

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7035079号
(P7035079)

(45)発行日 令和4年3月14日(2022.3.14)

(24)登録日 令和4年3月4日(2022.3.4)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	9/50 (2006.01)	F I	C 1 2 N	9/50	Z N A
C 1 2 N	15/57 (2006.01)		C 1 2 N	15/57	
C 1 2 P	21/00 (2006.01)		C 1 2 P	21/00	C
A 2 3 K	20/189 (2016.01)		A 2 3 K	20/189	

請求項の数 15 (全43頁)

(21)出願番号 特願2019-555724(P2019-555724)
 (86)(22)出願日 平成29年12月22日(2017.12.22)
 (65)公表番号 特表2020-505944(P2020-505944
 A)
 (43)公表日 令和2年2月27日(2020.2.27)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2017/084452
 (87)国際公開番号 WO2018/115473
 (87)国際公開日 平成30年6月28日(2018.6.28)
 審査請求日 令和2年12月21日(2020.12.21)
 (31)優先権主張番号 16206367.1
 (32)優先日 平成28年12月22日(2016.12.22)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)

(73)特許権者	519225657 イーダブル ニュートリション ゲゼルシ ャフト ミット ベシュレンクテル ハフ ツング ドイツ連邦共和国 4 9 4 2 9 ヴィスペ ク ホーゲンベーゲン 1
(74)代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者	ミヒエルス アンドレアス ドイツ連邦共和国 4 0 2 3 7 デュッセ ルドルフ リンデマンシュトラーセ 1 1 0
(72)発明者	シャイディク アンドレアス ドイツ連邦共和国 2 6 8 1 0 ヴェスト ヴェルレーディングен イーデヘルナー シュトラーセ 1 6

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 安定なプロテアーゼ変異型

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

配列番号1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、プロテアーゼ変異体であつて、

該プロテアーゼ変異体は、1つ以上のアミノ酸置換を有し、少なくとも1つのアミノ酸置換が配列番号1の残基位置A517にあり、

前記アミノ酸置換がA517TまたはA517Sであり、

該プロテアーゼ変異体が野生型のアリシクロバチルス・センダイエンシス(Alicyclobacillus sendaiensis)のクマモリシン(クマモリシンAS)と比較して、熱安定性が増加している、プロテアーゼ変異体。

【請求項2】

(i)配列番号4に記載のクマモリシンAS野生型、または

(ii)配列番号1~3のいずれか1つに記載のクマモリシンAS主鎖

と比較して少なくとも1つの改善された安定性を示す、請求項1に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項3】

配列番号1の残基位置D447および/またはA449に少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換D447Sおよび/またはA449Yを有する、請求項1または2に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項4】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S 主鎖と比較して、少なくとも 2 つのアミノ酸置換を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 5】

N 5 1 0 H、E 3 6 0 L、E 3 6 0 V、E 3 6 0 C、V 5 0 2 C、E 4 5 3 W、A 5 1 4 T、A 5 1 4 Y、A 5 1 4 D、A 5 1 4 S、A 4 6 0 W、A 3 8 6 I からなる群から選択される、少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、より好ましくは少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくとも 4 つ、より好ましくは少なくとも 5 つ、最も好ましくは少なくとも 6 つのさらなるアミノ酸置換を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 6】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S 主鎖中の選択された残基に置換の組を有し、前記置換の組は、

- a) D 4 4 7 S、A 4 4 9 Y、E 4 5 3 W、および A 5 1 7 T、または
- b) D 4 4 7 S、A 4 4 9 Y、E 4 5 3 W、および A 5 1 7 S

である、請求項 1 または 2 に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 7】

前記改善された安定性が、活性化酵素またはチモーゲンのいずれかの改善された熱安定性 (I T 50) である、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体。

【請求項 8】

前記プロテアーゼ変異体が、試験温度で 10 分間インキュベートする条件で、75 および 105 の I T 50 を有する、請求項 7 に記載のプロテアーゼ変異体。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体をコードする、核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子を含む、プラスミドまたはベクター系。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体を含む組成物であって、5 の pH を有する組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体を含む、飼料添加剤、配合原料、飼料補給剤、および / または飼料。

20

30

【請求項 13】

飼料の製造のための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体の使用。

【請求項 14】

i) 配列番号 1 ~ 4 のいずれかに 1 つに記載のクマモリシン A S アミノ酸配列をコードする DNA、cDNA または mRNA を突然変異誘発すること、
 ii) 得られたクマモリシン A S の 1 つ以上の突然変異体を発現すること、および
 iii) 安定性、好ましくは熱安定性について、クマモリシン A S の 1 つ以上の突然変異体を試験すること

を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のプロテアーゼ変異体を製造する方法。

40

【請求項 15】

配列番号 1 に記載のクマモリシン A S と比較して、A 4 4 9 Y、N 5 1 0 H、E 3 6 0 L、E 3 6 0 V、E 3 6 0 C、V 5 0 2 C、E 4 5 3 W、A 5 1 4 T、A 5 1 4 Y、A 5 1 4 D、A 5 1 4 S、A 4 6 0 W からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸置換をさらに含む、請求項 1 に記載のプロテアーゼ変異体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はプロテアーゼの分野に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

プロテアーゼは今日、動物飼料、洗剤、果実および飲料加工、皮革加工、タンパク質加水分解物の製造、硬質表面洗浄またはバイオフィルム洗浄、創傷治癒を促進するための壊死組織または火傷組織の治療および／またはベーキング生地の調製などの食品の調製をはじめとする、数多くの一連の産業用途で使用されている。

【 0 0 0 3 】

これらの用途の多くにおいて、酵素の安定性の改善は重要な利点である。プロテアーゼはしばしば製造工程中に熱処理を受けるので、熱安定性の改善は、それぞれのプロテアーゼの加工性を高めるのを助ける。

【 0 0 0 4 】

これは、とりわけ、それらが飼料の消化性および栄養素利用を改善するのを助ける、動物飼料におけるプロテアーゼの使用に当てはまる。

【 0 0 0 5 】

飼料加工の間に、病原体を低下させまたは除去し、飼料の貯蔵寿命を延長し、成分の使用を最適化し、飼料要求率の改善をもたらすために、飼料はしばしば、例えば蒸気の適用により加熱される。調質時間は、飼料の種類および配合に応じて数秒から数分まで変化し得る。調質中の温度は、典型的には 70 から 100 の範囲にわたる。調質後、飼料はペレットダイから押し出されることもあり、それは短い時間の間に、摩擦によって引き起こされる熱放散のために、飼料の温度を徐々に上昇させる。

【 0 0 0 6 】

さらにその他の用途でも、プロテアーゼ酵素は同様に熱に曝露される。これには、洗剤（例えば洗濯中の熱水への曝露）、果実および飲料加工（圧搾工程中または低温殺菌または滅菌による熱曝露）、皮革加工、タンパク質加水分解物の製造、硬表面浄化またはバイオフィルム洗浄、創傷治癒を促進するための壊死組織または熱傷組織の治療、組織工学における加工助剤（滅菌、およびブリオンタンパク質の変性）および／またはベーキング生地調製などの食品調製における使用が挙げられる。

【 0 0 0 7 】

プロテアーゼはタンパク質であるため、熱と圧力による変性を受け易い。変性は本質的に酵素の構造を変化させ、結果として活性レベルが低下して酵素の効力が低下する。

【 0 0 0 8 】

プロテアーゼの安定性を改善し、または熱の影響からプロテアーゼを保護するためのさまざまな方法がある。動物飼料用途では、1つの選択肢はペレット化後の液体塗布であり、これは特殊な装置の購入と設置、液体酵素を貯蔵するスペース、そして塗布する酵素量の注意深い計算を要することから、比較的複雑で高価である。

【 0 0 0 9 】

別の選択肢は、プロテアーゼをその他の成分と一緒にペレット化する前に（例えば、飼料または洗剤中で）、保護コーティングを塗布することである。このアプローチは、コーティングが、例えば、洗浄媒体中または動物の消化管中で完全に溶解しないこともあるため、酵素の効力を低下させることもある。ペレット化工程の高い熱および水分含有量に耐え得るが、引き続いて、例えば、動物の腸または洗濯機中などのより低い温度およびより高い水分条件下で溶解するコーティングの設計は、さらに達成し難い。

【 0 0 1 0 】

別の選択肢は、本質的に熱安定性のプロテアーゼを使用することである。これらのプロテアーゼは好熱性および超好熱性生物に由来し、高い熱安定性という独特の構造および機能特性を有する。しかし、これらのプロテアーゼは、最適以下の活性、特異性、生物学的利用能、pH範囲または加工性のようなその他の制限を受けることもある。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【 0 0 1 1 】**

それ故、本発明の目的は、上記の制限を受けない安定なプロテアーゼ変異型を提供するこ

10

20

30

40

50

とである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

これらのおよびさらなる目的は、本発明の独立請求項に記載の方法および手段によって満たされる。従属請求項は、特定の実施形態に関連する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】チモーゲンおよび活性化酵素の熱安定性について最適化された変異型における、変異の分布を示す。

【図2】WTおよび表4からの上位変異型 #1～#7の安定性および性能に対する、イオン強度の影響を示す。10

【図3】別個のクローナンおよびコンビナトリアルクローナンの異なる組のAA位置における置換の発生を示す。

【図4】別個のクローナンおよびコンビナトリアルクローナンの異なる組のAA位置における置換の発生を示す。

【図5】別個のクローナンおよびコンビナトリアルクローナンの異なる組のAA位置における置換の発生を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明を詳細に説明する前に、記載される装置および方法は変動してもよいため、本発明は、記載される装置または組成物の特定の構成部分または構造的特徴に、または記載される方法の工程段階に限定されないものと理解される。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態の説明のみを目的として、制限を意図しないこともまた理解される。特定の手段が互いに異なる従属請求項に列挙されているという単なる事実は、これらの手段の組み合わせが有利に使用され得ないことを示すものではない。請求項中のいかなる参照符号も、範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求範囲の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、単数形および/または複数形の指示対象を含むことに留意すべきである。さらに、特許請求の範囲において、「含む」という単語は、その他の要素またはステップを排除するものではない。20

【0015】

さらに、数値で区切られたパラメータ範囲が与えられている場合、その範囲は、これらの制限値を含むと見なされるものと理解される。

【0016】

本明細書で開示される実施形態は、互いに関係しない個々の実施形態として理解されることが意図されることもさらに理解される。一実施形態で論じられる特徴は、本明細書に示されるその他の実施形態に関連しても開示されることが意図される。ある場合に、特定の特徴が、1つの実施形態では開示されず、別の実施形態では開示される場合、当業者は、それが、前記特徴が前記別の実施形態と共に開示されることを必ずしも意味しないことを理解するであろう。当業者は、別の実施形態についても前記特徴を開示することが本出願の要旨であるが、単に明確さの目的のためにそして仕様を扱いやすい量に保つために、それが実施されていないことを理解するであろう。40

【0017】

本発明の一実施形態によれば、配列番号1～3のいずれかに記載のクマモリシンAS主鎖の全長アミノ酸配列と少なくとも90%と同一であるプロテアーゼ変異型、またはタンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分もしくはシャッフル変異型が提供される。プロテアーゼ変異型は、

(i) 配列番号4に記載のクマモリシンAS野生型、または

(ii) 配列番号1～3のいずれかに記載のクマモリシンAS主鎖と比較して改変されたまたは改善された安定性を示す。50

【0018】

「シャッフル変異型」という用語は、このような組み合わせがタンパク質分解活性を維持する限り、このようなフラグメントまたは部分と、その他の相同酵素由来の1つまたは複数のフラグメントとの組み合わせに関する。

【0019】

「相同酵素」という用語は、クマモリシンと同じ構造的折り畳みに属し、少なくとも40%の配列同一性がある酵素を表す。このカテゴリーは、本明細書中で以下に論じるようにセドリシンを包含する。

【0020】

クマモリシンASのいくつかの変異体が記載されている。クマモリシンASのN291D変異株の発見は、セリアック病に対する有用な治療を提供することが検討されている。ヒトの消化管においてN291DクマモリシンASタンパク質を産生する可能性がある遺伝子修飾生物の創製を示唆する、数多くの提案がある。米国特許出願第20140178355A1号明細書を参照されたい。10

【0021】

好ましくは、本発明によるクマモリシンAS変異型は、93%の同一性、より好ましくは95%の同一、より好ましくは98%の同一性、最も好ましくは99%の同一性を有する。

【0022】

「クマモリシン」という用語は、酸作用性エンドペプチダーゼおよびトリペプチジルペプチダーゼを含む、セドリシンファミリーのペプチダーゼに由来する、S53とも称される酸性プロテアーゼを指す(MEROPS登録MER000995、Wlodawer et al., 2003も参照されたい)。セドリシンはペプスタチンによる阻害に対して抵抗性であるという点で、大部分のエンドペプチダーゼと異なる酸性pH最適条件を有するエンドペプチダーゼである(Teraschita et al., 1981; Oda et al., 1998)。20

【0023】

セドリシンの活性化は、pH6.5未満、より良好にはpH3.5未満のpHにおける自己触媒的切断を伴い(欧洲特許出願第16176044号明細書およびOkubo et al., 2016もまた参照されたい)、それは1つまたは複数のペプチドを放出して成熟および活性形態をもたらす。前記自己触媒的切断は、アルカリ性、中性、弱酸性条件下で阻害される。30

【0024】

セドリシンは、配列番号1に記載のクマモリシンASでは、位置G1u267、Asp271、およびSer278に位置する、G1u、Asp、およびSerの触媒三つ組を含む。Ser残基は、サブチリシンプロテアーゼ(MEROPSファミリーS8)の触媒三つ組Asp、His、Ser三つ組中のSerに相当する求核剤であり、三つ組のG1uはサブチリシン中のHis一般塩基の機能的置換であるが、構造的に同等の位置にはない。

【0025】

セドリシンのタンパク質折り畳みはサブチリシンの折り畳みと明らかに関連しており、どちらの群も時にセリンプロテアーゼと称される。しかし、セドリシンはさらなるループを有する。アミノ酸配列はサブチリシンとあまり類似しておらず、これは、かなり異なる活性部位残基と、その結果生じる最大活性のためのより低いpHと相俟って、別個のファミリーにすることを正当化する。40

【0026】

一実施形態では、配列番号1に記載のクマモリシンASに由来するアミノ酸配列、またはタンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分もしくはシャッフル変異型を含む、プロテアーゼ変異型が提供され、上記プロテアーゼ変異型は、D447、A449、A517、N510、V502、E453、E360、A514、A460、A392、A386、T301、D199、Q518、G266、P553、E269、R412、S435、G320、T326、T461、Q244、D293、A487、V274、A

50

372、K283、T308、A418、I391、A423、A331、S327、I219、M333、A329、N515、A378、S434、E421、A433、S230、Q393、D399、Y490、G281、Y287、R516、A475、S354、S315P、W325、L442、A470、S324、Q361、A190、T196、Q202、E228、A229、A242、D251、S262、N291、L297、H305、D306、V314、A328、I330、L338、A342、A351、D358、G388、D402、V455、E459、A478、K483、Q497、T507、L540、Q542、A548、P551、R166および/またはD265からなる群から選択される、配列番号1中の1つまたは複数の残基位置に1つまたは複数のアミノ酸置換を有する。

10

【0027】

上記の番号付けは、配列番号1または4（それらはほぼ同一であり、4は野生型であり、1は変異誘発に使用される実際の主鎖であり、2つの間の差はN末端AA残基である）を参照する一方で、特許請求されるプロテアーゼは、タンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分またはシャッフル変異型であり得ることに留意されたい。このような場合、得られるアミノ酸配列は配列番号1または4のものよりも短い一方で、変異体残基の番号付けは、なおも全長配列番号1～4を指し、それぞれ短い形態の番号付けに翻訳されなければならない。

【0028】

一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、

20

(i) 配列番号4に記載のクマモリシンAS野生型、または

(ii) 配列番号1～3のいずれかに記載のクマモリシンAS主鎖と比較して改変されたまたは改善された安定性を示す。

【0029】

一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、配列番号1または4に記載のクマモリシンASと比較して、D447S、A449Y、A517T、N510H、E360L、E360V、E360C、V502C、E453W、A514T、A514Y、A514D、A514S、A460W、A386I、A392V、A392L、A392I、A392M、T301S、D199E、Q518G、P553K、E269M、E269T、E269C、E269H、E269Q、G266A、D293Y、G320A、R412Q、E421R、A487Q、T461V、T461C、A331F、A331Y、A329Q、A329H、A329T、S435I、S435R、S435T、S435V、V274I、A372S、K283L、Q244C、Q244G、T308C、A418W、I391W、A423V、T326R、T326W、T326L、T326K、I219L、S327F、S327L、S327W、M333I、N515G、A378G、S434G、A433G、S230D、Q393S、D399S、Y490W、A190D、T196S、Q202D、E228Q、A229W、A242S、D251S、S262C、G281R、Y287K、N291T、N291S、D293F、L297T、T301C、T301M、H305F、H305W、D306S、V314M、V314L、S315P、G320Q、G320S、S324L、S324R、W325K、A328W、A328D、A328R、A328Y、I330L、M333Y、M333L、L338R、A342R、A351S、S354E、S354Q、D358G、Q361C、Q361L、A386L、A386V、A386M、G388C、D402E、R412M、R412E、R412D、L442W、L442W、D447C、D447A、A449L、A449M、A449E、A449N、E453Y、E453F、V455I、V455L、E459W、A460R、A470V、A475V、A478L、K483A、Q497Y、Q497M、Q497D、Q497R、V502T、T507L、R516L、R516E、R516I、A517S、L540V、Q542H、Q542D、Q542S、A548S、P551N、P551R、P553L、R166I、D265Tからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。

30

40

50

【0030】

これらの個々のアミノ酸置換は、表1に示される。上記の番号付けは配列番号1または4を指す一方で、特許請求されるプロテアーゼは、タンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分またはシャッフル変異型であり得ることに留意されたい。このような場合、得られるアミノ酸配列は、配列番号1または4のものよりも短いかまたは長い一方で、変異体残基の番号付けは、なおも全長配列番号1または4を指す。

【0031】

本発明の一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、配列番号1または4に記載のクマモリシンASと比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、置換は、

- ・ A 5 1 7 T または A 5 1 7 S 10
- ・ A 5 1 4 S、 A 5 1 4 T または A 5 1 4 D
- ・ N 5 1 0 H
- ・ V 5 0 2 C
- ・ A 4 4 9 Y、 A 4 4 9 N または好ましさに劣る A 4 4 9 E
- ・ D 4 4 7 S または D 4 4 7 C
- ・ A 3 9 2 I、 A 3 9 2 L、 A 3 9 2 V または A 3 9 2 M
- ・ E 3 6 0 L、 E 3 6 0 V または E 3 6 0 C
- ・ E 2 6 9 H、 E 2 6 9 T、 E 2 6 9 M、 E 2 6 9 C または E 2 6 9 Q
- ・ Q 5 1 8 G
- ・ G 3 2 0 Q、 G 3 2 0 A または好ましさに劣る G 3 2 0 S 20
- ・ A 3 8 6 I、 A 3 8 6 L、 A 3 8 6 V または A 3 8 6 M
- ・ G 2 6 6 A
- ・ A 3 7 2 S
- ・ E 4 5 3 Y、 E 4 5 3 W または好ましさに劣る E 4 5 3 F
- ・ A 4 6 0 W
- ・ A 3 2 9 Q、 A 3 2 9 H または A 3 2 9 T
- ・ D 2 9 3 Y
- ・ R 4 1 2 E、 R 4 1 2 D、 R 4 1 2 Q または R 4 1 2 M
- ・ T 3 0 1 S
- ・ D 1 9 9 E 30
- ・ A 3 3 1 F または A 3 3 1 Y
- ・ S 4 3 5 T、 S 4 3 5 R または S 4 3 5 I
- ・ V 2 7 4 I
- ・ D 3 9 9 S
- ・ S 2 3 0 D
- ・ S 4 3 4 G
- ・ M 3 3 3 I または M 3 3 3 L
- ・ N 5 1 5 G
- ・ A 4 1 8 W
- ・ I 3 9 1 W 40
- ・ E 4 2 1 R
- ・ A 4 8 7 Q
- ・ A 3 7 8 G
- ・ A 4 2 3 V
- ・ T 3 2 6 K、 T 3 2 6 L、 T 3 2 6 R または T 3 2 6 W
- ・ A 4 3 3 G
- ・ D 3 9 9 S
- ・ Y 4 9 0 W
- ・ R 5 1 6 E または R 5 1 6 I
- ・ P 5 5 3 K 50

- ・ V 3 1 4 L
- ・ S 3 2 7 W、 S 3 2 7 L または S 3 2 7 F A 4 7 5 V
- ・ A 3 4 2 R
- ・ S 3 5 4 E または S 3 5 4 Q
- ・ S 3 1 5 P

からなる群から選択される。

【 0 0 3 2 】

これらの置換のいくつかは、配列番号 1 または 4 に記載のクマモリシン A S に個々に導入された場合、高い I T 5 0 をもたらし、したがって好ましい一方で、その他のものは、個々の置換と高い全体的 I T 5 0 との組み合わせを有する、表 2 a、2 b、および 4 のコンビナトリアルクローンおよび別個のクローン、およびいくつかの組み合わせにおいて、高い発生率を有する。

10

【 0 0 3 3 】

いくつかは区別なく使用されて酵素を安定化させて得て、いくつかの組み合わせは、発酵力価、プロテアーゼ阻害剤（大豆ボーマン・パークおよびクニッツ型トリプシンおよび / またはキモトリプシン阻害剤）としての抗栄養因子の加水分解、p H プロファイル、p H およびペプシン安定性、またはより高いイオン強度に対する安定性およびその下での性能のような、飼料の生産または性能に関連するその他の形質をもたらす。

20

【 0 0 3 4 】

上記の番号付けは配列番号 1 または 4 を指す一方で、特許請求されるプロテアーゼは、タンパク質分解活性を維持するそのフラグメント、部分またはシャッフル変異型であり得ることに留意されたい。このような場合、得られるアミノ酸配列は、配列番号 1 または 4 のものよりも短い一方で、変異体残基の番号付けは、なおも全長配列番号 1 または 4 を指す。

【 0 0 3 5 】

本発明の一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、配列番号 1 または 4 に記載のクマモリシン A S 主鎖と比較して、少なくとも 2 つのアミノ酸置換を有する。好ましくはプロテアーゼ変異型は、前記群から選択される少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくとも 4 つ、より好ましくは少なくとも 5 つ、最も好ましくは少なくとも 6 つのアミノ酸置換を有する。好ましくは、これらのアミノ酸置換は、上で論じた個々の置換の組み合わせである。

30

【 0 0 3 6 】

本発明の一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、配列番号 1 または 4 に記載のクマモリシン A S 主鎖と比較して、少なくとも 2 つのアミノ酸置換を有し、少なくとも 2 つのアミノ酸置換は、4 4 7、および 4 4 9、4 5 3、5 0 2、5 1 0、5 1 7、3 6 0、4 6 0、1 9 9、2 6 6、3 0 1、3 8 6、および 5 1 4 からなる群から選択される、配列番号 1 または 4 の 2 つ以上の残基位置にある。好ましくはプロテアーゼ変異型は、前記群から選択される少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくとも 4 つ、より好ましくは少なくとも 5 つ、最も好ましくは少なくとも 6 つのアミノ酸置換を有する。

【 0 0 3 7 】

好ましい一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、D 4 4 7 S、A 4 4 9 Y、A 5 1 7 T、N 5 1 0 H、E 3 6 0 L、E 3 6 0 V、E 3 6 0 C、V 5 0 2 C、E 4 5 3 W、A 5 1 4 T、A 5 1 4 Y、A 4 6 0 W、A 3 8 6 I、D 1 9 9 E、G 2 6 6 A、T 3 0 1 S からなる群から選択される、少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、より好ましくは少なくとも 3 つ、より好ましくは少なくとも 4 つ、より好ましくは少なくとも 5 つ、最も好ましくは少なくとも 6 つのアミノ酸置換を有する。

40

【 0 0 3 8 】

表 2 a、2 b、および 4 は、上記の個々の変異組み合わせを有する、いわゆる「別個のクローン」または「コンビナトリアルクローン」の組を示す。

【 0 0 3 9 】

本明細書の用法では、「コンビナトリアルクローンまたは変異型」という用語は、組換えライブラリーからスクリーニングされた、クローンまたは変異型を意味する。そのような

50

組換えライブラリーは、表1の群から選択される異なる量および変異を有する集団を含む。

【0040】

本明細書の用法では、「別個のクローンまたは変異型」という用語は、合理的なアプローチにおいて、表1の群から選択される定義された変異の組を含むように構築されたクローンを意味する。

【0041】

好ましくは、本発明によるプロテアーゼ変異型が有する前記改善された安定性は、改善された熱安定性(ITT50)である。酵素の熱安定性は通常、不活性化温度(ITT50)を測定することによって判定される。「不活性化温度」は、一定期間インキュベートし引き続いて室温まで冷却した後の酵素の残留活性が、室温において同一条件下で同一期間インキュベートした同一酵素の残留活性の50%である温度として定義される。10

【0042】

一実施様態によれば、プロテアーゼ変異型は、配列番号1または4に記載のクマモリシンAS主鎖中の選択された残基に、

- a) 360、447、449、および510
- b) 447、449、および514、および/または
- c) 447、449、453、および517

の少なくとも1つの置換の組を有する。

【0043】

これらの3組の同時に置換された残基は、特に好ましい(コンセンサス変異)3組の特定の別個のクローンまたはコンビナトリアルクローンにおいて生じる。表2a/図3、表2b/図4、および表4/図5を参照されたい。これらの理由から、これらの組の同時置換残基は、安定性の改善に関して言えば、特に相乗的であるように見える。20

【0044】

一実施様態によれば、前記改善された安定性は、活性化酵素またはチモーゲンのいずれかの改善された熱安定性(ITT50)である。一実施形態では、プロテアーゼ変異型は、75~105のITT50を有する。

【0045】

いくつかの実施形態では、活性化酵素では70~90のITT50が提供される一方で、チモーゲンでは80および105のITT50が提供される。30

【0046】

クマモリシンAS野生型酵素は、チモーゲン、すなわち不活性チモーゲンとして79.6+/-0.4(n=46)のITT50を有し、活性化酵素として59+/-1(n=10)のITT50を有する。本明細書中では、異なる変種は、それらのITT50、またはITT50(すなわち、野生型ITT50と比較した差)のいずれかによって特徴付けられる。

【0047】

本発明の別の実施形態によれば、上記の説明に従ったプロテアーゼ変異型をコードする核酸分子が提供される。さらに、前記核酸分子を含む、プラスミドまたはベクター系が提供され、ならびに前記プラスミドまたはベクターで形質転換されおよび/または前記核酸分子を含む、宿主細胞が提供される。40

【0048】

さらに、プロテアーゼまたはプロテアーゼ変異型を製造する方法が提供され、前記方法は

- a) 前記宿主細胞を培養するステップと、
 - b) 前記宿主細胞からプロテアーゼまたはプロテアーゼ変異型を単離し、または培地からプロテアーゼまたはプロテアーゼ変異型を採取するステップと
- を包含する。

【0049】

本発明の別の実施形態によれば、上記の説明によるプロテアーゼ変異型を含んでなりのpHを有する組成物が、提供される。5

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

このような組成物は、その内容が参照により本明細書に援用される、欧州特許出願第 1 6 1 7 6 0 4 4 . 2 - 1 3 7 5 号明細書およびその優先権を主張する後の出願において一般的に考査されているが、本明細書で開示される特定のプロテアーゼ変異型は考査されていない。

【 0 0 5 1 】

本発明の別の実施形態によれば、上記の説明によるプロテアーゼ変異型または組成物を含む、飼料添加剤、配合原料、飼料補給剤、および／または飼料が提供される。

【 0 0 5 2 】

さらに、飼料を製造するための上記の説明によるプロテアーゼ変異型の使用が提供される。

10

【 0 0 5 3 】

このような飼料添加剤、配合原料、飼料補給剤、および／または飼料は、好ましくは单胃家禽、ブタ、魚類および水産養殖用であり、それはタンパク質消化と飼料からの吸収度を高めるのを助け、さらに動物の健康や消化に有害なタンパク質生成化合物を分解する。

【 0 0 5 4 】

さらに、上記の説明によるプロテアーゼの使用は、

- ・洗剤
- ・果実および飲料加工
- ・皮革加工
- ・タンパク質加水分解物の製造
- ・硬質表面洗浄またはバイオフィルム洗浄
- ・創傷治癒を促進するための壞死組織または火傷組織の治療
- ・組織工学における加工助剤および／または
- ・ベーキング生地調製などの食品調製

20

からなる群から選択される、少なくとも 1 つの目的または薬剤のために提供される。

【 0 0 5 5 】

同様に、

- ・洗剤
- ・果実および飲料加工
- ・皮革加工
- ・タンパク質加水分解物の製造
- ・硬質表面洗浄またはバイオフィルム洗浄
- ・創傷治癒を促進するための壞死組織または火傷組織の治療
- ・組織工学における加工助剤および／または
- ・ベーキング生地調製などの食品調製

30

なる群から選択される、1 つの目的または薬剤のための添加剤、成分または薬剤が提供され、上記添加剤、成分または薬剤は、上記の説明による組成物を含む。

【 0 0 5 6 】

さらに、

- i) 配列番号 1 ~ 4 のいずれかに記載のクマモリシン A S アミノ酸配列をコードする D N A、c D N A または m R N A を変異誘発するステップと、
 - i i) このようにして得られたクマモリシン A S の 1 つまたは複数の変異体を発現するステップと、
 - i i i) クマモリシン A S の 1 つまたは複数の変異体を少なくとも安定性、好ましくは熱安定性について試験するステップと
- を含む、上記の説明に従ってプロテアーゼ変異型を製造する方法が提供される。

40

【 0 0 5 7 】

好ましくは、前記方法において、クマモリシン A S の 1 つまたは変異型をコードする核酸配列および／またはアミノ酸配列が決定される。この目的のために、先行技術からの日常的方法が使用され得る。

50

【0058】

実験および図面

本発明を図面および前述の記載において詳細に例証し説明してきたが、このような図面および記載は例証的または示例的であり、限定的ではないと見なすべきであり；本発明は開示された実施形態に限定されない。開示された実施形態のその他のバリエーションは、図面、開示、および添付の特許請求の範囲の検討から、特許請求された発明の実施において当業者によって理解され達成され得る。いかなる参照符号も、範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0059】

本明細書で開示される全てのアミノ酸配列は、N末端からC末端方向で示されており；本明細書で開示される全ての核酸配列は、5' 3' 方向で示されている。

10

【0060】

1. クマモリシンAS主鎖のアミノ酸配列

配列番号1は、本明細書で使用されるクマモリシンAS主鎖のプロペプチド（プロペプチドが付いた酵素、本明細書ではチモーゲンとも称される）配列を示す。クマモリシンASの野生型配列がN末端M残基を有する一方で、本明細書で使用されるクマモリシンAS主鎖は前記Mを欠いていることを理解することが重要であるが、これは後者が、後に切断されたシグナル配列によって置換されたためである。このようなシグナル配列は、例えばsacBシグナルペプチドMNICKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFである。

20

【0061】

したがって、配列番号1では、プロペプチドはAA2～189（以前のN末端Mは欠損しているが、なおも配列番号の番号付けにおいてAA番号1と見なされる）を含んでなり、酵素はAA190～553を含む：

【化1】

SDMEKPWKE GEEARAVLQG HARAQAPQAV DKGPVAGDER MAVTVVLRRQ RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR EHLKREAA SHGASLDDFA ELRRFADAHG LALDRANVAAGTAVLSPV	120
AINRAFGVEL RHFDPDGSY RSYLGEVTVP ASIAPMIEAV LGEDTRPVAR PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA APTAYTPLDV AQAYQFPEGDGQGCIAII ELGGGYDEAS LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVSV DGASNQPTGD PSGPDGEVEL DIEVAGALAP GAKFAVYFAP NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK PSVVSISWGG PEDSWTSAAI AAMNRAFLDA AALGVTVLAA AGDSGSTDGE	360
QDGGLYHVDFP AASPYVLACG GTRLVASGGR IAQETVWNNDG PDGGATGGGV SRIFPPLPAWQ	420
EHANVPPSAN PGASSGRGVP DLAGNADPAT GYEVVIDGEA TVIGGTSAVA PLFAALVARI	480
NQKLGKAVGY LNPTLYQLPA DVFHIDTEGN NDIANRAQTY QAGPGWDPCT GLGSPIGVRL	540
LQALLPSASQ PQP	553

30

【0062】

プロペプチドは灰色で網掛けされている。E267、D271、およびS467からなる触媒三つ組SED（=Ser/Glu/Asp）は、斜体で示される。本発明者らが、改変／改善された特性をもたらす変異を見いだした位置は、下線で強調される。

40

【0063】

2. リーダー配列およびHisTagが付いたクマモリシンAS主鎖のアミノ酸配列
配列番号2では、sacBリーダー配列は、AA1～29（波状の下線）を含んでなり、プロペプチドの最初のN末端Mを置換する。プロペプチド（灰色の網掛け）はAA30～217を含んでなり、活性化酵素はAA218～581を含んでなり、His標識はAA582～587（二重下線）を含む。

50

【化 2】

MNIKKFAKQA TVLTFTTALL AGGATQAFAS DMEKPWKEGE EARAVLQGHA RAQAPQAVDK	60
GPVAGDERMA VTVVLRRQRA GELAAHVERQ AAIAPHAREH LKREAFAASH GASLDDFAEL	120
RRFADAHGLA LDRANVAAGT AVLSPVDAI NRAFGVELRH FDHPDGSYRS YLGEVTVPAS	180
IAPMIEAVLG LDTRPVARPH FRMQRRAEgg FEARSQAAAP TAYTPLDVAQ AYQFPEGLDG	240
QGQCIAIEL GGGYDEASLA QYFASLGVPQ PQVSVSVDG ASNQPTGDPS GPDGEVELDI	300
EVAGALAPGA KFAVYFAPNT DAGFLDAITT AIHDPTLKPS VVSISWGGPE DSWTSAIAA	360
MNRAFLDAAA LGVTVLAAAG DSGSTDGEQD GLYHVDFPAA SPYVLACGGT RLVASGGRIA	420
QETVWNDGPD GGATGGGCSR IFPLPAWQEH ANVPPSANPG ASSGRGPDL AGNADPATGY	480
EVVIDGEATV IGGTSAVAPL FAALVARINQ KLKGAVGYLN PTLYQLPADV FHDITEGNND	540
IANRAQIYQA GPGWDPCTGL GSPIGVRLQQ ALLPSASQPQ PHHHHHH	587

【0064】

3. プロペプチドを欠く活性化クマモリシンAS主鎖のアミノ酸配列

配列番号3では、活性化クマモリシンAS主鎖酵素がAA1~364で示される：

【化3】

AAPTAAYTPLD VAQAYQFPEG LDGQQCIAI IELGGYDEA SLAQYFASLG VPAPQVSVS	60
VDGASNQPTG DPSGPGEVE LDIEVAGALA PGAKFAVYFA PNTDAGFLDA ITTAIHPTL	120
KPSVVSISWG GPEDSWTSAA IAAMNRAFLD AAALGVTVLA AAGDSGSTDG EQDGLYHVDF	180
PAASPYVLAC GGTRLVASGG RIAQETVWND GDPGGATGGG VSRIFPLPAW QECHANVPPSA	240
NPGASSGRGV PDLAGNADPA TGYEVVIDGE ATVIGGTSAV APLFAALVAR INQKLGKAVG	300
YLNPTLYQLP ADVFHDITEG NNDIANRAQI YQAGPGWDPC TGLGSPIGVRL LQALLPSAS	360
QPQP 364	

【0065】

4. クマモリシンAS野生型のアミノ酸配列

配列番号4は、アリシクロバチルス・センダイエンシス (Alicyclobacillus us sendaiensis) から得られた、クマモリシンAS野生型のプロ酵素（プロペプチドが付いた酵素）配列 (GenBank : AB085855.1) を示す。配列番号4は、本明細書で使用されるクマモリシンAS主鎖の配列を示す配列番号1と異なり、配列番号1は、野生型配列番号4にはなおも存在するN末端Mを欠く。これは、配列番号1では、N末端Mが後後に切断されるsacBシグナル配列によって置換されたためである。配列番号4では、プロペプチドはAA1~189を含んでおり、酵素はAA190~553を含む：

【化4】

MSDMEKPWKE GEEARAVLQG HARAQAPQAV DKGPVAGDER MAVTVVLLRRQ RAGELAAHVE	60
RQAAIAPHAR EHLKREAFAA SHGASLDDFA ELRRFADAHG LALDRANVA GTAVLSGPVD	120
AINRAFGVEL RHFHDPGSY RSYLGTVTVP ASIAPMIEAV LGILDTRPVAR PHFRMQRRAE	180
GGFEARSQAA APTAYTPLDV AQAYQFPEGL DGQGQCIAII ELGGGYDEAS LAQYFASLGV	240
PAPQVVSVS DGASNQPTGD PSGPDGEVEL DIEVAGALAP GAKFAVYFAP NTDAGFLDAI	300
TTAIHDPTLK PSVVSISWGG PEDSWTSAAI AAMNRAFLDA AALGVTVLAA AGDSGSTDGE	360
QDGLYHVDFP AASPYVLACG GTRLVASSGR 1AQETVWNNDG PDGGATGGGV SRIFPLPAWQ	420
EHANVPPSAN PGASSGRGVP DLGNADPAT GYEVVIDGEA TVIGGTSAVA PLFAALVARI	480
NQKLGKAVGY LNPTLYQLPA DVFHLDITEGN NDIANRAQIY QAGPGWDPCT GLGSPIGVRL	540
LQALLPSASQ PQP	553

ここでもプロペプチドは灰色で網掛けされている。E 2 6 7、D 2 7 1、およびS 4 6 7からなる触媒三つ組S E D (= S e r / G l u / A s p)は、斜体で示される。

【実施例】

【0066】

実施例1：プロテアーゼ活性試験

プロテアーゼ活性アッセイをマイクロタイタープレート内で実施した。

a) AAPFアッセイ 96 ウエルフォルメート

アッセイ緩衝液：200 mMの酢酸ナトリウム、1 mMのCaCl₂、pH 3の0.01%トリトンX-100、実験に応じて

基質原液：無水DMSO中の100 mM

基質使用液：アッセイ緩衝液で1:50に希釈された基質原液

【0067】

実施：50 μLの希釈サンプルをNunc 96 透明平底プレートのウェル内に装填する。サンプルの体積活性に対応する0.01%トリトン-X100を含むように、水で希釈する。50 μLの基質使用液を加えて、反応を開始させる。酵素活性の尺度として410 nmにおける吸着の増加をモニターすることによって、37 °Cで動態を測定する。活性は、参考法によって測定された既知のタンパク質分解活性を有する主鎖の標準酵素製剤を用いて、検量線を構築することによって計算した。

【0068】

異なるpH値でプロテアーゼ活性をアッセイするために、以下の緩衝液を使用した：各200 mMのpH 2.0~3.0のグリシン/HCL、pH 3.0~6.0のクエン酸三ナトリウム/クエン酸、およびpH 6.0~7.5のトリス/マレイン酸。

【0069】

b) I T 50

IT 50は、上述の条件下で活性の50%が不活性化される温度を定義する。同等ではないが、それは、例えば、ペレット化条件または洗剤用途における条件、食器洗いまたは布帛または硬質表面の洗浄、およびその他の技術的用途などの用途における、熱安定性の尺度である。

【0070】

予測条件下における酵素変異型のスクリーニングは必須である。本明細書に記載されるもののようなプロテアーゼでは、これもまた本明細書に記載される方法による熱的により安定な変異型のスクリーニングは、プロテアーゼの自己加水分解によって影響され得る。欧洲特許出願16176044号明細書の実施例9に既に記載されているように、プロテアーゼが活性である条件下で、より高い熱安定性を有する変異型についてスクリーニングすると、熱不活性化および自己加水分解の混合効果の結果として、多数の偽陽性がもたらされる。同じ出願は、以下に記載する方法で、不活性酵素チモーゲンの形態の酵素および酵

10

20

30

40

50

素変異型の熱安定性についての試験を実施することによって、本明細書に記載のクラスの酸性プロテアーゼの場合のように、小分子可逆酵素阻害剤の不在下でこの問題を回避することを教示する。

【0071】

アッセイ緩衝剤：50 mMのリン酸ナトリウム、0.25 mMのCaCl₂、pH 6.5
800 mMのグリシン/HCl、pH 2.8

【0072】

熱不活性化実施：サンプルをリン酸カリウム緩衝液中で体積活性に対応して希釈した。最終溶液のpHがpH 6.3を超えていることを確認した。PCR装置の温度勾配の方向に従って、サンプルを1ウェルあたり20 μLの複製で384ウェルPCRプレートに移し入れた。プレートを接着剤またはホットメルトのカバー荷物で密封し、予想されるIT50値付近で±12°の温度勾配を有する熱勾配サイクラー上で、10分間インキュベートした。サンプルを8°に冷却してから、以下のようにAAPF-pNAを用いてサンプルの残留活性を測定した。それぞれ15 μLのサンプルを温度インキュベーションプレートから384ウェルグレイナー透明平底PS-マイクロプレートに移し入れ、9 μLのグリシン緩衝液を添加し、プロテアーゼを37°で1時間のインキュベーション中に活性化した。プロテアーゼの活性化後、24 μLのAAPF-pNA溶液(0.01% Triton-X 100を含む水中の2 mM AAPF-pNA)を添加することによってアッセイを開始し、37°での動態を追跡することによって活性を測定した。不活性化温度における残留活性の正規化実験データを4パラメータロジスティクス関数に当てはめ、IT50を評価した。
10

【0073】

c) プロペプチドなしの活性化酵素タンパク質のIT50：

熱不活性化実施前の酵素活性化。サンプルを、2b)に記載のようにグリシン緩衝液pH 2.8中で体積活性に対応して希釈し、pHがpH 4.0以下であることを確認した。サンプルを37°で1時間のインキュベーションによって活性化した。インキュベーション後、サンプルを50 mMリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0で1:3に希釈することによって、pHが7.0を超えるようにした。活性化酵素タンパク質の熱不活性化の実施。PCR装置の温度勾配の方向に従って、活性化酵素タンパク質のアリコートを1ウェルあたり20 μLの複製で384ウェルPCRプレートに移し入れた。プレートを接着剤またはホットメルトのカバー荷物で密封し、予想されるIT50値付近で±12°の温度勾配を有する熱勾配サイクラー上で、10分間インキュベートした。サンプルを8°に冷却してから、以下のようにAAPF-pNAを用いてサンプルの残留活性を測定した。それぞれ15 μLのサンプルを温度インキュベーションプレートから384ウェルグレイナー透明平底PS-マイクロプレートに移し入れ、9 μLのグリシン/HCl緩衝液を加えてpHを3.0に調節した。24 μLのAAPF-pNA溶液(0.01% Triton-X 100を含む水中の2 mM AAPF-pNA)を添加することによってアッセイを開始し、37°での動態を追跡することによって活性を測定した。不活性化温度における残留活性の正規化実験データを4パラメータロジスティクス関数に当てはめ、IT50を評価した。
30

【0074】

d) pHプロファイル - 活性化酵素タンパク質

酵素タンパク質を含有する未希釈細菌上清を1MのHClでpH 4に滴定し、酵素を37°で60分間活性化した。20 μLのサンプルをpH 1.8~7.0の200 μLのブリトン・ロビンソン緩衝液に添加した(NaClで15 mM/cmの導電率に調節)。次に20 μLを384ウェルグレイナー平底PS-マイクロプレートに、20 μLの基質溶液(0.01% Triton-X 100を含む水中の2 mM AAPF-pNA)と共に移し入れ、実施例1a)に記載のように410 nmおよび37°で動態をモニターすることによって活性を測定した。各動態実験は四連で行った。

【0075】

10

20

30

40

50

e) pH / ペプシン抵抗性

酵素タンパク質を含有する未希釈細菌上清を1MのHClでpH2.5に滴定した。次に90μlをNunc96ウェル透明平底マイクロタイプレートに移し入れた。pH2.5緩衝液中の250μg/mLペプシントック溶液(アッセイにおける最終濃度25μg/mL)またはpH2.5緩衝液の10μlを各ウェルに添加し、次に37℃で30分間インキュベートした。最後に、5μlの100μMペプスタチンA溶液(最終濃度5μM)を各ウェルに添加し、ペプシン反応を停止させた。25μlのサンプルを新しいNunc96ウェル透明平底マイクロタイプレート内の175μlのグリシン/HCl緩衝液pH3.0に移し入れた。次に20μLを384-ウェルグレイナー平底PS-マイクロプレートに、20μlの基質溶液(0.01%トリトン-X100を含む水中の2mMのAAPF-pNA)と共に移し入れ、実施例1a)に記載のように410nmおよび37℃で動態をモニターすることによって活性を測定した。各動態実験は四連で行った。

【0076】

f) 導電率依存性

Nunc96ウェル透明平底マイクロタイプレート内において、20μlの未希釈細菌上清を180μlのグリシン/HCl緩衝液pH3.0で希釈し、NaClで2、4、6、10、20、30、40、50mS/cmの伝導率に調節した。サンプルを37℃で20分間インキュベートし、次に20μLのサンプルを384ウェルグレイナー平底PS-マイクロプレートに、20μlの基質溶液(0.01% Triton-X100を含む水中2mMのAAPF-pNA)と共に移し入れ、実施例1a)に記載のように410nmおよび37℃で動態をモニターすることによって活性を測定した。各動態実験は四連で行った。

【0077】

g) BBI / KTI 加水分解 - 機能的トリプシンアッセイ

ボーマン・バークおよびクニツツ型阻害剤(BBI / KTI)は、マメ科植物や穀物の種子に広く分布している、セリンプロテアーゼの強力な阻害剤である。アッセイ原理は、プロテアーゼ活性によるBBI / KTIのタンパク質分解が、阻害剤なしで、ベンジル-アルギニン-pNA(Bz-R-pNA)基質上の天然トリプシン活性を回復することである。酵素タンパク質を含有する90μLの細菌上清をグリシン/HCl緩衝液でpH3.0に希釈し、次に37℃で30分間インキュベートした。次に20μlのサンプルを20μlの阻害剤溶液(グリシン緩衝液pH3.0中で希釈された、KTI:8μg/mL; BBI:16μg/mL; KTI/BBI:4/8μg/mL)に混合し、37℃で60分間さらにインキュベートした。15μlのサンプルを384ウェルグレイナー平底PS-マイクロプレートに移し入れ、次にpH8.0の15μlトリプシン溶液(最終トリプシン濃度1μg/mL; 最終pH7.0またはpH7.5)を各ウェルに添加し、プレートを37℃で10分間インキュベートした。最後に、30μLの基質溶液(0.01% Triton-X100を含む水中の2mMのBz-R-pNA)を各ウェルに添加し、実施例1a)に記載のように410nmおよび37℃で動態をモニターすることによって活性を測定した。各動態実験は四連で行った。

【0078】

実施例2：遺伝的多様性の創製

初期の遺伝的多様性は、配列番号1の活性酵素コア配列の各位置を無作為化することによって導入した。Green & Sambrook(eds), Molecular Cloning, 4th edition, CSHLに記載されるような変異誘発法およびCawdwell and Joyce(PCR Methods Appl. 3 [1994], 136-140)で開示されるような適切な変異誘発PCR法を用いて、大腸菌(E. coli) / バチルス属(Bacillus)シャトルベクター上に担持されている遺伝子に、変異体酵素単一部位飽和ライブラリーを導入した。バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis)における異種発現後にプロテアーゼ酵素変異型を特徴付け、表現型的に最適化された変異型を実施例3に概説されるスクリーニング手順によって選

10

20

30

40

50

択した。

【0079】

一般に、酵素のようなタンパク質を変異誘発し、そのメンバーが変化した特徴を有してもよい変異タンパク質ライブラリーを得る方法は十分に確立されている。タンパク質を変異誘発する方法は、例えば、その内容が使用可能化の目的で参照により本明細書に援用される、Hsieh & Vaissila (2013) に記載されるような部位特異的変異誘発などを包含する。

【0080】

そのような方法は時に、すなわち確立されたライブラリーが次に特定の特徴についてスクリーニングされる場合、「指向性進化」と称される。その内容が使用可能化の目的で参照により本明細書に援用されるPacker & Liu (2015) が、各方法論の概説を提供する。

10

【0081】

実施例3：熱安定性が増大した酵素変異型の表現型スクリーニング

初期段階で単一部位飽和ライブラリーの形態で、またはその後の段階で組換えライブラリーまたは別個のクローンの形態で、生じた遺伝的多様性は、完全に自動化されたロボットワークステーションにおいてハイスループットでそれらを実行するために必要な適応を加えて、実施例1b) に記載の方法を用いて、最適化された表現型、すなわち熱安定性が増大した変異型についてスクリーニングした。これらは主にインキュベーション時間、体積、基質における適応であり、主な適応は、温度勾配上の熱不活性化プロファイルによってではなく、遺伝的多様性の平均から最適化変異型を区別するために設定された温度である单一温度でのインキュベーション後の残留活性によって、最適化変異型を選択することであった。2個の位置、3個の位置、n個の位置をはじめとする、1つまたは複数のアミノ酸位置が配列番号2と異なる、プロテアーゼ変異型を誘導した。本出願の要求を満たすために、本明細書に記載の手順の適切な反復ラウンドを実施した。

20

【0082】

実施例4：

使用された主鎖と比較してIT50を増加させる、以下の個々の変異を同定した。IT50を上記のように分析し、使用される主鎖(=N末端メチオニンが欠如した野生型)のIT50と比較し、対応するIT50によって変異型を特徴付けた。主鎖は、チモーゲンとして79.6 + / - 0.4 (n = 46) のIT50、および活性化酵素として59 + / - 1 (n = 10) のIT50を有する。

30

【0083】

40

50

【表 1】

位置	変異	Δ IT50 チモーゲン	Δ IT50 活性化酵素
A190	D	1.5	0.8
T196	S	0.7	0.3
D199	E	0.5	1.0
Q202	D	0.4	-0.3
I219	L	1.1	0.8
E228	Q	0.7	0.1
A229	W	0.2	n. d.
S230	D	2.8	-0.8
A242	S	0.3	-0.4
Q244	C	0.5	-3.6
Q244	G	0.7	1.5
D251	S	0.8	-0.3
S262	C	0.9	-0.3
G266	A	1.7	0.0
E269	M	2.4	-0.1
E269	T	2.6	-0.1
E269	C	2.1	-1.1
E269	H	4.0	-0.5
E269	Q	2.0	-1.4
V274	I	1.8	1.3
G281	R	2.0	5.4
K283	L	0.6	-0.2
Y287	K	0.2	5.2
N291	T	0.7	0.5
N291	S	-0.2	1.0
D293	Y	0.8	1.0
D293	F	1.1	1.3
L297	T	1.2	0.2
T301	S	0.6	7.6
T301	C	0.8	1.0
T301	M	0.7	0.5
H305	F	0.4	-0.4
H305	W	0.1	-2.7
D306	S	0.3	-0.5
T308	C	0.5	-0.8
V314	M	0.6	0.3
V314	L	2.5	0.7
S315P	P	0.8	3.0

10

20

30

40

50

G320	A	3.0	-0.2
G320	Q	3.6	1.5
G320	S	1.0	0.6
S324	L	0.1	1.3
S324	R	0.7	2.0
W325	K	-0.3	2.7
T326	R	1.7	1.2
T326	W	0.9	0.2
T326	L	1.7	1.6
T326	K	1.9	1.2
S327	F	1.2	0.6
S327	L	1.5	1.1
S327	W	2.0	1.0
A328	W	0.6	0.5
A328	D	1.3	1.1
A328	R	1.1	0.1
A328	Y	1.5	0.8
A329	Q	2.8	0.2
A329	H	2.1	0.3
A329	T	1.0	0.9
I330	L	1.1	0.8
A331	F	2.0	0.6
A331	Y	1.3	0.6
M333	I	2.5	-0.7
M333	Y	0.3	1.0
M333	L	2.4	-1.0
L338	R	-0.5	1.5
A342	R	-0.6	3.9
A351	S	1.3	-0.9
S354	E	1.6	3.3
S354	Q	2.0	0.3
D358	G	-2.0	0.7
E360	L	1.4	3.1
E360	V	2.4	2.9
E360	C	2.3	2.3
Q361	C	0.9	1.5
Q361	L	0.2	0.1
A372	S	2.4	-0.7
A378	G	1.5	1.5
A386	I	3.6	0.5
A386	L	2.7	1.3

10

20

30

40

50

A386	V	2. 1	1. 2
A386	M	1. 7	0. 0
G388	C	0. 6	-3. 5
I391	W	1. 7	0. 6
A392	V	2. 8	0. 7
A392	L	3. 0	0. 9
A392	I	3. 7	2. 4
A392	M	2. 3	2. 0
Q393	S	0. 9	0. 2
D399	S	2. 3	2. 1
D402	E	0. 6	1. 7
R412	Q	0. 5	2. 4
R412	M	1. 5	2. 9
R412	E	1. 8	4. 4
R412	D	0. 4	3. 5
A418	W	2. 8	0. 2
E421	R	1. 0	0. 5
A423	V	1. 1	0. 8
A433	G	1. 4	1. 9
S434	G	1. 9	0. 7
S435	I	1. 7	1. 6
S435	R	1. 8	0. 5
S435	T	2. 5	4. 7
S435	V	1. 6	2. 1
L442	W	1. 4	0. 3
L442	W	-0. 7	2. 4
D447	S	4. 0	3. 2
D447	C	3. 0	1. 4
D447	A	1. 6	1. 3
A449	Y	1. 7	0. 7
A449	L	0. 8	0. 3
A449	M	1. 9	-0. 9
A449	E	1. 6	0. 4
A449	N	1. 6	3. 3
E453	W	2. 4	0. 0
E453	Y	2. 6	0. 7
E453	F	1. 1	-0. 5
V455	I	1. 2	0. 3
V455	L	1. 8	0. 7
E459	W	0. 9	-0. 3
A460	W	2. 6	0. 5

10

20

30

40

50

A460	R	2.0	-0.6
T461	V	1.2	0.0
T461	C	1.2	0.6
A470	V	0.6	2.3
A475	V	-0.3	3.7
A478	L	1.2	0.2
K483	A	1.5	0.7
A487	Q	0.0	1.6
Y490	W	1.5	0.3
Q497	Y	1.8	1.2
Q497	M	0.8	0.8
Q497	D	0.3	1.0
Q497	R	0.6	0.2
V502	C	2.3	1.9
V502	T	1.5	1.6
T507	L	0.2	1.0
N510	H	2.4	7.9
A514	T	2.2	1.3
A514	Y	1.3	-1.2
A514	D	1.5	1.2
A514	S	2.4	0.5
N515	G	2.0	-0.2
R516	L	0.5	1.2
R516	E	1.1	3.5
R516	I	1.2	4.3
A517	T	1.3	3.9
A517	S	0.3	7.7
Q518	G	1.6	4.1
L540	V	0.7	0.5
Q542	H	0.9	-0.2
Q542	D	1.1	0.4
Q542	S	0.4	0.5
A548	S	0.2	n. d.
P551	N	0.9	-0.4
P551	R	0.6	0.3
P553	K	0.5	0.3
P553	L	0.8	0.2
R166	I	1.0	0.7
D265	T	1.7	n. d.

表1: 配列番号1に対するクマモリシンASの単一アミノ酸置換、
およびチモーゲン主鎖および活性化酵素と比較したそれらのΔIT50。

10

20

30

40

【0084】

表3に示されるようにかなりの数の別個のクローニングおよびコンビナトリアルクローニングがこれらの位置に置換を有し、その2つ以上の残基が同時に変異した場合、熱安定化に相乗効果がもたらされる。

【0085】

実施例5:

部位特異的変異誘発を通じ、選択された別個の変異をクマモリシンAS野生型配列に導入することによって、別個の変異型を創成した。当該技術分野で公知の適切な突然変異誘発PCR法、およびGreen & Sambrook (eds), Molecular C

50

loning, 4th edition, CSHLに記載されるような標準的なクローニング技術を用いた。バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) における異種発現、および上述の方法を用いた表現型的分析後に、プロテアーゼ酵素変異型を特徴付けた。

【0086】

Yolov and Shabarov (1990) に記載されるような周知のPCR法によって、そして Green & Sambrook (eds), Molecular Cloning, 4th edition, CSHLに記載されるような標準的なクローニング技術を用いて、上記の実施例で同定され表1に概説される変異を組み合わせたコンビナトリアルライブラリーを作成した。実施例3に記載されるように、コンビナトリアルライブラリーを最適化変異型についてスクリーニングした。10

【0087】

実施例6：

表1からの2つ以上の変異を含む別個のクローンおよびコンビナトリアルクローンを同定し、IT50を上記のように分析して使用された主鎖のIT50 (=N末端メチオニンが欠如する野生型)と比較して、対応するIT50によって変異型を特徴付けた。主鎖のIT50は変異型と同じ実験で判定されたため、測定された主鎖のIT50は平均値とわずかに異なり得る。結果は以下の表2aに示される(図3は結果を図の形式で示す)：

【0088】

20

30

40

50

【表 2 a】

#	別個のクローンおよび選択されたコンビナトリアルクローンにおける変異						
1					E360L		A392V
2			T301S		E360V	A386I	
3					E360L	A386I	A392V
4					E360L		A392I
5					E360V	A386I	A392I
6			T301S	G320A	E360L		
7			T301S		E360L	A386I	A392I
8			T301S		E360V		A392I
9					E360V		A392V
10					E360L	A386I	
11			T301S		E360L		A392I
12			T301S		E360L	A386I	
13					E360L	A386I	A392I
14					E360V		A392V
15					E360L	A386I	
16			T301S		E360L		
17			T301S		E360L		A392V
18			T301S		E360V	A386I	
19					E360V	A386I	
20			T301S		E360V		A392I
21	D199E				E360V		
22					E360L	A386I	
23					E360L	A386I	A392I
24					E360V		A392V
25		E269T			E360V	A386I	
26			T301S		E360L		A392V
27					E360L		A392V
28					E360V		A392I
29			T301S		E360L		
30					E360L	A386I	A392I
31			T301S		E360L	A386I	A392V
32					E360V		A392I
33			T301S		E360L		A392I
34					E360V		
35					E360L	A386I	A392V
36			T301S		E360V	A386I	
37					E360L	A386I	
38			T301S		E360L	A386I	A392V
39			T301S		E360V		A392V
40			T301S		E360L	A386I	A392V

表2a: 表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、
および野生型と比較したそれらのΔIT50

40

50

#	別個のクローンおよび選択されたコンピナトリアルクローンにおける変異						
1		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
2		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
3		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
4		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
5		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
6		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
7		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
8		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
9		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
10		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
11		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
12		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
13		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
14		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
15		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
16		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
17		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
18		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
19		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
20		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
21		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
22		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
23		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
24		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
25		D447S	A449Y			V502C	N510H
26		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
27		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
28		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
29		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
30		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
31		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
32		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
33		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
34		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
35		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
36		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
37		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
38		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
39		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
40		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H

表2a続き：表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、
および野生型と比較したそれらのΔIT50

10

20

30

40

50

#	別個のクローンおよび選択された コンビナトリアルクローンにおける変異			IT50 チモーゲン	Δ IT50 チモーゲン	IT50 活性酵素	Δ IT50 活性酵素
1	A517T			95,5	17,0	90,1	30,6
2	A517T			>95	>17	90,1	30,6
3	A517T			99,5	21,0	89,2	29,7
4	A517T			97,3	18,8	89,1	29,6
5	A517T			99,4	20,9	88,8	29,3
6	A517T			96,4	17,9	88,6	29,1
7	A517T			96,4	17,9	88,5	29,0
8	A517T			99,1	20,6	88,5	29,0
9	A517T	Q518G		97,8	19,3	88,5	29,0
10	A517T			98,4	19,9	88,4	28,9
11	A517T			97,7	19,2	88,4	28,9
12	A517T			98,6	20,1	88,3	28,8
13	A517T			99,5	21,0	88,2	28,7
14	A517T			>95	>17	88,2	28,7
15	A517T			98,3	19,8	88,1	28,6
16	A517T			95,8	17,3	88,0	28,5
17	A517T			97,2	18,7	88,0	28,5
18	A517T			97,6	19,1	87,8	28,3
19	A517T			98,5	20,0	87,8	28,3
20	A517T	Q518G		97,0	18,5	87,8	28,3
21	A517T			>95	>17	87,8	28,3
22	A517T			>95	>17	87,8	28,3
23	A517T			97,1	18,6	87,8	28,3
24	A517T			99,0	20,5	87,8	28,3
25	A517T			94,0	16,0	87,7	27,0
26	A517T			97,4	18,9	87,7	28,2
27	A517T	Q518G		98,0	19,5	87,7	28,2
28	A517T			>95	>17	87,6	28,1
29	A517T			96,5	18,0	87,6	28,1
30	A517T			99,0	20,2	87,5	28,0
31	A517T			98,1	19,6	87,5	28,0
32	A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
33	A517T	Q518G		97,1	18,6	87,4	27,9
34	A517T			95,6	17,1	87,4	27,9
35	A517T			98,2	19,7	87,4	27,9
36	A517T			98,5	20,0	87,4	27,9
37	A517T	Q518G		97,9	19,4	87,4	27,9
38	A517T			>95	>17	87,3	27,8
39	A517T			96,2	17,7	87,2	27,7
40	A517T	Q518G		>95	>17	87,1	27,6

表2a続き：表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、
および野生型と比較したそれらのΔIT50

10

20

30

40

50

#	別個のクローンおよび選択されたコンピナトリアルクローンにおける変異						
41				T301S		E360L	A386I
42						E360V	A392I
43						E360V	A392I
44						E360L	A392V
45	D199E					E360V	
46				T301S		E360L	A392I
47	D199E	G266A				E360V	A392V
48		G266A				E360V	A392V
49						E360L	A392I
50				T301S		E360V	A386I
51						E360L	A386I
52						E360L	A386I
53	D199E	G266A				E360V	A392V
54						E360V	A386I
55	D199E	G266A	E269H			E360V	A392L
56						E360V	A386I
57						E360V	A392V
58				T301S		E360L	A392I
59	D199E					E360V	A386I
60						E360V	A386I
61	D199E					E360V	A386I
62						E360V	A386I
63	D199E	G266A		T301S		E360L	
64	D199E	G266A	E269T		G320A	E360V	A392L
65						E360L	A386I
66		G266A				E360V	A392V
67						E360L	A386I
68	D199E					E360V	
69	D199E					E360V	A386I
70	D199E					E360L	
71	D199E	G266A	E269H	T301S		E360L	
72	D199E					E360L	
73	D199E	G266A				E360V	
74	D199E	G266A	E269H			E360V	A392L
75	D199E					E360V	
76				T301S		E360L	A392I
77	D199E					E360V	
78	D199E					E360L	
79						E360V	A386I

10

20

30

表2a続き：表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、
および野生型と比較したそれらの $\Delta IT50$

40

50

#	別個のクローンおよび選択されたコンビナトリアルクローンにおける変異						
41		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
42		D447S	A449Y		A460W		N510H
43		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
44		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
45		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
46		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
47		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
48	R412E	D447S	A449Y	E453W	A460W		
49		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
50		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
51		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
52		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
53		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
54		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
55		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
56		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
57		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
58		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
59		D447S	A449Y			V502C	N510H
60		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
61		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
62		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
63		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
64		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
65		D447S	A449Y			V502C	N510H
66		D447S	A449Y	E453W	A460W		
67		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
68		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
69		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
70		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
71		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
72		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
73		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
74		D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H
75		D447S	A449Y		A460W	V502C	N510H
76		D447S	A449Y	E453W	A460W		N510H
77		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
78		D447S	A449Y	E453W		V502C	N510H
79		D447S	A449Y			V502C	N510H

表2a続き：表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、
および野生型と比較したそれらのΔIT50

10

20

30

40

50

#	別個のクローンおよび選択されたコンピナトリアルクローンにおける変異			IT50 チモーゲン	Δ IT50 チモーゲン	IT50 活性酵素	Δ IT50 活性酵素	
41		A517T	Q518G		98,4	19,9	87,0	27,5
42		A517T			92,7	14,2	86,9	27,4
43		A517T			>95	>17	86,9	27,4
44		A517T			96,9	18,4	86,8	27,3
45		A517T			93,5	15,1	86,7	26,0
46		A517T	Q518G		97,4	18,9	86,7	27,2
47		A517T	Q518G		101,5	23,0	86,6	27,1
48		A517T	Q518G		100,3	21,8	86,6	27,1
49		A517T	Q518G		>95	>17	86,6	27,1
50		A517T	Q518G		94,7	16,2	86,5	27,0
51		A517T			>95	>17	86,5	27,0
52		A517T			>95	>17	86,4	26,9
53		A517T	Q518G	P553K	102,2	23,7	86,4	26,9
54		A517T	Q518G		>95	>17	86,4	26,9
55		A517T	Q518G	P553K	101,7	23,2	86,3	26,8
56		A517T			93,1	14,6	86,2	27,0
57		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
58		A517T	Q518G		>95	>17	86,2	26,7
59		A517T			92,2	14,1	86,1	25,4
60		A517T	Q518G		97,2	18,7	86,0	26,5
61		A517T			93,2	14,9	85,9	26,2
62		A517T			92,4	13,9	85,9	26,6
63		A517T			95,7	17,2	85,8	26,3
64		A517T	Q518G	P553K	100,1	21,6	85,8	26,8
65		A517T			94,0	15,9	85,8	25,1
66	R516I	A517T	Q518G		100,1	21,6	85,7	26,2
67		A517T			>95	>17	85,7	26,2
68		A517T	Q518G		>95	>17	85,7	26,2
69		A517T			94,9	16,6	85,4	25,7
70		A517T			-10,0	-10,0	85,4	25,9
71		A517T			95,8	17,3	85,4	25,9
72		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
73		A517T	Q518G		>95	>17	85,4	25,9
74		A517T	Q518G		100,4	21,9	85,3	25,8
75		A517T			>95	>17	85,3	25,8
76		A517T	Q518G		95,1	16,6	85,2	25,7
77		A517T			94,9	16,4	85,1	25,5
78		A517T			>95	>17	85,1	25,6
79		A517T			93,0	15,0	85,0	25,7

表2a続き：表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン、および野生型と比較したそれらのΔIT50

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

表2a、2b、および4の別個のクローンの得られたIT50は、例えば表6に示されるように、別個のクローンに含まれる個々の変異のIT50の算術合計に必ずしも相当しないことを理解することが重要である。

【 0 0 9 0 】

表2aおよび2bに示されるように、チモーゲンに対して最も高い安定化効果を有するコンピナトリアルクローンから分かるように、いくつかの変異は、活性化酵素と比較してチモーゲンにおいて異なる効果を有することを理解することがさらに重要である。

【 0 0 9 1 】

50

表2 bは、表2 aに示されていないチモーゲンのIT50に基づく、クローンおよび変異を示す。(図4は結果を図の形式で示す)。

【0092】

【表2 b】

#	別個のクローンおよび選択されたコンビナトリアルクローンにおける変異														全置換	IT50 チモーゲン	IT50 活性化酵素				
	E360V	A392V	D447S	A449Y	E453W	V502C	N510H	A514Y	A517T	O518G	P553K	12	100.3	84.42							
1	D199E				E360V	A392V	D447S	A449Y	E453W	V502C	N510H	A514Y	A517T	O518G	P553K	12	96.36	84.31			
2	D199E				E360L	A386I	D447S	A449Y	E453W	V502C	N510H	A514Y	A517T	O518G	P553K	12	96.61	83.73			
3		T301S			E360L	A386I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H	A514T	A517T	O518G		97.93	82.38			
4	D199E				G265A	E269T			A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H	A514Y	A517T	O518G	12	97.41	81.03
5					G265A	E269T			A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H	A514Y	A517T	O518G	12	96.27	80.3
6					G265A	E269T	G320A		E360L	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	11	95.99	74.55
7					G265A	E269T			A386I	A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	95.99	74.55
8					G265A	E269T	G320A		A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	95.99	74.55	
9					G265A	E269H			A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	11	99.78	74.16	
10					G265A	E269H			A386I	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	95.86	73.37
11					G265A	E269Q	G320A			A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.55	72.94
12					G265A	E269H	G320A			A392L	D447S	A449M	A453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.01	72.85
13					G265A	E269H	G320A			A392L	D447S	A449M	A453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.41	72.8
14					G265H	E269H				A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	96.45	72.74
15					G265H	E269H	G320A			A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	95.86	73.37
16					G265A	E269Q	G320A			A392V	D447S	A449M	A453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.55	72.94
17					G265A	E269H	G320A			A392V	D447S	A449M	A453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.01	72.85
18					G265A	E269H	G320A			A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	96.57	71.84
19					G265A	E269T	G320A			A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	96.01	71.51
20					G265A	E269H	G320A			A392L	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	10	96.02	71.22
21					G265A	E269H	G320A	A392Q	A392V	D447C	A449M	E453W	A460W		A514Y	A517T	O518G	9	95.88	69.68	
																		12	96.08	69.08	

表2b: チモーゲンのIT50および野生型と比較したそれらのIT50によって格付けされた、表1からの変異の選択された組み合わせを含んでなる別個のクローン。

【0093】

いくつかの変異において、安定化効果がチモーゲンと比較して活性化酵素において減少するという知見は、理論に束縛されることなく、プロペプチドへの近接性およびプロペプチドと酵素コアとの間の潜在的に最適化された相互作用によって説明され得る。

【0094】

したがって、チモーゲンまたは活性酵素の安定化において最も高い効果を有する変異が組

み合わされるかどうかの決定は、用途または貯蔵条件に左右される。

【 0 0 9 5 】

熱処理前の pH が低い用途、すなわち pH が極めて低いプレミックスは、活性化酵素を最も安定化させる単一変異の組み合わせを有する変異型酵素の使用を要求するのに対して、熱処理前のより高い pH 状態は、活性化酵素よりもさらにチモーゲンを安定化する変異を組み合わせられるようにし、その結果、プロペプチドの熱的安定化効果もまた利用できるようにし、それはこの場合、変異の影響に対して相加的である。

【 0 0 9 6 】

さらに、絶対的な安定化効果が最も高いわけではないが、双方の酵素形態、すなわちチモーゲンおよび活性化酵素を同様に安定化する変異を組み合わせることは、道理にかなっているかもしれない。

10

【 0 0 9 7 】

以下の表 3 および図 1において、いくつかの好ましい置換が示される。好ましいプロテアーゼ変異型は、配列番号 1 または 4 に記載のクマモリシン A S と比較して、これらのアミノ酸置換の少なくとも 1 つを有する。これらの置換が好ましい理由は、a) それらが単独の置換として特定の I T 5 0 (チモーゲンまたは活性化酵素) を付与し、または b) それらが好ましいコンビナトリアル変異型および別個の変異型においてしばしば生じるためである。

【 0 0 9 8 】

20

30

40

50

【表 3】

位置	変異	ΔIT50 チモーゲン	ΔIT50 活性化酵素	上位のコンビナトリアルおよび別個の 変異型における出現頻度	
				活性化酵素 ($\text{IT50} > 80^\circ\text{C}$) (測定された 全変異型: 146)	チモーゲン ($\text{IT50} > 85^\circ\text{C}$) (測定された 全変異型: 554)
D447	S	4.0	3.2	138	331
	C	3.0	1.4		33
	A	1.6	1.3		
A449	Y	1.7	0.7	138	303
	N	1.6	3.3		
	E	1.6	0.4		7
	L	0.8	0.3		
	M	1.9	-0.9		42
A517	T	1.3	3.9	138	176
	S	0.3	7.7		79
N510	H	2.4	7.9	125	175
V502	C	2.3	1.9	118	164
E453	W	2.4	0.0	106	295
	Y	2.6	0.7		33
	F	1.1	-0.5		
E360	L	1.4	3.1	62	118
	V	2.4	2.9	74	93
	C	2.3	2.3		49
A514	T	2.2	1.3	11	52
	Y	1.3	-1.2	87	217
	D	1.5	1.2		
	S	2.4	0.5		
A460	W	2.6	0.5	85	300
	R	2.0	-0.6		15
A392	V	2.8	0.7	38	133
	L	3.0	0.9	4	75
	I	3.7	2.4	22	18
	M	2.3	2.0		
A386	I	3.6	0.5	55	164
	L	2.7	1.3		1
	V	2.1	1.2		4
	M	1.7	0.0		
T301	S	0.6	7.6	43	70
	C	0.8	1.0	1	5
	M	0.7	0.5		

10

20

30

40

50

D199	E	0.5	1.0	43	30
Q518	G	1.6	4.1	36	250
G266	A	1.7	0.0	33	152
P553	K	0.5	0.3	20	6
E269	M	2.4	-0.1		
	T	2.6	-0.1	5	84
	C	2.1	-1.2		2
	H	4.0	-0.5	6	180
	Q	2.0	-1.4		10
R412	Q	0.5	2.4	1	75
	M	1.5	2.9	1	1
	E	1.8	4.4	1	1
	D	0.4	3.5	1	1
S435	I	1.7	1.6	1	3
	R	1.8	0.5		9
	T	2.5	4.7	1	1
	V	1.6	2.1	1	1
G320	A	3.0	-0.2	2	186
	Q	3.6	1.5		46
	S	1.0	0.6		35
T326	R	1.7	1.2		11
	W	0.9	0.2		
	L	1.7	1.6	1	6
	K	1.9	1.2	1	1
T461	V	1.2	0.0	1	26
	C	1.2	0.6		48
Q244	C	0.5	-3.6		46
	G	0.7	1.5	1	1
D293	Y	0.8	1.0	1	24
	F	1.1	1.3		
A487	Q	0.0	1.6	1	24
V274	I	1.8	1.3		104
A372	S	2.4	-0.7		82
K283	L	0.6	-0.2		68
T308	C	0.5	-0.8		30
A418	W	2.8	0.2		12
	H	1.1	1.3		16
I391	W	1.7	0.6		21
A423	V	1.1	0.8		18
A331	F	2.0	0.6		7
	Y	1.3	0.6		9

10

20

30

40

50

S327	F	1. 2	0. 6		
	L	1. 5	1. 1		16
	W	2. 0	1. 0		
I219	L	1. 1	0. 8		16
M333	I	2. 5	-0. 7		16
A329	Q	2. 8	0. 2		5
	H	2. 1	0. 3		3
	T	1. 0	0. 9		7
N515	G	2. 0	-0. 2		13
A378	G	1. 5	1. 5		12
S434	G	1. 9	0. 7		12
E421	R	1. 0	0. 5	1	11
A433	G	1. 4	1. 9		11
S230	D	2. 8	-0. 8		9
Q393	S	0. 9	0. 2		3
D399	S	2. 3	2. 1		4
Y490	W	1. 5	0. 3		2
G281	R	2. 0	5. 4		
Y287	K	0. 2	5. 2		
R516	I	1. 2	4. 3		
	E	1. 1	3. 5		
	L	0. 5	1. 2		
A475	V	-0. 3	3. 7		
S354	E	1. 6	3. 3		
S315P	P	0. 8	3. 0		
W325	K	-0. 3	2. 7		
L442	W	-0. 7	2. 4		
	W	1. 4	0. 3		
A470	V	0. 6	2. 3		
S324	R	0. 7	2. 0		
S324	L	0. 1	1. 3		
Q361	C	0. 9	1. 5		
Q361	L	0. 2	0. 1		
A190	D	1. 5	0. 8		
T196	S	0. 7	0. 3		
Q202	D	0. 4	-0. 3		
E228	Q	0. 7	0. 1		
A229	W	0. 2	n. d.		
A242	S	0. 3	-0. 4		
D251	S	0. 8	-0. 4		
S262	C	0. 9	-0. 3		
N291	T	0. 7	0. 5		

10

20

30

40

50

N291	S	-0.2	1.0	
L297	T	1.2	0.2	
H305	F	0.4	-0.4	
H305	W	0.1	-2.7	
D306	S	0.3	-0.5	
V314	M	0.6	0.3	
V314	L	2.5	0.7	
A328	W	0.6	0.5	
A328	D	1.3	1.1	
A328	R	1.1	0.1	
A328	Y	1.5	0.8	
I330	L	1.1	0.8	
M333	Y	0.3	1.0	
M333	L	2.4	-1.0	
L338	R	-0.5	1.5	
A342	R	-0.6	3.9	
A351	S	1.3	-0.9	
S354	Q	2.0	0.3	
D358	G	-2.0	0.7	
G388	C	0.6	-3.5	
D402	E	0.6	1.7	
V455	I	1.2	0.3	
V455	L	1.8	0.7	
E459	W	0.9	-0.3	
A478	L	1.2	0.2	
K483	A	1.5	0.7	
Q497	Y	1.8	1.2	
Q497	M	0.8	0.8	
Q497	D	0.3	1.0	
Q497	R	0.6	0.2	
V502	T	1.5	1.6	
T507	L	0.2	1.0	
L540	V	0.7	0.5	
Q542	H	0.9	-0.2	
Q542	D	1.1	0.4	
Q542	S	0.4	0.5	
A548	S	0.2	n. d.	
P551	N	0.9	-0.4	
P551	R	0.6	0.3	
P553	L	0.8	0.2	
R166	I	1.0	0.7	
D265	T	1.7	n. d.	

表 3: いくつかの好ましい置換とそれらの主な特徴

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

変異は、発酵微生物生産系における生産可能性、またはペプシンのような動物の pH 条件または内因性プロテアーゼに対する安定性などのその他の酵素パラメータに対して、正または負の影響を及ぼし得ることもさらに理解される。低 pH およびペプシンの存在下で飼料用酵素の安定性を試験することは、飼料用酵素の標準であり、実施例 1 e に概説されるようにこの研究において実施された。より高いイオン強度に対する安定性は、飼料用酵素の標準試験法ではないが、高イオン濃度はこのような条件下における酵素安定性および酵素性能を妨害し得て、例えば腸内で見いだされ得る。腸内の酸分泌および飼料成分は、イオン強度の増加につながる。

50

【 0 1 0 0 】

図 2 は、より高いイオン強度の存在下において、野生型が安定性と性能の低下の複合効果を被ることを示している。図 2 はまた、表 4 に示す最上位の変種 # 1 ~ # 7 に対するイオン強度の影響も示す。

【 0 1 0 1 】

実施例 1 d に記載のように、高イオン強度における性能および安定性を試験した。pH プロファイルは対照パラメータであり、実施例 1 f に記載のように試験した。トリプシン / キモトリプシン阻害剤 BBI および KTI (ボーマン・バーク阻害剤およびクニッツ型阻害剤) のようなタンパク質性抗栄養因子の分解は、実施例 1 g に記載のように試験したプロテアーゼに特徴的な潜在的な有益な性能である。

10

【 0 1 0 2 】

表 4 は、詳細に試験された 651 の個々のコンビナトリアル変異型および別個の変異型から、多数の性能および安定性パラメータをまとめて変異型を記載する（図 5 は結果を図の形式で示す）。

【 0 1 0 3 】

表 4 に示される全ての変異型は、野生型よりも微生物生産系においてより良くまたは同等に生産され、実施例 1 d に記載されるように試験されたそれらの pH 活性プロフィールに関連する変化を有さない。表 4 は、活性化酵素の熱安定性、pH / ペプシン安定性、およびより高いイオン強度に対する安定性ならびにその下での性能に基づいて、これらの変異型を格付けする。

20

【 0 1 0 4 】

機能的トリプシン阻害アッセイで試験したところ、最良の変異型は、BBI および KTI (ボーマン・バーク阻害剤およびクニッツ型阻害剤) を加水分解し得ることがさらに見いだされ、それはこれらの変異型に組み込まれた高い熱安定性に加えて、これらの変異型を親酵素と区別する。

【 0 1 0 5 】

30

40

50

【表 4】

#	変異体コード	発生のクローニングによる選択されたコンビナトリアルクローニング結果													
		1750 °C	1500 °C	1300 °C	2000 °C	2500 °C	2800 °C	3100 °C	3400 °C	3700 °C	4000 °C	4300 °C	4600 °C		
1	GN_392_08429														
2	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	L360V	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
3	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H		L360V	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
4	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H		G25A	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M	
5	GN_392_08348							A380I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M	
6	GN_392_08565							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
7	GN_4850ca	D139E	G256A					E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
8	GN_4850ca							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
9	GN_392_08830							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
10	GN_392_08473							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
11	GN_392_08584							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
12	GN_392_08879							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
13	GN_392_01139							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
14	GN_392_01119							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
15	GN_392_02549							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
16	GN_392_02958							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
17	GN_392_02556							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
18	GN_392_02313							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
19	GN_392_01532							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
20	GN_392_01240							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
21	GN_392_01245							E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M
22	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S			D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
23	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W		D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
24	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	A392I		D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
25	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
26	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
27	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
28	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
29	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
30	GN_392_05265							D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
31	GN_392_05815							D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
32	GN_2850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		
33	GN_4850ca	D139E	G265A	E29H	T801S	E36W	A392I	D447S	A449Y	E453W	A460W	V520C	N510M		

表4: 特に良好な性能を有するいくつかの別個のクローニングおよびコンビナトリアルクローニング

【0106】

以下の表5は、所与の変異、好ましいコンビナトリアル変異型、および別個の変異型の出現頻度を示す。出現頻度は、所与の変異の役割と重要性の尺度である。

【0107】

【表 5】

変異	好ましいコンビナトリアル変異型および別個の変異型における出現頻度 (活性化酵素(1T50>80°C))	変異	好ましいコンビナトリアル変異型および別個の変異型チモーゲンにおける出現頻度 (1T50>85°C)	変異	好ましいコンビナトリアル変異型および別個の変異型チモーゲンにおける 出現頻度(1T50>85°C)
D447S	127	D447S	365	A331F	7
A449Y	127	A449Y	353	A331Y	9
A517T	127	A517T	256	A329Q/H/T	15
N510H	125	N510H	175	S435R/I	11
E360L/V	125	E360V/L	262	V274I	104
V502C	120	V502C	185	A372S	82
E453W	92	E453W	320	K283L	66
A514V/T	84	A514V/T	265	O244C	46
A460W	72	A460W	308	T380C	30
A386I	56	A386I	178	A418W	28
A392V/I	50	A392V/I	392	I391W	21
T301S	44	T301S	79	A423V	18
D199E	43	D199E	30	T326L	16
Q518G	36	Q518G	250	I219L	16
P533K	20	P533K	6	S327L	16
E269T/H	12	E269T/H	133	M331I	16
G266A	19	G266A	133	N515G	13
D293Y	1	D293Y	24	A378G	12
G320A	1	G320A	265	S434G	12
R412Q	1	R412Q	74	A433G	10
E421R	1	E421R	11	S230D	9
A487Q	1	A487Q	24	Q393S	3
T461V	1	T461V	26	D399S	3
T461C	48		Y490W		3

表 5: 好ましいコンビナトリアル変異型および別個の変異型における所与の変異の出現頻度。
出現頻度は所与の変異の役割と重要性の尺度である。

10

20

30

40

【0108】

以下の表 6 は、チモーゲンまたは活性化形態の I T 5 0 に対する、单一変異の影響を示す。この場合も、I T 5 0 に対する单一変異の影響の量は、前記変異の役割および重要性の尺度である。

【0109】

50

【表 6】

変異	Δ IT50 チモーゲン	変異	Δ IT50 チモーゲン
D447S	4.8	L297T	1.2
E269H	4.0	S327F	1.2
A392I	3.7	V455I	1.2
G320Q	3.6	T461V	1.2
A386I	3.6	T461C	1.2
G320A	3.0	A478L	1.2
A392L	3.0	R516I	1.2
D447C	3.0	I219L	1.1
S230D	2.8	D293F	1.1
A329Q	2.8	A328R	1.1
A392V	2.8	I330L	1.1
A418W	2.8	A423V	1.1
A386L	2.7	E453F	1.1
E269T	2.6	R516E	1.1
E453Y	2.6	Q542D	1.1
A460W	2.6	G320S	1.0
V314L	2.5	A329T	1.0
M333I	2.5	E421R	1.0
S435T	2.5	R166I	1.0
E269M	2.4	V410I	1.0
M333L	2.4	S262C	0.9
E360V	2.4	T326W	0.9
A372S	2.4	Q361C	0.9
E453W	2.4	Q393S	0.9
N510H	2.4	E459W	0.9
A514S	2.4	Q542H	0.9
E360C	2.3	P551N	0.9
A392M	2.3	D251S	0.8
D399S	2.3	D293Y	0.8
V502C	2.3	T301C	0.8

変異	Δ IT50 活性化酵素	変異	Δ IT50 活性化酵素
A517S	7.7	D358G	0.7
N510H	7.6	A331Y	0.6
T301S	7.6	S327F	0.6
G281R	5.4	T461C	0.6
Y287K	5.2	G320S	0.6
S435T	4.7	A386I	0.5
R412E	4.4	A460W	0.5
R516I	4.3	A514S	0.5
Q518G	4.1	S435R	0.5
A517T	3.9	A190D	0.5
A475V	3.7	E421R	0.5
R516E	3.5	N291T	0.5
R412D	3.5	T301M	0.5
A342R	3.4	L540V	0.5
D447S	3.3	A328W	0.5
S354E	3.3	Q542S	0.5
A449N	3.3	A449E	0.4
E360L	3.1	Q542D	0.4
S315PP	3.0	A329H	0.3
E360V	2.9	S354Q	0.3
R412M	2.9	Y490W	0.3
W325K	2.7	L442W	0.3
A392I	2.4	V455I	0.3
R412Q	2.4	A449L	0.3
L442W	2.4	T196S	0.3
E360C	2.3	V314M	0.3
A470V	2.3	P551R	0.3
D399S	2.1	P553K	0.3
S435V	2.1	A329Q	0.2
A392M	2.0	A418W	0.2

表6: チモーゲン（左）または活性化型（右）の Δ IT50に対する単一変異の影響。 Δ IT50に対する単一の変異の影響の量は前記変異の役割および重要性の尺度である。

10

20

30

40

50

変異	Δ IT50 チモーゲン	変異	Δ IT50 チモーゲン	変異	Δ IT50 活性化酵素	変異	Δ IT50 活性化酵素
A514T	2.2	S315P	0.8	V502C	1.9	L297T	0.2
E269C	2.1	A449L	0.8	A433G	1.9	A478L	0.2
A329H	2.1	Q497M	0.8	S324R	1.9	T326W	0.2
A331F	2.1	P553L	0.8	D402E	1.7	Q393S	0.2
A386V	2.1	T196S	0.7	T326L	1.6	P553L	0.2
E269Q	2.0	E228Q	0.7	S435I	1.6	Q497R	0.2
G281R	2.0	Q244G	0.7	V502T	1.6	A331F	0.1
S327W	2.0	N291T	0.7	A487Q	1.6	A328R	0.1
S354Q	2.0	T301M	0.7	G320Q	1.5	E228Q	0.1
A460R	2.0	L540V	0.7	A378G	1.5	Q361L	0.1
N515G	2.0	K283L	0.6	Q361C	1.5	E453W	0
T326K	1.9	T301S	0.6	Q244G	1.5	G266A	0
S434G	1.9	V314M	0.6	L338R	1.5	A386M	0
A449M	1.9	S324R	0.6	D447C	1.4	I391W	0
V274I	1.8	A328W	0.6	A386L	1.3	T461V	0
R412E	1.8	G388C	0.6	A514T	1.3	E269T	-0.1
S435R	1.8	D402E	0.6	V274I	1.3	E269M	-0.1
V455L	1.8	A470V	0.6	D447A	1.3	Q542H	-0.1
Q497Y	1.8	Q497R	0.6	D293F	1.3	G320A	-0.2
G266A	1.7	P551R	0.6	S324L	1.3	N515G	-0.2
T326R	1.7	D199E	0.5	A386V	1.2	K283L	-0.2
T326L	1.7	Q244C	0.5	T326K	1.2	S262C	-0.3
A386M	1.7	T308C	0.5	Q497Y	1.2	E459W	-0.3
I391W	1.7	R412Q	0.5	T326R	1.2	D251S	-0.3
S435I	1.7	R516L	0.5	A514D	1.2	Q202D	-0.3
A449Y	1.7	P553K	0.5	R516L	1.2	P551N	-0.4
D265T	1.7	Q202D	0.4	S327L	1.1	H305F	-0.4
S354E	1.6	H305F	0.4	A328D	1.1	A242S	-0.4
S435V	1.6	R412D	0.4	S327W	1.0	E269H	-0.5
D447A	1.6	Q542S	0.4	D293Y	1.0	E453F	-0.5
A449E	1.6	A242S	0.3	T301C	1.0	D306S	-0.5
A449N	1.6	D306S	0.3	D199E	1.0	A460R	-0.6
Q518G	1.6	M333Y	0.3	M333Y	1.0	M333I	-0.7
A190D	1.5	Q497D	0.3	Q497D	1.0	A372S	-0.7
S327L	1.5	A517S	0.3	T507L	1.0	S230D	-0.8
A328Y	1.5	A229W	0.2	N291S	1.0	T308C	-0.8
A378G	1.5	Y287K	0.2	A392L	0.9	A449M	-0.9

表6続き：チモーゲン（左）または活性化型（右）の Δ IT50に対する単一変異の影響。 Δ IT50に対する単一の変異の影響の量は前記変異の役割および重要性の尺度である。

10

20

30

40

50

変異	$\Delta IT50$ チモーゲン	変異	$\Delta IT50$ チモーゲン	変異	$\Delta IT50$ 活性化酵素	変異	$\Delta IT50$ 活性化酵素
R412M	1.5	Q361L	0.2	A329T	0.9	A351S	-0.9
K483A	1.5	T507L	0.2	V455L	0.8	M333L	-1.0
Y490W	1.5	A548S	0.2	A328Y	0.8	E269C	-1.1
A514D	1.5	S324L	0.1	I330L	0.8	E269Q	-1.4
E360L	1.4	A487Q	0	A423V	0.8	H305W	-2.7
A433G	1.4	N291S	-0.2	Q497M	0.8	G388C	-3.5
L442W	1.4	W325K	-0.3	A392V	0.7	Q244C	-3.6
A328D	1.3	A475V	-0.3	E453Y	0.7	D265T	n. d.
A331Y	1.3	L338R	-0.5	V314L	0.7	R166I	n. d.
A351S	1.3	A342R	-0.6	S434G	0.7	V410I	n. d.
A514Y	1.3	L442W	-0.7	A449Y	0.7	A229W	n. d.
A517T	1.3	D358G	-2	K483A	0.7	A548S	n. d.

表6続き：チモーゲン（左）または活性化型（右）の $\Delta IT50$ に対する単一変異の影響。

$\Delta IT50$ に対する単一の変異の影響の量は前記変異の役割および重要性の尺度である。

【 0 1 1 0 】

表1および表6のいくつかの変異を区別なく使用し、クマモリシンASにおける熱安定性を操作し得ることがさらに理解される。表7は、表7の変異型#1に基づく変異型の組を示す。遺伝子操作の過程で、位置502および510における変異は、pH2未満の極端な酸性pHで活性を変化させるようであった。

【 0 1 1 1 】

502および510での変異を除外すると、例えば表7のクローン#2のように、活性化酵素の目標温度安定性よりも著しく熱安定性が低下し、それはクローン#1と比較して熱安定性が7.8低下した。表1および6で同定され示された変異を利用し、合理的なアプローチによって一組の別個の変異型を構築し、502および510の影響を補償した。D399S置換を除いて、502および510における変異の影響は、徐々にまたは完全に補償され得る。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 7】

#	別個のクローラーおよび選択されたコピットアルゴードにおける変異												[150°C]	[180°C]
													活性化	チモール
1	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W	V502C	N510H	A514Y	A517T	0518G	101.5	86.6
2	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W			A514Y	A517T	0518G	>95	78.8
3	G266A	E350V	A392V	R412E		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	100.3	86.6
4	G266A	E350V	A392V	R412D		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	96.5	84.3
5	G266A	E350V	A392V	R412Q		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	97.7	81.8
6	G266A	E350V	A392V	A433G	S435I	D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	97.4	81.4
7	G266A	E350V	A392V	A433G		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	98.1	81.3
8	G266A	E350V	A392V	T336L		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	98.7	81.1
9	G266A	E350V	A392V	R412M		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	98.3	81.0
10	G266A	E350V	A392V	S435T		D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	99.2	81.0
11	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W	A487Q		A514Y	A517T	0518G	96.3	81.0
12	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W			A514Y	A517T	0518G	97.2	80.5
13	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W			A514Y	A517T	0518G	96.2	80.4
14	G266A	E350V	A392V	D447S	A449Y	E453W	A460W			A514Y	A517T	0518G	96.3	80.2
15	G266A	E350V	A392V	S435V	D447S	A449Y	E453W	A460W		A514Y	A517T	0518G	98.6	80.1
16	G266A	E350V	A392V	D399S	D447S	A449Y	E453W	A460W	A514Y	A517T	0518G	87.90	71.92	

表 7: 変異型#1に基づく変異型の組

10

20

30

40

【0 1 1 3】

参考文献 :

Wlodawer A I , Li M , Gustchina A , Oyama H , Dunn BM , Oda K . , Acta Biochim Pol . 2003 ; 50 (1) : 81 - 102

Terashita , T . , Oda , K . , Kono , M . & Murao , S . , Agric Biol Chem (1981) 45 , 1937 - 1943

Oda , K . , Takahashi , S . , Ito , M . & Dunn , B . M . , Adv Exp Med Biol (1998) 436 , 349 - 353

50

Packer & Liu, Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics* 16, 379 - 394 (2015)

Hsieh & Vaissila, Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol.* 2013; 978: 173 - 86

Cadwell and Joyce, Mutagenic PCR. *PCR Methods Appl.* 3, 1994, 136 - 140

Okubo et al., 2006 Jun; 273(11): 2563 - 76.

【図面】

【図1】

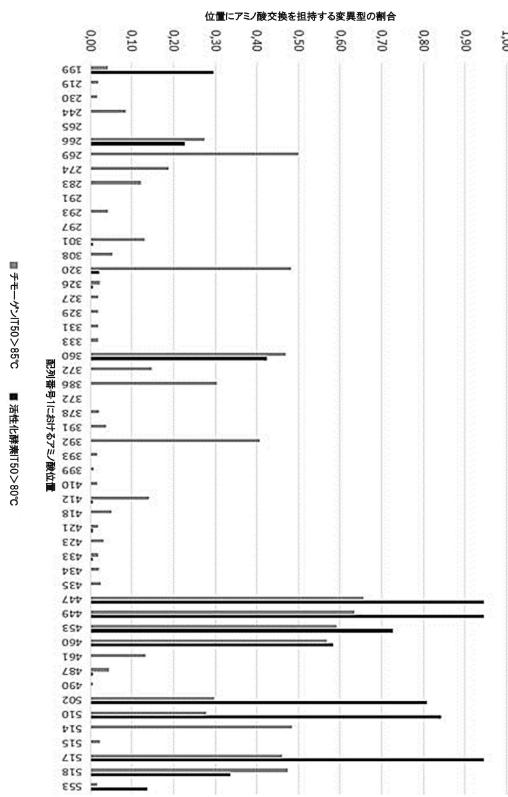


図1

【図2】

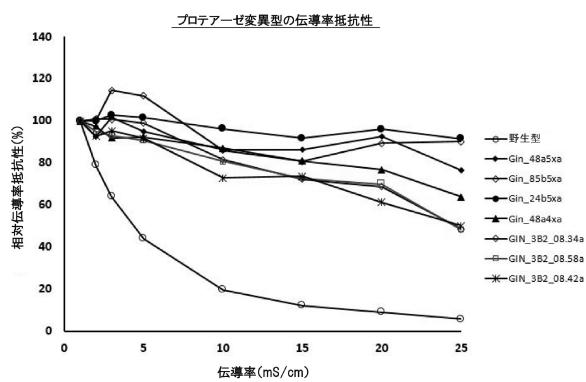


図2

10

30

40

50

【図3】

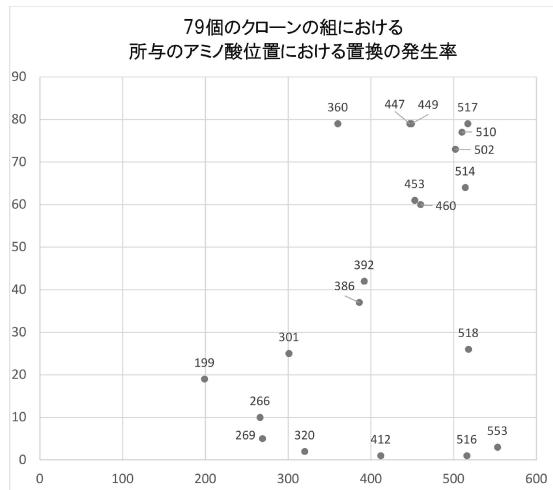


図3

【図4】

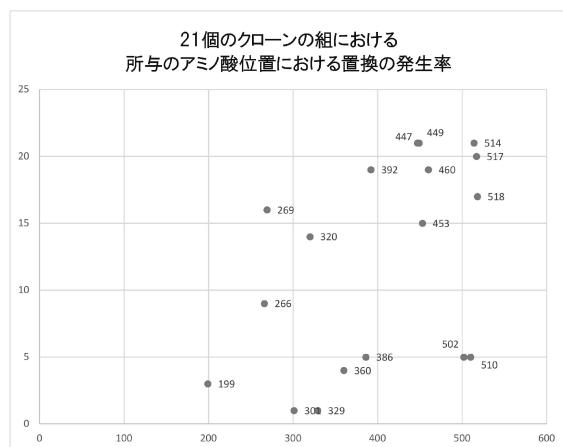
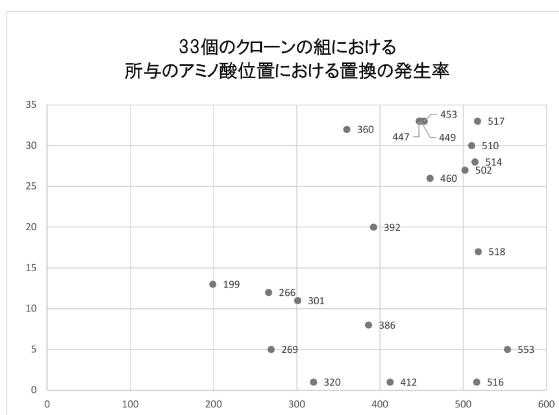


図4

10

【図5】



20

30

図5

【配列表】

00070350790000001.app

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 エレンド クリストイアン
 ドイツ連邦共和国 5 0 8 2 9 ケルン インゲンドルファー ヴェーク 7 3
(72)発明者 クラップ クラウディア
 ドイツ連邦共和国 5 0 6 7 7 ケルン ロートリンガー シュトラーセ 2 5
(72)発明者 ホルン トーマス
 ドイツ連邦共和国 5 2 0 6 8 アーヘン ライヒスヴェーク 6 6
審査官 宮岡 真衣
(56)参考文献
 国際公開第 2 0 1 6 / 2 0 0 8 8 0 (WO , A 1)
 国際公開第 2 0 1 5 / 0 2 3 7 2 8 (WO , A 1)
 国際公開第 2 0 1 3 / 0 2 3 1 5 1 (WO , A 2)
 国際公開第 2 0 1 7 / 2 2 0 7 7 6 (WO , A 1)
 Peptidase S53 propeptide , Database Uniprot [online] , Accession No. J9HC20, entry version 19 , 2016年09月07日
 TSURUOKA N. et al. , Appl. Environ. Microbiol. , 2003年 , Vol.69 No.1 , p.162-169
 Kumamoliisin-As , Database UniProtKB/Swiss-Prot [online] , 2006年11月28日 , Accession No. Q8GB88
(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
 C 1 2 N 9 / 4 8 - 9 / 6 4
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 P 2 1 / 0 0
 A 2 3 K 2 0 / 1 8 9
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q