	1.32
067S	1.00	1.23
080D	0.86	1.22
080I	0.82	1.29
090E	0.92	1.20
133P	1.08	1.41
133V	0.92	1.25
137M	0.83	1.30
137S	0.98	1.45
141E	0.92	3.48
141I	0.87	1.40
141L	0.85	1.22
141M	1.01	1.23
141Q	0.97	1.28
141R	0.99	1.23
141S	0.98	1.21
141V	1.00	1.21
150E	0.87	4.54
151I	0.78	1.22
152G	0.91	1.25
155S	0.85	1.22
155Y	0.80	1.21
168W	0.66	1.23
173T	0.86	1.33
188P	1.16	1.40
193F	0.98	1.71

193K	1.17	1.28
193L	0.78	1.22
193Y	1.10	1.89
213L	0.75	1.26
213M	0.78	1.26
213V	0.76	1.35
217Q	0.74	1.31
220P	0.89	1.33
220Q	0.87	1.21
220R	0.83	1.26
220S	0.81	1.30
220V	0.82	1.21
221I	1.23	1.33
221S	1.40	1.34
249E	0.92	1.27
250F	1.28	1.29
250I	1.27	1.35
250M	1.39	1.35
252L	0.96	1.32
253Y	0.94	1.34
254E	0.89	1.29
254F	0.74	1.23
254T	0.65	1.21
254V	0.92	1.31
255F	0.68	1.30
255K	0.83	1.27
255W	0.74	1.27
257L	0.74	1.26
257M	0.79	1.29
257S	0.71	1.29
257V	0.78	1.31
258D	1.10	1.33
258G	1.02	1.30
258H	1.13	1.38
258K	1.11	1.29
258Q	1.13	1.31
258T	1.10	1.27
258V	0.80	1.29
268F	1.07	1.28
274W	0.79	1.26
283M	0.93	1.26
283N	0.96	1.29
283V	0.81	1.23
285E	0.89	1.33
285Q	1.22	1.38
293G	0.92	1.31
293K	1.41	1.42
294W	0.66	1.23
301F	0.68	1.44
301I	0.74	1.28
301P	0.61	1.21

10

20

30

40

301R	0.89	1.35
301T	0.85	1.23
301W	0.75	1.27
309D	0.89	1.27
309V	0.95	1.38
312H	0.99	1.30
312S	0.99	1.29
312V	0.87	1.40
312Y	0.92	1.31
313G	0.96	1.25
313H	0.94	1.25
313I	0.55	1.44
313L	0.85	1.21
313S	1.05	1.25
313V	0.74	1.28
318T	1.32	1.40
338A	1.29	1.36
338C	0.67	1.24
338G	1.34	1.38
338M	1.27	1.20
338T	1.05	1.42
339K	1.13	1.26
339T	1.01	1.35
339V	0.76	1.23
340A	1.43	1.23
340M	1.20	1.24
340Q	1.76	1.21
340T	1.14	1.21
343C	0.74	1.32
343I	0.88	1.27
343P	1.03	1.30
343R	1.03	1.25
343Y	0.82	1.29
345I	0.90	1.28
345Q	1.10	1.26
369I	0.91	1.33
369T	0.68	1.28
370G	1.18	1.21
375T	1.04	1.25
385T	0.92	1.22
386K	0.87	1.22
394L	1.11	1.22
394V	0.75	3.00
400A	0.89	1.24
400N	0.92	1.26
400V	0.91	1.28
402H	0.91	1.21
402I	0.75	1.36
402T	1.02	1.32
402V	0.95	1.40
402W	0.89	1.24
403A	0.89	1.20

403E	0.93	1.26
403G	0.96	1.22
403Q	0.98	1.24
403R	1.01	1.36
403T	0.99	1.53
403V	1.00	1.34
404C	0.61	1.28
404E	0.78	1.38
404G	0.77	1.25
404I	0.84	1.20
404V	0.79	1.28
419A	1.29	1.36
419C	0.67	1.24
419M	1.27	1.20
419T	1.05	1.42
422E	0.78	1.31
422G	0.99	1.20
433A	1.08	1.27
433H	0.99	1.27
433I	0.86	1.37
433K	1.05	1.27
433L	0.90	1.30
433M	1.01	1.23
433V	0.95	1.27
433Y	1.01	1.26
442A	0.98	1.38

10

20

30

40

442G	1.02	1.23
442N	1.03	1.39
442R	1.01	1.33
442S	1.07	1.24
442T	1.06	1.34
442V	0.99	1.20
442W	0.98	1.32
442Y	1.08	1.24
445G	1.01	1.21
445I	0.84	1.25
445N	0.91	1.20
445T	0.88	1.29
445V	0.93	1.27
445W	0.80	1.25
447I	0.91	1.22
447N	0.97	1.43
447Q	1.00	1.34
447W	0.89	1.31
447Y	0.96	1.21
448C	0.98	1.36
448F	1.01	1.48
448G	1.05	1.26
448H	1.03	1.37
448I	0.97	1.44
448N	0.70	1.24
448Y	1.27	1.33
450C	0.84	1.22
450H	0.90	1.23
450M	0.89	1.29
450N	0.96	1.23
450R	1.02	1.22
450S	1.01	1.22
450T	0.96	1.32
450W	0.95	1.21
455G	1.00	1.23
455I	0.95	1.23
455P	0.93	1.36
455V	0.89	1.26
463A	1.06	1.25
463M	1.08	1.24
463S	0.96	1.27
463T	0.91	1.38
463V	0.86	1.32
463W	0.74	1.45
465G	0.92	1.35
465I	0.85	1.37
465K	0.88	1.53
465N	0.93	1.32
465T	0.92	1.42
465V	0.93	1.24
469D	1.02	1.22

469W	0.97	1.24
469Y	1.09	1.35
471I	1.02	1.22
471V	1.11	1.28
473G	0.99	1.35
473Y	0.86	1.23
476A	1.02	1.51
476G	0.97	1.22
476L	0.93	1.46
476M	1.08	1.58
476N	0.98	1.61
476T	1.01	1.78

10

20

30

40

野生型 A m y S よりも少なくとも 2 0 % 大きな活性又は発現の性能インデックスを有する変異を有する A m y S タンパク質の置換位置（カラムでは V a r i a n t と表示）

変異体	活性
006A	1.59
006D	1.64
006E	1.93
006H	2.29
006I	1.47
006K	2.36
006L	1.61
006M	1.60
006N	1.61
006P	2.47
006Q	1.34
006R	1.28
006S	1.86
006T	2.01
006V	1.54
006W	1.32
006Y	1.88
013K	1.22
014F	1.25
014T	1.22
014Y	1.71
015A	1.48
015D	1.82
015E	1.96
015G	1.89
015H	1.85
015K	1.58
015N	1.88
015P	1.59
015Q	1.74
015R	1.60
015S	1.78
015T	1.47
015W	1.44
016A	1.31
016E	1.21
016G	1.35
016H	1.21
016K	1.41
016N	1.32
016P	1.30
016Q	1.33
016R	1.28
016T	1.32
025C	1.46
039D	1.47
039E	1.32
039N	1.64
039Q	1.43
081Y	1.20

121P	1.22
139D	1.40
139H	1.59
139R	1.29
139Y	1.63
177A	1.20
188D	1.21
191H	1.27
191K	1.33
192A	1.26
192D	1.50
192G	1.38
192N	1.35
192P	1.33
192Q	1.55
192S	1.47
192T	1.35
192V	1.25
192Y	1.30
196A	1.57
196C	1.36
196D	1.29
196E	1.29
196F	1.38
196H	1.92
196I	1.61
196K	1.29
196P	1.50
196R	1.29
196S	1.59
196T	1.65
196V	1.55
201A	1.41
201E	1.36
201G	1.63
201H	1.44
201M	1.21
202H	1.30
216E	1.30
216G	1.20
216H	1.28
216M	1.39
216Q	1.34
216R	1.32
216S	1.28
216T	1.22
216Y	1.31
221A	1.54
221D	1.31
221F	1.28
221I	1.23

10

20

30

40

221L	1.50
221M	1.35
221N	1.57
221R	1.29
221S	1.40
221V	1.31
221Y	1.36
237G	1.21
240G	1.22
240N	1.37
240P	1.69
240Q	1.21
240R	1.41
240T	1.23
246R	1.31
250A	1.21
250D	1.29
250E	1.33
250F	1.28
250G	1.33
250I	1.27
250K	1.48
250L	1.32
250M	1.39
250N	1.40
250Q	1.54
250R	1.55
250S	1.41
250W	1.35
252K	1.21
268A	1.39
268D	1.44
268E	1.47
268G	1.21
268H	1.24
268K	1.90
268N	1.51
268P	1.41
268Q	1.30
268R	1.49
268S	1.22
274A	1.40
274D	1.20
274G	1.36
274I	1.39
274K	1.60
274L	1.40
274N	1.50
274Q	1.47
274R	1.50
274S	1.28
274T	1.38

275K	1.22
285Q	1.22
285Y	1.49
293K	1.41
293R	1.37
318A	1.38
318F	1.22
318G	1.39
318I	1.40
318K	1.73
318L	1.31
318M	1.26
318R	1.54
318S	1.37
318T	1.32
318V	1.34
318Y	1.33
319C	1.38
319D	1.31
319H	1.28
319I	1.32
319K	1.52
319R	1.44
319Y	1.41
320K	1.23
320R	1.25
320T	1.28
338A	1.29
338G	1.34
338I	1.32
338M	1.27
338P	1.23
338S	1.51
338V	1.55
339G	1.21
339P	1.24
340A	1.43
340D	1.63
340E	1.58
340H	1.45
340K	1.76
340N	1.75
340Q	1.76
345E	1.24
363D	1.74
363E	1.34
363M	1.36
363N	1.86
363Q	1.78
363S	1.35
366Q	1.49
370A	1.21

10

20

30

40

370D	1.35
370E	1.35
370H	1.36
370K	1.65
370N	1.41
370Q	1.51
370S	1.50
375A	1.39
375D	1.52
375E	1.48
375K	1.43
375N	1.48
375Q	1.56
375R	1.61
375S	1.29
419A	1.29
419I	1.32
419M	1.27
419P	1.23
419S	1.51
419V	1.55
448Y	1.27
452N	1.28
452Q	1.22
452R	1.26
452S	1.21
471R	1.33
471Y	1.36

10

20

30

40

表 2 6 - 4

この表は 1 5 2 位における Amy S の 2, 6 6 6 変異体についての性能インデックス (P I) を示す。活性アッセイにおいて 0. 0 5 以下の性能インデックスは 0. 0 0 5 と表記し、イタリック太字で表記した。熱安定性測定について、性能インデックスが 0. 0 5 以下の場合も 0. 0 5 と表記した。

Table 26-4: Performance Indices for stability and activity measurements for AmyS variants			
Position	Variant	Stability PI	Activity PI
5	N005A	0.95	0.32
5	N005C	0.98	0.29
5	N005E	1.04	0.43
5	N005F	0.79	0.15
5	N005G	0.88	0.34
5	N005H	0.89	0.43
5	N005I	1.00	0.10
5	N005K	0.90	0.34
5	N005L	1.04	0.10
5	N005M	0.84	0.18
5	N005P	1.10	0.40
5	N005Q	1.07	0.58
5	N005R	0.94	0.40
5	N005S	0.98	0.35
5	N005T	0.83	0.35
5	N005V	0.88	0.16
5	N005W	0.94	0.07
5	N005Y	1.07	0.21
6	G006A	1.10	1.59
6	G006D	1.14	1.64
6	G006E	1.08	1.93
6	G006H	0.95	2.29
6	G006I	1.23	1.47
6	G006K	0.93	2.36
6	G006L	1.15	1.61
6	G006M	1.11	1.60
6	G006N	1.21	1.61
6	G006P	1.10	2.47
6	G006Q	1.26	1.34
6	G006R	0.98	1.28
6	G006S	1.12	1.86
6	G006T	1.21	2.01
6	G006V	1.29	1.54

10

20

30

40

6	G006W	1.13	1.32
6	G006Y	1.07	1.88
13	E013A	0.32	1.01
13	E013C	0.22	0.68
13	E013D	0.08	1.03
13	E013F	0.05	0.81
13	E013G	0.18	1.00
13	E013H	0.60	1.10
13	E013I	0.15	0.87
13	E013K	0.22	1.22
13	E013L	0.20	1.02
13	E013M	0.20	0.96
13	E013N	0.05	0.05
13	E013P	0.05	0.37
13	E013Q	0.21	0.96
13	E013R	0.28	1.04
13	E013S	0.28	0.92
13	E013T	0.19	0.79
13	E013V	0.19	0.76
13	E013W	0.05	0.76
13	E013Y	0.89	0.93
14	W014A	0.95	0.77
14	W014C	0.91	0.71
14	W014D	0.81	0.59
14	W014E	0.95	1.07
14	W014F	1.06	1.25
14	W014G	0.97	0.88
14	W014H	0.05	0.05
14	W014I	1.12	0.40
14	W014K	1.01	0.69
14	W014L	0.88	0.15
14	W014M	1.18	0.84
14	W014N	0.92	0.99
14	W014P	0.84	0.98
14	W014Q	0.94	0.67
14	W014R	0.97	0.67
14	W014S	0.97	1.02
14	W014T	1.22	1.22
14	W014V	1.17	0.81
14	W014Y	1.08	1.71
15	Y015A	1.05	1.48
15	Y015C	0.70	1.15
15	Y015D	0.77	1.82
15	Y015E	0.68	1.96
15	Y015G	0.69	1.89
15	Y015H	1.01	1.85
15	Y015I	0.63	0.91
15	Y015K	0.74	1.58
15	Y015L	0.67	0.76

10

20

30

40

15	Y015M	0.72	1.12
15	Y015N	0.99	1.88
15	Y015P	0.57	1.59
15	Y015Q	0.80	1.74
15	Y015R	0.72	1.60
15	Y015S	0.58	1.78
15	Y015T	0.87	1.47
15	Y015W	0.95	1.44
16	L016A	0.81	1.31
16	L016D	0.93	1.12
16	L016E	1.09	1.21
16	L016F	2.17	0.98
16	L016G	0.61	1.35
16	L016H	0.96	1.21
16	L016I	0.79	1.12
16	L016K	0.79	1.41
16	L016M	0.94	1.15
16	L016N	0.92	1.32
16	L016P	0.35	1.30
16	L016Q	0.96	1.33
16	L016R	0.71	1.28
16	L016S	0.94	1.19
16	L016T	0.87	1.32
16	L016V	0.87	1.16
16	L016W	0.75	0.99
16	L016Y	0.97	1.10
18	D018A	1.08	0.89
18	D018F	0.68	0.58
18	D018G	0.88	0.87
18	D018H	0.84	0.84
18	D018I	0.79	0.70
18	D018K	0.88	0.65
18	D018L	0.60	0.72
18	D018N	0.73	1.01
18	D018P	0.84	1.04
18	D018Q	0.80	1.00
18	D018R	0.81	0.65
18	D018S	0.81	0.93
18	D018T	0.81	0.91
18	D018V	0.89	0.77
18	D018W	0.72	0.51
18	D018Y	0.72	0.87
20	G020A	0.79	0.25
20	G020C	0.58	0.24
20	G020D	0.92	0.96
20	G020E	0.89	0.95
20	G020F	0.65	0.13
20	G020H	0.75	0.11
20	G020I	0.96	0.28

10

20

30

40

20	G020K	0.05	0.05
20	G020L	0.05	0.05
20	G020M	0.69	0.10
20	G020N	0.78	0.09
20	G020P	0.05	0.05
20	G020Q	0.61	0.07
20	G020R	0.05	0.05
20	G020S	0.05	0.05
20	G020T	0.82	0.09
20	G020V	0.77	0.19
20	G020W	0.80	0.69
20	G020Y	0.05	0.05
25	K025A	1.22	0.82
25	K025C	1.33	1.46
25	K025D	1.06	1.03
25	K025E	1.07	0.95
25	K025F	1.00	0.58
25	K025G	1.27	0.97
25	K025H	1.03	1.06
25	K025L	1.12	0.64
25	K025M	1.03	0.61
25	K025N	0.91	1.06
25	K025P	0.98	0.55
25	K025Q	1.24	1.07
25	K025R	1.08	0.96
25	K025S	1.07	0.98
25	K025T	1.14	0.89
25	K025Y	0.98	0.65
27	A027C	0.79	0.55
27	A027D	1.01	0.95
27	A027E	0.93	0.95
27	A027F	0.88	0.85
27	A027G	1.20	0.98
27	A027H	1.05	1.00
27	A027I	1.05	0.87
27	A027K	0.86	1.01
27	A027L	1.06	0.86
27	A027M	1.21	0.88
27	A027N	1.06	1.00
27	A027P	1.13	0.43
27	A027Q	1.00	0.96
27	A027R	1.11	0.89
27	A027S	1.16	0.97
27	A027T	1.20	0.90
27	A027V	1.20	0.82
27	A027W	1.13	0.76
27	A027Y	0.97	0.28
29	E029A	1.05	0.50
29	E029D	0.94	1.11

10

20

30

40

29	E029G	0.75	0.37
29	E029H	0.83	0.83
29	E029K	1.05	0.89
29	E029L	0.76	0.22
29	E029M	0.76	0.15
29	E029N	1.02	0.89
29	E029P	0.87	0.33
29	E029Q	1.04	0.86
29	E029R	1.09	0.92
29	E029S	0.97	0.83
29	E029T	0.95	0.59
29	E029W	0.74	0.10
29	E029Y	0.05	0.05
36	L036A	0.95	0.85
36	L036C	0.83	0.43
36	L036D	0.91	0.27
36	L036E	0.90	0.40
36	L036F	1.14	0.90
36	L036G	0.92	0.34
36	L036H	0.92	0.77
36	L036I	1.17	0.89
36	L036K	1.01	1.05
36	L036M	1.05	1.05
36	L036N	1.02	0.68
36	L036P	0.90	0.06
36	L036Q	1.40	0.78
36	L036R	1.12	0.76
36	L036S	1.25	0.69
36	L036T	1.11	0.64
36	L036V	0.88	0.97
36	L036W	0.92	0.63
36	L036Y	1.07	0.91
39	T039C	1.09	1.05
39	T039D	1.15	1.47
39	T039E	1.15	1.32
39	T039F	1.16	0.48
39	T039G	1.23	1.05
39	T039H	1.16	1.10
39	T039K	1.12	1.10
39	T039M	1.18	0.54
39	T039N	1.14	1.64
39	T039P	1.11	0.26
39	T039Q	1.20	1.43
39	T039R	1.01	1.10
39	T039S	1.15	1.02
39	T039V	1.30	0.82
39	T039W	1.11	0.25
50	T050A	1.09	0.98
50	T050C	1.03	0.34

10

20

30

40

50	T050D	0.87	0.91
50	T050E	0.05	0.05
50	T050F	0.86	0.43
50	T050G	1.00	1.18
50	T050H	0.97	0.82
50	T050I	1.24	0.61
50	T050K	1.13	0.80
50	T050L	1.22	0.67
50	T050M	1.32	0.62
50	T050N	1.20	1.12
50	T050P	1.03	0.99
50	T050Q	1.31	1.08
50	T050R	1.13	0.79
50	T050S	1.07	1.09
50	T050V	1.02	0.79
50	T050W	0.90	0.18
50	T050Y	1.14	0.42
52	R052A	0.99	1.02
52	R052C	0.87	0.62
52	R052D	0.76	0.85
52	R052E	0.77	0.97
52	R052G	0.96	0.93
52	R052H	0.91	0.99
52	R052K	0.93	1.02
52	R052L	1.10	0.98
52	R052M	1.01	1.00
52	R052N	0.95	0.99
52	R052P	1.05	0.95
52	R052Q	0.05	0.05
52	R052S	1.21	0.92
52	R052T	1.11	1.00
52	R052V	1.14	0.95
52	R052W	1.00	0.83
52	R052Y	0.99	0.96
53	S053A	1.03	1.00
53	S053C	0.73	0.58
53	S053D	0.75	0.83
53	S053E	1.05	0.88
53	S053F	0.87	0.85
53	S053G	1.14	0.93
53	S053H	1.12	1.00
53	S053I	0.99	1.12
53	S053K	1.03	1.10
53	S053L	0.93	0.96
53	S053M	0.96	0.97
53	S053P	0.88	1.00
53	S053Q	0.94	0.94
53	S053R	0.83	1.15
53	S053T	1.25	1.02

10

20

30

40

53	S053V	1.11	0.94
53	S053W	1.09	0.84
53	S053Y	0.94	0.93
54	D054A	0.34	0.88
54	D054C	0.64	0.38
54	D054E	0.05	0.05
54	D054F	0.05	0.60
54	D054G	0.11	0.97
54	D054H	0.11	1.04
54	D054I	0.30	0.83
54	D054K	0.05	1.08
54	D054L	0.05	0.89
54	D054M	0.11	0.88
54	D054N	0.94	1.05
54	D054P	0.05	1.03
54	D054Q	0.05	0.05
54	D054R	0.06	0.89
54	D054S	0.38	0.96
54	D054T	0.17	0.95
54	D054V	0.17	0.77
54	D054W	0.05	0.05
54	D054Y	0.05	0.64
67	E067A	0.05	0.05
67	E067C	1.08	0.75
67	E067D	0.90	1.07
67	E067G	1.01	1.13
67	E067H	1.04	1.03
67	E067K	0.98	0.94
67	E067L	0.97	0.95
67	E067M	0.93	0.91
67	E067N	1.32	0.95
67	E067P	0.05	0.05
67	E067Q	0.93	0.95
67	E067R	1.01	0.90
67	E067S	1.23	1.00
67	E067T	0.99	0.98
67	E067W	0.05	0.05
67	E067Y	1.11	0.93
71	K071A	0.72	0.81
71	K071C	0.80	0.61
71	K071D	0.69	0.71
71	K071E	0.80	0.84
71	K071F	0.47	0.61
71	K071G	0.74	0.91
71	K071H	0.96	0.88
71	K071I	0.83	0.75
71	K071L	0.55	0.61
71	K071M	0.80	0.68
71	K071N	1.11	0.89

10

20

30

40

71	K071P	0.92	0.86
71	K071Q	0.98	0.77
71	K071R	1.10	1.10
71	K071S	0.99	0.97
71	K071T	0.95	0.83
71	K071V	0.94	0.84
71	K071W	0.82	0.91
71	K071Y	0.52	0.71
73	T073A	0.97	1.11
73	T073C	0.91	0.60
73	T073D	0.89	1.02
73	T073E	0.75	1.08
73	T073F	0.73	0.99
73	T073G	0.79	1.12
73	T073H	0.86	0.88
73	T073I	0.66	1.02
73	T073K	0.20	0.97
73	T073L	0.47	1.17
73	T073M	0.59	0.64
73	T073N	0.73	1.08
73	T073P	0.57	0.98
73	T073R	0.40	1.11
73	T073S	0.87	1.10
73	T073V	0.67	1.09
73	T073W	0.83	1.07
73	T073Y	0.79	1.10
75	R075A	1.05	1.14
75	R075C	0.88	0.85
75	R075D	0.87	0.99
75	R075E	0.86	1.01
75	R075F	0.76	0.92
75	R075G	0.79	1.04
75	R075H	0.85	1.07
75	R075I	0.86	1.01
75	R075L	0.88	1.04
75	R075M	1.04	1.04
75	R075P	0.90	0.93
75	R075Q	0.90	0.95
75	R075S	0.66	0.60
75	R075T	0.98	0.88
75	R075V	0.78	0.94
75	R075W	0.75	0.93
75	R075Y	0.68	1.04
77	K077A	0.38	0.98
77	K077C	0.28	0.51
77	K077D	0.05	0.59
77	K077E	0.11	0.77
77	K077F	0.20	0.72
77	K077G	0.13	0.76

10

20

30

40

77	K077I	0.16	1.00
77	K077L	0.54	0.98
77	K077M	0.58	0.99
77	K077N	0.05	0.05
77	K077P	0.05	0.61
77	K077Q	0.07	0.86
77	K077R	0.77	1.07
77	K077S	0.11	0.89
77	K077T	0.05	0.86
77	K077V	0.05	0.83
77	K077W	0.05	0.77
80	T080A	0.88	1.01
80	T080C	0.91	0.69
80	T080D	1.22	0.86
80	T080E	0.71	0.92
80	T080F	1.10	0.50
80	T080G	1.02	0.93
80	T080H	1.01	0.95
80	T080I	1.29	0.82
80	T080K	0.90	0.86
80	T080L	0.82	0.98
80	T080M	0.97	0.95
80	T080N	0.90	1.00
80	T080P	0.88	0.88
80	T080Q	0.87	0.88
80	T080R	0.99	0.76
80	T080S	0.83	1.09
80	T080V	0.87	0.87
80	T080W	0.77	0.89
80	T080Y	0.72	0.97
81	K081A	0.87	0.94
81	K081C	0.84	0.74
81	K081D	0.96	0.83
81	K081E	0.69	0.92
81	K081G	0.86	0.81
81	K081H	0.73	1.03
81	K081I	0.82	0.79
81	K081L	0.87	1.01
81	K081M	0.93	1.04
81	K081N	0.05	0.05
81	K081P	0.90	0.79
81	K081Q	0.84	1.03
81	K081R	0.90	1.04
81	K081S	0.74	0.98
81	K081T	0.80	0.93
81	K081V	0.66	1.03
81	K081W	0.60	0.98
81	K081Y	0.89	1.20
83	Q083A	1.20	0.98

10

20

30

40

83	Q083C	1.79	0.17
83	Q083D	0.94	0.92
83	Q083E	0.98	0.95
83	Q083F	0.87	0.80
83	Q083G	0.76	1.01
83	Q083H	0.78	0.86
83	Q083I	0.69	0.85
83	Q083L	0.77	0.91
83	Q083M	0.91	0.96
83	Q083P	1.01	0.82
83	Q083R	0.91	0.90
83	Q083S	0.75	0.99
83	Q083T	0.84	0.84
83	Q083V	0.73	0.80
83	Q083W	0.82	0.78
83	Q083Y	0.71	0.93
85	L085A	0.94	1.06
85	L085C	0.90	0.63
85	L085D	0.84	1.04
85	L085E	1.09	1.02
85	L085G	0.85	0.90
85	L085H	0.73	1.02
85	L085I	0.89	0.88
85	L085K	0.96	0.93
85	L085M	1.01	1.04
85	L085N	1.10	0.89
85	L085P	1.01	0.72
85	L085Q	0.91	0.99
85	L085R	0.96	1.01
85	L085S	1.02	1.04
85	L085T	0.83	1.12
85	L085W	0.93	0.95
85	L085Y	0.70	1.08
90	A090C	1.00	0.65
90	A090D	1.12	0.92
90	A090E	1.20	0.92
90	A090F	0.99	0.76
90	A090G	1.04	0.87
90	A090H	1.05	1.03
90	A090I	0.90	0.83
90	A090K	0.93	1.04
90	A090L	0.76	0.92
90	A090M	1.02	1.02
90	A090N	1.02	0.98
90	A090P	1.39	0.10
90	A090Q	0.94	0.93
90	A090R	0.90	0.90
90	A090S	1.16	0.99
90	A090T	0.78	0.88

10

20

30

40

90	A090V	0.79	0.87
90	A090W	0.69	0.84
90	A090Y	0.83	0.96
92	H092C	0.75	0.29
92	H092D	1.06	0.69
92	H092E	0.88	0.76
92	H092F	0.92	0.28
92	H092G	0.86	0.81
92	H092K	0.89	0.98
92	H092L	0.43	0.12
92	H092N	0.85	0.78
92	H092P	0.05	0.05
92	H092Q	0.80	0.89
92	H092R	0.75	0.96
92	H092S	0.70	0.87
92	H092T	0.68	0.47
92	H092V	0.70	0.28
92	H092W	0.83	0.44
92	H092Y	0.71	0.63
106	H106A	0.32	0.19
106	H106C	0.33	0.06
106	H106D	0.58	0.07
106	H106E	0.05	0.05
106	H106G	0.16	0.17
106	H106I	0.05	0.05
106	H106K	0.05	0.05
106	H106L	0.05	0.06
106	H106N	0.14	0.08
106	H106P	0.59	0.06
106	H106Q	0.07	0.39
106	H106R	0.05	0.05
106	H106S	0.05	0.20
106	H106T	0.05	0.05
106	H106V	0.05	0.05
106	H106W	0.05	0.05
106	H106Y	0.05	0.05
107	K107A	0.46	0.81
107	K107C	0.42	0.67
107	K107D	0.32	0.51
107	K107E	0.35	0.70
107	K107F	0.42	0.66
107	K107G	0.23	0.76
107	K107H	0.34	0.94
107	K107I	0.29	0.69
107	K107L	0.53	0.75
107	K107M	0.60	0.79
107	K107N	0.43	0.88
107	K107P	0.05	0.65
107	K107Q	0.63	0.74

10

20

30

40

107	K107R	1.05	0.71
107	K107S	0.30	0.78
107	K107T	0.38	0.72
107	K107V	0.41	0.70
107	K107W	0.05	0.44
107	K107Y	0.40	0.64
111	D111A	0.55	0.95
111	D111C	0.71	0.60
111	D111E	0.87	1.01
111	D111F	0.63	0.65
111	D111G	0.74	0.90
111	D111H	0.50	0.85
111	D111I	0.56	0.91
111	D111K	0.45	0.62
111	D111L	0.44	0.86
111	D111M	0.65	1.00
111	D111N	0.97	0.87
111	D111P	0.78	0.71
111	D111Q	0.77	0.95
111	D111R	0.53	0.07
111	D111S	0.67	0.91
111	D111T	0.61	1.02
111	D111V	0.58	1.02
111	D111W	0.42	0.54
111	D111Y	0.49	0.92
113	T113A	0.89	0.97
113	T113C	0.80	0.82
113	T113D	0.94	0.95
113	T113E	0.92	0.91
113	T113F	0.76	0.92
113	T113G	0.88	1.08
113	T113H	0.88	0.96
113	T113I	1.14	0.88
113	T113K	0.93	1.13
113	T113L	1.08	1.08
113	T113M	0.83	0.99
113	T113P	1.05	0.96
113	T113Q	0.88	1.05
113	T113R	0.88	1.03
113	T113V	1.12	0.94
113	T113W	1.06	0.88
114	E114A	0.54	0.97
114	E114C	0.62	0.76
114	E114D	0.71	0.82
114	E114F	0.36	0.92
114	E114G	0.59	1.01
114	E114H	0.49	0.92
114	E114I	0.54	0.86
114	E114L	0.43	0.97

10

20

30

40

114	E114M	0.77	0.97
114	E114N	0.67	0.88
114	E114P	0.37	0.37
114	E114R	0.35	0.84
114	E114T	0.54	0.94
114	E114V	0.43	0.85
114	E114W	0.31	0.94
114	E114Y	0.26	0.93
120	E120A	0.29	1.20
120	E120C	0.24	0.89
120	E120D	0.05	1.02
120	E120F	0.05	0.88
120	E120G	0.05	1.14
120	E120H	0.09	0.90
120	E120I	0.60	0.87
120	E120L	0.20	0.97
120	E120M	0.39	0.96
120	E120N	0.16	1.02
120	E120P	0.05	1.12
120	E120Q	0.66	1.10
120	E120R	0.12	1.12
120	E120S	0.08	1.07
120	E120T	0.22	1.06
120	E120V	0.53	0.93
120	E120W	0.15	0.81
120	E120Y	0.07	0.98
121	V121A	0.05	1.04
121	V121C	0.92	0.55
121	V121D	0.05	0.91
121	V121E	0.05	0.93
121	V121F	0.05	0.77
121	V121G	0.05	0.92
121	V121H	0.05	0.05
121	V121I	0.05	0.79
121	V121L	0.05	0.98
121	V121M	0.05	0.97
121	V121P	0.05	1.22
121	V121Q	0.05	0.97
121	V121R	0.05	1.01
121	V121S	0.05	0.95
121	V121T	0.07	0.92
121	V121W	0.05	0.62
121	V121Y	0.05	0.88
126	R126A	0.05	0.05
126	R126D	0.05	0.46
126	R126E	0.05	0.82
126	R126F	0.05	1.03
126	R126G	0.05	0.89
126	R126H	0.05	1.06

10

20

30

40

126	R126I	0.05	0.95
126	R126L	0.05	0.97
126	R126M	0.05	1.01
126	R126N	0.05	1.07
126	R126P	0.05	0.67
126	R126Q	0.05	0.65
126	R126T	0.05	0.83
126	R126V	0.05	0.99
126	R126W	0.05	1.06
126	R126Y	0.05	1.01
128	Q128A	0.05	0.05
128	Q128C	0.42	0.95
128	Q128D	0.15	1.05
128	Q128E	0.90	1.00
128	Q128G	0.05	0.99
128	Q128H	0.34	1.05
128	Q128I	0.90	0.89
128	Q128K	0.52	1.15
128	Q128L	0.47	0.97
128	Q128N	0.12	1.05
128	Q128P	0.05	1.03
128	Q128R	0.31	1.14
128	Q128S	0.28	1.02
128	Q128T	0.05	0.05
128	Q128V	0.86	0.97
128	Q128W	0.07	0.76
128	Q128Y	0.13	0.86
131	S131A	0.05	1.15
131	S131C	0.05	0.98
131	S131D	0.26	1.08
131	S131E	0.05	1.14
131	S131F	0.05	0.92
131	S131G	0.24	0.86
131	S131H	0.05	1.13
131	S131I	0.05	0.05
131	S131K	0.05	1.13
131	S131M	0.05	0.99
131	S131N	0.76	1.02
131	S131P	0.05	1.05
131	S131R	0.05	1.05
131	S131T	0.49	0.90
131	S131W	0.05	0.82
131	S131Y	0.05	0.90
133	T133A	0.95	1.13
133	T133C	0.49	0.97
133	T133D	1.03	0.99
133	T133E	0.82	1.02
133	T133F	0.17	0.97
133	T133G	0.47	0.84

10

20

30

40

133	T133H	0.41	1.19
133	T133I	0.86	0.96
133	T133K	0.47	0.85
133	T133L	0.41	1.06
133	T133M	0.51	1.05
133	T133N	0.68	1.13
133	T133P	1.41	1.08
133	T133Q	0.63	1.10
133	T133R	0.18	1.13
133	T133S	0.72	1.08
133	T133V	1.25	0.92
133	T133W	0.14	0.98
133	T133Y	0.41	1.01
137	Q137A	0.92	0.97
137	Q137C	1.09	0.77
137	Q137D	0.89	0.96
137	Q137E	1.06	0.87
137	Q137F	0.85	0.86
137	Q137G	1.13	0.94
137	Q137H	0.95	1.05
137	Q137I	0.93	0.22
137	Q137L	1.20	0.82
137	Q137M	1.30	0.83
137	Q137P	0.07	1.05
137	Q137R	0.95	1.05
137	Q137S	1.45	0.98
137	Q137T	1.12	0.91
137	Q137V	1.02	0.86
137	Q137W	1.06	0.88
137	Q137Y	0.94	0.89
138	A138C	0.05	0.05
138	A138D	0.05	0.37
138	A138E	0.05	0.54
138	A138G	0.90	1.02
138	A138H	0.05	0.60
138	A138I	0.23	0.90
138	A138K	0.05	0.15
138	A138L	0.05	0.90
138	A138M	0.05	0.94
138	A138N	0.50	0.94
138	A138P	1.07	1.15
138	A138Q	0.13	0.69
138	A138R	0.05	0.15
138	A138S	1.12	1.02
138	A138T	1.16	1.05
138	A138V	1.17	0.87
138	A138W	0.05	0.27
138	A138Y	0.14	0.97
139	W139A	0.82	0.89

10

20

30

40

139	W139C	0.75	0.39
139	W139D	0.93	1.40
139	W139E	0.81	0.97
139	W139G	0.79	0.74
139	W139H	0.97	1.59
139	W139I	0.74	0.58
139	W139K	0.68	0.42
139	W139L	0.78	0.59
139	W139M	0.87	1.00
139	W139N	1.13	0.85
139	W139Q	0.82	0.79
139	W139R	0.96	1.29
139	W139S	0.93	1.04
139	W139T	0.71	0.87
139	W139V	0.72	0.66
139	W139Y	1.14	1.63
141	K141A	1.09	0.73
141	K141C	1.03	0.85
141	K141D	0.89	0.98
141	K141E	3.48	0.92
141	K141F	0.89	0.80
141	K141G	1.18	0.96
141	K141H	1.13	0.99
141	K141I	1.40	0.87
141	K141L	1.22	0.85
141	K141M	1.23	1.01
141	K141N	1.11	1.02
141	K141P	1.07	0.96
141	K141Q	1.28	0.97
141	K141R	1.23	0.99
141	K141S	1.21	0.98
141	K141T	1.17	0.94
141	K141V	1.21	1.00
141	K141W	1.16	0.87
141	K141Y	1.17	0.88
143	D143A	0.95	1.04
143	D143C	1.11	0.84
143	D143E	1.12	0.98
143	D143G	1.13	1.09
143	D143H	0.91	0.98
143	D143I	1.05	0.94
143	D143K	0.86	0.96
143	D143L	0.05	0.05
143	D143M	0.86	1.05
143	D143N	1.10	0.99
143	D143P	0.98	0.84
143	D143T	0.05	0.05
143	D143V	1.00	1.01
143	D143W	1.00	0.99

10

20

30

40

143	D143Y	0.75	0.15
147	R147A	0.73	0.25
147	R147C	0.05	0.05
147	R147D	0.66	0.07
147	R147E	0.05	0.05
147	R147F	0.05	0.05
147	R147G	0.74	0.11
147	R147H	0.81	0.21
147	R147I	0.05	0.05
147	R147K	1.05	0.48
147	R147L	0.05	0.05
147	R147M	0.65	0.07
147	R147N	0.91	0.30
147	R147P	0.05	0.05
147	R147Q	0.88	0.30
147	R147S	0.90	0.39
147	R147T	0.90	0.10
147	R147V	0.05	0.05
147	R147W	0.05	0.05
147	R147Y	0.05	0.05
149	N149A	0.94	0.93
149	N149D	0.89	0.95
149	N149E	0.98	0.93
149	N149F	1.09	0.85
149	N149G	0.90	0.93
149	N149H	1.01	0.98
149	N149I	1.15	0.83
149	N149K	0.90	0.88
149	N149L	0.88	0.94
149	N149M	0.05	0.05
149	N149Q	1.00	0.93
149	N149R	0.80	0.95
149	N149S	0.94	1.03
149	N149V	1.06	0.87
149	N149W	1.01	0.87
150	T150A	0.90	0.96
150	T150C	1.03	0.72
150	T150D	0.82	0.87
150	T150E	4.54	0.87
150	T150F	0.05	0.05
150	T150G	0.99	0.86
150	T150I	0.82	0.93
150	T150K	0.86	0.96
150	T150L	0.83	0.07
150	T150M	1.05	1.00
150	T150N	0.98	1.08
150	T150Q	0.83	0.99
150	T150R	0.99	1.04
150	T150S	0.77	0.96

10

20

30

40

150	T150V	0.90	0.93
150	T150Y	1.18	1.00
151	Y151A	0.96	0.87
151	Y151C	0.80	0.67
151	Y151D	0.99	0.71
151	Y151E	0.76	0.71
151	Y151F	0.96	0.88
151	Y151G	1.17	0.79
151	Y151H	1.04	0.87
151	Y151I	1.22	0.78
151	Y151L	1.05	0.90
151	Y151M	1.02	0.83
151	Y151N	0.98	0.91
151	Y151P	0.89	0.77
151	Y151Q	1.07	0.75
151	Y151R	1.05	0.76
151	Y151S	0.85	0.80
151	Y151T	1.04	0.80
151	Y151V	1.14	0.80
151	Y151W	1.16	0.79
152	S152A	0.95	0.88
152	S152C	0.83	0.75
152	S152D	0.05	0.05
152	S152E	1.09	0.71
152	S152F	0.75	0.22
152	S152G	1.25	0.91
152	S152H	0.99	0.71
152	S152I	0.81	0.22
152	S152K	0.74	0.58
152	S152M	0.05	0.05
152	S152N	1.20	0.43
152	S152Q	0.71	0.21
152	S152R	0.89	0.86
152	S152T	1.16	0.99
152	S152V	0.79	0.42
152	S152W	0.73	0.22
152	S152Y	0.91	0.26
155	K155A	1.10	0.85
155	K155C	0.92	0.72
155	K155D	0.94	0.85
155	K155E	0.82	0.79
155	K155G	1.05	0.58
155	K155H	1.04	0.84
155	K155L	1.05	0.89
155	K155M	0.91	0.91
155	K155N	1.18	0.90
155	K155P	0.99	0.94
155	K155Q	0.84	0.90
155	K155R	1.20	0.93

10

20

30

40

155	K155S	1.22	0.85
155	K155T	1.12	0.76
155	K155V	1.01	0.85
155	K155W	1.09	0.88
155	K155Y	1.21	0.80
160	H160A	0.89	0.89
160	H160C	0.84	0.98
160	H160D	0.89	0.69
160	H160E	0.86	0.52
160	H160F	0.77	0.79
160	H160G	0.82	0.36
160	H160I	0.36	0.58
160	H160L	1.03	0.92
160	H160M	0.56	0.97
160	H160N	1.11	1.02
160	H160P	0.05	0.05
160	H160Q	0.98	0.47
160	H160R	0.54	0.62
160	H160S	0.05	0.05
160	H160T	1.01	0.91
160	H160V	0.76	0.74
160	H160W	0.26	0.66
160	H160Y	0.86	0.89
165	D165A	0.53	0.12
165	D165C	1.01	0.07
165	D165E	1.14	0.07
165	D165F	0.09	0.07
165	D165G	0.63	0.20
165	D165H	0.46	0.18
165	D165I	0.06	0.15
165	D165K	0.07	0.14
165	D165L	0.30	0.11
165	D165M	0.58	0.10
165	D165N	1.16	1.10
165	D165P	0.05	0.05
165	D165Q	0.53	0.11
165	D165R	0.08	0.11
165	D165S	0.83	0.43
165	D165T	0.05	0.50
165	D165V	0.05	0.15
165	D165W	0.05	0.05
165	D165Y	0.31	0.07
168	E168A	0.83	0.92
168	E168C	0.83	0.50
168	E168D	0.82	0.57
168	E168F	0.69	0.59
168	E168G	0.92	0.75
168	E168H	0.84	0.90
168	E168I	1.08	0.71

10

20

30

40

168	E168K	0.05	0.05
168	E168L	0.80	0.92
168	E168M	1.12	0.80
168	E168N	0.97	0.83
168	E168P	0.05	0.05
168	E168Q	0.88	0.87
168	E168R	1.18	0.90
168	E168S	0.95	0.83
168	E168T	0.83	0.16
168	E168V	0.89	0.73
168	E168W	1.23	0.66
168	E168Y	0.76	0.82
172	L172A	1.14	1.06
172	L172C	1.07	0.89
172	L172D	0.83	0.91
172	L172E	0.97	1.01
172	L172G	0.50	0.60
172	L172H	0.93	1.06
172	L172I	0.97	0.90
172	L172K	0.98	1.12
172	L172M	0.86	0.91
172	L172N	0.91	0.96
172	L172P	0.17	0.83
172	L172Q	1.00	0.89
172	L172R	1.16	1.06
172	L172S	0.78	1.01
172	L172T	0.82	0.94
172	L172V	1.02	0.88
172	L172W	1.09	0.92
172	L172Y	1.06	0.98
173	S173A	0.92	0.74
173	S173C	0.82	0.57
173	S173D	0.63	0.71
173	S173E	1.07	0.65
173	S173F	0.82	0.25
173	S173G	0.73	0.78
173	S173H	0.85	0.66
173	S173I	1.20	0.59
173	S173K	1.17	1.03
173	S173L	0.75	0.20
173	S173M	1.05	0.48
173	S173N	1.02	0.84
173	S173Q	1.08	0.84
173	S173R	0.88	1.03
173	S173T	1.33	0.86
173	S173V	1.12	0.46
173	S173W	0.86	0.20
173	S173Y	0.90	0.25
177	K177A	0.05	1.20

10

20

30

40

177	K177C	0.05	0.76
177	K177D	0.05	1.07
177	K177E	0.05	1.08
177	K177F	0.05	1.01
177	K177G	0.05	1.03
177	K177H	0.05	1.07
177	K177I	0.05	0.89
177	K177L	0.89	0.91
177	K177M	0.10	0.90
177	K177N	0.05	1.15
177	K177P	0.05	1.11
177	K177Q	0.08	1.07
177	K177R	0.47	1.09
177	K177S	0.05	1.00
177	K177T	0.05	1.01
177	K177W	0.05	1.07
177	K177Y	0.05	0.97
188	E188A	0.05	1.10
188	E188C	0.05	0.85
188	E188D	0.05	1.21
188	E188F	0.05	1.08
188	E188G	0.05	1.17
188	E188H	0.05	1.00
188	E188I	0.05	1.11
188	E188K	0.05	1.02
188	E188M	0.05	1.08
188	E188N	0.05	1.06
188	E188P	1.40	1.16
188	E188Q	0.05	1.06
188	E188S	0.05	1.10
188	E188T	0.05	1.17
188	E188V	0.05	1.08
188	E188W	0.05	1.07
188	E188Y	0.05	1.02
191	T191A	0.49	1.11
191	T191C	0.13	1.07
191	T191D	0.91	1.03
191	T191F	0.05	1.02
191	T191G	0.19	1.09
191	T191H	0.05	1.27
191	T191I	0.18	1.06
191	T191K	0.05	1.33
191	T191L	0.05	1.08
191	T191M	0.06	1.09
191	T191N	0.76	1.13
191	T191P	0.99	1.07
191	T191Q	0.18	1.17
191	T191R	0.05	1.20
191	T191S	0.72	1.05

10

20

30

40

191	T191V	0.16	1.02
191	T191W	0.05	0.91
192	E192A	0.05	1.26
192	E192C	0.55	1.12
192	E192D	0.42	1.50
192	E192G	0.05	1.38
192	E192H	0.05	0.78
192	E192I	0.05	1.00
192	E192K	0.05	0.33
192	E192M	0.05	1.19
192	E192N	0.05	1.35
192	E192P	0.05	1.33
192	E192Q	0.22	1.55
192	E192R	0.05	0.37
192	E192S	0.05	1.47
192	E192T	0.10	1.35
192	E192V	0.05	1.25
192	E192W	0.05	1.17
192	E192Y	0.05	1.30
193	N193A	0.05	0.98
193	N193C	0.73	0.62
193	N193D	0.05	0.95
193	N193E	0.05	0.74
193	N193F	1.71	0.98
193	N193G	0.05	0.96
193	N193H	1.10	0.92
193	N193I	0.05	0.78
193	N193K	1.28	1.17
193	N193L	1.22	0.78
193	N193M	0.81	0.96
193	N193P	0.05	0.90
193	N193R	0.87	0.97
193	N193S	0.05	1.15
193	N193T	0.05	0.86
193	N193W	1.09	0.73
193	N193Y	1.89	1.10
196	Y196A	0.74	1.57
196	Y196C	0.05	1.36
196	Y196D	0.29	1.29
196	Y196E	0.05	1.29
196	Y196F	0.74	1.38
196	Y196G	0.05	1.09
196	Y196H	0.05	1.92
196	Y196I	0.05	1.61
196	Y196K	0.05	1.29
196	Y196L	0.05	1.14
196	Y196N	0.54	0.94
196	Y196P	0.05	1.50
196	Y196R	0.05	1.29

10

20

30

40

196	Y196S	0.36	1.59
196	Y196T	0.05	1.65
196	Y196V	0.05	1.55
196	Y196W	0.05	0.57
199	L199A	0.16	0.42
199	L199E	0.05	0.34
199	L199G	0.05	0.31
199	L199H	0.05	0.18
199	L199I	0.14	0.30
199	L199K	0.22	0.15
199	L199M	0.30	0.14
199	L199N	0.05	0.07
199	L199P	0.05	0.05
199	L199Q	0.05	0.20
199	L199R	0.05	0.23
199	L199S	0.05	0.29
199	L199T	0.12	0.35
199	L199V	0.61	0.13
199	L199W	0.05	0.05
199	L199Y	0.05	0.05
200	M200A	1.03	0.68
200	M200C	0.84	0.53
200	M200D	0.71	0.81
200	M200E	0.54	0.55
200	M200F	0.05	0.25
200	M200G	0.23	0.41
200	M200H	0.05	0.05
200	M200I	1.14	0.57
200	M200K	0.05	0.05
200	M200L	0.68	1.11
200	M200N	0.46	0.72
200	M200P	0.05	0.05
200	M200Q	0.78	0.77
200	M200S	0.61	1.11
200	M200T	0.80	0.61
200	M200V	0.97	0.56
200	M200W	0.05	0.05
201	Y201A	0.90	1.41
201	Y201C	1.22	0.14
201	Y201D	0.60	0.73
201	Y201E	0.81	1.36
201	Y201F	0.85	0.81
201	Y201G	0.56	1.63
201	Y201H	1.06	1.44
201	Y201I	1.35	0.11
201	Y201K	0.89	0.08
201	Y201L	1.05	0.18
201	Y201M	1.16	1.21
201	Y201N	1.15	0.31

10

20

30

40

201	Y201P	0.05	0.05
201	Y201Q	1.11	0.79
201	Y201R	0.87	0.06
201	Y201S	0.74	1.11
201	Y201T	0.65	0.39
201	Y201V	0.05	0.05
201	Y201W	0.73	0.08
202	A202C	0.97	0.57
202	A202D	0.83	0.93
202	A202E	0.49	0.85
202	A202F	0.05	0.68
202	A202G	0.45	0.83
202	A202H	0.05	1.30
202	A202I	0.50	1.02
202	A202K	0.37	0.12
202	A202L	0.46	0.95
202	A202M	0.32	0.84
202	A202N	0.53	1.08
202	A202P	0.05	0.72
202	A202Q	0.47	1.01
202	A202R	0.05	0.05
202	A202S	0.69	0.79
202	A202T	0.63	1.07
202	A202V	0.82	1.02
202	A202Y	0.05	0.43
213	T213A	1.11	0.98
213	T213C	0.97	0.77
213	T213D	1.12	0.91
213	T213E	1.11	0.88
213	T213F	1.13	0.75
213	T213G	1.11	0.91
213	T213H	0.92	1.00
213	T213I	0.05	0.05
213	T213K	0.90	1.11
213	T213L	1.26	0.75
213	T213M	1.26	0.78
213	T213N	1.11	0.91
213	T213P	0.94	0.91
213	T213Q	1.12	1.02
213	T213R	1.05	1.05
213	T213S	1.10	1.08
213	T213V	1.35	0.76
213	T213W	1.17	0.68
216	K216A	0.66	0.24
216	K216D	0.05	0.05
216	K216E	1.03	1.30
216	K216F	0.05	0.05
216	K216G	0.83	1.20
216	K216H	0.90	1.28

10

20

30

40

216	K216I	0.05	0.05
216	K216L	0.05	0.05
216	K216M	0.97	1.39
216	K216P	0.91	0.97
216	K216Q	1.04	1.34
216	K216R	0.77	1.32
216	K216S	0.97	1.28
216	K216T	0.99	1.22
216	K216V	0.95	1.07
216	K216W	1.00	1.13
216	K216Y	0.79	1.31
217	N217A	1.10	0.87
217	N217C	0.81	0.78
217	N217E	0.05	0.73
217	N217F	0.90	0.88
217	N217G	0.95	0.90
217	N217H	1.09	0.90
217	N217I	1.08	0.76
217	N217L	1.09	0.82
217	N217M	0.97	0.80
217	N217P	0.97	0.73
217	N217Q	1.31	0.74
217	N217R	1.19	0.87
217	N217S	1.05	0.87
217	N217T	1.01	0.87
217	N217V	1.18	0.69
217	N217W	0.99	0.80
217	N217Y	0.05	0.05
220	K220A	1.06	0.79
220	K220C	1.05	0.75
220	K220D	1.02	0.88
220	K220E	1.12	0.88
220	K220F	1.03	0.78
220	K220G	1.10	0.84
220	K220H	1.12	0.81
220	K220I	1.13	0.81
220	K220M	1.05	0.75
220	K220N	1.17	0.80
220	K220P	1.33	0.89
220	K220Q	1.21	0.87
220	K220R	1.26	0.83
220	K220S	1.30	0.81
220	K220T	0.05	0.09
220	K220V	1.21	0.82
220	K220W	1.01	0.81
220	K220Y	1.08	0.84
221	W221A	0.88	1.54
221	W221C	0.95	1.09
221	W221D	0.84	1.31

10

20

30

40

221	W221E	0.05	0.05
221	W221F	1.07	1.28
221	W221G	0.05	0.05
221	W221H	0.05	0.05
221	W221I	1.33	1.23
221	W221K	0.05	0.05
221	W221L	0.88	1.50
221	W221M	1.16	1.35
221	W221N	1.11	1.57
221	W221P	0.05	0.05
221	W221R	0.93	1.29
221	W221S	1.34	1.40
221	W221V	1.13	1.31
221	W221Y	1.14	1.36
227	N227A	1.01	1.02
227	N227C	0.92	0.95
227	N227D	1.01	1.06
227	N227E	1.03	1.06
227	N227F	0.72	0.81
227	N227G	1.05	1.09
227	N227H	0.95	1.13
227	N227I	1.03	0.76
227	N227K	1.00	1.13
227	N227L	0.84	0.75
227	N227M	0.84	0.87
227	N227P	1.08	0.88
227	N227Q	0.94	1.00
227	N227R	0.89	1.03
227	N227S	0.96	0.95
227	N227T	1.06	0.96
227	N227V	1.05	0.84
227	N227W	1.07	0.81
227	N227Y	1.01	0.85
232	R232A	0.05	0.05
232	R232C	0.40	0.14
232	R232D	0.05	0.05
232	R232E	0.41	0.12
232	R232G	0.06	0.23
232	R232H	0.66	0.34
232	R232K	0.52	0.47
232	R232M	0.62	0.12
232	R232N	0.05	0.05
232	R232P	0.05	0.05
232	R232Q	0.54	0.12
232	R232S	0.59	0.16
232	R232T	0.76	0.17
232	R232V	0.70	0.15
232	R232W	0.05	0.05
232	R232Y	0.05	0.05

10

20

30

40

235	A235C	0.86	0.53
235	A235D	0.70	0.98
235	A235E	0.93	0.84
235	A235F	1.01	0.68
235	A235G	1.17	0.78
235	A235H	0.80	1.01
235	A235I	1.07	0.84
235	A235K	0.93	1.14
235	A235L	0.89	0.97
235	A235M	0.99	0.91
235	A235N	0.78	1.03
235	A235P	0.97	0.48
235	A235Q	1.01	0.89
235	A235R	1.03	1.14
235	A235S	0.92	1.00
235	A235T	0.05	0.05
235	A235V	1.01	0.86
235	A235W	0.98	0.60
235	A235Y	0.91	0.93
237	K237A	0.05	0.78
237	K237C	0.05	0.57
237	K237D	0.05	0.08
237	K237E	0.05	0.74
237	K237F	0.05	0.09
237	K237G	0.05	1.21
237	K237H	0.05	0.26
237	K237I	0.05	0.40
237	K237L	0.05	0.57
237	K237M	0.05	0.46
237	K237N	0.05	0.43
237	K237P	0.05	0.30
237	K237Q	0.05	0.77
237	K237R	0.48	0.88
237	K237T	0.05	0.69
237	K237V	0.05	0.54
237	K237W	0.05	0.05
237	K237Y	0.05	0.05
238	H238A	0.05	0.62
238	H238C	0.05	0.63
238	H238D	0.05	0.75
238	H238F	0.05	0.05
238	H238G	0.05	0.73
238	H238I	0.05	0.18
238	H238K	0.05	0.05
238	H238L	0.05	0.25
238	H238M	0.05	0.36
238	H238N	0.21	0.83
238	H238P	0.05	0.57
238	H238Q	0.05	1.18

10

20

30

40

238	H238R	0.05	0.05
238	H238T	0.05	0.74
238	H238V	0.05	0.52
238	H238Y	0.05	0.05
240	K240A	0.05	1.13
240	K240D	0.05	1.19
240	K240E	0.05	1.19
240	K240F	0.05	0.90
240	K240G	0.05	1.22
240	K240H	0.05	1.17
240	K240I	0.05	0.99
240	K240M	0.31	1.13
240	K240N	0.05	1.37
240	K240P	0.05	1.69
240	K240Q	0.12	1.21
240	K240R	0.27	1.41
240	K240S	0.05	1.07
240	K240T	0.05	1.23
240	K240V	0.05	1.09
240	K240W	0.05	1.01
240	K240Y	0.05	1.11
246	D246A	0.73	1.03
246	D246E	1.18	1.03
246	D246F	0.67	1.02
246	D246G	0.61	1.09
246	D246H	0.71	1.05
246	D246I	0.75	0.85
246	D246K	0.36	1.18
246	D246L	0.81	0.91
246	D246M	0.80	0.92
246	D246N	0.68	0.97
246	D246P	0.47	0.81
246	D246Q	0.78	0.98
246	D246R	0.24	1.31
246	D246S	0.97	1.01
246	D246T	0.83	1.14
246	D246Y	0.90	0.96
249	S249A	1.06	0.97
249	S249C	0.93	0.74
249	S249D	0.98	0.94
249	S249E	1.27	0.92
249	S249F	0.91	0.74
249	S249G	0.91	0.94
249	S249H	1.04	0.93
249	S249K	1.15	1.02
249	S249L	1.14	0.82
249	S249M	0.95	0.77
249	S249P	1.09	0.80
249	S249Q	1.20	0.94

10

20

30

40

249	S249R	1.07	1.03
249	S249T	1.17	0.91
249	S249V	1.01	0.74
249	S249W	1.13	0.77
249	S249Y	1.07	0.87
250	Y250A	0.99	1.21
250	Y250C	1.03	1.12
250	Y250D	0.97	1.29
250	Y250E	1.13	1.33
250	Y250F	1.29	1.28
250	Y250G	1.09	1.33
250	Y250I	1.35	1.27
250	Y250K	1.07	1.48
250	Y250L	1.02	1.32
250	Y250M	1.35	1.39
250	Y250N	1.05	1.40
250	Y250P	0.71	1.05
250	Y250Q	1.01	1.54
250	Y250R	0.99	1.55
250	Y250S	1.02	1.41
250	Y250T	0.05	0.05
250	Y250V	0.05	0.05
250	Y250W	0.99	1.35
252	R252A	1.12	1.08
252	R252C	0.97	0.81
252	R252D	0.89	0.86
252	R252E	1.09	1.12
252	R252F	1.01	0.89
252	R252G	0.76	1.00
252	R252I	1.07	0.97
252	R252K	1.19	1.21
252	R252L	1.32	0.96
252	R252M	0.98	0.96
252	R252N	1.15	0.97
252	R252P	0.72	0.83
252	R252Q	1.16	1.04
252	R252S	1.04	1.01
252	R252T	1.09	0.99
252	R252V	1.01	0.94
252	R252Y	1.14	0.86
253	S253A	1.09	0.97
253	S253D	1.07	1.04
253	S253E	0.05	0.05
253	S253F	1.19	0.82
253	S253G	1.18	0.92
253	S253H	1.13	0.97
253	S253I	1.13	0.84
253	S253K	1.10	1.01
253	S253L	1.09	0.79

10

20

30

40

253	S253M	0.05	0.05
253	S253N	1.06	1.03
253	S253P	0.95	0.90
253	S253Q	1.13	0.93
253	S253T	1.14	0.97
253	S253V	1.15	0.90
253	S253W	1.04	0.87
253	S253Y	1.34	0.94
254	Q254A	0.98	0.88
254	Q254C	0.94	0.66
254	Q254D	1.10	0.90
254	Q254E	1.29	0.89
254	Q254F	1.23	0.74
254	Q254G	1.15	0.77
254	Q254H	1.04	0.94
254	Q254I	1.12	0.91
254	Q254K	1.00	0.99
254	Q254L	1.09	0.82
254	Q254M	0.94	0.89
254	Q254N	1.17	0.90
254	Q254R	1.05	0.98
254	Q254S	1.07	0.98
254	Q254T	1.21	0.65
254	Q254V	1.31	0.92
254	Q254W	1.17	0.69
254	Q254Y	1.03	0.87
255	T255A	1.09	0.73
255	T255C	0.89	0.78
255	T255D	0.05	0.05
255	T255E	1.09	0.64
255	T255F	1.30	0.68
255	T255G	1.15	0.73
255	T255H	1.10	0.74
255	T255I	1.18	0.70
255	T255K	1.27	0.83
255	T255L	0.97	0.73
255	T255M	0.98	0.72
255	T255N	0.83	0.76
255	T255P	0.77	0.59
255	T255R	1.12	0.85
255	T255S	1.10	0.84
255	T255V	1.17	0.70
255	T255W	1.27	0.74
255	T255Y	1.02	0.72
257	K257A	1.08	0.67
257	K257C	0.89	0.49
257	K257D	1.16	0.75
257	K257E	1.15	0.76
257	K257F	1.03	0.92

10

20

30

40

257	K257G	0.97	0.73
257	K257H	1.12	0.69
257	K257I	1.09	0.59
257	K257L	1.26	0.74
257	K257M	1.29	0.79
257	K257N	1.16	0.83
257	K257P	0.62	0.38
257	K257Q	1.18	0.82
257	K257R	1.03	0.89
257	K257S	1.29	0.71
257	K257T	1.04	0.77
257	K257V	1.31	0.78
257	K257W	0.99	0.72
258	P258A	0.97	1.08
258	P258C	1.17	0.85
258	P258D	1.33	1.10
258	P258E	0.95	1.05
258	P258F	0.96	0.75
258	P258G	1.30	1.02
258	P258H	1.38	1.13
258	P258I	1.27	0.25
258	P258K	1.29	1.11
258	P258L	1.08	0.61
258	P258M	1.09	0.91
258	P258N	1.07	1.01
258	P258Q	1.31	1.13
258	P258R	1.02	1.13
258	P258S	1.12	1.08
258	P258T	1.27	1.10
258	P258V	1.29	0.80
258	P258W	1.14	0.87
258	P258Y	1.16	1.08
268	Y268A	0.86	1.39
268	Y268C	0.47	1.10
268	Y268D	0.59	1.44
268	Y268E	0.55	1.47
268	Y268F	1.28	1.07
268	Y268G	1.03	1.21
268	Y268H	0.87	1.24
268	Y268I	0.05	0.05
268	Y268K	0.78	1.90
268	Y268L	0.72	1.10
268	Y268M	0.97	1.15
268	Y268N	0.69	1.51
268	Y268P	0.78	1.41
268	Y268Q	0.71	1.30
268	Y268R	0.76	1.49
268	Y268S	1.06	1.22
268	Y268T	0.99	1.12

10

20

30

40

268	Y268V	0.88	0.99
268	Y268W	0.97	1.07
272	K272A	0.05	0.73
272	K272C	0.05	0.68
272	K272D	0.05	0.86
272	K272E	0.05	0.85
272	K272F	0.05	0.56
272	K272G	0.05	0.60
272	K272H	0.05	0.78
272	K272I	0.05	0.81
272	K272M	0.05	0.77
272	K272N	0.05	0.67
272	K272P	0.05	0.38
272	K272R	0.90	0.86
272	K272S	0.05	0.79
272	K272T	0.05	0.99
272	K272V	0.05	0.64
272	K272W	0.05	0.48
272	K272Y	0.05	0.66
274	H274A	0.66	1.40
274	H274C	0.65	0.68
274	H274D	0.64	1.20
274	H274E	0.86	1.14
274	H274F	0.88	1.00
274	H274G	0.56	1.36
274	H274I	0.76	1.39
274	H274K	0.85	1.60
274	H274L	0.87	1.40
274	H274N	0.67	1.50
274	H274P	0.05	0.50
274	H274Q	0.84	1.47
274	H274R	0.80	1.50
274	H274S	0.67	1.28
274	H274T	0.69	1.38
274	H274W	1.26	0.79
274	H274Y	1.05	1.07
275	N275A	0.32	1.01
275	N275C	0.22	0.68
275	N275D	0.08	1.03
275	N275E	0.05	0.98
275	N275F	0.05	0.81
275	N275G	0.18	1.00
275	N275H	0.60	1.10
275	N275I	0.15	0.87
275	N275K	0.22	1.22
275	N275L	0.20	1.02
275	N275M	0.20	0.96
275	N275P	0.05	0.37
275	N275Q	0.21	0.96

10

20

30

40

275	N275R	0.28	1.04
275	N275S	0.28	0.92
275	N275T	0.19	0.79
275	N275V	0.19	0.76
275	N275W	0.05	0.76
275	N275Y	0.89	0.93
279	K279C	0.05	0.54
279	K279E	0.05	0.91
279	K279F	0.05	0.70
279	K279G	0.05	0.85
279	K279H	0.05	0.36
279	K279I	0.05	0.68
279	K279L	0.05	0.52
279	K279M	0.05	0.71
279	K279N	0.05	0.91
279	K279P	0.05	0.46
279	K279Q	0.05	0.86
279	K279S	0.05	0.94
279	K279T	0.05	0.92
279	K279V	0.05	0.78
279	K279W	0.05	0.76
279	K279Y	0.05	0.78
283	T283A	1.06	0.97
283	T283C	1.16	0.78
283	T283D	0.92	1.03
283	T283E	0.95	1.01
283	T283G	0.97	1.01
283	T283H	1.09	0.84
283	T283I	1.10	0.72
283	T283K	1.14	1.01
283	T283L	1.07	0.76
283	T283M	1.26	0.93
283	T283N	1.29	0.96
283	T283P	0.46	0.56
283	T283R	0.82	1.08
283	T283S	1.02	1.06
283	T283V	1.23	0.81
283	T283W	1.07	0.75
283	T283Y	1.01	1.04
285	S285A	0.93	0.80
285	S285C	0.73	0.61
285	S285D	0.91	1.09
285	S285E	1.33	0.89
285	S285F	1.18	1.02
285	S285H	0.98	1.10
285	S285I	0.84	0.52
285	S285K	1.16	0.84
285	S285L	0.85	0.54
285	S285M	0.98	0.76

10

20

30

40

285	S285Q	1.38	1.22
285	S285R	0.84	0.96
285	S285T	0.98	0.79
285	S285V	0.70	0.63
285	S285W	1.13	1.08
285	S285Y	0.97	1.49
293	N293A	1.02	0.93
293	N293C	0.78	0.69
293	N293D	1.08	0.89
293	N293E	0.87	0.92
293	N293F	0.89	0.70
293	N293G	1.31	0.92
293	N293H	1.12	1.05
293	N293I	0.94	0.75
293	N293K	1.42	1.41
293	N293L	0.87	0.81
293	N293M	0.95	1.07
293	N293P	0.97	0.40
293	N293Q	1.14	1.06
293	N293R	0.86	1.37
293	N293S	0.93	0.95
293	N293T	1.10	1.12
293	N293V	1.04	0.82
293	N293W	1.09	0.78
293	N293Y	1.19	0.74
294	K294A	0.83	0.92
294	K294C	0.83	0.50
294	K294D	0.82	0.57
294	K294E	0.83	0.68
294	K294F	0.69	0.59
294	K294G	0.92	0.75
294	K294H	0.84	0.90
294	K294I	1.08	0.71
294	K294L	0.80	0.92
294	K294M	1.12	0.80
294	K294N	0.97	0.83
294	K294P	0.05	0.05
294	K294Q	0.88	0.87
294	K294R	1.18	0.90
294	K294S	0.95	0.83
294	K294T	0.83	0.16
294	K294V	0.89	0.73
294	K294W	1.23	0.66
294	K294Y	0.76	0.82
297	T297C	0.86	0.53
297	T297D	0.70	0.98
297	T297E	0.93	0.84
297	T297F	1.01	0.68
297	T297G	1.17	0.78

10

20

30

40

297	T297H	0.80	1.01
297	T297I	1.07	0.84
297	T297K	0.93	1.14
297	T297L	0.89	0.97
297	T297M	0.99	0.91
297	T297N	0.78	1.03
297	T297P	0.97	0.48
297	T297Q	1.01	0.89
297	T297R	1.03	1.14
297	T297S	0.92	1.00
297	T297V	1.01	0.86
297	T297W	0.98	0.60
297	T297Y	0.91	0.93
300	K300A	0.99	0.79
300	K300C	0.95	0.39
300	K300D	0.91	0.61
300	K300E	0.86	0.78
300	K300F	0.74	0.63
300	K300G	0.98	0.62
300	K300H	1.04	0.83
300	K300I	1.02	0.82
300	K300L	0.91	0.73
300	K300M	1.17	0.80
300	K300N	1.02	0.80
300	K300P	0.05	0.05
300	K300Q	0.90	0.86
300	K300R	1.20	0.92
300	K300S	0.93	0.80
300	K300T	1.16	0.87
300	K300V	1.15	0.84
300	K300W	0.97	0.57
301	S301A	1.10	0.89
301	S301E	1.12	0.94
301	S301F	1.44	0.68
301	S301G	1.02	1.05
301	S301H	1.12	0.87
301	S301I	1.28	0.74
301	S301K	1.08	1.05
301	S301L	1.09	0.97
301	S301M	1.09	0.87
301	S301N	1.16	0.64
301	S301P	1.21	0.61
301	S301Q	1.18	0.95
301	S301R	1.35	0.89
301	S301T	1.23	0.85
301	S301V	1.18	0.81
301	S301W	1.27	0.75
301	S301Y	1.10	0.80
306	D306A	0.82	0.40

10

20

30

40

306	D306C	0.74	0.30
306	D306E	0.80	0.71
306	D306F	0.71	0.10
306	D306G	0.76	0.26
306	D306H	0.84	0.35
306	D306I	0.80	0.18
306	D306K	0.77	0.41
306	D306L	0.78	0.18
306	D306N	1.15	0.89
306	D306P	0.82	0.39
306	D306Q	1.03	0.43
306	D306R	0.82	0.27
306	D306S	0.81	0.50
306	D306T	0.88	0.29
306	D306V	0.99	0.22
306	D306W	0.05	0.05
306	D306Y	0.94	0.12
309	T309A	0.05	0.05
309	T309C	1.15	0.59
309	T309D	1.27	0.89
309	T309E	0.95	0.91
309	T309F	1.15	0.80
309	T309G	1.17	1.00
309	T309H	0.94	0.97
309	T309I	1.17	0.82
309	T309K	1.18	1.08
309	T309L	1.15	0.95
309	T309M	1.15	0.97
309	T309N	1.20	0.99
309	T309P	0.93	0.20
309	T309Q	1.19	0.98
309	T309R	1.12	1.08
309	T309S	1.00	1.04
309	T309V	1.38	0.95
309	T309W	1.08	0.77
309	T309Y	1.11	0.94
312	T312A	1.01	1.00
312	T312C	0.99	0.70
312	T312D	1.03	0.96
312	T312E	1.15	0.95
312	T312F	1.05	0.92
312	T312G	1.18	1.07
312	T312H	1.30	0.99
312	T312K	0.83	0.25
312	T312L	1.08	0.95
312	T312M	0.98	0.91
312	T312N	1.04	0.99
312	T312P	0.74	0.85
312	T312Q	1.05	0.94

10

20

30

40

312	T312R	1.13	1.00
312	T312S	1.29	0.99
312	T312V	1.40	0.87
312	T312W	1.14	0.83
312	T312Y	1.31	0.92
313	N313A	1.01	0.93
313	N313C	0.95	0.63
313	N313D	0.95	0.51
313	N313E	1.05	0.90
313	N313F	1.06	0.64
313	N313G	1.25	0.96
313	N313H	1.25	0.94
313	N313I	1.44	0.55
313	N313K	1.12	0.85
313	N313L	1.21	0.85
313	N313M	1.02	0.89
313	N313P	1.05	0.81
313	N313Q	1.00	1.00
313	N313R	1.19	1.13
313	N313S	1.25	1.05
313	N313V	1.28	0.74
313	N313W	1.01	0.67
313	N313Y	1.10	0.90
317	K317A	0.98	0.94
317	K317C	0.83	0.54
317	K317D	0.82	0.86
317	K317E	0.78	0.91
317	K317F	0.92	0.84
317	K317G	0.91	0.88
317	K317L	1.10	0.86
317	K317M	1.02	0.95
317	K317N	1.03	0.92
317	K317P	0.86	0.80
317	K317Q	0.76	0.94
317	K317R	0.78	0.89
317	K317S	1.04	0.93
317	K317T	0.94	0.88
317	K317V	1.00	0.93
317	K317W	1.08	0.83
317	K317Y	1.05	0.93
318	D318A	0.93	1.38
318	D318E	0.90	1.09
318	D318F	0.78	1.22
318	D318G	0.91	1.39
318	D318H	1.12	1.10
318	D318I	0.75	1.40
318	D318K	0.65	1.73
318	D318L	1.00	1.31
318	D318M	0.90	1.26

10

20

30

40

318	D318N	0.92	1.19
318	D318P	0.61	0.37
318	D318Q	0.93	1.14
318	D318R	0.71	1.54
318	D318S	1.11	1.37
318	D318T	1.40	1.32
318	D318V	0.81	1.34
318	D318W	0.90	1.07
318	D318Y	1.10	1.33
319	Q319A	1.02	1.13
319	Q319C	0.73	1.38
319	Q319D	0.85	1.31
319	Q319E	0.98	1.20
319	Q319F	0.87	1.11
319	Q319G	1.14	1.03
319	Q319H	0.94	1.28
319	Q319I	0.94	1.32
319	Q319K	1.10	1.52
319	Q319L	0.95	1.11
319	Q319M	0.90	1.09
319	Q319N	0.91	1.12
319	Q319P	1.13	0.57
319	Q319R	1.18	1.44
319	Q319S	0.91	1.12
319	Q319T	0.98	1.10
319	Q319V	1.07	1.08
319	Q319W	1.05	1.08
319	Q319Y	1.04	1.41
320	P320A	1.02	0.96
320	P320C	1.01	0.75
320	P320D	0.74	0.91
320	P320E	1.04	0.85
320	P320F	0.76	0.77
320	P320G	1.00	1.00
320	P320H	1.00	1.18
320	P320I	0.86	0.80
320	P320K	0.96	1.23
320	P320L	0.87	0.83
320	P320M	1.04	0.60
320	P320Q	0.95	1.08
320	P320R	0.79	1.25
320	P320S	1.16	1.03
320	P320T	1.11	1.28
320	P320V	1.08	0.88
320	P320W	0.90	1.03
320	P320Y	1.05	1.03
338	L338A	1.36	1.29
338	L338C	1.24	0.67
338	L338D	1.00	0.94

10

20

30

40

338	L338E	0.87	0.65
338	L338F	0.90	0.17
338	L338G	1.38	1.34
338	L338H	0.05	0.05
338	L338I	1.12	1.32
338	L338K	0.05	0.05
338	L338M	1.20	1.27
338	L338P	1.11	1.23
338	L338Q	0.96	0.61
338	L338R	0.05	0.05
338	L338S	1.13	1.51
338	L338T	1.42	1.05
338	L338V	1.14	1.55
338	L338W	0.98	0.14
338	L338Y	1.15	0.11
339	Q339A	1.08	1.13
339	Q339C	0.88	0.79
339	Q339D	0.93	0.11
339	Q339E	1.07	0.84
339	Q339F	0.86	0.55
339	Q339G	1.17	1.21
339	Q339H	1.03	1.04
339	Q339K	1.26	1.13
339	Q339L	1.12	0.70
339	Q339M	0.93	0.81
339	Q339P	1.02	1.24
339	Q339R	0.81	0.35
339	Q339S	1.02	1.02
339	Q339T	1.35	1.01
339	Q339V	1.23	0.76
339	Q339W	0.05	0.05
339	Q339Y	1.14	0.78
340	S340A	1.23	1.43
340	S340C	0.74	0.75
340	S340D	0.97	1.63
340	S340E	0.92	1.58
340	S340F	0.83	0.82
340	S340H	1.12	1.45
340	S340I	1.07	1.07
340	S340K	0.99	1.76
340	S340L	0.05	0.05
340	S340M	1.24	1.20
340	S340N	1.10	1.75
340	S340P	0.69	0.81
340	S340Q	1.21	1.76
340	S340T	1.21	1.14
340	S340V	1.00	1.09
340	S340Y	1.02	0.97
343	D343A	0.96	0.35

10

20

30

40

343	D343C	1.32	0.74
343	D343E	1.00	1.07
343	D343F	0.91	0.79
343	D343H	0.98	1.02
343	D343I	1.27	0.88
343	D343L	0.95	1.08
343	D343M	0.99	1.02
343	D343N	1.05	0.88
343	D343P	1.30	1.03
343	D343Q	1.14	1.01
343	D343R	1.25	1.03
343	D343T	1.08	0.98
343	D343W	1.00	0.64
343	D343Y	1.29	0.82
345	W345A	1.05	0.90
345	W345C	0.97	0.43
345	W345D	1.10	1.15
345	W345E	1.06	1.24
345	W345F	1.07	0.55
345	W345H	1.15	1.10
345	W345I	1.28	0.90
345	W345K	0.05	0.05
345	W345L	1.07	0.99
345	W345M	1.02	1.01
345	W345N	1.07	1.10
345	W345P	1.00	0.94
345	W345Q	1.26	1.10
345	W345S	1.01	1.12
345	W345T	1.15	1.15
345	W345V	1.16	1.02
363	C363A	0.84	1.06
363	C363D	0.87	1.74
363	C363E	0.99	1.34
363	C363F	0.83	1.03
363	C363G	0.61	0.83
363	C363H	0.78	0.76
363	C363I	0.92	0.63
363	C363L	0.73	0.89
363	C363M	0.97	1.36
363	C363N	0.92	1.86
363	C363P	0.05	0.05
363	C363Q	0.88	1.78
363	C363R	0.05	0.05
363	C363S	0.88	1.35
363	C363T	1.15	0.18
363	C363V	1.02	0.99
363	C363W	0.35	0.70
363	C363Y	0.92	0.12
366	Y366A	0.96	1.14

10

20

30

40

366	Y366C	0.46	0.37
366	Y366D	0.52	1.18
366	Y366E	0.91	1.18
366	Y366F	0.91	0.87
366	Y366G	0.94	1.08
366	Y366H	1.07	1.12
366	Y366I	0.85	0.87
366	Y366K	0.72	0.82
366	Y366L	0.77	0.61
366	Y366M	0.92	0.79
366	Y366N	1.03	0.91
366	Y366P	0.54	0.78
366	Y366Q	1.03	1.49
366	Y366R	0.96	0.96
366	Y366S	1.07	1.02
366	Y366T	1.01	0.91
366	Y366V	1.04	0.94
366	Y366W	1.11	0.99
369	Y369A	0.05	0.05
369	Y369C	0.44	0.16
369	Y369E	0.98	0.87
369	Y369F	1.03	0.79
369	Y369G	0.86	0.33
369	Y369H	0.89	0.78
369	Y369I	1.33	0.91
369	Y369K	1.07	0.80
369	Y369M	1.06	1.02
369	Y369P	0.49	0.20
369	Y369Q	1.07	0.79
369	Y369R	1.11	0.95
369	Y369S	0.89	0.60
369	Y369T	1.28	0.68
369	Y369V	1.17	0.91
369	Y369W	1.09	0.95
370	Y370A	1.03	1.21
370	Y370C	0.44	0.19
370	Y370D	0.48	1.35
370	Y370E	0.98	1.35
370	Y370F	0.90	0.73
370	Y370G	1.21	1.18
370	Y370H	0.96	1.36
370	Y370I	0.99	1.00
370	Y370K	0.93	1.65
370	Y370L	0.93	0.88
370	Y370M	0.91	1.04
370	Y370N	1.04	1.41
370	Y370P	0.44	0.67
370	Y370Q	0.87	1.51
370	Y370S	1.06	1.50

10

20

30

40

370	Y370T	1.07	1.10
370	Y370V	1.05	1.13
370	Y370W	0.94	0.91
375	Y375A	1.03	1.39
375	Y375C	0.59	0.48
375	Y375D	0.96	1.52
375	Y375E	0.96	1.48
375	Y375F	0.90	1.00
375	Y375G	0.90	0.98
375	Y375H	0.98	1.16
375	Y375I	0.94	1.06
375	Y375K	0.96	1.43
375	Y375L	1.03	1.07
375	Y375M	0.98	1.05
375	Y375N	0.92	1.48
375	Y375P	0.92	0.89
375	Y375Q	0.92	1.56
375	Y375R	0.77	1.61
375	Y375S	0.92	1.29
375	Y375T	1.25	1.04
375	Y375W	0.98	0.88
379	S379A	1.01	1.02
379	S379C	0.60	0.44
379	S379D	0.92	0.96
379	S379E	0.99	1.01
379	S379F	0.48	0.43
379	S379G	0.90	0.91
379	S379H	0.05	0.05
379	S379I	0.80	0.70
379	S379K	1.00	1.12
379	S379L	0.84	0.56
379	S379M	0.87	0.80
379	S379N	1.03	0.98
379	S379P	0.61	0.39
379	S379Q	0.94	0.98
379	S379R	0.96	1.01
379	S379T	1.07	0.95
379	S379V	0.90	0.75
379	S379W	0.70	0.35
379	S379Y	0.92	0.59
381	K381A	0.85	0.78
381	K381C	0.86	0.35
381	K381D	0.87	0.65
381	K381E	0.93	0.81
381	K381F	0.96	0.20
381	K381G	0.96	0.82
381	K381H	1.13	0.73
381	K381I	0.98	0.36
381	K381L	0.95	0.38

10

20

30

40

381	K381M	0.93	0.56
381	K381N	0.87	0.68
381	K381P	1.18	0.39
381	K381Q	1.03	0.90
381	K381R	1.20	0.95
381	K381S	1.18	0.89
381	K381T	1.01	0.60
381	K381V	1.00	0.43
381	K381W	0.90	0.22
381	K381Y	0.87	0.63
385	D385A	1.01	0.88
385	D385C	0.05	0.05
385	D385E	0.89	1.05
385	D385F	0.73	0.54
385	D385G	1.05	0.88
385	D385H	0.96	0.99
385	D385I	0.46	0.15
385	D385K	1.00	1.06
385	D385L	0.96	0.47
385	D385N	0.91	0.96
385	D385P	0.05	0.05
385	D385Q	1.02	1.01
385	D385R	0.86	0.95
385	D385S	1.10	1.00
385	D385T	1.22	0.92
385	D385V	0.85	0.43
385	D385W	0.98	0.53
386	P386A	0.90	0.80
386	P386C	0.72	0.69
386	P386D	0.85	0.94
386	P386E	0.94	0.87
386	P386F	0.72	0.66
386	P386G	1.02	0.77
386	P386H	0.89	0.93
386	P386I	1.12	0.73
386	P386K	1.22	0.87
386	P386L	0.96	0.73
386	P386M	0.94	0.70
386	P386N	0.91	0.86
386	P386Q	0.95	0.86
386	P386S	0.83	0.82
386	P386T	1.00	0.54
386	P386V	1.11	0.79
386	P386W	0.90	0.44
386	P386Y	0.91	0.78
391	R391A	0.58	0.22
391	R391C	0.28	0.12
391	R391E	0.05	0.08
391	R391G	0.42	0.16

10

20

30

40

391	R391H	0.59	0.29
391	R391K	0.88	0.59
391	R391L	0.05	0.05
391	R391N	0.71	0.38
391	R391P	0.05	0.05
391	R391Q	0.62	0.28
391	R391S	0.05	0.33
391	R391T	0.67	0.25
391	R391V	0.24	0.09
391	R391W	0.05	0.05
391	R391Y	0.05	0.05
392	R392A	0.89	0.73
392	R392C	0.74	0.66
392	R392E	0.79	0.46
392	R392F	1.03	0.43
392	R392G	0.99	0.65
392	R392H	0.86	0.96
392	R392I	1.08	0.57
392	R392K	1.10	1.09
392	R392L	0.91	0.63
392	R392M	1.07	0.72
392	R392N	0.89	0.90
392	R392P	0.67	0.31
392	R392Q	1.12	0.75
392	R392S	1.00	0.73
392	R392T	1.00	0.91
392	R392V	0.89	0.48
392	R392W	0.68	0.23
392	R392Y	1.00	0.60
393	D393A	0.98	0.77
393	D393C	0.69	0.48
393	D393E	0.92	0.81
393	D393F	0.84	0.61
393	D393G	1.08	0.75
393	D393H	0.88	0.75
393	D393I	0.05	0.05
393	D393K	1.09	0.80
393	D393L	1.04	0.70
393	D393N	0.05	0.05
393	D393P	0.05	0.05
393	D393Q	1.00	0.82
393	D393R	0.88	0.64
393	D393S	0.92	0.91
393	D393T	1.12	0.90
393	D393V	1.04	0.63
393	D393W	0.95	0.66
393	D393Y	1.01	0.66
394	Y394A	0.91	0.86
394	Y394D	0.98	0.84

10

20

30

40

394	Y394E	0.92	1.03
394	Y394F	1.07	0.98
394	Y394G	1.13	0.85
394	Y394H	1.04	0.99
394	Y394I	1.11	0.95
394	Y394K	1.09	1.07
394	Y394L	1.22	1.11
394	Y394M	0.74	0.23
394	Y394N	1.00	1.01
394	Y394P	0.05	0.05
394	Y394Q	1.09	1.13
394	Y394S	1.11	1.15
394	Y394V	3.00	0.75
394	Y394W	1.11	1.16
400	H400A	1.24	0.89
400	H400C	1.16	0.73
400	H400D	1.05	0.82
400	H400E	0.99	0.95
400	H400F	1.01	0.94
400	H400G	0.90	0.83
400	H400I	1.04	0.91
400	H400K	0.92	1.03
400	H400L	0.90	0.88
400	H400M	1.01	0.91
400	H400N	1.26	0.92
400	H400P	0.05	0.05
400	H400Q	0.96	0.94
400	H400R	1.03	0.87
400	H400S	0.94	0.92
400	H400T	0.95	0.88
400	H400V	1.28	0.91
400	H400W	1.17	0.80
400	H400Y	1.15	0.92
402	Y402A	1.07	0.97
402	Y402C	0.92	0.76
402	Y402D	0.90	0.80
402	Y402E	1.09	0.77
402	Y402F	0.89	0.82
402	Y402G	0.92	0.81
402	Y402H	1.21	0.91
402	Y402I	1.36	0.75
402	Y402K	0.95	0.84
402	Y402L	1.09	0.49
402	Y402M	1.14	0.88
402	Y402N	1.06	0.86
402	Y402P	1.03	0.28
402	Y402Q	0.98	0.83
402	Y402R	1.16	0.75
402	Y402T	1.32	1.02

10

20

30

40

402	Y402V	1.40	0.95
402	Y402W	1.24	0.89
403	L403A	1.20	0.89
403	L403C	1.10	0.98
403	L403D	1.03	0.95
403	L403E	1.26	0.93
403	L403F	1.03	0.74
403	L403G	1.22	0.96
403	L403H	1.10	0.90
403	L403M	1.11	0.99
403	L403N	0.98	0.95
403	L403P	0.78	0.47
403	L403Q	1.24	0.98
403	L403R	1.36	1.01
403	L403S	1.17	1.00
403	L403T	1.53	0.99
403	L403V	1.34	1.00
403	L403W	1.15	0.85
403	L403Y	1.16	0.97
404	D404A	1.12	0.73
404	D404C	1.28	0.61
404	D404E	1.38	0.78
404	D404G	1.25	0.77
404	D404I	1.20	0.84
404	D404K	1.10	0.83
404	D404L	1.09	0.91
404	D404M	1.13	0.76
404	D404N	1.13	0.98
404	D404P	1.05	0.56
404	D404Q	1.17	0.91
404	D404R	1.15	0.77
404	D404S	1.19	0.99
404	D404V	1.28	0.79
404	D404W	1.05	0.76
404	D404Y	1.08	0.81
406	S406A	0.99	0.99
406	S406C	1.11	0.85
406	S406D	0.93	1.02
406	S406E	0.95	0.91
406	S406F	0.86	0.88
406	S406G	0.93	0.86
406	S406H	0.88	0.98
406	S406I	0.92	0.91
406	S406K	0.95	0.82
406	S406L	0.94	0.98
406	S406M	0.89	0.90
406	S406N	1.09	0.94
406	S406P	0.91	0.93
406	S406Q	0.05	0.05

10

20

30

40

406	S406T	1.18	0.97
406	S406V	1.14	0.87
406	S406Y	0.99	0.80
407	D407C	1.14	0.41
407	D407E	0.82	0.59
407	D407F	0.88	0.35
407	D407G	1.10	0.38
407	D407H	0.85	0.63
407	D407I	1.05	0.22
407	D407K	1.00	0.44
407	D407L	0.91	0.18
407	D407M	1.05	0.37
407	D407N	1.11	0.96
407	D407P	0.05	0.05
407	D407Q	0.94	0.53
407	D407R	0.78	0.36
407	D407S	0.93	0.65
407	D407T	1.06	0.49
407	D407V	0.93	0.29
407	D407W	1.06	0.20
407	D407Y	0.85	0.38
410	G410A	0.90	1.00
410	G410C	1.04	0.81
410	G410D	0.05	0.05
410	G410E	0.05	0.05
410	G410F	0.96	0.22
410	G410H	0.93	0.34
410	G410I	0.05	0.05
410	G410L	0.05	0.05
410	G410M	1.13	0.35
410	G410N	0.99	0.27
410	G410P	0.05	0.05
410	G410Q	1.05	0.14
410	G410R	0.98	0.27
410	G410T	1.08	0.70
410	G410V	1.10	0.42
410	G410W	0.05	0.05
410	G410Y	0.92	0.49
413	R413A	1.02	1.06
413	R413D	0.71	0.40
413	R413E	0.86	0.67
413	R413G	1.19	0.33
413	R413H	1.06	0.95
413	R413I	0.96	0.75
413	R413K	1.08	0.95
413	R413L	1.02	0.96
413	R413M	0.81	0.81
413	R413N	0.93	0.72
413	R413P	0.05	0.05

10

20

30

40

413	R413Q	0.81	0.35
413	R413S	0.85	0.87
413	R413T	0.05	0.74
413	R413V	0.93	0.73
413	R413W	0.92	0.41
413	R413Y	0.73	0.49
414	E414A	1.06	0.70
414	E414C	1.05	0.55
414	E414D	1.13	0.75
414	E414F	0.81	0.59
414	E414G	0.82	0.68
414	E414H	0.89	0.65
414	E414I	0.98	0.60
414	E414K	0.96	0.65
414	E414L	1.16	0.71
414	E414M	0.88	0.72
414	E414N	0.99	0.57
414	E414P	0.85	0.60
414	E414Q	0.85	0.70
414	E414R	1.00	0.65
414	E414S	0.91	0.63
414	E414T	0.79	0.67
414	E414W	1.03	0.25
414	E414Y	0.78	0.58
416	V416A	0.93	0.67
416	V416C	0.94	0.61
416	V416D	1.05	0.71
416	V416F	0.05	0.05
416	V416H	0.92	0.78
416	V416I	0.83	0.74
416	V416K	0.71	0.65
416	V416L	0.96	0.81
416	V416M	1.06	0.78
416	V416N	0.92	0.66
416	V416P	1.18	0.53
416	V416Q	1.02	0.74
416	V416R	1.02	0.29
416	V416S	1.15	0.46
416	V416T	1.01	0.65
416	V416W	0.83	0.55
416	V416Y	0.89	0.69
419	K419A	1.36	1.29
419	K419C	1.24	0.67
419	K419D	1.00	0.94
419	K419E	0.87	0.65
419	K419F	0.90	0.17
419	K419H	0.05	0.05
419	K419I	1.12	1.32
419	K419L	0.05	0.05

10

20

30

40

419	K419M	1.20	1.27
419	K419N	0.05	0.05
419	K419P	1.11	1.23
419	K419Q	0.96	0.61
419	K419R	0.05	0.05
419	K419S	1.13	1.51
419	K419T	1.42	1.05
419	K419V	1.14	1.55
419	K419W	0.98	0.14
419	K419Y	1.15	0.11
422	S422A	0.64	0.97
422	S422C	0.96	0.71
422	S422D	0.97	0.96
422	S422E	1.31	0.78
422	S422F	0.96	0.71
422	S422G	1.20	0.99
422	S422H	1.06	0.66
422	S422I	1.11	0.85
422	S422K	1.16	0.96
422	S422L	0.99	0.74
422	S422M	1.04	0.94
422	S422N	1.12	1.03
422	S422P	0.84	0.70
422	S422Q	0.15	0.82
422	S422R	1.02	0.94
422	S422T	0.97	0.92
422	S422V	1.17	0.88
422	S422W	0.96	0.70
422	S422Y	1.09	0.92
427	L427A	0.93	0.66
427	L427C	1.02	0.68
427	L427D	0.05	0.05
427	L427E	0.86	0.27
427	L427F	0.89	0.30
427	L427G	0.63	0.26
427	L427H	0.05	0.05
427	L427I	1.08	0.64
427	L427K	0.05	0.05
427	L427M	0.86	0.79
427	L427N	0.76	0.31
427	L427P	1.13	0.06
427	L427Q	0.95	0.53
427	L427R	0.05	0.05
427	L427S	0.78	0.27
427	L427T	0.80	0.70
427	L427V	0.82	0.72
427	L427W	0.05	0.05
427	L427Y	0.05	0.05
433	G433A	1.27	1.08

10

20

30

40

433	G433C	1.15	0.69
433	G433D	1.05	0.96
433	G433E	0.92	0.99
433	G433F	1.04	0.92
433	G433H	1.27	0.99
433	G433I	1.37	0.86
433	G433K	1.27	1.05
433	G433L	1.30	0.90
433	G433M	1.23	1.01
433	G433N	1.07	0.75
433	G433P	1.13	0.95
433	G433Q	0.78	0.99
433	G433R	1.00	0.91
433	G433S	1.17	0.96
433	G433T	1.17	0.90
433	G433V	1.27	0.95
433	G433Y	1.26	1.01
436	K436A	0.92	0.94
436	K436C	0.90	0.84
436	K436D	0.86	0.93
436	K436E	0.70	0.87
436	K436F	0.81	0.64
436	K436G	0.84	0.77
436	K436H	1.09	0.89
436	K436I	1.08	0.81
436	K436L	1.01	0.78
436	K436M	0.76	0.85
436	K436N	0.98	0.92
436	K436P	0.88	0.71
436	K436Q	1.01	0.96
436	K436R	1.06	0.79
436	K436S	0.75	0.92
436	K436T	0.95	0.90
436	K436V	0.98	0.87
436	K436W	1.07	0.71
436	K436Y	0.99	0.80
439	Y439A	1.02	0.78
439	Y439D	1.01	0.85
439	Y439E	0.05	0.05
439	Y439F	0.77	0.78
439	Y439G	1.01	0.77
439	Y439H	0.96	0.73
439	Y439I	0.05	0.05
439	Y439K	0.96	0.74
439	Y439L	0.05	0.05
439	Y439M	1.04	0.77
439	Y439N	0.96	0.83
439	Y439P	0.87	0.85
439	Y439Q	0.90	0.88

10

20

30

40

439	Y439R	0.75	0.80
439	Y439S	0.94	0.82
439	Y439T	0.84	0.79
439	Y439V	1.04	0.70
439	Y439W	0.86	0.72
442	K442A	1.38	0.98
442	K442C	0.05	0.05
442	K442F	1.04	0.97
442	K442G	1.23	1.02
442	K442H	1.07	1.04
442	K442I	1.13	0.93
442	K442N	1.39	1.03
442	K442P	1.11	1.03
442	K442Q	1.11	1.05
442	K442R	1.33	1.01
442	K442S	1.24	1.07
442	K442T	1.34	1.06
442	K442V	1.20	0.99
442	K442W	1.32	0.98
442	K442Y	1.24	1.08
445	A445C	0.98	0.83
445	A445D	1.04	0.87
445	A445G	1.21	1.01
445	A445H	0.90	0.93
445	A445I	1.25	0.84
445	A445K	1.20	0.11
445	A445L	1.17	0.92
445	A445N	1.20	0.91
445	A445P	0.91	0.77
445	A445Q	0.05	0.05
445	A445R	0.91	0.89
445	A445S	1.16	0.94
445	A445T	1.29	0.88
445	A445V	1.27	0.93
445	A445W	1.25	0.80
447	K447A	1.09	1.06
447	K447C	1.11	0.87
447	K447D	1.00	0.99
447	K447F	1.09	0.84
447	K447G	1.06	0.94
447	K447H	1.13	0.92
447	K447I	1.22	0.91
447	K447L	1.06	1.01
447	K447M	1.07	0.96
447	K447N	1.43	0.97
447	K447Q	1.34	1.00
447	K447R	1.10	0.96
447	K447S	0.90	0.92
447	K447T	1.21	0.37

10

20

30

40

447	K447V	0.69	0.86
447	K447W	1.31	0.89
447	K447Y	1.21	0.96
448	V448A	0.98	0.96
448	V448C	1.36	0.98
448	V448D	1.15	1.02
448	V448E	0.05	0.05
448	V448F	1.48	1.01
448	V448G	1.26	1.05
448	V448H	1.37	1.03
448	V448I	1.44	0.97
448	V448K	1.20	1.07
448	V448L	1.04	1.08
448	V448M	1.13	0.97
448	V448N	1.24	0.70
448	V448P	0.84	1.19
448	V448Q	1.18	1.16
448	V448R	0.05	0.05
448	V448S	1.20	1.10
448	V448T	0.05	0.05
448	V448W	1.08	0.89
448	V448Y	1.33	1.27
450	Y450A	0.95	0.94
450	Y450C	1.22	0.84
450	Y450D	1.19	0.95
450	Y450E	1.01	0.92
450	Y450G	1.02	0.93
450	Y450H	1.23	0.90
450	Y450K	1.18	0.94
450	Y450L	0.93	0.69
450	Y450M	1.29	0.89
450	Y450N	1.23	0.96
450	Y450P	0.75	0.30
450	Y450Q	1.00	0.95
450	Y450R	1.22	1.02
450	Y450S	1.22	1.01
450	Y450T	1.32	0.96
450	Y450V	0.05	0.05
450	Y450W	1.21	0.95
452	L452A	1.08	1.06
452	L452C	1.00	1.01
452	L452D	0.98	1.08
452	L452E	0.75	0.55
452	L452F	0.79	0.93
452	L452G	1.07	1.00
452	L452H	1.05	0.99
452	L452K	1.11	1.08
452	L452M	1.13	1.09
452	L452N	1.06	1.28

10

20

30

40

452	L452P	1.02	0.78
452	L452Q	0.92	1.22
452	L452R	0.93	1.26
452	L452S	0.86	1.21
452	L452T	1.02	1.18
452	L452V	1.14	1.14
452	L452Y	1.17	1.07
455	N455A	1.07	1.04
455	N455C	0.85	0.89
455	N455D	1.07	0.97
455	N455E	1.14	0.94
455	N455G	1.23	1.00
455	N455H	1.05	1.01
455	N455I	1.23	0.95
455	N455K	1.10	1.08
455	N455L	1.06	0.97
455	N455M	0.95	0.96
455	N455P	1.36	0.93
455	N455Q	0.96	0.91
455	N455R	1.13	1.02
455	N455S	1.04	0.91
455	N455T	1.16	0.90
455	N455V	1.26	0.89
455	N455W	1.12	0.76
455	N455Y	1.08	0.15
463	N463A	1.25	1.06
463	N463D	0.97	1.02
463	N463F	1.04	0.87
463	N463G	1.04	1.00
463	N463H	1.12	0.99
463	N463I	0.05	0.05
463	N463K	1.07	1.00
463	N463L	1.16	1.01
463	N463M	1.24	1.08
463	N463P	0.93	1.05
463	N463Q	0.98	1.04
463	N463R	0.95	0.93
463	N463S	1.27	0.96
463	N463T	1.38	0.91
463	N463V	1.32	0.86
463	N463W	1.45	0.74
463	N463Y	1.20	0.90
465	D465A	0.76	1.06
465	D465C	0.84	0.74
465	D465E	0.95	0.93
465	D465F	0.78	0.89
465	D465G	1.35	0.92
465	D465H	1.06	0.92
465	D465I	1.37	0.85

10

20

30

40

465	D465K	1.53	0.88
465	D465L	1.14	0.95
465	D465M	1.06	0.98
465	D465N	1.32	0.93
465	D465P	1.13	0.71
465	D465Q	0.86	0.94
465	D465R	1.18	0.90
465	D465S	0.87	0.98
465	D465T	1.42	0.92
465	D465V	1.24	0.93
465	D465W	1.00	0.83
465	D465Y	1.06	0.93
469	E469A	1.16	1.01
469	E469C	1.03	0.86
469	E469D	1.22	1.02
469	E469F	1.11	1.00
469	E469G	1.19	1.00
469	E469H	1.04	0.96
469	E469K	1.16	0.96
469	E469L	1.10	0.98
469	E469M	0.05	0.05
469	E469N	1.19	0.47
469	E469P	0.85	1.05
469	E469Q	1.03	1.04
469	E469R	1.01	0.75
469	E469S	0.91	1.08
469	E469T	1.15	1.06
469	E469V	1.15	1.08
469	E469W	1.24	0.97
469	E469Y	1.35	1.09
471	K471A	1.09	1.09
471	K471C	1.04	0.91
471	K471D	1.01	1.06
471	K471F	1.10	1.05
471	K471G	1.13	1.12
471	K471H	1.00	1.10
471	K471I	1.22	1.02
471	K471L	0.99	1.07
471	K471M	0.95	1.14
471	K471N	1.04	1.12
471	K471P	0.84	0.98
471	K471Q	0.90	1.08
471	K471R	0.77	1.33
471	K471S	0.97	1.01
471	K471T	1.11	1.09
471	K471V	1.28	1.11
471	K471Y	1.15	1.36
473	N473A	1.03	0.99
473	N473C	1.15	0.74

10

20

30

40

473	N473D	1.14	0.98
473	N473E	1.20	0.99
473	N473F	1.10	0.83
473	N473G	1.35	0.99
473	N473H	1.02	0.91
473	N473I	0.66	0.45
473	N473K	1.02	1.02
473	N473L	0.05	0.97
473	N473M	1.11	1.00
473	N473P	1.01	0.95
473	N473Q	1.13	0.99
473	N473R	1.08	1.05
473	N473S	1.15	0.98
473	N473T	1.04	1.04
473	N473V	0.05	0.05
473	N473W	0.85	0.64
473	N473Y	1.23	0.86
476	S476A	1.51	1.02
476	S476C	0.91	0.89
476	S476D	0.98	0.91
476	S476E	1.08	0.91
476	S476F	1.09	0.87
476	S476G	1.22	0.97
476	S476H	1.07	0.96
476	S476I	1.03	0.78
476	S476K	1.01	0.97
476	S476L	1.46	0.93
476	S476M	1.58	1.08
476	S476N	1.61	0.98
476	S476P	1.02	0.62
476	S476Q	1.13	1.03
476	S476R	1.01	1.08
476	S476T	1.78	1.01
476	S476V	1.21	0.89
476	S476W	1.43	0.78
476	S476Y	1.79	0.94

表 26-5

この表は152位におけるコンビネーション変異体であるAmyS変異体を列挙する。これらの変異体は少なくとも1つの性質（活性又は安定性）について0.5以上の性能インデックス及び両方の性質において0.005より大きい性能インデックスを有する。

表26-5: AmySにおける組み合わせ変異体

POS	変異体	安定性 PI	活性 PI
5	N005A	0.95	0.32
5	N005C	0.98	0.29
5	N005E	1.04	0.43
5	N005F	0.79	0.15
5	N005G	0.88	0.34
5	N005H	0.89	0.43
5	N005I	1.00	0.10
5	N005K	0.90	0.34
5	N005L	1.04	0.10
5	N005M	0.84	0.18
5	N005P	1.10	0.40
5	N005Q	1.07	0.58
5	N005R	0.94	0.40
5	N005S	0.98	0.35
5	N005T	0.83	0.35
5	N005V	0.88	0.16
5	N005W	0.94	0.07
5	N005Y	1.07	0.21
6	G006A	1.10	1.59
6	G006D	1.14	1.64
6	G006E	1.08	1.93
6	G006H	0.95	2.29
6	G006I	1.23	1.47
6	G006K	0.93	2.36
6	G006L	1.15	1.61
6	G006M	1.11	1.60
6	G006N	1.21	1.61
6	G006P	1.10	2.47
6	G006Q	1.26	1.34
6	G006R	0.98	1.28
6	G006S	1.12	1.86
6	G006T	1.21	2.01
6	G006V	1.29	1.54
6	G006W	1.13	1.32
6	G006Y	1.07	1.88
13	E013A	0.32	1.01
13	E013C	0.22	0.68
13	E013D	0.08	1.03
13	E013G	0.18	1.00
13	E013H	0.60	1.10
13	E013I	0.15	0.87
13	E013K	0.22	1.22

10

20

30

40

13	E013L	0.20	1.02
13	E013M	0.20	0.96
13	E013Q	0.21	0.96
13	E013R	0.28	1.04
13	E013S	0.28	0.92
13	E013T	0.19	0.79
13	E013V	0.19	0.76
13	E013W	0.05	0.76
13	E013Y	0.89	0.93
14	W014A	0.95	0.77
14	W014C	0.91	0.71
14	W014D	0.81	0.59
14	W014E	0.95	1.07
14	W014F	1.06	1.25
14	W014G	0.97	0.88
14	W014I	1.12	0.40
14	W014K	1.01	0.69
14	W014L	0.88	0.15
14	W014M	1.18	0.84
14	W014N	0.92	0.99
14	W014P	0.84	0.98
14	W014Q	0.94	0.67
14	W014R	0.97	0.67
14	W014S	0.97	1.02
14	W014T	1.22	1.22
14	W014V	1.17	0.81
14	W014Y	1.08	1.71
15	Y015A	1.05	1.48
15	Y015C	0.70	1.15
15	Y015D	0.77	1.82
15	Y015E	0.68	1.96
15	Y015G	0.69	1.89
15	Y015H	1.01	1.85
15	Y015I	0.63	0.91
15	Y015K	0.74	1.58
15	Y015L	0.67	0.76
15	Y015M	0.72	1.12
15	Y015N	0.99	1.88
15	Y015P	0.57	1.59
15	Y015Q	0.80	1.74
15	Y015R	0.72	1.60
15	Y015S	0.58	1.78
15	Y015T	0.87	1.47
15	Y015W	0.95	1.44
16	L016A	0.81	1.31
16	L016D	0.93	1.12
16	L016E	1.09	1.21
16	L016F	2.17	0.98
16	L016G	0.61	1.35

10

20

30

40

16	L016H	0.96	1.21
16	L016I	0.79	1.12
16	L016K	0.79	1.41
16	L016M	0.94	1.15
16	L016N	0.92	1.32
16	L016P	0.35	1.30
16	L016Q	0.96	1.33
16	L016R	0.71	1.28
16	L016S	0.94	1.19
16	L016T	0.87	1.32
16	L016V	0.87	1.16
16	L016W	0.75	0.99
16	L016Y	0.97	1.10
18	D018A	1.08	0.89
18	D018F	0.68	0.58
18	D018G	0.88	0.87
18	D018H	0.84	0.84
18	D018I	0.79	0.70
18	D018K	0.88	0.65
18	D018L	0.60	0.72
18	D018N	0.73	1.01
18	D018P	0.84	1.04
18	D018Q	0.80	1.00
18	D018R	0.81	0.65
18	D018S	0.81	0.93
18	D018T	0.81	0.91
18	D018V	0.89	0.77
18	D018W	0.72	0.51
18	D018Y	0.72	0.87
20	G020A	0.79	0.25
20	G020C	0.58	0.24
20	G020D	0.92	0.96
20	G020E	0.89	0.95
20	G020F	0.65	0.13
20	G020H	0.75	0.11
20	G020I	0.96	0.28
20	G020M	0.69	0.10
20	G020N	0.78	0.09
20	G020Q	0.61	0.07
20	G020T	0.82	0.09
20	G020V	0.77	0.19
20	G020W	0.80	0.69
25	K025A	1.22	0.82
25	K025C	1.33	1.46
25	K025D	1.06	1.03
25	K025E	1.07	0.95
25	K025F	1.00	0.58
25	K025G	1.27	0.97
25	K025H	1.03	1.06

10

20

30

40

25	K025L	1.12	0.64
25	K025M	1.03	0.61
25	K025N	0.91	1.06
25	K025P	0.98	0.55
25	K025Q	1.24	1.07
25	K025R	1.08	0.96
25	K025S	1.07	0.98
25	K025T	1.14	0.89
25	K025Y	0.98	0.65
27	A027C	0.79	0.55
27	A027D	1.01	0.95
27	A027E	0.93	0.95
27	A027F	0.88	0.85
27	A027G	1.20	0.98
27	A027H	1.05	1.00
27	A027I	1.05	0.87
27	A027K	0.86	1.01
27	A027L	1.06	0.86
27	A027M	1.21	0.88
27	A027N	1.06	1.00
27	A027P	1.13	0.43
27	A027Q	1.00	0.96
27	A027R	1.11	0.89
27	A027S	1.16	0.97
27	A027T	1.20	0.90
27	A027V	1.20	0.82
27	A027W	1.13	0.76
27	A027Y	0.97	0.28
29	E029A	1.05	0.50
29	E029D	0.94	1.11
29	E029G	0.75	0.37
29	E029H	0.83	0.83
29	E029K	1.05	0.89
29	E029L	0.76	0.22
29	E029M	0.76	0.15
29	E029N	1.02	0.89
29	E029P	0.87	0.33
29	E029Q	1.04	0.86
29	E029R	1.09	0.92
29	E029S	0.97	0.83
29	E029T	0.95	0.59
29	E029W	0.74	0.10
36	L036A	0.95	0.85
36	L036C	0.83	0.43
36	L036D	0.91	0.27
36	L036E	0.90	0.40
36	L036F	1.14	0.90
36	L036G	0.92	0.34
36	L036H	0.92	0.77

10

20

30

40

36	L036I	1.17	0.89
36	L036K	1.01	1.05
36	L036M	1.05	1.05
36	L036N	1.02	0.68
36	L036P	0.90	0.06
36	L036Q	1.40	0.78
36	L036R	1.12	0.76
36	L036S	1.25	0.69
36	L036T	1.11	0.64
36	L036V	0.88	0.97
36	L036W	0.92	0.63
36	L036Y	1.07	0.91
39	T039C	1.09	1.05
39	T039D	1.15	1.47
39	T039E	1.15	1.32
39	T039F	1.16	0.48
39	T039G	1.23	1.05
39	T039H	1.16	1.10
39	T039K	1.12	1.10
39	T039M	1.18	0.54
39	T039N	1.14	1.64
39	T039P	1.11	0.26
39	T039Q	1.20	1.43
39	T039R	1.01	1.10
39	T039S	1.15	1.02
39	T039V	1.30	0.82
39	T039W	1.11	0.25
50	T050A	1.09	0.98
50	T050C	1.03	0.34
50	T050D	0.87	0.91
50	T050F	0.86	0.43
50	T050G	1.00	1.18
50	T050H	0.97	0.82
50	T050I	1.24	0.61
50	T050K	1.13	0.80
50	T050L	1.22	0.67
50	T050M	1.32	0.62
50	T050N	1.20	1.12
50	T050P	1.03	0.99
50	T050Q	1.31	1.08
50	T050R	1.13	0.79
50	T050S	1.07	1.09
50	T050V	1.02	0.79
50	T050W	0.90	0.18
50	T050Y	1.14	0.42
52	R052A	0.99	1.02
52	R052C	0.87	0.62
52	R052D	0.76	0.85
52	R052E	0.77	0.97

10

20

30

40

52	R052G	0.96	0.93
52	R052H	0.91	0.99
52	R052K	0.93	1.02
52	R052L	1.10	0.98
52	R052M	1.01	1.00
52	R052N	0.95	0.99
52	R052P	1.05	0.95
52	R052S	1.21	0.92
52	R052T	1.11	1.00
52	R052V	1.14	0.95
52	R052W	1.00	0.83
52	R052Y	0.99	0.96
53	S053A	1.03	1.00
53	S053C	0.73	0.58
53	S053D	0.75	0.83
53	S053E	1.05	0.88
53	S053F	0.87	0.85
53	S053G	1.14	0.93
53	S053H	1.12	1.00
53	S053I	0.99	1.12
53	S053K	1.03	1.10
53	S053L	0.93	0.96
53	S053M	0.96	0.97
53	S053P	0.88	1.00
53	S053Q	0.94	0.94
53	S053R	0.83	1.15
53	S053T	1.25	1.02
53	S053V	1.11	0.94
53	S053W	1.09	0.84
53	S053Y	0.94	0.93
54	D054A	0.34	0.88
54	D054C	0.64	0.38
54	D054G	0.11	0.97
54	D054H	0.11	1.04
54	D054I	0.30	0.83
54	D054M	0.11	0.88
54	D054N	0.94	1.05
54	D054R	0.06	0.89
54	D054S	0.38	0.96
54	D054T	0.17	0.95
54	D054V	0.17	0.77
67	E067C	1.08	0.75
67	E067D	0.90	1.07
67	E067G	1.01	1.13
67	E067H	1.04	1.03
67	E067K	0.98	0.94
67	E067L	0.97	0.95
67	E067M	0.93	0.91
67	E067N	1.32	0.95

10

20

30

40

67	E067Q	0.93	0.95
67	E067R	1.01	0.90
67	E067S	1.23	1.00
67	E067T	0.99	0.98
67	E067Y	1.11	0.93
71	K071A	0.72	0.81
71	K071C	0.80	0.61
71	K071D	0.69	0.71
71	K071E	0.80	0.84
71	K071F	0.47	0.61
71	K071G	0.74	0.91
71	K071H	0.96	0.88
71	K071I	0.83	0.75
71	K071L	0.55	0.61
71	K071M	0.80	0.68
71	K071N	1.11	0.89
71	K071P	0.92	0.86
71	K071Q	0.98	0.77
71	K071R	1.10	1.10
71	K071S	0.99	0.97
71	K071T	0.95	0.83
71	K071V	0.94	0.84
71	K071W	0.82	0.91
71	K071Y	0.52	0.71
73	T073A	0.97	1.11
73	T073C	0.91	0.60
73	T073D	0.89	1.02
73	T073E	0.75	1.08
73	T073F	0.73	0.99
73	T073G	0.79	1.12
73	T073H	0.86	0.88
73	T073I	0.66	1.02
73	T073K	0.20	0.97
73	T073L	0.47	1.17
73	T073M	0.59	0.64
73	T073N	0.73	1.08
73	T073P	0.57	0.98
73	T073R	0.40	1.11
73	T073S	0.87	1.10
73	T073V	0.67	1.09
73	T073W	0.83	1.07
73	T073Y	0.79	1.10
75	R075A	1.05	1.14
75	R075C	0.88	0.85
75	R075D	0.87	0.99
75	R075E	0.86	1.01
75	R075F	0.76	0.92
75	R075G	0.79	1.04
75	R075H	0.85	1.07

10

20

30

40

75	R075I	0.86	1.01
75	R075L	0.88	1.04
75	R075M	1.04	1.04
75	R075P	0.90	0.93
75	R075Q	0.90	0.95
75	R075S	0.66	0.60
75	R075T	0.98	0.88
75	R075V	0.78	0.94
75	R075W	0.75	0.93
75	R075Y	0.68	1.04
77	K077A	0.38	0.98
77	K077C	0.28	0.51
77	K077E	0.11	0.77
77	K077F	0.20	0.72
77	K077G	0.13	0.76
77	K077I	0.16	1.00
77	K077L	0.54	0.98
77	K077M	0.58	0.99
77	K077Q	0.07	0.86
77	K077R	0.77	1.07
77	K077S	0.11	0.89
77	K077V	0.05	0.83
80	T080A	0.88	1.01
80	T080C	0.91	0.69
80	T080D	1.22	0.86
80	T080E	0.71	0.92
80	T080F	1.10	0.50
80	T080G	1.02	0.93
80	T080H	1.01	0.95
80	T080I	1.29	0.82
80	T080K	0.90	0.86
80	T080L	0.82	0.98
80	T080M	0.97	0.95
80	T080N	0.90	1.00
80	T080P	0.88	0.88
80	T080Q	0.87	0.88
80	T080R	0.99	0.76
80	T080S	0.83	1.09
80	T080V	0.87	0.87
80	T080W	0.77	0.89
80	T080Y	0.72	0.97
81	K081A	0.87	0.94
81	K081C	0.84	0.74
81	K081D	0.96	0.83
81	K081E	0.69	0.92
81	K081G	0.86	0.81
81	K081H	0.73	1.03
81	K081I	0.82	0.79
81	K081L	0.87	1.01

10

20

30

40

81	K081M	0.93	1.04
81	K081P	0.90	0.79
81	K081Q	0.84	1.03
81	K081R	0.90	1.04
81	K081S	0.74	0.98
81	K081T	0.80	0.93
81	K081V	0.66	1.03
81	K081W	0.60	0.98
81	K081Y	0.89	1.20
83	Q083A	1.20	0.98
83	Q083C	1.79	0.17
83	Q083D	0.94	0.92
83	Q083E	0.98	0.95
83	Q083F	0.87	0.80
83	Q083G	0.76	1.01
83	Q083H	0.78	0.86
83	Q083I	0.69	0.85
83	Q083L	0.77	0.91
83	Q083M	0.91	0.96
83	Q083P	1.01	0.82
83	Q083R	0.91	0.90
83	Q083S	0.75	0.99
83	Q083T	0.84	0.84
83	Q083V	0.73	0.80
83	Q083W	0.82	0.78
83	Q083Y	0.71	0.93
85	L085A	0.94	1.06
85	L085C	0.90	0.63
85	L085D	0.84	1.04
85	L085E	1.09	1.02
85	L085G	0.85	0.90
85	L085H	0.73	1.02
85	L085I	0.89	0.88
85	L085K	0.96	0.93
85	L085M	1.01	1.04
85	L085N	1.10	0.89
85	L085P	1.01	0.72
85	L085Q	0.91	0.99
85	L085R	0.96	1.01
85	L085S	1.02	1.04
85	L085T	0.83	1.12
85	L085W	0.93	0.95
85	L085Y	0.70	1.08
90	A090C	1.00	0.65
90	A090D	1.12	0.92
90	A090E	1.20	0.92
90	A090F	0.99	0.76
90	A090G	1.04	0.87
90	A090H	1.05	1.03

10

20

30

40

90	A090I	0.90	0.83
90	A090K	0.93	1.04
90	A090L	0.76	0.92
90	A090M	1.02	1.02
90	A090N	1.02	0.98
90	A090P	1.39	0.10
90	A090Q	0.94	0.93
90	A090R	0.90	0.90
90	A090S	1.16	0.99
90	A090T	0.78	0.88
90	A090V	0.79	0.87
90	A090W	0.69	0.84
90	A090Y	0.83	0.96
92	H092C	0.75	0.29
92	H092D	1.06	0.69
92	H092E	0.88	0.76
92	H092F	0.92	0.28
92	H092G	0.86	0.81
92	H092K	0.89	0.98
92	H092N	0.85	0.78
92	H092Q	0.80	0.89
92	H092R	0.75	0.96
92	H092S	0.70	0.87
92	H092T	0.68	0.47
92	H092V	0.70	0.28
92	H092W	0.83	0.44
92	H092Y	0.71	0.63
106	H106D	0.58	0.07
106	H106P	0.59	0.06
107	K107A	0.46	0.81
107	K107C	0.42	0.67
107	K107D	0.32	0.51
107	K107E	0.35	0.70
107	K107F	0.42	0.66
107	K107G	0.23	0.76
107	K107H	0.34	0.94
107	K107I	0.29	0.69
107	K107L	0.53	0.75
107	K107M	0.60	0.79
107	K107N	0.43	0.88
107	K107Q	0.63	0.74
107	K107R	1.05	0.71
107	K107S	0.30	0.78
107	K107T	0.38	0.72
107	K107V	0.41	0.70
107	K107Y	0.40	0.64
111	D111A	0.55	0.95
111	D111C	0.71	0.60
111	D111E	0.87	1.01

10

20

30

40

111	D111F	0.63	0.65
111	D111G	0.74	0.90
111	D111H	0.50	0.85
111	D111I	0.56	0.91
111	D111K	0.45	0.62
111	D111L	0.44	0.86
111	D111M	0.65	1.00
111	D111N	0.97	0.87
111	D111P	0.78	0.71
111	D111Q	0.77	0.95
111	D111R	0.53	0.07
111	D111S	0.67	0.91
111	D111T	0.61	1.02
111	D111V	0.58	1.02
111	D111W	0.42	0.54
111	D111Y	0.49	0.92
113	T113A	0.89	0.97
113	T113C	0.80	0.82
113	T113D	0.94	0.95
113	T113E	0.92	0.91
113	T113F	0.76	0.92
113	T113G	0.88	1.08
113	T113H	0.88	0.96
113	T113I	1.14	0.88
113	T113K	0.93	1.13
113	T113L	1.08	1.08
113	T113M	0.83	0.99
113	T113P	1.05	0.96
113	T113Q	0.88	1.05
113	T113R	0.88	1.03
113	T113V	1.12	0.94
113	T113W	1.06	0.88
114	E114A	0.54	0.97
114	E114C	0.62	0.76
114	E114D	0.71	0.82
114	E114F	0.36	0.92
114	E114G	0.59	1.01
114	E114H	0.49	0.92
114	E114I	0.54	0.86
114	E114L	0.43	0.97
114	E114M	0.77	0.97
114	E114N	0.67	0.88
114	E114R	0.35	0.84
114	E114T	0.54	0.94
114	E114V	0.43	0.85
114	E114W	0.31	0.94
114	E114Y	0.26	0.93
120	E120A	0.29	1.20
120	E120C	0.24	0.89

10

20

30

40

120	E120H	0.09	0.90
120	E120I	0.60	0.87
120	E120L	0.20	0.97
120	E120M	0.39	0.96
120	E120N	0.16	1.02
120	E120Q	0.66	1.10
120	E120R	0.12	1.12
120	E120S	0.08	1.07
120	E120T	0.22	1.06
120	E120V	0.53	0.93
120	E120W	0.15	0.81
120	E120Y	0.07	0.98
121	V121C	0.92	0.55
121	V121T	0.07	0.92
128	Q128C	0.42	0.95
128	Q128D	0.15	1.05
128	Q128E	0.90	1.00
128	Q128H	0.34	1.05
128	Q128I	0.90	0.89
128	Q128K	0.52	1.15
128	Q128L	0.47	0.97
128	Q128N	0.12	1.05
128	Q128R	0.31	1.14
128	Q128S	0.28	1.02
128	Q128V	0.86	0.97
128	Q128W	0.07	0.76
128	Q128Y	0.13	0.86
131	S131D	0.26	1.08
131	S131G	0.24	0.86
131	S131N	0.76	1.02
131	S131T	0.49	0.90
133	T133A	0.95	1.13
133	T133C	0.49	0.97
133	T133D	1.03	0.99
133	T133E	0.82	1.02
133	T133F	0.17	0.97
133	T133G	0.47	0.84
133	T133H	0.41	1.19
133	T133I	0.86	0.96
133	T133K	0.47	0.85
133	T133L	0.41	1.06
133	T133M	0.51	1.05
133	T133N	0.68	1.13
133	T133P	1.41	1.08
133	T133Q	0.63	1.10
133	T133R	0.18	1.13
133	T133S	0.72	1.08
133	T133V	1.25	0.92
133	T133W	0.14	0.98

10

20

30

40

133	T133Y	0.41	1.01
137	Q137A	0.92	0.97
137	Q137C	1.09	0.77
137	Q137D	0.89	0.96
137	Q137E	1.06	0.87
137	Q137F	0.85	0.86
137	Q137G	1.13	0.94
137	Q137H	0.95	1.05
137	Q137I	0.93	0.22
137	Q137L	1.20	0.82
137	Q137M	1.30	0.83
137	Q137P	0.07	1.05
137	Q137R	0.95	1.05
137	Q137S	1.45	0.98
137	Q137T	1.12	0.91
137	Q137V	1.02	0.86
137	Q137W	1.06	0.88
137	Q137Y	0.94	0.89
138	A138G	0.90	1.02
138	A138I	0.23	0.90
138	A138N	0.50	0.94
138	A138P	1.07	1.15
138	A138Q	0.13	0.69
138	A138S	1.12	1.02
138	A138T	1.16	1.05
138	A138V	1.17	0.87
138	A138Y	0.14	0.97
139	W139A	0.82	0.89
139	W139C	0.75	0.39
139	W139D	0.93	1.40
139	W139E	0.81	0.97
139	W139G	0.79	0.74
139	W139H	0.97	1.59
139	W139I	0.74	0.58
139	W139K	0.68	0.42
139	W139L	0.78	0.59
139	W139M	0.87	1.00
139	W139N	1.13	0.85
139	W139Q	0.82	0.79
139	W139R	0.96	1.29
139	W139S	0.93	1.04
139	W139T	0.71	0.87
139	W139V	0.72	0.66
139	W139Y	1.14	1.63
141	K141A	1.09	0.73
141	K141C	1.03	0.85
141	K141D	0.89	0.98
141	K141E	3.48	0.92
141	K141F	0.89	0.80

10

20

30

40

141	K141G	1.18	0.96
141	K141H	1.13	0.99
141	K141I	1.40	0.87
141	K141L	1.22	0.85
141	K141M	1.23	1.01
141	K141N	1.11	1.02
141	K141P	1.07	0.96
141	K141Q	1.28	0.97
141	K141R	1.23	0.99
141	K141S	1.21	0.98
141	K141T	1.17	0.94
141	K141V	1.21	1.00
141	K141W	1.16	0.87
141	K141Y	1.17	0.88
143	D143A	0.95	1.04
143	D143C	1.11	0.84
143	D143E	1.12	0.98
143	D143G	1.13	1.09
143	D143H	0.91	0.98
143	D143I	1.05	0.94
143	D143K	0.86	0.96
143	D143M	0.86	1.05
143	D143N	1.10	0.99
143	D143P	0.98	0.84
143	D143V	1.00	1.01
143	D143W	1.00	0.99
143	D143Y	0.75	0.15
147	R147A	0.73	0.25
147	R147D	0.66	0.07
147	R147G	0.74	0.11
147	R147H	0.81	0.21
147	R147K	1.05	0.48
147	R147M	0.65	0.07
147	R147N	0.91	0.30
147	R147Q	0.88	0.30
147	R147S	0.90	0.39
147	R147T	0.90	0.10
149	N149A	0.94	0.93
149	N149D	0.89	0.95
149	N149E	0.98	0.93
149	N149F	1.09	0.85
149	N149G	0.90	0.93
149	N149H	1.01	0.98
149	N149I	1.15	0.83
149	N149K	0.90	0.88
149	N149L	0.88	0.94
149	N149Q	1.00	0.93
149	N149R	0.80	0.95
149	N149S	0.94	1.03

10

20

30

40

149	N149V	1.06	0.87
149	N149W	1.01	0.87
150	T150A	0.90	0.96
150	T150C	1.03	0.72
150	T150D	0.82	0.87
150	T150E	4.54	0.87
150	T150G	0.99	0.86
150	T150I	0.82	0.93
150	T150K	0.86	0.96
150	T150L	0.83	0.07
150	T150M	1.05	1.00
150	T150N	0.98	1.08
150	T150Q	0.83	0.99
150	T150R	0.99	1.04
150	T150S	0.77	0.96
150	T150V	0.90	0.93
150	T150Y	1.18	1.00
151	Y151A	0.96	0.87
151	Y151C	0.80	0.67
151	Y151D	0.99	0.71
151	Y151E	0.76	0.71
151	Y151F	0.96	0.88
151	Y151G	1.17	0.79
151	Y151H	1.04	0.87
151	Y151I	1.22	0.78
151	Y151L	1.05	0.90
151	Y151M	1.02	0.83
151	Y151N	0.98	0.91
151	Y151P	0.89	0.77
151	Y151Q	1.07	0.75
151	Y151R	1.05	0.76
151	Y151S	0.85	0.80
151	Y151T	1.04	0.80
151	Y151V	1.14	0.80
151	Y151W	1.16	0.79
152	S152A	0.95	0.88
152	S152C	0.83	0.75
152	S152E	1.09	0.71
152	S152F	0.75	0.22
152	S152G	1.25	0.91
152	S152H	0.99	0.71
152	S152I	0.81	0.22
152	S152K	0.74	0.58
152	S152N	1.20	0.43
152	S152Q	0.71	0.21
152	S152R	0.89	0.86
152	S152T	1.16	0.99
152	S152V	0.79	0.42
152	S152W	0.73	0.22

10

20

30

40

152	S152Y	0.91	0.26
155	K155A	1.10	0.85
155	K155C	0.92	0.72
155	K155D	0.94	0.85
155	K155E	0.82	0.79
155	K155G	1.05	0.58
155	K155H	1.04	0.84
155	K155L	1.05	0.89
155	K155M	0.91	0.91
155	K155N	1.18	0.90
155	K155P	0.99	0.94
155	K155Q	0.84	0.90
155	K155R	1.20	0.93
155	K155S	1.22	0.85
155	K155T	1.12	0.76
155	K155V	1.01	0.85
155	K155W	1.09	0.88
155	K155Y	1.21	0.80
160	H160A	0.89	0.89
160	H160C	0.84	0.98
160	H160D	0.89	0.69
160	H160E	0.86	0.52
160	H160F	0.77	0.79
160	H160G	0.82	0.36
160	H160I	0.36	0.58
160	H160L	1.03	0.92
160	H160M	0.56	0.97
160	H160N	1.11	1.02
160	H160Q	0.98	0.47
160	H160R	0.54	0.62
160	H160T	1.01	0.91
160	H160V	0.76	0.74
160	H160W	0.26	0.66
160	H160Y	0.86	0.89
165	D165A	0.53	0.12
165	D165C	1.01	0.07
165	D165E	1.14	0.07
165	D165G	0.63	0.20
165	D165M	0.58	0.10
165	D165N	1.16	1.10
165	D165Q	0.53	0.11
165	D165S	0.83	0.43
168	E168A	0.83	0.92
168	E168C	0.83	0.50
168	E168D	0.82	0.57
168	E168F	0.69	0.59
168	E168G	0.92	0.75
168	E168H	0.84	0.90
168	E168I	1.08	0.71

10

20

30

40

168	E168L	0.80	0.92
168	E168M	1.12	0.80
168	E168N	0.97	0.83
168	E168Q	0.88	0.87
168	E168R	1.18	0.90
168	E168S	0.95	0.83
168	E168T	0.83	0.16
168	E168V	0.89	0.73
168	E168W	1.23	0.66
168	E168Y	0.76	0.82
172	L172A	1.14	1.06
172	L172C	1.07	0.89
172	L172D	0.83	0.91
172	L172E	0.97	1.01
172	L172G	0.50	0.60
172	L172H	0.93	1.06
172	L172I	0.97	0.90
172	L172K	0.98	1.12
172	L172M	0.86	0.91
172	L172N	0.91	0.96
172	L172P	0.17	0.83
172	L172Q	1.00	0.89
172	L172R	1.16	1.06
172	L172S	0.78	1.01
172	L172T	0.82	0.94
172	L172V	1.02	0.88
172	L172W	1.09	0.92
172	L172Y	1.06	0.98
173	S173A	0.92	0.74
173	S173C	0.82	0.57
173	S173D	0.63	0.71
173	S173E	1.07	0.65
173	S173F	0.82	0.25
173	S173G	0.73	0.78
173	S173H	0.85	0.66
173	S173I	1.20	0.59
173	S173K	1.17	1.03
173	S173L	0.75	0.20
173	S173M	1.05	0.48
173	S173N	1.02	0.84
173	S173Q	1.08	0.84
173	S173R	0.88	1.03
173	S173T	1.33	0.86
173	S173V	1.12	0.46
173	S173W	0.86	0.20
173	S173Y	0.90	0.25
177	K177L	0.89	0.91
177	K177M	0.10	0.90
177	K177Q	0.08	1.07

10

20

30

40

177	K177R	0.47	1.09
188	E188P	1.40	1.16
191	T191A	0.49	1.11
191	T191C	0.13	1.07
191	T191D	0.91	1.03
191	T191G	0.19	1.09
191	T191I	0.18	1.06
191	T191M	0.06	1.09
191	T191N	0.76	1.13
191	T191P	0.99	1.07
191	T191Q	0.18	1.17
191	T191S	0.72	1.05
191	T191V	0.16	1.02
192	E192C	0.55	1.12
192	E192D	0.42	1.50
192	E192Q	0.22	1.55
192	E192T	0.10	1.35
193	N193C	0.73	0.62
193	N193F	1.71	0.98
193	N193H	1.10	0.92
193	N193K	1.28	1.17
193	N193L	1.22	0.78
193	N193M	0.81	0.96
193	N193R	0.87	0.97
193	N193W	1.09	0.73
193	N193Y	1.89	1.10
196	Y196A	0.74	1.57
196	Y196D	0.29	1.29
196	Y196F	0.74	1.38
196	Y196N	0.54	0.94
196	Y196S	0.36	1.59
199	L199V	0.61	0.13
200	M200A	1.03	0.68
200	M200C	0.84	0.53
200	M200D	0.71	0.81
200	M200E	0.54	0.55
200	M200I	1.14	0.57
200	M200L	0.68	1.11
200	M200N	0.46	0.72
200	M200Q	0.78	0.77
200	M200S	0.61	1.11
200	M200T	0.80	0.61
200	M200V	0.97	0.56
201	Y201A	0.90	1.41
201	Y201C	1.22	0.14
201	Y201D	0.60	0.73
201	Y201E	0.81	1.36
201	Y201F	0.85	0.81
201	Y201G	0.56	1.63

10

20

30

40

201	Y201H	1.06	1.44
201	Y201I	1.35	0.11
201	Y201K	0.89	0.08
201	Y201L	1.05	0.18
201	Y201M	1.16	1.21
201	Y201N	1.15	0.31
201	Y201Q	1.11	0.79
201	Y201R	0.87	0.06
201	Y201S	0.74	1.11
201	Y201T	0.65	0.39
201	Y201W	0.73	0.08
202	A202C	0.97	0.57
202	A202D	0.83	0.93
202	A202E	0.49	0.85
202	A202G	0.45	0.83
202	A202I	0.50	1.02
202	A202L	0.46	0.95
202	A202M	0.32	0.84
202	A202N	0.53	1.08
202	A202Q	0.47	1.01
202	A202S	0.69	0.79
202	A202T	0.63	1.07
202	A202V	0.82	1.02
213	T213A	1.11	0.98
213	T213C	0.97	0.77
213	T213D	1.12	0.91
213	T213E	1.11	0.88
213	T213F	1.13	0.75
213	T213G	1.11	0.91
213	T213H	0.92	1.00
213	T213K	0.90	1.11
213	T213L	1.26	0.75
213	T213M	1.26	0.78
213	T213N	1.11	0.91
213	T213P	0.94	0.91
213	T213Q	1.12	1.02
213	T213R	1.05	1.05
213	T213S	1.10	1.08
213	T213V	1.35	0.76
213	T213W	1.17	0.68
216	K216A	0.66	0.24
216	K216E	1.03	1.30
216	K216G	0.83	1.20
216	K216H	0.90	1.28
216	K216M	0.97	1.39
216	K216P	0.91	0.97
216	K216Q	1.04	1.34
216	K216R	0.77	1.32
216	K216S	0.97	1.28

10

20

30

40

216	K216T	0.99	1.22
216	K216V	0.95	1.07
216	K216W	1.00	1.13
216	K216Y	0.79	1.31
217	N217A	1.10	0.87
217	N217C	0.81	0.78
217	N217F	0.90	0.88
217	N217G	0.95	0.90
217	N217H	1.09	0.90
217	N217I	1.08	0.76
217	N217L	1.09	0.82
217	N217M	0.97	0.80
217	N217P	0.97	0.73
217	N217Q	1.31	0.74
217	N217R	1.19	0.87
217	N217S	1.05	0.87
217	N217T	1.01	0.87
217	N217V	1.18	0.69
217	N217W	0.99	0.80
220	K220A	1.06	0.79
220	K220C	1.05	0.75
220	K220D	1.02	0.88
220	K220E	1.12	0.88
220	K220F	1.03	0.78
220	K220G	1.10	0.84
220	K220H	1.12	0.81
220	K220I	1.13	0.81
220	K220M	1.05	0.75
220	K220N	1.17	0.80
220	K220P	1.33	0.89
220	K220Q	1.21	0.87
220	K220R	1.26	0.83
220	K220S	1.30	0.81
220	K220V	1.21	0.82
220	K220W	1.01	0.81
220	K220Y	1.08	0.84
221	W221A	0.88	1.54
221	W221C	0.95	1.09
221	W221D	0.84	1.31
221	W221F	1.07	1.28
221	W221I	1.33	1.23
221	W221L	0.88	1.50
221	W221M	1.16	1.35
221	W221N	1.11	1.57
221	W221R	0.93	1.29
221	W221S	1.34	1.40
221	W221V	1.13	1.31
221	W221Y	1.14	1.36
227	N227A	1.01	1.02

10

20

30

40

227	N227C	0.92	0.95
227	N227D	1.01	1.06
227	N227E	1.03	1.06
227	N227F	0.72	0.81
227	N227G	1.05	1.09
227	N227H	0.95	1.13
227	N227I	1.03	0.76
227	N227K	1.00	1.13
227	N227L	0.84	0.75
227	N227M	0.84	0.87
227	N227P	1.08	0.88
227	N227Q	0.94	1.00
227	N227R	0.89	1.03
227	N227S	0.96	0.95
227	N227T	1.06	0.96
227	N227V	1.05	0.84
227	N227W	1.07	0.81
227	N227Y	1.01	0.85
232	R232H	0.66	0.34
232	R232K	0.52	0.47
232	R232M	0.62	0.12
232	R232Q	0.54	0.12
232	R232S	0.59	0.16
232	R232T	0.76	0.17
232	R232V	0.70	0.15
235	A235C	0.86	0.53
235	A235D	0.70	0.98
235	A235E	0.93	0.84
235	A235F	1.01	0.68
235	A235G	1.17	0.78
235	A235H	0.80	1.01
235	A235I	1.07	0.84
235	A235K	0.93	1.14
235	A235L	0.89	0.97
235	A235M	0.99	0.91
235	A235N	0.78	1.03
235	A235P	0.97	0.48
235	A235Q	1.01	0.89
235	A235R	1.03	1.14
235	A235S	0.92	1.00
235	A235V	1.01	0.86
235	A235W	0.98	0.60
235	A235Y	0.91	0.93
237	K237R	0.48	0.88
238	H238N	0.21	0.83
240	K240M	0.31	1.13
240	K240Q	0.12	1.21
240	K240R	0.27	1.41
246	D246A	0.73	1.03

10

20

30

40

246	D246E	1.18	1.03
246	D246F	0.67	1.02
246	D246G	0.61	1.09
246	D246H	0.71	1.05
246	D246I	0.75	0.85
246	D246K	0.36	1.18
246	D246L	0.81	0.91
246	D246M	0.80	0.92
246	D246N	0.68	0.97
246	D246P	0.47	0.81
246	D246Q	0.78	0.98
246	D246R	0.24	1.31
246	D246S	0.97	1.01
246	D246T	0.83	1.14
246	D246Y	0.90	0.96
249	S249A	1.06	0.97
249	S249C	0.93	0.74
249	S249D	0.98	0.94
249	S249E	1.27	0.92
249	S249F	0.91	0.74
249	S249G	0.91	0.94
249	S249H	1.04	0.93
249	S249K	1.15	1.02
249	S249L	1.14	0.82
249	S249M	0.95	0.77
249	S249P	1.09	0.80
249	S249Q	1.20	0.94
249	S249R	1.07	1.03
249	S249T	1.17	0.91
249	S249V	1.01	0.74
249	S249W	1.13	0.77
249	S249Y	1.07	0.87
250	Y250A	0.99	1.21
250	Y250C	1.03	1.12
250	Y250D	0.97	1.29
250	Y250E	1.13	1.33
250	Y250F	1.29	1.28
250	Y250G	1.09	1.33
250	Y250I	1.35	1.27
250	Y250K	1.07	1.48
250	Y250L	1.02	1.32
250	Y250M	1.35	1.39
250	Y250N	1.05	1.40
250	Y250P	0.71	1.05
250	Y250Q	1.01	1.54
250	Y250R	0.99	1.55
250	Y250S	1.02	1.41
250	Y250W	0.99	1.35
252	R252A	1.12	1.08

10

20

30

40

252	R252C	0.97	0.81
252	R252D	0.89	0.86
252	R252E	1.09	1.12
252	R252F	1.01	0.89
252	R252G	0.76	1.00
252	R252I	1.07	0.97
252	R252K	1.19	1.21
252	R252L	1.32	0.96
252	R252M	0.98	0.96
252	R252N	1.15	0.97
252	R252P	0.72	0.83
252	R252Q	1.16	1.04
252	R252S	1.04	1.01
252	R252T	1.09	0.99
252	R252V	1.01	0.94
252	R252Y	1.14	0.86
253	S253A	1.09	0.97
253	S253D	1.07	1.04
253	S253F	1.19	0.82
253	S253G	1.18	0.92
253	S253H	1.13	0.97
253	S253I	1.13	0.84
253	S253K	1.10	1.01
253	S253L	1.09	0.79
253	S253N	1.06	1.03
253	S253P	0.95	0.90
253	S253Q	1.13	0.93
253	S253T	1.14	0.97
253	S253V	1.15	0.90
253	S253W	1.04	0.87
253	S253Y	1.34	0.94
254	Q254A	0.98	0.88
254	Q254C	0.94	0.66
254	Q254D	1.10	0.90
254	Q254E	1.29	0.89
254	Q254F	1.23	0.74
254	Q254G	1.15	0.77
254	Q254H	1.04	0.94
254	Q254I	1.12	0.91
254	Q254K	1.00	0.99
254	Q254L	1.09	0.82
254	Q254M	0.94	0.89
254	Q254N	1.17	0.90
254	Q254R	1.05	0.98
254	Q254S	1.07	0.98
254	Q254T	1.21	0.65
254	Q254V	1.31	0.92
254	Q254W	1.17	0.69
254	Q254Y	1.03	0.87

10

20

30

40

255	T255A	1.09	0.73
255	T255C	0.89	0.78
255	T255E	1.09	0.64
255	T255F	1.30	0.68
255	T255G	1.15	0.73
255	T255H	1.10	0.74
255	T255I	1.18	0.70
255	T255K	1.27	0.83
255	T255L	0.97	0.73
255	T255M	0.98	0.72
255	T255N	0.83	0.76
255	T255P	0.77	0.59
255	T255R	1.12	0.85
255	T255S	1.10	0.84
255	T255V	1.17	0.70
255	T255W	1.27	0.74
255	T255Y	1.02	0.72
257	K257A	1.08	0.67
257	K257C	0.89	0.49
257	K257D	1.16	0.75
257	K257E	1.15	0.76
257	K257F	1.03	0.92
257	K257G	0.97	0.73
257	K257H	1.12	0.69
257	K257I	1.09	0.59
257	K257L	1.26	0.74
257	K257M	1.29	0.79
257	K257N	1.16	0.83
257	K257P	0.62	0.38
257	K257Q	1.18	0.82
257	K257R	1.03	0.89
257	K257S	1.29	0.71
257	K257T	1.04	0.77
257	K257V	1.31	0.78
257	K257W	0.99	0.72
258	P258A	0.97	1.08
258	P258C	1.17	0.85
258	P258D	1.33	1.10
258	P258E	0.95	1.05
258	P258F	0.96	0.75
258	P258G	1.30	1.02
258	P258H	1.38	1.13
258	P258I	1.27	0.25
258	P258K	1.29	1.11
258	P258L	1.08	0.61
258	P258M	1.09	0.91
258	P258N	1.07	1.01
258	P258Q	1.31	1.13
258	P258R	1.02	1.13

10

20

30

40

258	P258S	1.12	1.08
258	P258T	1.27	1.10
258	P258V	1.29	0.80
258	P258W	1.14	0.87
258	P258Y	1.16	1.08
268	Y268A	0.86	1.39
268	Y268C	0.47	1.10
268	Y268D	0.59	1.44
268	Y268E	0.55	1.47
268	Y268F	1.28	1.07
268	Y268G	1.03	1.21
268	Y268H	0.87	1.24
268	Y268K	0.78	1.90
268	Y268L	0.72	1.10
268	Y268M	0.97	1.15
268	Y268N	0.69	1.51
268	Y268P	0.78	1.41
268	Y268Q	0.71	1.30
268	Y268R	0.76	1.49
268	Y268S	1.06	1.22
268	Y268T	0.99	1.12
268	Y268V	0.88	0.99
268	Y268W	0.97	1.07
272	K272R	0.90	0.86
274	H274A	0.66	1.40
274	H274C	0.65	0.68
274	H274D	0.64	1.20
274	H274E	0.86	1.14
274	H274F	0.88	1.00
274	H274G	0.56	1.36
274	H274I	0.76	1.39
274	H274K	0.85	1.60
274	H274L	0.87	1.40
274	H274N	0.67	1.50
274	H274Q	0.84	1.47
274	H274R	0.80	1.50
274	H274S	0.67	1.28
274	H274T	0.69	1.38
274	H274W	1.26	0.79
274	H274Y	1.05	1.07
275	N275A	0.32	1.01
275	N275C	0.22	0.68
275	N275D	0.08	1.03
275	N275G	0.18	1.00
275	N275H	0.60	1.10
275	N275I	0.15	0.87
275	N275K	0.22	1.22
275	N275L	0.20	1.02
275	N275M	0.20	0.96

10

20

30

40

275	N275Q	0.21	0.96
275	N275R	0.28	1.04
275	N275S	0.28	0.92
275	N275T	0.19	0.79
275	N275V	0.19	0.76
275	N275W	0.05	0.76
275	N275Y	0.89	0.93
283	T283A	1.06	0.97
283	T283C	1.16	0.78
283	T283D	0.92	1.03
283	T283E	0.95	1.01
283	T283G	0.97	1.01
283	T283H	1.09	0.84
283	T283I	1.10	0.72
283	T283K	1.14	1.01
283	T283L	1.07	0.76
283	T283M	1.26	0.93
283	T283N	1.29	0.96
283	T283P	0.46	0.56
283	T283R	0.82	1.08
283	T283S	1.02	1.06
283	T283V	1.23	0.81
283	T283W	1.07	0.75
283	T283Y	1.01	1.04
285	S285A	0.93	0.80
285	S285C	0.73	0.61
285	S285D	0.91	1.09
285	S285E	1.33	0.89
285	S285F	1.18	1.02
285	S285H	0.98	1.10
285	S285I	0.84	0.52
285	S285K	1.16	0.84
285	S285L	0.85	0.54
285	S285M	0.98	0.76
285	S285Q	1.38	1.22
285	S285R	0.84	0.96
285	S285T	0.98	0.79
285	S285V	0.70	0.63
285	S285W	1.13	1.08
285	S285Y	0.97	1.49
293	N293A	1.02	0.93
293	N293C	0.78	0.69
293	N293D	1.08	0.89
293	N293E	0.87	0.92
293	N293F	0.89	0.70
293	N293G	1.31	0.92
293	N293H	1.12	1.05
293	N293I	0.94	0.75
293	N293K	1.42	1.41

10

20

30

40

293	N293L	0.87	0.81
293	N293M	0.95	1.07
293	N293P	0.97	0.40
293	N293Q	1.14	1.06
293	N293R	0.86	1.37
293	N293S	0.93	0.95
293	N293T	1.10	1.12
293	N293V	1.04	0.82
293	N293W	1.09	0.78
293	N293Y	1.19	0.74
294	K294A	0.83	0.92
294	K294C	0.83	0.50
294	K294D	0.82	0.57
294	K294E	0.83	0.68
294	K294F	0.69	0.59
294	K294G	0.92	0.75
294	K294H	0.84	0.90
294	K294I	1.08	0.71
294	K294L	0.80	0.92
294	K294M	1.12	0.80
294	K294N	0.97	0.83
294	K294Q	0.88	0.87
294	K294R	1.18	0.90
294	K294S	0.95	0.83
294	K294T	0.83	0.16
294	K294V	0.89	0.73
294	K294W	1.23	0.66
294	K294Y	0.76	0.82
297	T297C	0.86	0.53
297	T297D	0.70	0.98
297	T297E	0.93	0.84
297	T297F	1.01	0.68
297	T297G	1.17	0.78
297	T297H	0.80	1.01
297	T297I	1.07	0.84
297	T297K	0.93	1.14
297	T297L	0.89	0.97
297	T297M	0.99	0.91
297	T297N	0.78	1.03
297	T297P	0.97	0.48
297	T297Q	1.01	0.89
297	T297R	1.03	1.14
297	T297S	0.92	1.00
297	T297V	1.01	0.86
297	T297W	0.98	0.60
297	T297Y	0.91	0.93
300	K300A	0.99	0.79
300	K300C	0.95	0.39
300	K300D	0.91	0.61

10

20

30

40

300	K300E	0.86	0.78
300	K300F	0.74	0.63
300	K300G	0.98	0.62
300	K300H	1.04	0.83
300	K300I	1.02	0.82
300	K300L	0.91	0.73
300	K300M	1.17	0.80
300	K300N	1.02	0.80
300	K300Q	0.90	0.86
300	K300R	1.20	0.92
300	K300S	0.93	0.80
300	K300T	1.16	0.87
300	K300V	1.15	0.84
300	K300W	0.97	0.57
301	S301A	1.10	0.89
301	S301E	1.12	0.94
301	S301F	1.44	0.68
301	S301G	1.02	1.05
301	S301H	1.12	0.87
301	S301I	1.28	0.74
301	S301K	1.08	1.05
301	S301L	1.09	0.97
301	S301M	1.09	0.87
301	S301N	1.16	0.64
301	S301P	1.21	0.61
301	S301Q	1.18	0.95
301	S301R	1.35	0.89
301	S301T	1.23	0.85
301	S301V	1.18	0.81
301	S301W	1.27	0.75
301	S301Y	1.10	0.80
306	D306A	0.82	0.40
306	D306C	0.74	0.30
306	D306E	0.80	0.71
306	D306F	0.71	0.10
306	D306G	0.76	0.26
306	D306H	0.84	0.35
306	D306I	0.80	0.18
306	D306K	0.77	0.41
306	D306L	0.78	0.18
306	D306N	1.15	0.89
306	D306P	0.82	0.39
306	D306Q	1.03	0.43
306	D306R	0.82	0.27
306	D306S	0.81	0.50
306	D306T	0.88	0.29
306	D306V	0.99	0.22
306	D306Y	0.94	0.12
309	T309C	1.15	0.59

10

20

30

40

309	T309D	1.27	0.89
309	T309E	0.95	0.91
309	T309F	1.15	0.80
309	T309G	1.17	1.00
309	T309H	0.94	0.97
309	T309I	1.17	0.82
309	T309K	1.18	1.08
309	T309L	1.15	0.95
309	T309M	1.15	0.97
309	T309N	1.20	0.99
309	T309P	0.93	0.20
309	T309Q	1.19	0.98
309	T309R	1.12	1.08
309	T309S	1.00	1.04
309	T309V	1.38	0.95
309	T309W	1.08	0.77
309	T309Y	1.11	0.94
312	T312A	1.01	1.00
312	T312C	0.99	0.70
312	T312D	1.03	0.96
312	T312E	1.15	0.95
312	T312F	1.05	0.92
312	T312G	1.18	1.07
312	T312H	1.30	0.99
312	T312K	0.83	0.25
312	T312L	1.08	0.95
312	T312M	0.98	0.91
312	T312N	1.04	0.99
312	T312P	0.74	0.85
312	T312Q	1.05	0.94
312	T312R	1.13	1.00
312	T312S	1.29	0.99
312	T312V	1.40	0.87
312	T312W	1.14	0.83
312	T312Y	1.31	0.92
313	N313A	1.01	0.93
313	N313C	0.95	0.63
313	N313D	0.95	0.51
313	N313E	1.05	0.90
313	N313F	1.06	0.64
313	N313G	1.25	0.96
313	N313H	1.25	0.94
313	N313I	1.44	0.55
313	N313K	1.12	0.85
313	N313L	1.21	0.85
313	N313M	1.02	0.89
313	N313P	1.05	0.81
313	N313Q	1.00	1.00
313	N313R	1.19	1.13

10

20

30

40

313	N313S	1.25	1.05
313	N313V	1.28	0.74
313	N313W	1.01	0.67
313	N313Y	1.10	0.90
317	K317A	0.98	0.94
317	K317C	0.83	0.54
317	K317D	0.82	0.86
317	K317E	0.78	0.91
317	K317F	0.92	0.84
317	K317G	0.91	0.88
317	K317L	1.10	0.86
317	K317M	1.02	0.95
317	K317N	1.03	0.92
317	K317P	0.86	0.80
317	K317Q	0.76	0.94
317	K317R	0.78	0.89
317	K317S	1.04	0.93
317	K317T	0.94	0.88
317	K317V	1.00	0.93
317	K317W	1.08	0.83
317	K317Y	1.05	0.93
318	D318A	0.93	1.38
318	D318E	0.90	1.09
318	D318F	0.78	1.22
318	D318G	0.91	1.39
318	D318H	1.12	1.10
318	D318I	0.75	1.40
318	D318K	0.65	1.73
318	D318L	1.00	1.31
318	D318M	0.90	1.26
318	D318N	0.92	1.19
318	D318P	0.61	0.37
318	D318Q	0.93	1.14
318	D318R	0.71	1.54
318	D318S	1.11	1.37
318	D318T	1.40	1.32
318	D318V	0.81	1.34
318	D318W	0.90	1.07
318	D318Y	1.10	1.33
319	Q319A	1.02	1.13
319	Q319C	0.73	1.38
319	Q319D	0.85	1.31
319	Q319E	0.98	1.20
319	Q319F	0.87	1.11
319	Q319G	1.14	1.03
319	Q319H	0.94	1.28
319	Q319I	0.94	1.32
319	Q319K	1.10	1.52
319	Q319L	0.95	1.11

10

20

30

40

319	Q319M	0.90	1.09
319	Q319N	0.91	1.12
319	Q319P	1.13	0.57
319	Q319R	1.18	1.44
319	Q319S	0.91	1.12
319	Q319T	0.98	1.10
319	Q319V	1.07	1.08
319	Q319W	1.05	1.08
319	Q319Y	1.04	1.41
320	P320A	1.02	0.96
320	P320C	1.01	0.75
320	P320D	0.74	0.91
320	P320E	1.04	0.85
320	P320F	0.76	0.77
320	P320G	1.00	1.00
320	P320H	1.00	1.18
320	P320I	0.86	0.80
320	P320K	0.96	1.23
320	P320L	0.87	0.83
320	P320M	1.04	0.60
320	P320Q	0.95	1.08
320	P320R	0.79	1.25
320	P320S	1.16	1.03
320	P320T	1.11	1.28
320	P320V	1.08	0.88
320	P320W	0.90	1.03
320	P320Y	1.05	1.03
338	L338A	1.36	1.29
338	L338C	1.24	0.67
338	L338D	1.00	0.94
338	L338E	0.87	0.65
338	L338F	0.90	0.17
338	L338G	1.38	1.34
338	L338H	0.05	0.05
338	L338I	1.12	1.32
338	L338M	1.20	1.27
338	L338P	1.11	1.23
338	L338Q	0.96	0.61
338	L338S	1.13	1.51
338	L338T	1.42	1.05
338	L338V	1.14	1.55
338	L338W	0.98	0.14
338	L338Y	1.15	0.11
339	Q339A	1.08	1.13
339	Q339C	0.88	0.79
339	Q339D	0.93	0.11
339	Q339E	1.07	0.84
339	Q339F	0.86	0.55
339	Q339G	1.17	1.21

10

20

30

40

339	Q339H	1.03	1.04
339	Q339K	1.26	1.13
339	Q339L	1.12	0.70
339	Q339M	0.93	0.81
339	Q339P	1.02	1.24
339	Q339R	0.81	0.35
339	Q339S	1.02	1.02
339	Q339T	1.35	1.01
339	Q339V	1.23	0.76
339	Q339Y	1.14	0.78
340	S340A	1.23	1.43
340	S340C	0.74	0.75
340	S340D	0.97	1.63
340	S340E	0.92	1.58
340	S340F	0.83	0.82
340	S340H	1.12	1.45
340	S340I	1.07	1.07
340	S340K	0.99	1.76
340	S340M	1.24	1.20
340	S340N	1.10	1.75
340	S340P	0.69	0.81
340	S340Q	1.21	1.76
340	S340T	1.21	1.14
340	S340V	1.00	1.09
340	S340Y	1.02	0.97
343	D343A	0.96	0.35
343	D343C	1.32	0.74
343	D343E	1.00	1.07
343	D343F	0.91	0.79
343	D343H	0.98	1.02
343	D343I	1.27	0.88
343	D343L	0.95	1.08
343	D343M	0.99	1.02
343	D343N	1.05	0.88
343	D343P	1.30	1.03
343	D343Q	1.14	1.01
343	D343R	1.25	1.03
343	D343T	1.08	0.98
343	D343W	1.00	0.64
343	D343Y	1.29	0.82
345	W345A	1.05	0.90
345	W345C	0.97	0.43
345	W345D	1.10	1.15
345	W345E	1.06	1.24
345	W345F	1.07	0.55
345	W345H	1.15	1.10
345	W345I	1.28	0.90
345	W345L	1.07	0.99
345	W345M	1.02	1.01

10

20

30

40

345	W345N	1.07	1.10
345	W345P	1.00	0.94
345	W345Q	1.26	1.10
345	W345S	1.01	1.12
345	W345T	1.15	1.15
345	W345V	1.16	1.02
363	C363A	0.84	1.06
363	C363D	0.87	1.74
363	C363E	0.99	1.34
363	C363F	0.83	1.03
363	C363G	0.61	0.83
363	C363H	0.78	0.76
363	C363I	0.92	0.63
363	C363L	0.73	0.89
363	C363M	0.97	1.36
363	C363N	0.92	1.86
363	C363Q	0.88	1.78
363	C363S	0.88	1.35
363	C363T	1.15	0.18
363	C363V	1.02	0.99
363	C363W	0.35	0.70
363	C363Y	0.92	0.12
366	Y366A	0.96	1.14
366	Y366D	0.52	1.18
366	Y366E	0.91	1.18
366	Y366F	0.91	0.87
366	Y366G	0.94	1.08
366	Y366H	1.07	1.12
366	Y366I	0.85	0.87
366	Y366K	0.72	0.82
366	Y366L	0.77	0.61
366	Y366M	0.92	0.79
366	Y366N	1.03	0.91
366	Y366P	0.54	0.78
366	Y366Q	1.03	1.49
366	Y366R	0.96	0.96
366	Y366S	1.07	1.02
366	Y366T	1.01	0.91
366	Y366V	1.04	0.94
366	Y366W	1.11	0.99
369	Y369E	0.98	0.87
369	Y369F	1.03	0.79
369	Y369G	0.86	0.33
369	Y369H	0.89	0.78
369	Y369I	1.33	0.91
369	Y369K	1.07	0.80
369	Y369M	1.06	1.02
369	Y369P	0.49	0.20
369	Y369Q	1.07	0.79

10

20

30

40

369	Y369R	1.11	0.95
369	Y369S	0.89	0.60
369	Y369T	1.28	0.68
369	Y369V	1.17	0.91
369	Y369W	1.09	0.95
370	Y370A	1.03	1.21
370	Y370D	0.48	1.35
370	Y370E	0.98	1.35
370	Y370F	0.90	0.73
370	Y370G	1.21	1.18
370	Y370H	0.96	1.36
370	Y370I	0.99	1.00
370	Y370K	0.93	1.65
370	Y370L	0.93	0.88
370	Y370M	0.91	1.04
370	Y370N	1.04	1.41
370	Y370P	0.44	0.67
370	Y370Q	0.87	1.51
370	Y370S	1.06	1.50
370	Y370T	1.07	1.10
370	Y370V	1.05	1.13
370	Y370W	0.94	0.91
375	Y375A	1.03	1.39
375	Y375C	0.59	0.48
375	Y375D	0.96	1.52
375	Y375E	0.96	1.48
375	Y375F	0.90	1.00
375	Y375G	0.90	0.98
375	Y375H	0.98	1.16
375	Y375I	0.94	1.06
375	Y375K	0.96	1.43
375	Y375L	1.03	1.07
375	Y375M	0.98	1.05
375	Y375N	0.92	1.48
375	Y375P	0.92	0.89
375	Y375Q	0.92	1.56
375	Y375R	0.77	1.61
375	Y375S	0.92	1.29
375	Y375T	1.25	1.04
375	Y375W	0.98	0.88
379	S379A	1.01	1.02
379	S379C	0.60	0.44
379	S379D	0.92	0.96
379	S379E	0.99	1.01
379	S379G	0.90	0.91
379	S379I	0.80	0.70
379	S379K	1.00	1.12
379	S379L	0.84	0.56
379	S379M	0.87	0.80

10

20

30

40

379	S379N	1.03	0.98
379	S379P	0.61	0.39
379	S379Q	0.94	0.98
379	S379R	0.96	1.01
379	S379T	1.07	0.95
379	S379V	0.90	0.75
379	S379W	0.70	0.35
379	S379Y	0.92	0.59
381	K381A	0.85	0.78
381	K381C	0.86	0.35
381	K381D	0.87	0.65
381	K381E	0.93	0.81
381	K381F	0.96	0.20
381	K381G	0.96	0.82
381	K381H	1.13	0.73
381	K381I	0.98	0.36
381	K381L	0.95	0.38
381	K381M	0.93	0.56
381	K381N	0.87	0.68
381	K381P	1.18	0.39
381	K381Q	1.03	0.90
381	K381R	1.20	0.95
381	K381S	1.18	0.89
381	K381T	1.01	0.60
381	K381V	1.00	0.43
381	K381W	0.90	0.22
381	K381Y	0.87	0.63
385	D385A	1.01	0.88
385	D385E	0.89	1.05
385	D385F	0.73	0.54
385	D385G	1.05	0.88
385	D385H	0.96	0.99
385	D385K	1.00	1.06
385	D385L	0.96	0.47
385	D385N	0.91	0.96
385	D385Q	1.02	1.01
385	D385R	0.86	0.95
385	D385S	1.10	1.00
385	D385T	1.22	0.92
385	D385V	0.85	0.43
385	D385W	0.98	0.53
386	P386A	0.90	0.80
386	P386C	0.72	0.69
386	P386D	0.85	0.94
386	P386E	0.94	0.87
386	P386F	0.72	0.66
386	P386G	1.02	0.77
386	P386H	0.89	0.93
386	P386I	1.12	0.73

10

20

30

40

386	P386K	1.22	0.87
386	P386L	0.96	0.73
386	P386M	0.94	0.70
386	P386N	0.91	0.86
386	P386Q	0.95	0.86
386	P386S	0.83	0.82
386	P386T	1.00	0.54
386	P386V	1.11	0.79
386	P386W	0.90	0.44
386	P386Y	0.91	0.78
391	R391A	0.58	0.22
391	R391H	0.59	0.29
391	R391K	0.88	0.59
391	R391N	0.71	0.38
391	R391Q	0.62	0.28
391	R391T	0.67	0.25
392	R392A	0.89	0.73
392	R392C	0.74	0.66
392	R392E	0.79	0.46
392	R392F	1.03	0.43
392	R392G	0.99	0.65
392	R392H	0.86	0.96
392	R392I	1.08	0.57
392	R392K	1.10	1.09
392	R392L	0.91	0.63
392	R392M	1.07	0.72
392	R392N	0.89	0.90
392	R392P	0.67	0.31
392	R392Q	1.12	0.75
392	R392S	1.00	0.73
392	R392T	1.00	0.91
392	R392V	0.89	0.48
392	R392W	0.68	0.23
392	R392Y	1.00	0.60
393	D393A	0.98	0.77
393	D393C	0.69	0.48
393	D393E	0.92	0.81
393	D393F	0.84	0.61
393	D393G	1.08	0.75
393	D393H	0.88	0.75
393	D393K	1.09	0.80
393	D393L	1.04	0.70
393	D393Q	1.00	0.82
393	D393R	0.88	0.64
393	D393S	0.92	0.91
393	D393T	1.12	0.90
393	D393V	1.04	0.63
393	D393W	0.95	0.66
393	D393Y	1.01	0.66

10

20

30

40

394	Y394A	0.91	0.86
394	Y394D	0.98	0.84
394	Y394E	0.92	1.03
394	Y394F	1.07	0.98
394	Y394G	1.13	0.85
394	Y394H	1.04	0.99
394	Y394I	1.11	0.95
394	Y394K	1.09	1.07
394	Y394L	1.22	1.11
394	Y394M	0.74	0.23
394	Y394N	1.00	1.01
394	Y394Q	1.09	1.13
394	Y394S	1.11	1.15
394	Y394V	3.00	0.75
394	Y394W	1.11	1.16
400	H400A	1.24	0.89
400	H400C	1.16	0.73
400	H400D	1.05	0.82
400	H400E	0.99	0.95
400	H400F	1.01	0.94
400	H400G	0.90	0.83
400	H400I	1.04	0.91
400	H400K	0.92	1.03
400	H400L	0.90	0.88
400	H400M	1.01	0.91
400	H400N	1.26	0.92
400	H400Q	0.96	0.94
400	H400R	1.03	0.87
400	H400S	0.94	0.92
400	H400T	0.95	0.88
400	H400V	1.28	0.91
400	H400W	1.17	0.80
400	H400Y	1.15	0.92
402	Y402A	1.07	0.97
402	Y402C	0.92	0.76
402	Y402D	0.90	0.80
402	Y402E	1.09	0.77
402	Y402F	0.89	0.82
402	Y402G	0.92	0.81
402	Y402H	1.21	0.91
402	Y402I	1.36	0.75
402	Y402K	0.95	0.84
402	Y402L	1.09	0.49
402	Y402M	1.14	0.88
402	Y402N	1.06	0.86
402	Y402P	1.03	0.28
402	Y402Q	0.98	0.83
402	Y402R	1.16	0.75
402	Y402T	1.32	1.02

10

20

30

40

402	Y402V	1.40	0.95
402	Y402W	1.24	0.89
403	L403A	1.20	0.89
403	L403C	1.10	0.98
403	L403D	1.03	0.95
403	L403E	1.26	0.93
403	L403F	1.03	0.74
403	L403G	1.22	0.96
403	L403H	1.10	0.90
403	L403M	1.11	0.99
403	L403N	0.98	0.95
403	L403P	0.78	0.47
403	L403Q	1.24	0.98
403	L403R	1.36	1.01
403	L403S	1.17	1.00
403	L403T	1.53	0.99
403	L403V	1.34	1.00
403	L403W	1.15	0.85
403	L403Y	1.16	0.97
404	D404A	1.12	0.73
404	D404C	1.28	0.61
404	D404E	1.38	0.78
404	D404G	1.25	0.77
404	D404I	1.20	0.84
404	D404K	1.10	0.83
404	D404L	1.09	0.91
404	D404M	1.13	0.76
404	D404N	1.13	0.98
404	D404P	1.05	0.56
404	D404Q	1.17	0.91
404	D404R	1.15	0.77
404	D404S	1.19	0.99
404	D404V	1.28	0.79
404	D404W	1.05	0.76
404	D404Y	1.08	0.81
406	S406A	0.99	0.99
406	S406C	1.11	0.85
406	S406D	0.93	1.02
406	S406E	0.95	0.91
406	S406F	0.86	0.88
406	S406G	0.93	0.86
406	S406H	0.88	0.98
406	S406I	0.92	0.91
406	S406K	0.95	0.82
406	S406L	0.94	0.98
406	S406M	0.89	0.90
406	S406N	1.09	0.94
406	S406P	0.91	0.93
406	S406T	1.18	0.97

10

20

30

40

406	S406V	1.14	0.87
406	S406Y	0.99	0.80
407	D407C	1.14	0.41
407	D407E	0.82	0.59
407	D407F	0.88	0.35
407	D407G	1.10	0.38
407	D407H	0.85	0.63
407	D407I	1.05	0.22
407	D407K	1.00	0.44
407	D407L	0.91	0.18
407	D407M	1.05	0.37
407	D407N	1.11	0.96
407	D407Q	0.94	0.53
407	D407R	0.78	0.36
407	D407S	0.93	0.65
407	D407T	1.06	0.49
407	D407V	0.93	0.29
407	D407W	1.06	0.20
407	D407Y	0.85	0.38
410	G410A	0.90	1.00
410	G410C	1.04	0.81
410	G410F	0.96	0.22
410	G410H	0.93	0.34
410	G410M	1.13	0.35
410	G410N	0.99	0.27
410	G410Q	1.05	0.14
410	G410R	0.98	0.27
410	G410T	1.08	0.70
410	G410V	1.10	0.42
410	G410Y	0.92	0.49
413	R413A	1.02	1.06
413	R413D	0.71	0.40
413	R413E	0.86	0.67
413	R413G	1.19	0.33
413	R413H	1.06	0.95
413	R413I	0.96	0.75
413	R413K	1.08	0.95
413	R413L	1.02	0.96
413	R413M	0.81	0.81
413	R413N	0.93	0.72
413	R413Q	0.81	0.35
413	R413S	0.85	0.87
413	R413V	0.93	0.73
413	R413W	0.92	0.41
413	R413Y	0.73	0.49
414	E414A	1.06	0.70
414	E414C	1.05	0.55
414	E414D	1.13	0.75
414	E414F	0.81	0.59

10

20

30

40

414	E414G	0.82	0.68
414	E414H	0.89	0.65
414	E414I	0.98	0.60
414	E414K	0.96	0.65
414	E414L	1.16	0.71
414	E414M	0.88	0.72
414	E414N	0.99	0.57
414	E414P	0.85	0.60
414	E414Q	0.85	0.70
414	E414R	1.00	0.65
414	E414S	0.91	0.63
414	E414T	0.79	0.67
414	E414W	1.03	0.25
414	E414Y	0.78	0.58
416	V416A	0.93	0.67
416	V416C	0.94	0.61
416	V416D	1.05	0.71
416	V416H	0.92	0.78
416	V416I	0.83	0.74
416	V416K	0.71	0.65
416	V416L	0.96	0.81
416	V416M	1.06	0.78
416	V416N	0.92	0.66
416	V416P	1.18	0.53
416	V416Q	1.02	0.74
416	V416R	1.02	0.29
416	V416S	1.15	0.46
416	V416T	1.01	0.65
416	V416W	0.83	0.55
416	V416Y	0.89	0.69
419	K419A	1.36	1.29
419	K419C	1.24	0.67
419	K419D	1.00	0.94
419	K419E	0.87	0.65
419	K419F	0.90	0.17
419	K419H	0.05	0.05
419	K419I	1.12	1.32
419	K419M	1.20	1.27
419	K419P	1.11	1.23
419	K419Q	0.96	0.61
419	K419S	1.13	1.51
419	K419T	1.42	1.05
419	K419V	1.14	1.55
419	K419W	0.98	0.14
419	K419Y	1.15	0.11
422	S422A	0.64	0.97
422	S422C	0.96	0.71
422	S422D	0.97	0.96
422	S422E	1.31	0.78

10

20

30

40

422	S422F	0.96	0.71
422	S422G	1.20	0.99
422	S422H	1.06	0.66
422	S422I	1.11	0.85
422	S422K	1.16	0.96
422	S422L	0.99	0.74
422	S422M	1.04	0.94
422	S422N	1.12	1.03
422	S422P	0.84	0.70
422	S422Q	0.15	0.82
422	S422R	1.02	0.94
422	S422T	0.97	0.92
422	S422V	1.17	0.88
422	S422W	0.96	0.70
422	S422Y	1.09	0.92
427	L427A	0.93	0.66
427	L427C	1.02	0.68
427	L427E	0.86	0.27
427	L427F	0.89	0.30
427	L427G	0.63	0.26
427	L427I	1.08	0.64
427	L427M	0.86	0.79
427	L427N	0.76	0.31
427	L427P	1.13	0.06
427	L427Q	0.95	0.53
427	L427S	0.78	0.27
427	L427T	0.80	0.70
427	L427V	0.82	0.72
433	G433A	1.27	1.08
433	G433C	1.15	0.69
433	G433D	1.05	0.96
433	G433E	0.92	0.99
433	G433F	1.04	0.92
433	G433H	1.27	0.99
433	G433I	1.37	0.86
433	G433K	1.27	1.05
433	G433L	1.30	0.90
433	G433M	1.23	1.01
433	G433N	1.07	0.75
433	G433P	1.13	0.95
433	G433Q	0.78	0.99
433	G433R	1.00	0.91
433	G433S	1.17	0.96
433	G433T	1.17	0.90
433	G433V	1.27	0.95
433	G433Y	1.26	1.01
436	K436A	0.92	0.94
436	K436C	0.90	0.84
436	K436D	0.86	0.93

10

20

30

40

436	K436E	0.70	0.87
436	K436F	0.81	0.64
436	K436G	0.84	0.77
436	K436H	1.09	0.89
436	K436I	1.08	0.81
436	K436L	1.01	0.78
436	K436M	0.76	0.85
436	K436N	0.98	0.92
436	K436P	0.88	0.71
436	K436Q	1.01	0.96
436	K436R	1.06	0.79
436	K436S	0.75	0.92
436	K436T	0.95	0.90
436	K436V	0.98	0.87
436	K436W	1.07	0.71
436	K436Y	0.99	0.80
439	Y439A	1.02	0.78
439	Y439D	1.01	0.85
439	Y439F	0.77	0.78
439	Y439G	1.01	0.77
439	Y439H	0.96	0.73
439	Y439K	0.96	0.74
439	Y439M	1.04	0.77
439	Y439N	0.96	0.83
439	Y439P	0.87	0.85
439	Y439Q	0.90	0.88
439	Y439R	0.75	0.80
439	Y439S	0.94	0.82
439	Y439T	0.84	0.79
439	Y439V	1.04	0.70
439	Y439W	0.86	0.72
442	K442A	1.38	0.98
442	K442F	1.04	0.97
442	K442G	1.23	1.02
442	K442H	1.07	1.04
442	K442I	1.13	0.93
442	K442N	1.39	1.03
442	K442P	1.11	1.03
442	K442Q	1.11	1.05
442	K442R	1.33	1.01
442	K442S	1.24	1.07
442	K442T	1.34	1.06
442	K442V	1.20	0.99
442	K442W	1.32	0.98
442	K442Y	1.24	1.08
445	A445C	0.98	0.83
445	A445D	1.04	0.87
445	A445G	1.21	1.01
445	A445H	0.90	0.93

10

20

30

40

445	A445I	1.25	0.84
445	A445K	1.20	0.11
445	A445L	1.17	0.92
445	A445N	1.20	0.91
445	A445P	0.91	0.77
445	A445R	0.91	0.89
445	A445S	1.16	0.94
445	A445T	1.29	0.88
445	A445V	1.27	0.93
445	A445W	1.25	0.80
447	K447A	1.09	1.06
447	K447C	1.11	0.87
447	K447D	1.00	0.99
447	K447F	1.09	0.84
447	K447G	1.06	0.94
447	K447H	1.13	0.92
447	K447I	1.22	0.91
447	K447L	1.06	1.01
447	K447M	1.07	0.96
447	K447N	1.43	0.97
447	K447Q	1.34	1.00
447	K447R	1.10	0.96
447	K447S	0.90	0.92
447	K447T	1.21	0.37
447	K447V	0.69	0.86
447	K447W	1.31	0.89
447	K447Y	1.21	0.96
448	V448A	0.98	0.96
448	V448C	1.36	0.98
448	V448D	1.15	1.02
448	V448F	1.48	1.01
448	V448G	1.26	1.05
448	V448H	1.37	1.03
448	V448I	1.44	0.97
448	V448K	1.20	1.07
448	V448L	1.04	1.08
448	V448M	1.13	0.97
448	V448N	1.24	0.70
448	V448P	0.84	1.19
448	V448Q	1.18	1.16
448	V448S	1.20	1.10
448	V448W	1.08	0.89
448	V448Y	1.33	1.27
450	Y450A	0.95	0.94
450	Y450C	1.22	0.84
450	Y450D	1.19	0.95
450	Y450E	1.01	0.92
450	Y450G	1.02	0.93
450	Y450H	1.23	0.90

10

20

30

40

450	Y450K	1.18	0.94
450	Y450L	0.93	0.69
450	Y450M	1.29	0.89
450	Y450N	1.23	0.96
450	Y450P	0.75	0.30
450	Y450Q	1.00	0.95
450	Y450R	1.22	1.02
450	Y450S	1.22	1.01
450	Y450T	1.32	0.96
450	Y450W	1.21	0.95
452	L452A	1.08	1.06
452	L452C	1.00	1.01
452	L452D	0.98	1.08
452	L452E	0.75	0.55
452	L452F	0.79	0.93
452	L452G	1.07	1.00
452	L452H	1.05	0.99
452	L452K	1.11	1.08
452	L452M	1.13	1.09
452	L452N	1.06	1.28
452	L452P	1.02	0.78
452	L452Q	0.92	1.22
452	L452R	0.93	1.26
452	L452S	0.86	1.21
452	L452T	1.02	1.18
452	L452V	1.14	1.14
452	L452Y	1.17	1.07
455	N455A	1.07	1.04
455	N455C	0.85	0.89
455	N455D	1.07	0.97
455	N455E	1.14	0.94
455	N455G	1.23	1.00
455	N455H	1.05	1.01
455	N455I	1.23	0.95
455	N455K	1.10	1.08
455	N455L	1.06	0.97
455	N455M	0.95	0.96
455	N455P	1.36	0.93
455	N455Q	0.96	0.91
455	N455R	1.13	1.02
455	N455S	1.04	0.91
455	N455T	1.16	0.90
455	N455V	1.26	0.89
455	N455W	1.12	0.76
455	N455Y	1.08	0.15
463	N463A	1.25	1.06
463	N463D	0.97	1.02
463	N463F	1.04	0.87
463	N463G	1.04	1.00

10

20

30

40

463	N463H	1.12	0.99
463	N463K	1.07	1.00
463	N463L	1.16	1.01
463	N463M	1.24	1.08
463	N463P	0.93	1.05
463	N463Q	0.98	1.04
463	N463R	0.95	0.93
463	N463S	1.27	0.96
463	N463T	1.38	0.91
463	N463V	1.32	0.86
463	N463W	1.45	0.74
463	N463Y	1.20	0.90
465	D465A	0.76	1.06
465	D465C	0.84	0.74
465	D465E	0.95	0.93
465	D465F	0.78	0.89
465	D465G	1.35	0.92
465	D465H	1.06	0.92
465	D465I	1.37	0.85
465	D465K	1.53	0.88
465	D465L	1.14	0.95
465	D465M	1.06	0.98
465	D465N	1.32	0.93
465	D465P	1.13	0.71
465	D465Q	0.86	0.94
465	D465R	1.18	0.90
465	D465S	0.87	0.98
465	D465T	1.42	0.92
465	D465V	1.24	0.93
465	D465W	1.00	0.83
465	D465Y	1.06	0.93
469	E469A	1.16	1.01
469	E469C	1.03	0.86
469	E469D	1.22	1.02
469	E469F	1.11	1.00
469	E469G	1.19	1.00
469	E469H	1.04	0.96
469	E469K	1.16	0.96
469	E469L	1.10	0.98
469	E469N	1.19	0.47
469	E469P	0.85	1.05
469	E469Q	1.03	1.04
469	E469R	1.01	0.75
469	E469S	0.91	1.08
469	E469T	1.15	1.06
469	E469V	1.15	1.08
469	E469W	1.24	0.97
469	E469Y	1.35	1.09
471	K471A	1.09	1.09

10

20

30

40

471	K471C	1.04	0.91
471	K471D	1.01	1.06
471	K471F	1.10	1.05
471	K471G	1.13	1.12
471	K471H	1.00	1.10
471	K471I	1.22	1.02
471	K471L	0.99	1.07
471	K471M	0.95	1.14
471	K471N	1.04	1.12
471	K471P	0.84	0.98
471	K471Q	0.90	1.08
471	K471R	0.77	1.33
471	K471S	0.97	1.01
471	K471T	1.11	1.09
471	K471V	1.28	1.11
471	K471Y	1.15	1.36
473	N473A	1.03	0.99
473	N473C	1.15	0.74
473	N473D	1.14	0.98
473	N473E	1.20	0.99
473	N473F	1.10	0.83
473	N473G	1.35	0.99
473	N473H	1.02	0.91
473	N473I	0.66	0.45
473	N473K	1.02	1.02
473	N473M	1.11	1.00
473	N473P	1.01	0.95
473	N473Q	1.13	0.99
473	N473R	1.08	1.05
473	N473S	1.15	0.98
473	N473T	1.04	1.04
473	N473W	0.85	0.64
473	N473Y	1.23	0.86
476	S476A	1.51	1.02
476	S476C	0.91	0.89
476	S476D	0.98	0.91
476	S476E	1.08	0.91
476	S476F	1.09	0.87
476	S476G	1.22	0.97
476	S476H	1.07	0.96
476	S476I	1.03	0.78
476	S476K	1.01	0.97
476	S476L	1.46	0.93
476	S476M	1.58	1.08
476	S476N	1.61	0.98
476	S476P	1.02	0.62
476	S476Q	1.13	1.03
476	S476R	1.01	1.08
476	S476T	1.78	1.01

10

20

30

40

476	S476V	1.21	0.89
476	S476W	1.43	0.78
476	S476Y	1.79	0.94

実施例 2 7

有用な置換部位と有用ではない置換部位

実施例 2 6 に記載の Amy S 置換位置についての相対的な性能及び安定性のデータに基づいて、Amy S 置換位置を「限定的置換位置」及び「非限定的置換位置」に以下のように分類した。非限定的置換位置は少なくとも 1 つの性質について 20 % 以上の中立突然変異を有する。限定的置換位置は活性及び安定性について 20 % 未満の中立突然変異を有する。非限定的置換位置は、数多くの変異体が現状維持（野生型の性能に近い性能を維持している）又は改善された性能のいずれかであるから、改善された機能を有する α アミラーゼを設計するための変異の好適な候補である。限定的置換位置は変異体が許容できないものであるため、変異のための候補としては好ましくない。任意のアミラーゼの性質は非限定的位置における変異の組み合わせにより改善される。表 2 7-1 は Amy S において同定された 2 つの限定的位置を示す（% は中立突然変異の定義に一致する評価された変異体のパーセンテージである）。表 2 7-2 は Amy S において同定された 150 の有用な置換位置を示す（% は中立突然変異の定義に一致する評価された変異体のパーセンテージ；少なくとも 1 つの性質についての中立突然変異体が ≥ 20 %）。限定的及び非限定的位置は異なる α アミラーゼの間で保存されていると考えられている。

表 27-1. AmyS における変異させない位置			
位置	野生型アミノ酸	安定性 PI % > 0.5	活性 PI % > 0.5
106	H	18%	0%
199	L	13%	0%

（表 2 7-1）

表 27-2. AmyS における変異させるべき位置			
位置	野生型アミノ酸	安定性 PI % >0.5	活性 PI % >0.5
5	N	100%	6%
6	G	100%	100%
13	E	11%	89%
14	W	100%	84%
15	Y	100%	100%
16	L	94%	100%
18	D	100%	100%
20	G	95%	16%
25	K	100%	100%
27	A	100%	89%
29	E	100%	53%
36	L	100%	74%
39	T	100%	80%
50	T	95%	74%
52	R	94%	94%
53	S	100%	100%
54	D	11%	79%
67	E	94%	81%
71	K	95%	100%
73	T	83%	100%
75	R	100%	100%
77	K	24%	94%
80	T	100%	100%
81	K	100%	94%
83	Q	100%	94%
85	L	100%	100%
90	A	100%	95%
92	H	94%	56%
107	K	21%	95%
111	D	74%	95%
113	T	100%	100%
114	E	50%	94%
120	E	17%	100%
121	V	6%	94%
126	R	6%	88%
128	Q	29%	88%
131	S	13%	94%
133	T	53%	100%
137	Q	94%	94%
138	A	39%	72%
139	W	100%	88%
141	K	100%	100%

143	D	93%	80%
147	R	95%	0%
149	N	100%	93%
150	T	100%	88%
151	Y	100%	100%
152	S	94%	47%
155	K	100%	100%
160	H	89%	78%
165	D	47%	11%
168	E	89%	84%
172	L	94%	100%
173	S	100%	67%
177	K	6%	100%
188	E	6%	100%
191	T	24%	100%
192	E	6%	88%
193	N	53%	100%
196	Y	18%	100%

10

20

実施例 28Amy S 変異体による粘度低下

30

【0412】

Amy S 変異体による異なるバッチのコーン粉（バッグ A、C、E、G）の粘度低下を実施例 6 に記載のようにモニターし、SPEZYME（商標）Xtra（ジェネンコア）による粘度低下と比較した。結果を図 32A 及び表 28-1 に示す。粘度計アッセイにおいて改善された Amy S 変異体はいくつかの基準により確認された。これらはピーク粘度の減少、最終粘度の減少、又は野生型酵素について所定のピーク又は最終粘度に必要とされる酵素投与量と同じ効果を得るために必要とされる酵素の投与量の減少等である。表 28-1 において、Amy S 変異体の改善された性質は太字部分で示す。

表 28-1: Xtra と比較した AmyS 変異体のコーン粉の粘度低下				
		投与量 (ug)	ピーク粘度	最終粘度
コーン粉バッグ A	Xtra (UFC)	30.0	20610	4850
	I181A	27.5	16930	13140
	I181P	27.5	17320	13910
		投与量 (ug)	ピーク粘度	最終粘度
コーン粉バッグ C	Xtra	30.0	10870	3033
	I181C	30.0	11810	1280
	I181E	30.0	10800	1200
	I181Y	30.0	8990	2495
	S242A	30.0	10770	740
	S242Q	30.0	8220	440
		投与量 (ug)	ピーク粘度	最終粘度
コーン粉バッグ E	Xtra	15.0	18890	2830
	S242A	15.0	17300	1165
	S242E	15.0	18640	1345
	S242Q	15.0	20490	1800
		投与量 (ug)	ピーク粘度	最終粘度
コーン粉バッグ G	Xtra	20.0	26300	13100
	S242Q	20.0	20433	3660
	G132A	20.0	18400	10800
	N193Y	20.0	28900	11500
	E188P	20.0	24000	6950

(表 28-1)

実施例 29

フィターゼの存在下における Amy S 変異体による粘度低下

10

20

30

40

50

【0413】

コーン粉の粘度低下は実施例6に以下の変更を加えて、フィターゼB P 1 1 1を添加し、又は添加せずに、モニターした。粘度低下の効果はpH 5. 2、pH 5. 5、及びpH 5. 8で測定した。結果を図3 2 B及びCに示す。Amy SN 1 3 9 Yにフィターゼ(B P 1 1 1)を添加すると、粘度計における粘度低下能力が有意に改善された。

【0414】

これまでに言及してきた全ての刊行物及び特許は参照により本明細書に援用される。本発明の範囲及び精神を逸脱せずに、当業者は本発明で説明した方法及びシステムの各種変更及びバリエーションを理解することができる。本発明は特定の好適な態様に基づいて説明してきたけれども、特許請求の範囲に記載の発明はこれらの特定の態様に限定することを意図するものではない。即ち、本発明を実施するために説明された態様の各種変更を当業者は行うことができ、このような態様も添付の特許請求の範囲に属す。

10

【図1A】

SEQID No 1	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	50
SEQID No 2	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	
SEQID No 3	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	
SEQID No 4	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	
SEQID No 5	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	
SEQID No 6	(1)	HHNGTNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 7	(1)	--ANLNGTLMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 8	(1)	--ANLNGTLMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 9	(1)	---VNGTLMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 10	(1)	HHNGTNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 11	(1)	HHNGTNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 12	(1)	HHNGTNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 13	(1)	--DGLNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 14	(1)	--DGLNGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 15	(1)	-AAPNGTMMQYFENYLFDDGTLWTKVANEANNLSSLGITLWLP	
Consensus	(1)	A NGTMMQYFENYLFENDGNHWNRLRSDASNLKSGITAVNIPP	
SEQID No 1	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	100
SEQID No 2	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 3	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 4	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 5	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 6	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 7	(49)	TSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 8	(47)	TSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 9	(47)	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 10	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 11	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 12	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 13	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 14	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
SEQID No 15	(50)	TSRSQVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYLQAIQAHAAGM	
Consensus	(51)	TSQSDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKYL AI ALHA GIQVY	
SEQID No 1	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	150
SEQID No 2	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 3	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 4	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 5	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 6	(101)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 7	(99)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 8	(97)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 9	(97)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 10	(101)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 11	(101)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 12	(101)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 13	(99)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 14	(99)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
SEQID No 15	(100)	ADVVPDHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	
Consensus	(101)	GDVVMNHKGAGDGTSEWDAVEVNFSDRNQISGTYQIQAWTKFDFP	

図1A

【図1B】

SEQID No 1	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	200
SEQID No 2	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 3	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 4	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 5	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 6	(151)	THSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 7	(149)	TYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 8	(149)	TYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 9	(147)	TYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 10	(151)	THSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 11	(151)	TYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 12	(151)	THSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 13	(149)	AYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 14	(149)	AYSDFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 15	(150)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
Consensus	(151)	TYSSFKRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTE	
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	250
SEQID No 2	(199)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 3	(199)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 4	(199)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 5	(199)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 6	(201)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 7	(196)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 8	(196)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 9	(196)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 10	(201)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 11	(201)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 12	(201)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 13	(196)	LLGSNIDFHSFVQDELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 14	(196)	LLGSNIDFHSFVQDELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 15	(197)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
Consensus	(201)	LMYADLMDHFEVVTTELKNGWKYVNTNIDGFRDLDAVHKIKFS	
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	300
SEQID No 2	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 3	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 4	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 5	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 6	(251)	NHVRATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 7	(246)	NHVRATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 8	(246)	NHVRATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 9	(246)	NHVRATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 10	(251)	NHVRATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 11	(251)	THVRNATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 12	(251)	THVRNATGKMPFVAEYVQNDLGALENYLNKTNPNSHVSFVPLH	
SEQID No 13	(246)	RHQRNADQDLFVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 14	(246)	RHQRNADQDLFVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
SEQID No 15	(247)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	
Consensus	(251)	SHVRS TKG LFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPL	

図1B

【図 1 C】

301 350

SEQID No 1 (299) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 2 (299) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 3 (299) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 4 (299) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 5 (299) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 6 (301) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 7 (296) STQGGSDYMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 8 (296) STQGGSDYMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 9 (296) STQGGSDYMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 10 (301) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 11 (301) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 12 (301) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 13 (296) STQGGSDYMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 14 (296) STQGGSDYMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 SEQID No 15 (297) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF
 Consensus (301) SKSGGAFDMRTMTMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDWFKF

351 400

SEQID No 1 (349) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 2 (349) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 3 (349) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 4 (349) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 5 (349) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 6 (351) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 7 (346) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 8 (346) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 9 (346) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 10 (351) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 11 (351) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 12 (351) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 13 (346) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 14 (346) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 SEQID No 15 (347) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA
 Consensus (351) LAYAFILTRQBGYPVCFYGDYGIPOYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA

401 450

SEQID No 1 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 2 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 3 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 4 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 5 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 6 (398) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 7 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 8 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 9 (396) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 10 (398) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 11 (398) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 12 (398) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 13 (393) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 14 (393) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 SEQID No 15 (394) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA
 Consensus (401) YGTQHDYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGGGSKMNVGQKHA

図 1C

【図 1 D】

451 500

SEQID No 1 (446) GKVFYDLTGNRSDTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 2 (446) GKVFYDLTGNRSDTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 3 (446) GKVFYDLTGNRSDTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 4 (446) GKVFYDLTGNRSDTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 5 (446) GKVFYDLTGNRSDTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 6 (448) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 7 (446) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 8 (446) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 9 (446) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 10 (448) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 11 (448) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 12 (448) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 13 (443) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 14 (443) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 SEQID No 15 (444) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI
 Consensus (451) GQVNSDITGNRTGTFTVINSDDGWGEFKVNGGSSVWVPRKTTVSTIARPI

501 520

SEQID No 1 (496) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 2 (487) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 3 (496) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 4 (496) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 5 (496) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 6 (486) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 7 (484) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 8 (484) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 9 (484) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 10 (485) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 11 (486) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 12 (486) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 13 (481) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 14 (481) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 SEQID No 15 (487) TRPWTGEPVWTEPRIVANP
 Consensus (501) TRPWTGEPVWTEPRIVANP

図 1D

【図 2】

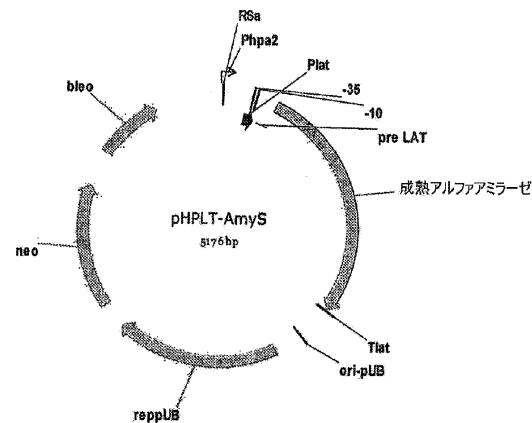


図 2

【図 3】

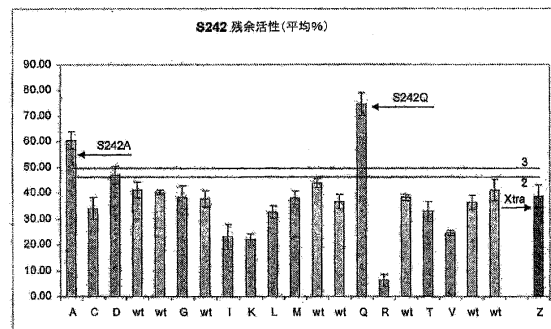


図 3

【図 4 A】

```

SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANRANLSSLGITALLWLPAYKGT
SEQID No 6 (1) HHNGTGTMMQYFEWYLPNDGNHNRNLSNDSANLKSIGITAVWIPPAWK
Consensus (1) NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL S GITALWIPPAWK
51 100
SEQID No 1 (50) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
SEQID No 6 (51) ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTASQLAAVTSKNNGIQVY
Consensus (51) S DVGYG YDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTAKA AI A GIQVY
101 150
SEQID No 1 (100) ADVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
SEQID No 6 (101) GDVVMNHKGAGADATEMVRAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
Consensus (101) ADVV HKGAGADATE V AVEVNP RNQESIG Y I AWTKFDFPPGRGN
151 200
SEQID No 1 (150) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
SEQID No 6 (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
Consensus (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
SEQID No 6 (201) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
Consensus (201) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
SEQID No 6 (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
Consensus (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
SEQID No 6 (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
Consensus (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 6 (351) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
Consensus (351) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
401 450
SEQID No 1 (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
SEQID No 6 (401) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
Consensus (401) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
SEQID No 6 (451) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
Consensus (451) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
501 517
SEQID No 1 (499) WTGGEFVRWTEPRVLVAMP
SEQID No 6 (486) -----
Consensus (501) -----

```

図 4 A

【図 4 B】

```

SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANRANLSSLGITALLWLPAYKGT
SEQID No 8 (1) -ANLNGTMMQYFEWYLPNDGNHNRNLSNDSANLKSIGITAVWIPPAWK
Consensus (1) A NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA LA GITALWIPPAWK
51 100
SEQID No 1 (51) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
SEQID No 8 (50) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
Consensus (51) S DVGYG YDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTAKA AI A HA INUYA
101 150
SEQID No 1 (101) DVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
SEQID No 8 (100) DVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
Consensus (101) DVV HKGAGADATE V AVEVNPDRN ISG H I AWT F PPGRG T
151 200
SEQID No 1 (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
SEQID No 8 (150) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
Consensus (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
SEQID No 8 (198) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
Consensus (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
251 300
SEQID No 1 (251) VRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
SEQID No 8 (248) VRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
Consensus (251) VRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
301 350
SEQID No 1 (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
SEQID No 8 (298) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
Consensus (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
351 400
SEQID No 1 (351) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 8 (348) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
Consensus (351) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
401 450
SEQID No 1 (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
SEQID No 8 (398) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
Consensus (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
SEQID No 8 (448) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
Consensus (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
501 518
SEQID No 1 (499) WTGGEFVRWTEPRVLVAMP
SEQID No 8 (484) -----
Consensus (501) -----

```

図 4 B

【図 4 C】

```

SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANRANLSSLGITALLWLPAYKGT
SEQID No 9 (1) ---VNGTMMQYFEWYLPNDGNHNRNLSNDSANLKSIGITAVWIPPAWK
Consensus (1) NGTMMQYFEWYLP DG W KL NDA LS GITALWIPPAWK
51 100
SEQID No 1 (51) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
SEQID No 9 (48) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
Consensus (51) S SD VGY YDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTAKA AI A HA MQVYA
101 150
SEQID No 1 (101) DVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
SEQID No 9 (98) DVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
Consensus (101) DVV HKAGADATE V AVEVNPDRN QS S YQI AWT F PPGRG T
151 200
SEQID No 1 (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
SEQID No 9 (148) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
Consensus (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
SEQID No 9 (198) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
Consensus (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
SEQID No 9 (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
Consensus (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
SEQID No 9 (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
Consensus (299) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 9 (348) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
Consensus (349) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
401 450
SEQID No 1 (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
SEQID No 9 (398) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
Consensus (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
SEQID No 9 (451) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
Consensus (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
501 518
SEQID No 1 (499) WTGGEFVRWTEPRVLVAMP
SEQID No 9 (484) -----
Consensus (501) -----

```

図 4 C

【図 4 D】

```

SEQID No 1 (1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANRANLSSLGITALLWLPAYKGT
SEQID No 10 (1) HHNGTGTMMQYFEWYLPNDGNHNRNLSNDSANLKSIGITAVWIPPAWK
Consensus (1) NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL GITALWIPPAWK
51 100
SEQID No 1 (50) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
SEQID No 10 (51) TSRSVDVGYVDYLDLGEFNGKGTVRTKYGTAKYQLAQIAAHAAGMQUY
Consensus (51) S DVGYG YDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTAKA AI A GIQVY
101 150
SEQID No 1 (100) ADVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
SEQID No 10 (101) ADVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPPGRGN
Consensus (101) ADVV HKGAGADATE V AVEVNPDRN QS S YQI AWT F PPGRG T
151 200
SEQID No 1 (150) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
SEQID No 10 (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
Consensus (151) TYSSEFKRWYHFDGVWDWDSRKLRS-RIYKFRGIGKAWDEVDTEGNNDY
201 250
SEQID No 1 (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
SEQID No 10 (201) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
Consensus (199) LMYADLMDHPEVVTELNKMGKMYVNTNIDGFRIDAVKHIFKSFPPDWL
251 300
SEQID No 1 (249) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
SEQID No 10 (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
Consensus (251) SYVRSQTKPLTFVGEYSYDINKLHNYITKNGTMSLFDAPLHNFYTA
301 350
SEQID No 1 (299) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
SEQID No 10 (301) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
Consensus (299) SKSGAFDMRTMTNTLMKDQPTLAVTFVNDHDTSPQALQSWDVPWKPLA
351 400
SEQID No 1 (349) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
SEQID No 10 (351) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
Consensus (349) LAYAPILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKIDPLLIARRDYAYGT
401 450
SEQID No 1 (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
SEQID No 10 (401) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
Consensus (399) QHDIYLDHSDIIGWTRREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKMYVKGKQAGK
451 500
SEQID No 1 (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
SEQID No 10 (451) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
Consensus (449) FYDLTGNRSDVTVTNSDGGWGEFKNVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITTR
501 517
SEQID No 1 (499) WTGGEFVRWTEPRVLVAMP
SEQID No 10 (486) -----
Consensus (501) -----

```

図 4 D

【図 4 E】

	1	50
SEQID No 1	(1) -AAPFNGTMMQYFHWLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPAYKG	
SEQID No 11	(1) HHNGTNGTMMQYFHWLPRDGNHNRRLDDASNRNRGITALWIPPAKMG	
Consensus	(1) NQTMQYFHWLPR DG W KL DA NL GITAIWIPPAKMG	
	51 100	
SEQID No 1	(50) TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
SEQID No 11	(51) TSQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
Consensus	(51) TS DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKA AI A GMQVY	
	101 150	
SEQID No 1	(100) ADVVFDHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 11	(101) GDVVMNHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
Consensus	(101) ADVV HKGAGDATE V AVEVNP RNQISG Y I AWTKDFDFPGRGN	
	151 200	
SEQID No 1	(150) TYSSEFKWRWYHFDGVDWDESR -KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDY	
SEQID No 11	(151) TYSDFKWRWYHFDGVDWDESRQPNRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDY	
Consensus	(151) TYS FKWRWYHFDGVDWDE SR RIYKFRG GKAWDWEVDSENGNYDY	
	201 250	
SEQID No 1	(199) IMYADLMDHPEVVTLEKNMGKMYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
SEQID No 11	(201) IMYADVMDHPEVVTLEKNMGKMYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
Consensus	(201) IMYADLMDHPEV ELK WG WY NT NIDGFRDLDAVKHIKFSF DWL	
	251 300	
SEQID No 1	(249) SYVRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTA	
SEQID No 11	(251) SHVR TGK LF VAEFW DI L NYI KTN SLFD PLH Y A	
Consensus	(251) SHVR TGK LF VAEFW DI L NYI KTN SLFD PLH Y A	
	301 350	
SEQID No 1	(299) SKSGGAFDMRTIMNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKP	
SEQID No 11	(301) SNSSGDFDMRNLGRSLVRAHPHIAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKP	
Consensus	(301) S SGG FDM LL TLM P AVTFVDNHDTE PG AL SFV WFKP	
	351 400	
SEQID No 1	(349) LAYAFILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 11	(351) LAYALILTRQEGYPCVFGYDYGIPHPSVPAMKAKIDPILARQNFAYGT	
Consensus	(351) LAYA ILTR GYP VFYGDYGIPI H IPALKAKIDPIL AR PAYGT	
	401 450	
SEQID No 1	(399) QHXYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPQSGKMYVQKHAGKV	
SEQID No 11	(401) QHXYDPHSDIIGWTREGTTHPNSGLATISNGPQSGKMYVQKHAGKV	
Consensus	(401) QHXY DH IIGWTREG T P SGLA IISDGPQSG KMYVQK AG V	
	451 500	
SEQID No 1	(449) FYDLTGNRSDTVITNSDQGEFKVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 11	(451) WHDITGNRSDTVITINADGNGFNTVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
Consensus	(451) FHDITGNK TVTINADGWA F VNGGVSVMV R	
	501 517	
SEQID No 1	(499) WTGEFVRWTEPRLVAMP	
SEQID No 11	(486) -----	
Consensus	(501) -----	

図 4E

【図 4 F】

	1	50
SEQID No 1	(1) -AAPFNGTMMQYFHWLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPAYKG	
SEQID No 12	(1) HHNGTNGTMMQYFHWLPRDGNHNRRLDDAANLKSIGITALWIPPAKMG	
Consensus	(1) NQTMQYFHWLPR DG W KL DA NL S GITAIWIPPAKMG	
	51 100	
SEQID No 1	(50) TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
SEQID No 12	(51) TSQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
Consensus	(51) TS DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKA AI A GIQVY	
	101 150	
SEQID No 1	(100) ADVVFDHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 12	(101) GDVVMNHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
Consensus	(101) ADVV HKGAGDTE V AVEVNP RNQISG Y I AWTKDFDFPGRGN	
	151 200	
SEQID No 1	(150) TYSSEFKWRWYHFDGVDWDESR -KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDY	
SEQID No 12	(151) THSNFKWRWYHFDGVDWDESRQPNRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDY	
Consensus	(151) THS FKWRWYHFDG DWD SR KIYKFRG GKAWDWEVD ENGNIDY	
	201 250	
SEQID No 1	(199) IMYADLMDHPEVVTLEKNMGKMYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
SEQID No 12	(201) IMYADIDMDHPEVINELRNMGVWYNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
Consensus	(201) IMYADIDMDHPEVI ELKNMG WY NT NIDGFRDLDAVKHIKFSF DWL	
	251 300	
SEQID No 1	(249) SYVRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTA	
SEQID No 12	(251) THVRNTTGKPMFAVAFKMDLAALINLNTKSNHNSVDFVPLHNLNA	
Consensus	(251) SHVR TGKPLF VAEFW DI I NYI KT SLFD PLH Y A	
	301 350	
SEQID No 1	(299) SKSGGAFDMRTIMNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKP	
SEQID No 12	(301) SNSSGDFDMRNLGRSLVRAHPHIAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKP	
Consensus	(301) S SGG FDMR IL SLM P AVTFVDNHDTE PG AL SFV WFKP	
	351 400	
SEQID No 1	(349) LAYAFILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 12	(351) LAYALILTRQEGYPCVFGYDYGIPHPSVPAMKAKIDPILARQNFAYGT	
Consensus	(351) LAYA ILTR GYP VFYGDYGIPI H IPSLAKSIDPLL AR YAYGT	
	401 450	
SEQID No 1	(399) QHXYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPQSGKMYVQKHAGKV	
SEQID No 12	(401) QHXYDPHSDIIGWTREGSDHPNSGLATISNGPQSGKMYVQKHAGKV	
Consensus	(401) QHXY DH DIIGWTREG S P SGLA IISDGPQSG KMYVQK AG V	
	451 500	
SEQID No 1	(449) FYDLTGNRSDTVITNSDQGEFKVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 12	(451) WRDITGNRSDTVITINADGNGFNTVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
Consensus	(451) F DITGNRS TVTINADGWF F VNGGVSVMV	
	501 517	
SEQID No 1	(499) WTGEFVRWTEPRLVAMP	
SEQID No 12	(486) -----	
Consensus	(501) -----	

図 4F

【図 4 G】

	1	50
SEQID No 1	(1) AAPFNGTMMQYFHWLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPAYKG	
SEQID No 13	(1) -DGLNGTMMQYFHWLPRDGNHNRRLDDAALSDAGITAIWIPPAKMG	
Consensus	(1) NQTMQYFHWLPR DG W KL DA LS GITAIWIPPAKMG	
	51 100	
SEQID No 1	(51) TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
SEQID No 13	(50) SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
Consensus	(51) S ADVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKA AI A INVYA	
	101 150	
SEQID No 1	(101) DVVFDHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 13	(100) DVVMNHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
Consensus	(101) DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDF GR N	
	151 200	
SEQID No 1	(151) YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM	
SEQID No 13	(150) YSDPKWRWYHFDGVDWDESRQPNRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLL	
Consensus	(151) YS FKWRWFHF GVDWD IFKF W W VD ENGNIDYLL	
	201 250	
SEQID No 1	(201) YADLMDHPEVVTLEKNMGKMYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
SEQID No 13	(198) GSNIDFSHPEVQBELKJWSWTFDELDLGRDLDAIKHIFWTSIDWVRH	
Consensus	(201) A ID HPEV ELK WG WF IDGFRDLDAIKH I F DWL H	
	251 300	
SEQID No 1	(251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTAS	
SEQID No 13	(248) QRNEADQDLFVVGYYKDDVGALFYLDEMNWMSLFDVPLNYNFRASQ	
Consensus	(251) R LF VGEYW DI L YI N MSFLD PL FY AS	
	301 350	
SEQID No 1	(301) SGGAFFDMRTIMNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKPLA	
SEQID No 13	(298) QGGSYDMRNLGRSLVRAHPHIAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKPLA	
Consensus	(301) GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHDTE PG AL SWV WFKPLA	
	351 400	
SEQID No 1	(351) YAFILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGTQH	
SEQID No 13	(348) YATILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGTQH	
Consensus	(351) YA ILTR GYP VFYGDYGIPI NI A K ID LL AR YAYGTQH	
	401 450	
SEQID No 1	(401) DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPQSGKMYVQKHAGKV	
SEQID No 13	(398) DYFDHSDIIGWTREGSSRPNSGLATISNGPQSGKMYVQKHAGQV	
Consensus	(401) DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPQSGKMYVQK AG F	
	451 500	
SEQID No 1	(451) DLTGNRSDTVITNSDQGEFKVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 13	(448) DLTGNNGASVTINDGNGEFTNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
Consensus	(451) DLTGN SVTIN DNGGEF NGGVSVMV	
	501 515	
SEQID No 1	(501) GEFVRWTEPRLVAMP	
SEQID No 13	(481) -----	
Consensus	(501) -----	

図 4G

【図 4 H】

	1	50
SEQID No 1	(1) AAPFNGTMMQYFHWLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPAYKG	
SEQID No 14	(1) -DGLNGTMMQYFHWLPRDGNHNRRLDDAALSDAGITAIWIPPAKMG	
Consensus	(1) NQTMQYFHWLPR DG W KL DA LS GITAIWIPPAKMG	
	51 100	
SEQID No 1	(51) TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
SEQID No 14	(50) SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYLAQIAAHAAGMVY	
Consensus	(51) S ADVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKA AI A INVYA	
	101 150	
SEQID No 1	(101) DVVFDHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 14	(100) DVVMNHKGAGDTEWVDVAVENPNSDRNQISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
Consensus	(101) DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDFGR N	
	151 200	
SEQID No 1	(151) YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM	
SEQID No 14	(150) YSDPKWRWYHFDGVDWDESRQPNRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLL	
Consensus	(151) YS FKWRWFHF GVDWD IFKF W W VD ENGNIDYLL	
	201 250	
SEQID No 1	(201) YADLMDHPEVVTLEKNMGKMYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFPDWL	
SEQID No 14	(198) GSNIDFSHPEVQBELKJWSWTFDELDLGRDLDAIKHIFWTSIDWVRH	
Consensus	(201) A ID HPEV ELK WG WF IDGFRDLDAIKH I F DWL H	
	251 300	
SEQID No 1	(251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKPYTAS	
SEQID No 14	(248) QRNEADQDLFVVGYYKDDVGALFYLDEMNWMSLFDVPLNYNFRASQ	
Consensus	(251) RS LF VGEYW DI L YI N MSFLD PL FY ASK	
	301 350	
SEQID No 1	(301) SGGAFFDMRTIMNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKPLA	
SEQID No 14	(298) QGGSYDMRNLGRSLVRAHPHIAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDFWFKPLA	
Consensus	(301) GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHDTE PG AL SWV WFKPLA	
	351 400	
SEQID No 1	(351) YAFILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGTQH	
SEQID No 14	(348) YATILTRQEGYPCVFGYDYGIPQYNIPLSKSIDPLLIARRDYAYGTQH	
Consensus	(351) YA ILTR GYP VFYGDYGIPI NI A K ID LL AR YAYGTQH	
	401 450	
SEQID No 1	(401) DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPQSGKMYVQKHAGKV	
SEQID No 14	(398) DYFDHSDIIGWTREGSSRPNSGLATISNGPQSGKMYVQKHAGQV	
Consensus	(401) DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPQSGKMYVQK QHAG F	
	451 500	
SEQID No 1	(451) DLTGNRSDTVITNSDQGEFKVNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 14	(448) DLTGNHAASVTINDGNGEFTNGGVSVMVPRKTTVSTIARPIITRP	
Consensus	(451) DLTGN A SVTIN DNGGEF NGGVSVMV	
	501 515	
SEQID No 1	(501) GEFVRWTEPRLVAMP	
SEQID No 14	(481) -----	
Consensus	(501) -----	

図 4H

【図 4 I】

	1	50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANEANNLSLGITLMLPPAYKGT
SEQID No 15	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANEANNLSLGITLMLPPAYKGT
Consensus	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLMTKVANEANNLSLGITLMLPPAYKGT
	51	100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTQAQYLQAIQAAHAAGMQVYA
SEQID No 15	(51)	SRSDVGYGVDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTQAQYLQAIQAAHAAGMQVYA
Consensus	(51)	SRSDVGYGVDLYDLGEFNGKGTVRTKYGTQAQYLQAIQAAHAAGMQVYA
	101	150
SEQID No 1	(101)	DVVFPHKGGADGTEWVDVAVENPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT
SEQID No 15	(101)	DVVFPHKGGADGTEWVDVAVENPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT
Consensus	(101)	DVVFPHKGGADGTEWVDVAVENPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT
	151	200
SEQID No 1	(151)	YSSFKRWYHFDGVMDDESRLSRIYKFRGIGKANDWEVDTEGNYDYLM
SEQID No 15	(151)	YSSFKRWYHFDGVMDDESRLSRIYKFR--GKANDWEVDTEGNYDYLM
Consensus	(151)	YSSFKRWYHFDGVMDDESRLSRIYKFR GKANDWEVDTE GNYDYLM
	201	250
SEQID No 1	(201)	YADLMDHPEVVTTELKNMGKMYVNTINIDGPRLDVAVKHIFSFPPDWLSY
SEQID No 15	(199)	YADLMDHPEVVTTELKNMGKMYVNTINIDGPRLDVAVKHIFSFPPDWLSY
Consensus	(201)	YADLMDHPEVVTTELKNMGKMYVNTINIDGPRLDVAVKHIFSFPPDWLSY
	251	300
SEQID No 1	(251)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNFYTTASK
SEQID No 15	(249)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNFYTTASK
Consensus	(251)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNFYTTASK
	301	350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTIMTNILMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA
SEQID No 15	(299)	SGGAFDMRTIMTNILMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA
Consensus	(301)	SGGAFDMRTIMTNILMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA
	351	400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYGI PQYNI PSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH
SEQID No 15	(349)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYGI PQYNI PSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH
Consensus	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYGI PQYNI PSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH
	401	450
SEQID No 1	(401)	DYLDHSDIIGWTREGTEKPGSGLAALITDGPQSGKWMYVGKQHAGKVFY
SEQID No 15	(399)	DYLDHSDIIGWTREGTEKPGSGLAALITDGPQSGKWMYVGKQHAGKVFY
Consensus	(401)	DYLDHSDIIGWTREG TRKPGSGLAALITDGPQSGKWMYVGKQHAGKVFY
	451	500
SEQID No 1	(451)	DLTGNRSDTITINS DGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVSTIARPIITRPWT
SEQID No 15	(449)	DLTGNRSDTITINS DGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVS-----
Consensus	(451)	DLTGNRSDTITINS DGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVS
	501	515
SEQID No 1	(501)	GEFVRWTEPRLVAMP
SEQID No 15	(497)	-----
Consensus	(501)	-----

図 4I

【図 5】

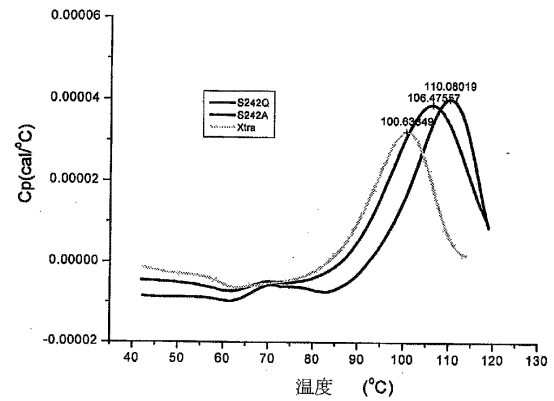


図 5

【図 6】

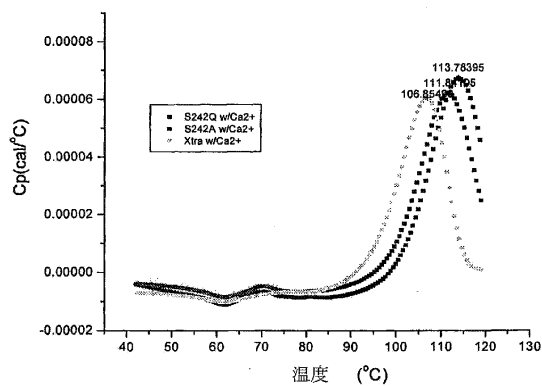


図 6

【図 8】

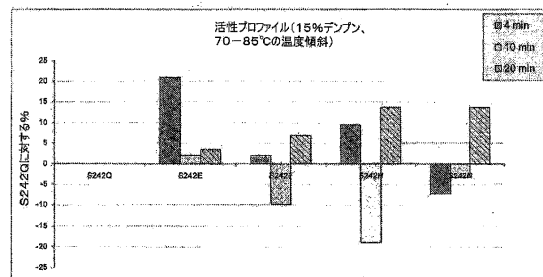


図 8

【図 7】

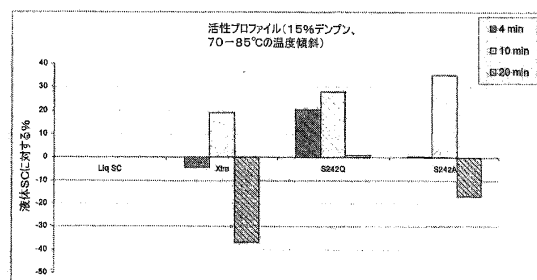


図 7

【図 9】

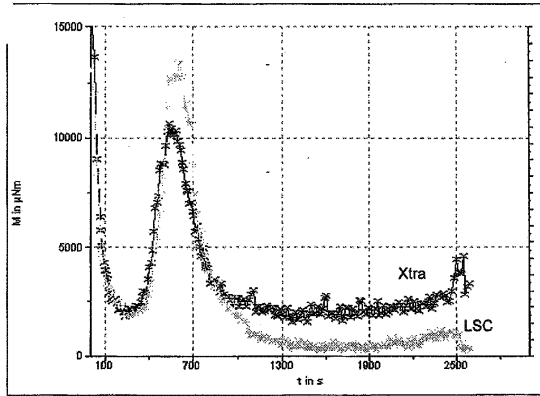


図 9

【図 10】

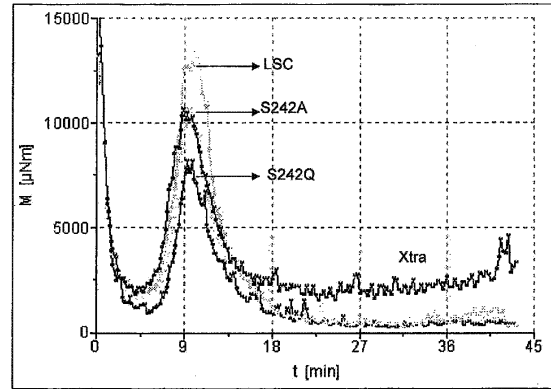


図 10

【図 11】

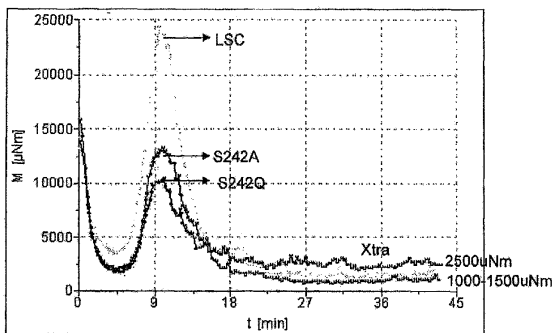


図 11

【図 13】

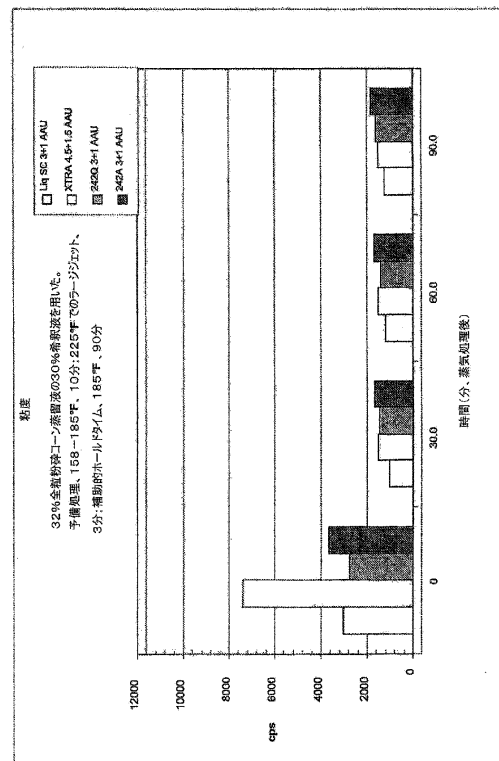


図 13

【図 12】

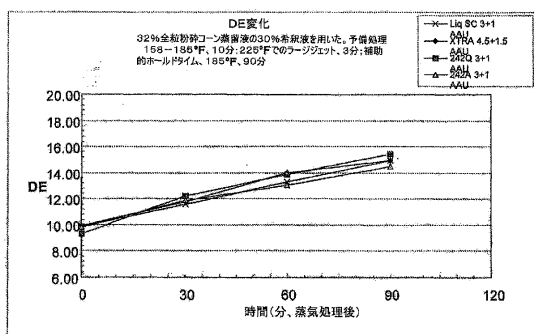


図 12

【図 14】

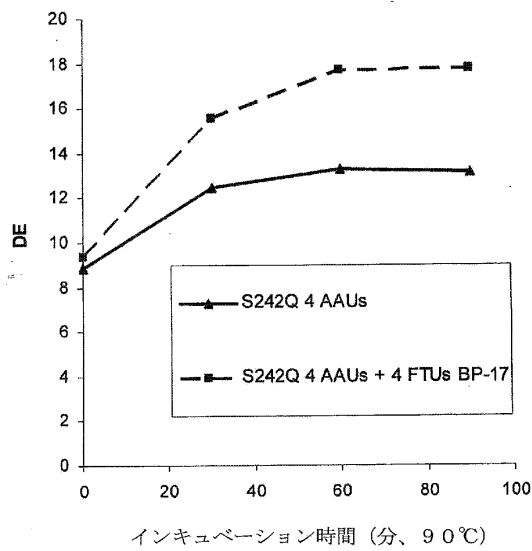


図 14

【図 15】

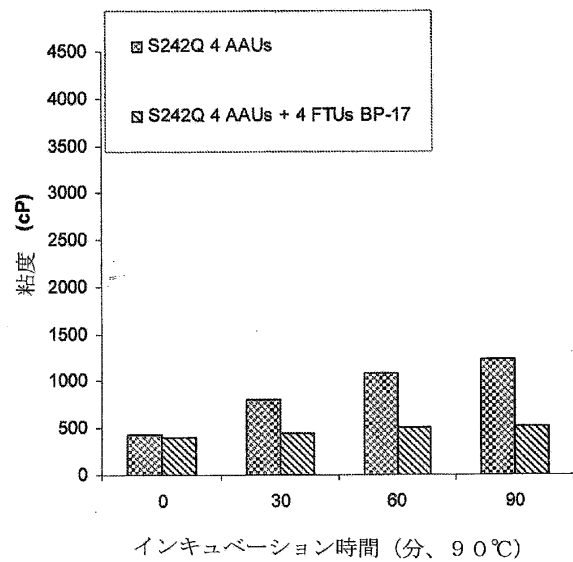


図 15

【図 16】

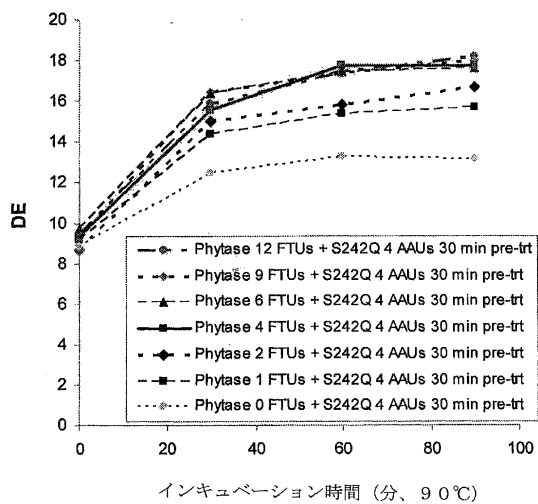


図 16

【図 17】

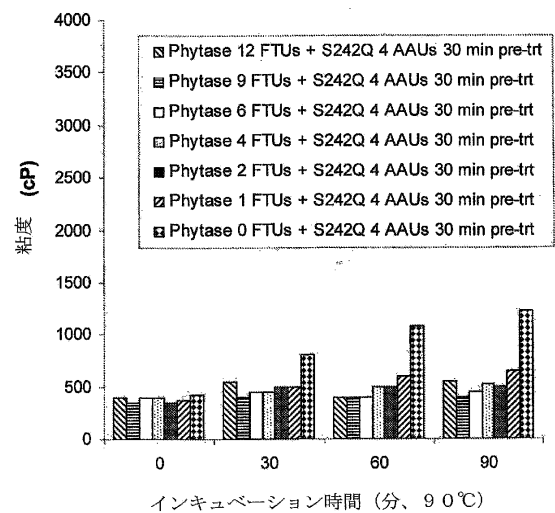


図 17

【図 18】

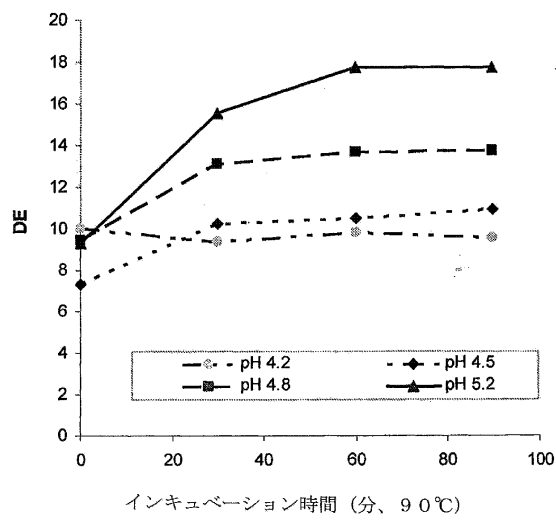


図 18

【図 19】

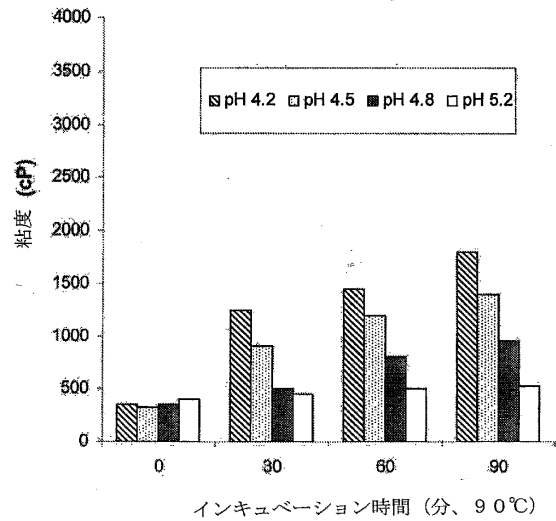


図 19

【図 20】

液化条件	アルコール生産 ガロン/ブッシュ エール	DDGS, % d s				
		デンプン	フィチン酸	% IP6	若離リン酸	産酸量
従来法 pH 5.8 (液化A)	2.70	7.25	0.6	100	1.20	1.92 mg/g d s
pH調整をしない方法、 pH 5.2、3+1AU U (スプリットドーズ)、 4FTUPP-17、蒸 気処理有り、225°F (液化B)	2.96	9.28	0.2	0	1.33	0.23 mg/g d s

図 20

【図 21】

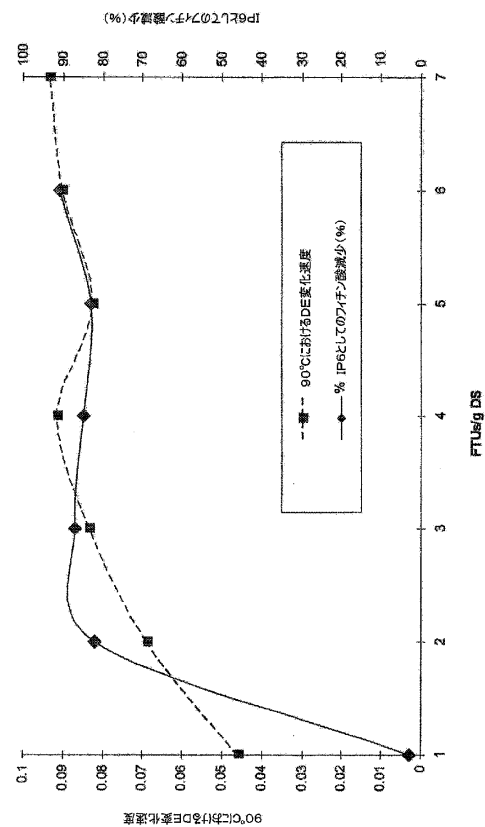


図 21

【図 2 2】

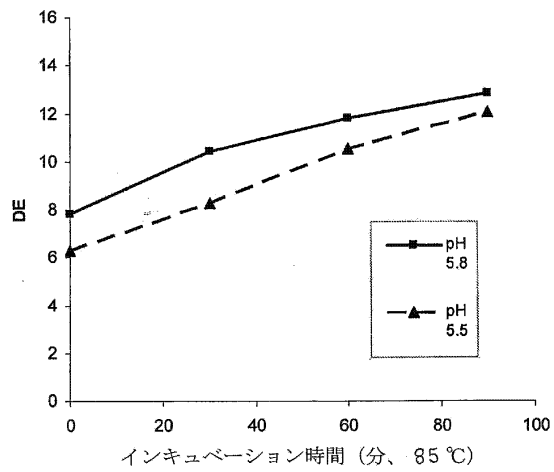


図 22

【図 2 3】

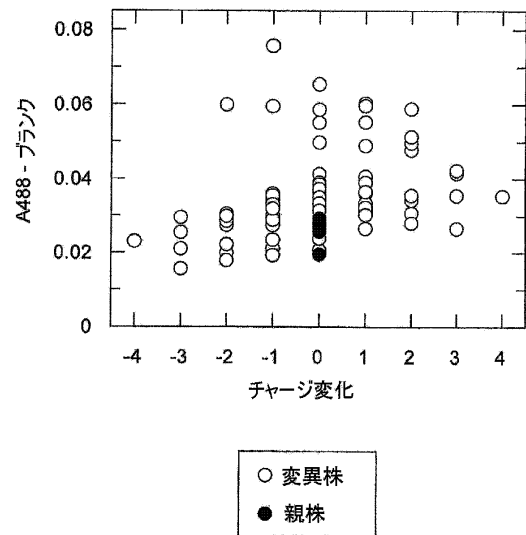


図23

【図 2 4】

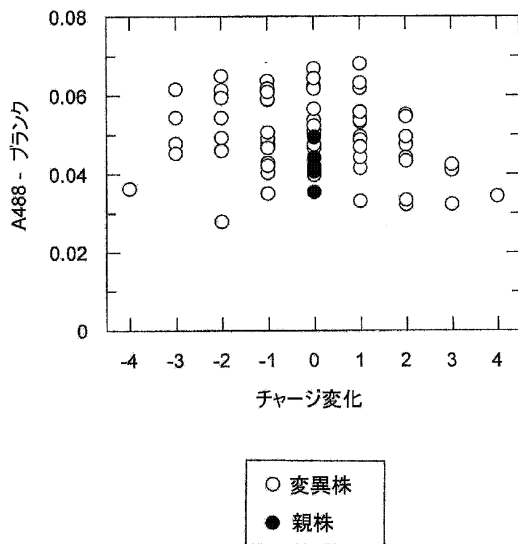


図24

【図 2 5】

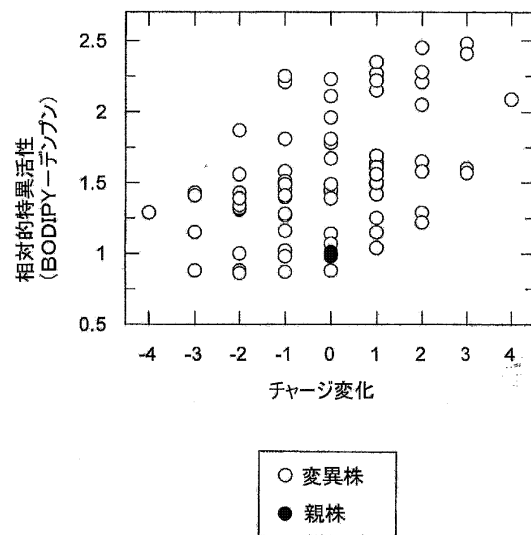


図25

【図 26】

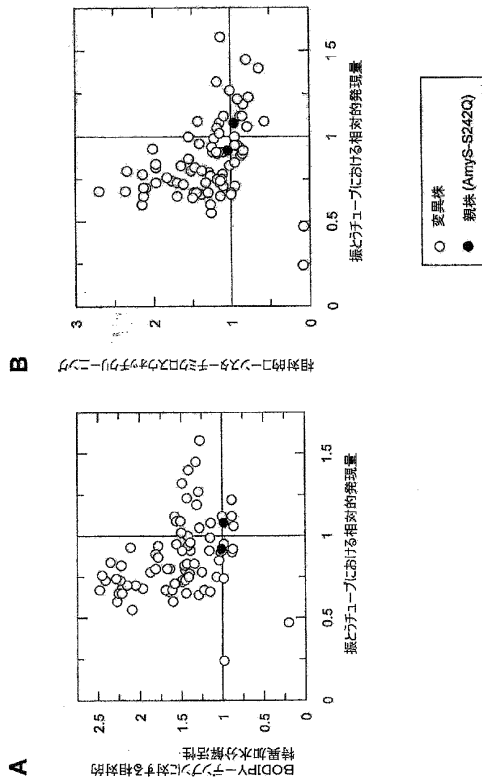


図 26

【図 27】

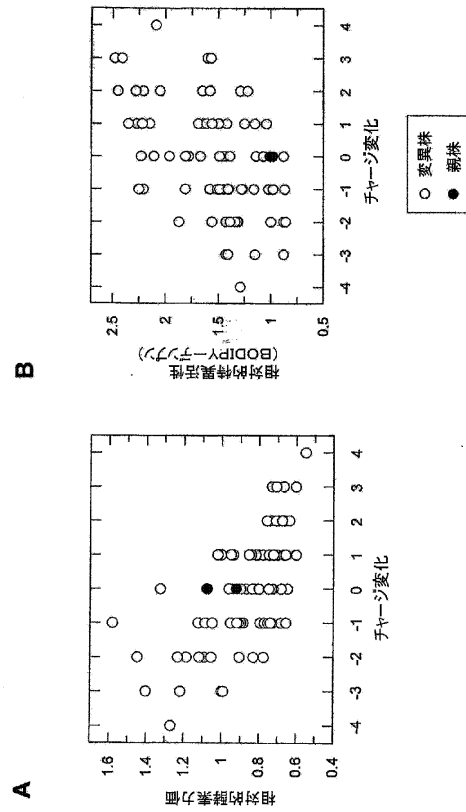


図 27

【図 28】

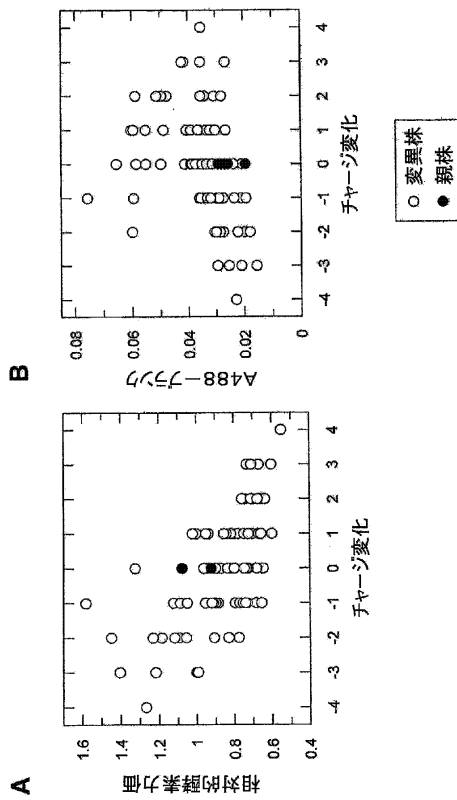


図 28

【図 29】

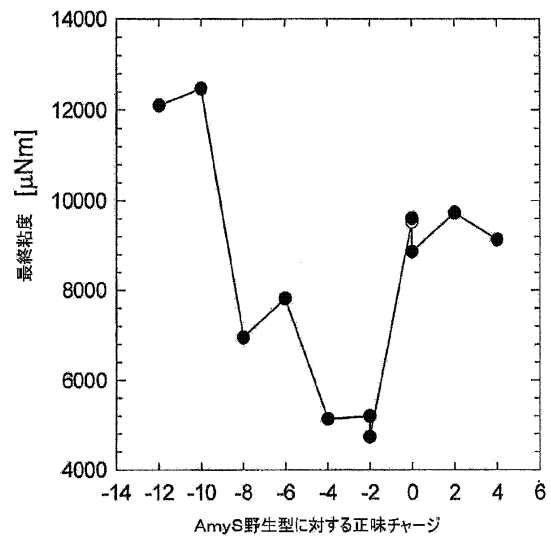


図 29

【図 30】

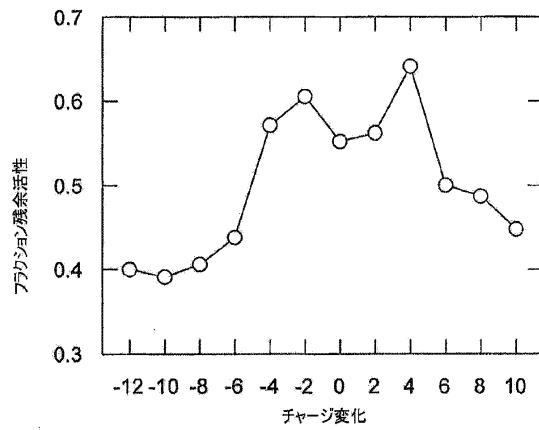
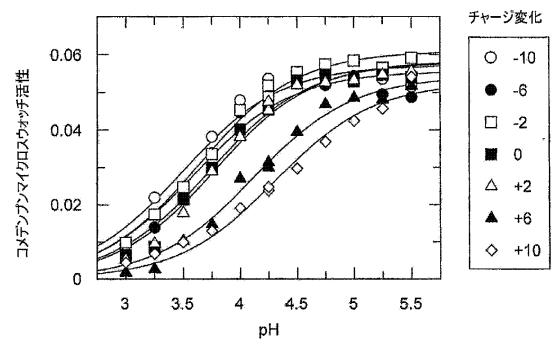


図 30

【図 31】



B

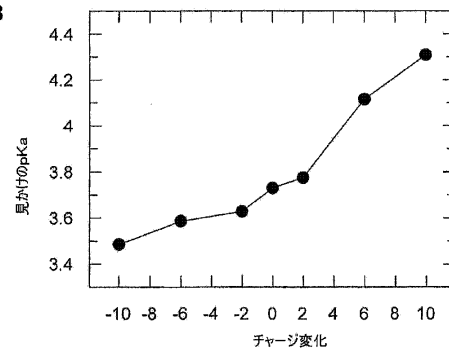


図 31

【図 32 A】

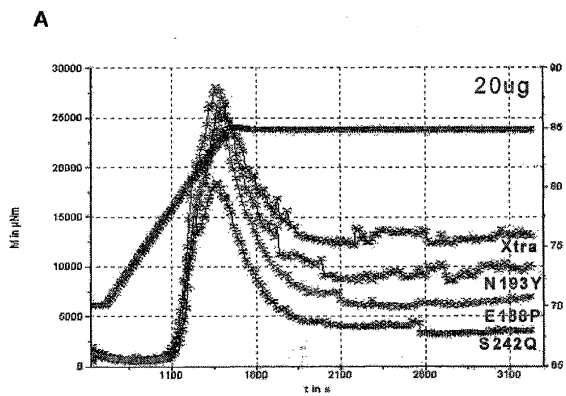
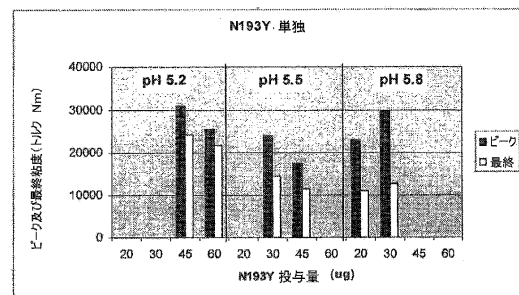


図32A

【図 32 B】



C

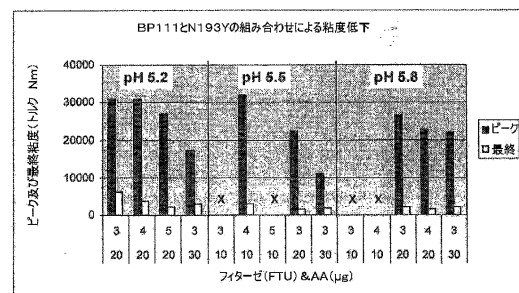


図32B

【配列表】

0005492879000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ケヴァス、ウィリアム・エー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 エステル、デイビッド・エー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 ハディ、スラ・フセイン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 リー、サンキュー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 レイマー、サンドラ・ダブリュー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 ショウ、アンドリュー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、サン・フランシスコ、シエラ・ストリート 2
5、ナンバーイー310
- (72)発明者 トッポザダ、アムル・アール
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン
- (72)発明者 ウェイラー、ウォルター
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
、ダニスコ・ユーエス・インク、ジェネンコー・ディビジョン

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 特表2001-520006 (JP, A)
特表2007-532117 (JP, A)
International Sugar Journal, 2008年 3月, Vol.110, No.1311, p.160,162,164,166,168
-174
Trends in Biotechnology, 2001年, Vol.19, No.12, p.507-510

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 9/26-9/34
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) UniProt/
GeneSeq
PubMed